

# Molekulární základ diagnostiky primárních imunodeficitů

---

TOMÁŠ FREIBERGER

GENETICKÁ LABORATOŘ, CENTRUM KARDIOVASKULÁRNÍ A  
TRANSPLANTAČNÍ CHIRURGIE BRNO, ČR

# Kazuistika 1

---

- chlapec, IVF, porod v termínu, zkalená plodová voda
- 1.den, cárovité slupování kůže
- vyloučena epidermolysis bullosa, susp. generalizovaná stafylodermie
- leukocytóza, eozinofilie
- pokračující deskvamace kůže, otoky; podán oxacilin

Jan Helešic, Lenka Krbková, Hana Bučková, Barbora Ravčuková, Hana Grombiříková, Renata Formánková, Petr Sedláček, Jiří Litzman, Tomáš Freiburger

# Kazuistika 1 - pokračování

---

- 3. den FC k vyloučení hematologické malignity > snížené B lymfocyty, snížené Th lymfocyty, vysoké hladiny IgE, hypereosinofilie > podrobné imunologické vyšetření
- TREC 0, KREC 0
- susp. Omenn syndrom > genetické vyšetření

# Kazuistika 1

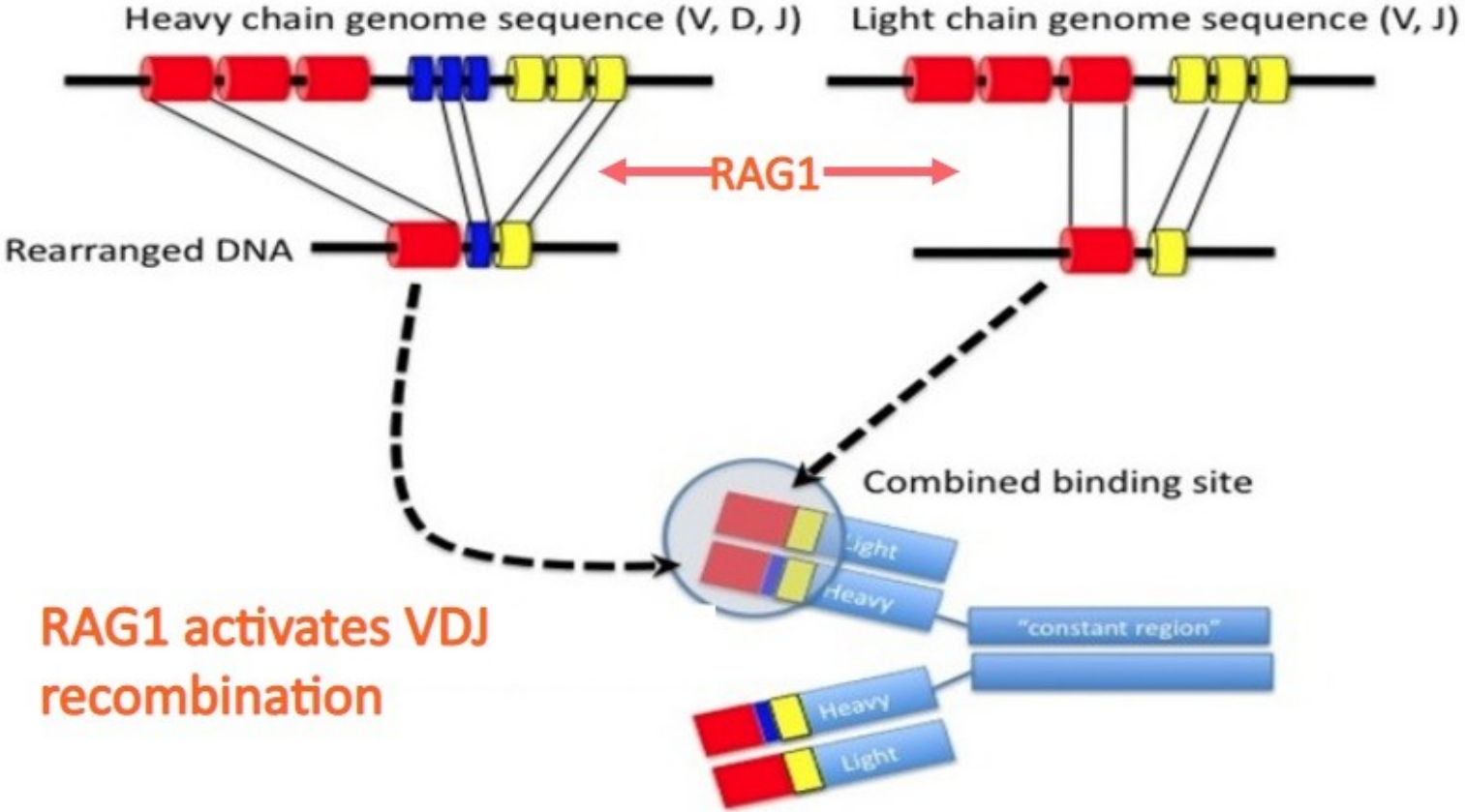
---

Sangerovo sekvenování

## Gen RAG1

- **detekovány 2 kauzální mutace** (již popsané v souvislosti s Omenn syndromem):
  - c.983G>A; p.Cys328Tyr
  - c.1186C>T; p.Arg396Cys
- matka zdravá - nositelka mutace: c.1186C>T; p.Arg396Cys
- otec zdravý - nositel mutace: c.983G>A; p.Cys328Tyr
  
- později k dispozici i výsledek vyšetření proliferace T lymfocytů – výrazně snížená

# RAG1 functions in DNA



N. Moehn: Omenn syndrome and RAG1. <https://slideplayer.com/slide/9423191/>

# Kazuistika 1 - závěr

---

- dg. Omenn syndrom - 3. den věku dítěte
- profylaxe oportunních infekcí
- 9. den překlad na transplantační jednotku,
- ve 2 měsících HSCT
- po HSCT chlapec prospívá

# Omennův syndrom (AR-SCID)

---

OMIM:

- autozomálně recesivní onemocnění
- neprospívání, průjmy
- pneumonie
- hepatosplenomegalie
- **generalizovaná erythrodermie**
- anemie, trombocytopenie, **eozinofilie**
- lymfadenopatie
- virové, mykotické a bakteriální infekce
- nízké IgG, A, M; **vysoké IgE**
- **nízké B lymfocyty**, variabilní počet T lymfocytů (efektorové)
- **defektní proliferace lymfocytů**

# Kazuistika 2

---

- 15-letý chlapec
- v 5 měsících věku neprospívání, lymfadenopatie, opakované enterorhagie, prolaps rekta, hepatosplenomegalie, anémie
- ve 4 letech apendektomie pro trvající bolesti břicha, lymfadenopatie mezenterických uzlin
- opakované sinusitidy, bronchitidy, otitidy a horečky nejasného původu

Veronika Kanderova, Hana Grombirikova, Irena Zentsova, Kamila Reblova, Adam Klocperk, Martina Fejtkova, Barbora Ravcukova, Tomas Kalina, Tomas Freiburger<sup>#</sup>, Anna Sediva<sup>#</sup>

Haematologica 2019; 104(1): e32-34.



# Kazuistika 2 - pokračování

---

- v 5 letech pneumonie, > chronické atelektázy levého plicního laloku
- generalizovaná lymfadenopatie
- četné EBV infekce
- chronická buněčná aktivace v kostní dřeni bez známek malignity
- mírná dysgamaglobulinemie, uspokojivá odpověď na proteinové vakcíny, slabá odpověď na očkování polysacharidovými vakcínami
- zvýšený počet aktivovaných T lymfocytů, posun ke zralým efektorovým buňkám, nízká hladina naivních T lymfocytů
- nižší počet zralých a zvýšený počet naivních B lymfocytů

# Kazuistika 2 - pokračování

---

- susp. primární porucha imunity > genetické vyšetření

- Sangerovo sekvenování:

Geny SH2D1A, BIRC4 (XLP1, 2), PK3CD, PK3R1 (APDS)

– kauzální mutace nedetekována

- > celoexomové sekvenování (WES)

# Kazuistika 2 - pokračování

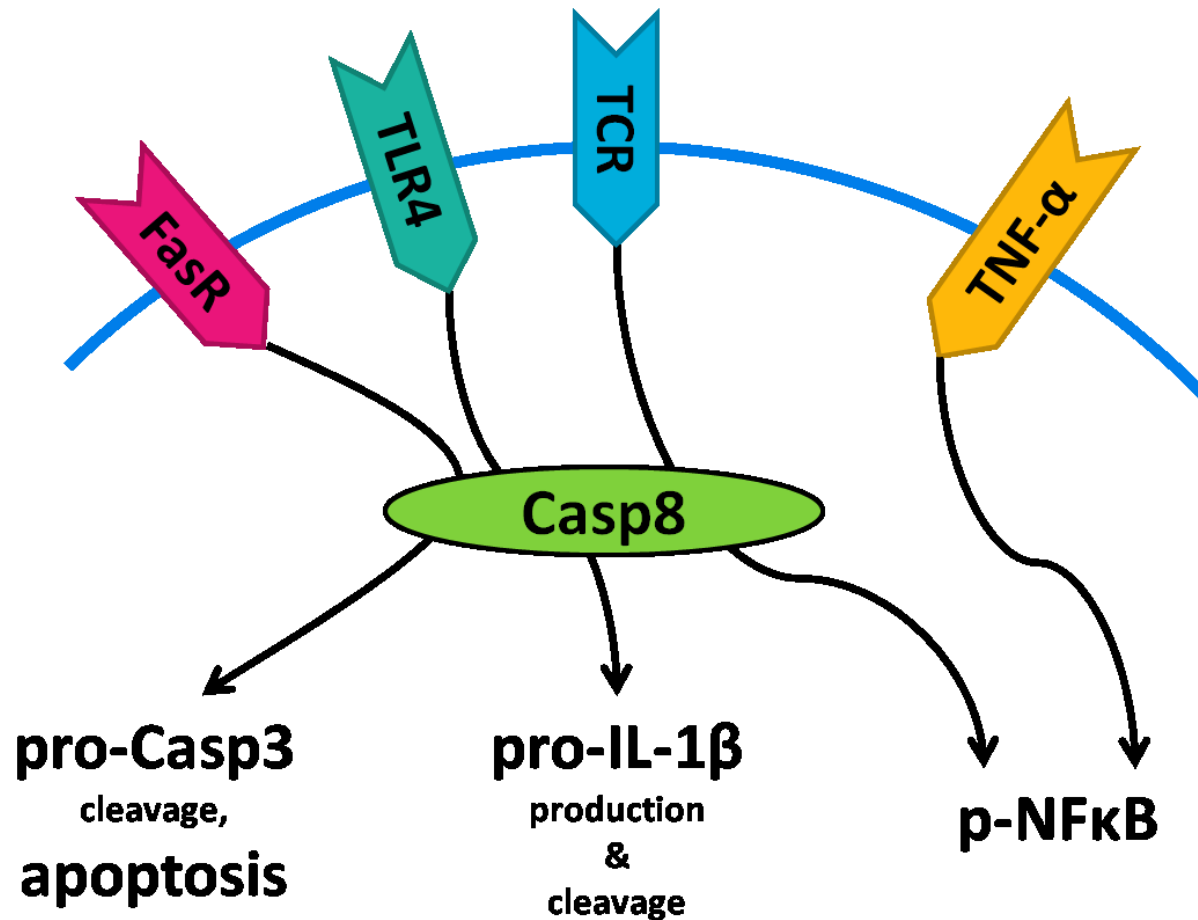
---

## WES:

Počet unikátních variant	48 632
Hloubka čtení $\geq 8$	37 574
Populační frekvence varianty $< 0.01$ (1000G)	3 841
Varianty v exonu či v kanonickém místě sestřihu	954
Homozygoti	168
Záznam v databázi mutací (HGMD)	24
Se vztahem k fenotypu	<b>1 (CASP8 +/+)</b>

Haematologica 2019; 104(1): e32-34.

# Úloha Casp-8 v apoptóze a zánětlivé signalizaci



# Kazuistika 2 - pokračování

- Gen **CASP8**: detekována mutace **c.1232C>T, p.4111L** (dosud nepopsaná)

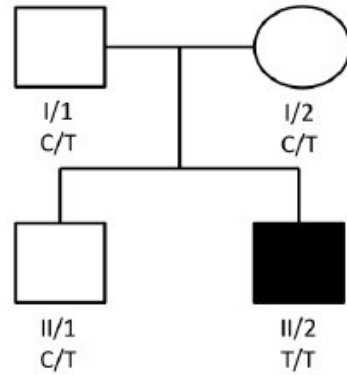
Variant		Region	Region function	Prediction tools				
cDNA	Protein			CADD	DANN	PolyPhen-2	SIFT	Provean
c.1232C>T	p.P411L	exonic	nonsynonymous	neutral 18.2	deleterious 0.9984	probably damaging 1.0	damaging 0.000	deleterious -8.61
c.793C>T	p.R265W	exonic	nonsynonymous	deleterious 26.9	deleterious 0.9983	probably damaging 1.0	damaging 0.002	deleterious -3.43

- *In silico* predikce svědčí pro kauzalitu mutace

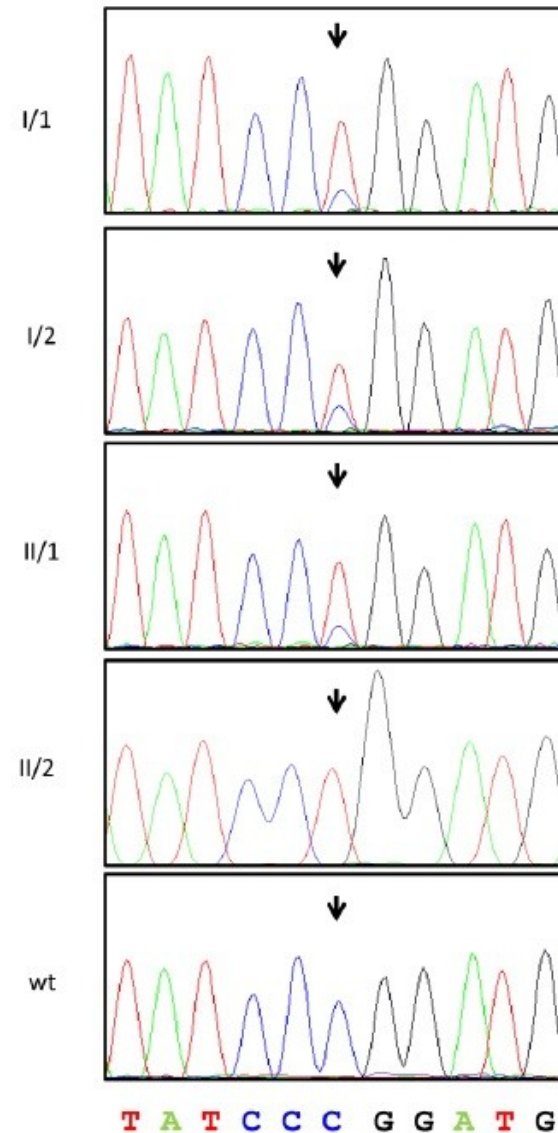
Haematologica 2019; 104(1): e32-34.

**A**

NM\_001228:c.1232C&gt;T

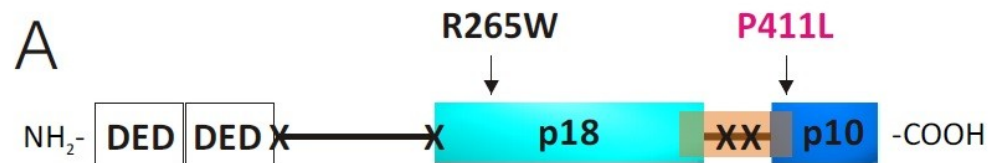
**B**

NM\_001228:c.1232C&gt;T

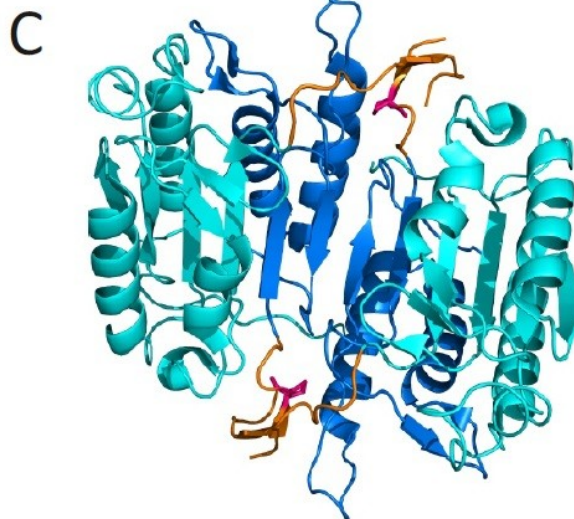
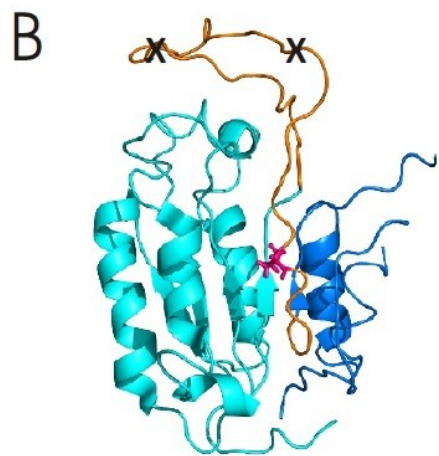


- Mutace segreguje s fenotypem

# Kazuistika 2 - pokračování



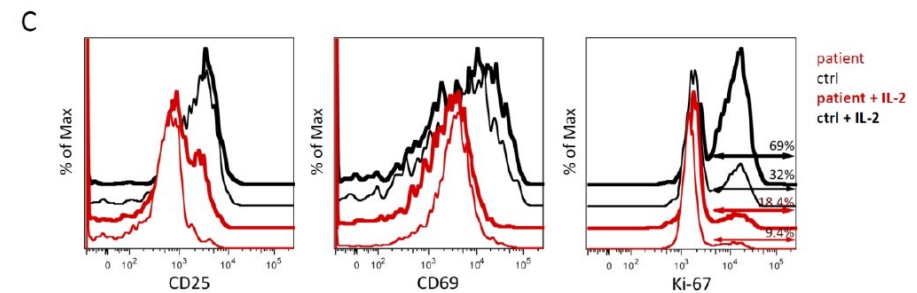
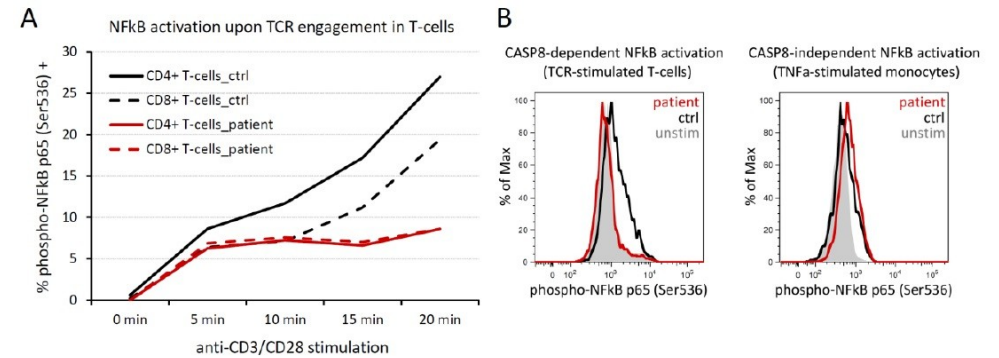
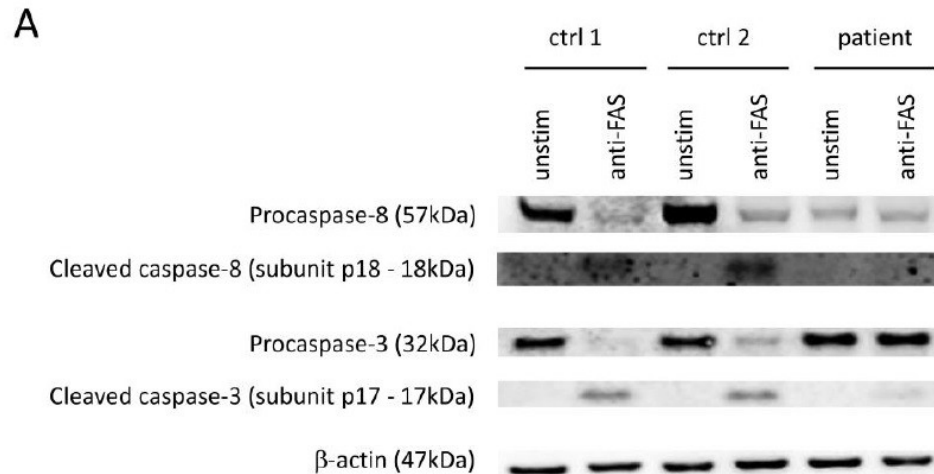
Struktura molekuly CASP8  
a poloha mutace



■ Subunit p10    ■ Amino acid P411    X Cleavage  
■ Subunit p18    ■ Structural linker

Haematologica 2019; 104(1): e32-34.

# Kazuistika 2 - závěr



- funkční analýzy - potvrdily funkční význam detekované varianty
- chlapec ve stabilizovaném stavu, léčen symptomaticky



# Deficit CASP8

## Autoimunitní lymfoproliferativní syndrom (ALPS) IIB (OMIM)

---

OMIM:

- **autozomálně recesivní onemocnění**
- malý vzrůst, neprospívání
- **postižení respiračního traktu, pneumonie**
- **splenomegalie**
- **chronické průjmy**
- ekzém
- **lymfadenopatie**
  
- **opakované sinobronchiální infekce**
- **chybějící odpověď na pneumokokovou vakcinaci**
  
- **defektní apoptóza**
- porucha aktivace T, B lymfocytů a NK buněk

# PID – genetické vyšetření

Rodinná anamnéza!!!

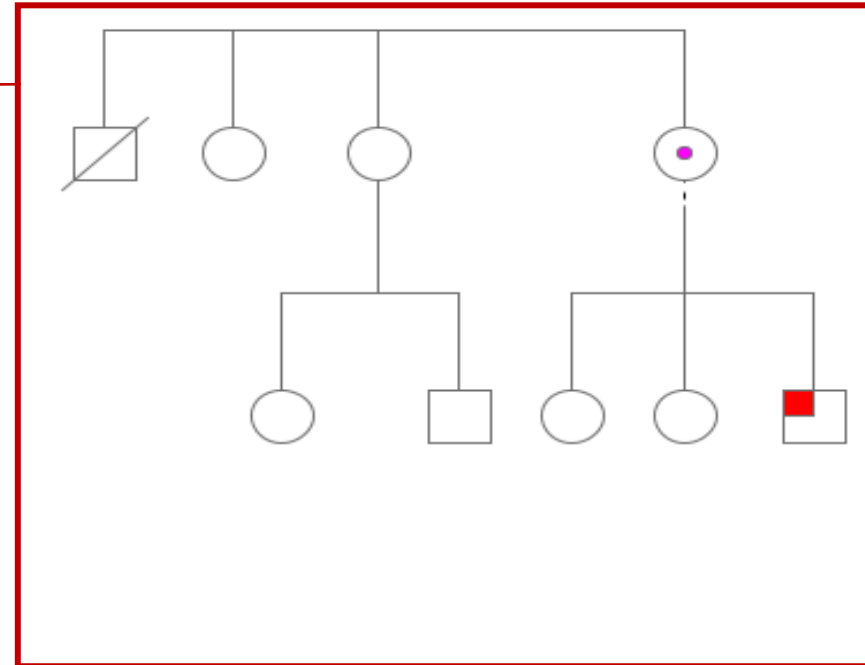
Osobní anamnéza

Fyzikální vyšetření

Laboratorní imunologické/biochemické testy

Cytogenetické vyšetření

Molekulárně genetické vyšetření



# PID – genetické vyšetření

---

Rodinná anamnéza!!!

Osobní anamnéza

Fyzikální vyšetření

Laboratorní imunologické/biochemické

Cytogenetické vyšetření

Molekulárně genetické vyšetření

DiGeorge syndrom (FISH)

Testy chromozomální instability

# PID – genetické vyšetření

---

Rodinná anamnéza!!!

Osobní anamnéza

Fyzikální vyšetření

Laboratorní imunologické/biochemické testy

Cytogenetické vyšetření

**Molekulárně genetické vyšetření**

# VYUŽITÍ METOD MOLEKULÁRNÍ GENETIKY V KLINICKÉ PRAXI

---

- MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTIKA PRIMÁRNÍCH IMUNODEFICIENCÍ
- HLA TYPIZACE
- MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTIKA U LYMFODINÍCH MALIGNIT, DETEKCE MINIMÁLNÍ ZBYTKOVÉ NEMOCI
- STANOVENÍ CHIMERISMU U PACIENTŮ PRO TRANSPLANTACI HEMATOPOETICKÝCH KMENOVÝCH BUNĚK
- MOLEKULÁRNÍ DETEKCE PATOGENŮ
- GENOVÁ TERAPIE

# PID – molekulárně genetické vyšetření

---

1. DIAGNOSTIKA GENETICKY PODMÍNĚNÝCH PORUCH IMUNITY

2. GENETICKY PODMÍNĚNÉ FAKTORY MODIFIKUJÍCÍ PRŮBĚH IMUNODEFICIENCÍ

# Převratný vývoj nových technologií

---



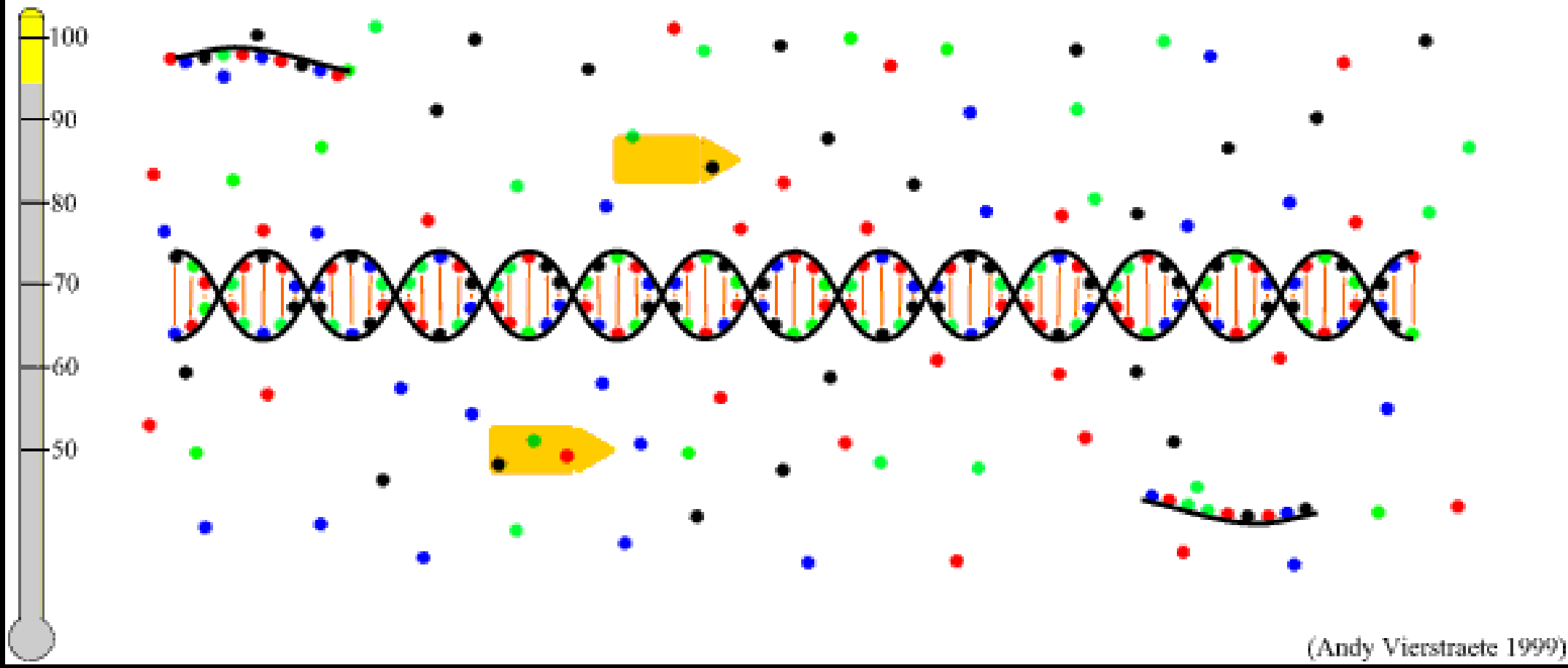
# PCR

---



PCR :

Denaturation 94°C



(Andy Vierstraete 1999)

# PCR

---

Počet kopií DNA ....  $2^n \times E$

- n ... počet cyklů; E ... efektivita PCR

30 cyklů ... teor.  $10^9$

45 cyklů ... teor.  $10^{12}$

---

# DETEKCE PCR PRODUKTŮ

# ● GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

---

- separace:
  - agaróza – horizontální
  - polyakrylamid – vertikální
- barvení: ethidium bromide, stříbro, Sybr green
- vizualizace: UV světlo (transiluminátor) (ethidium bromide, Sybr green)

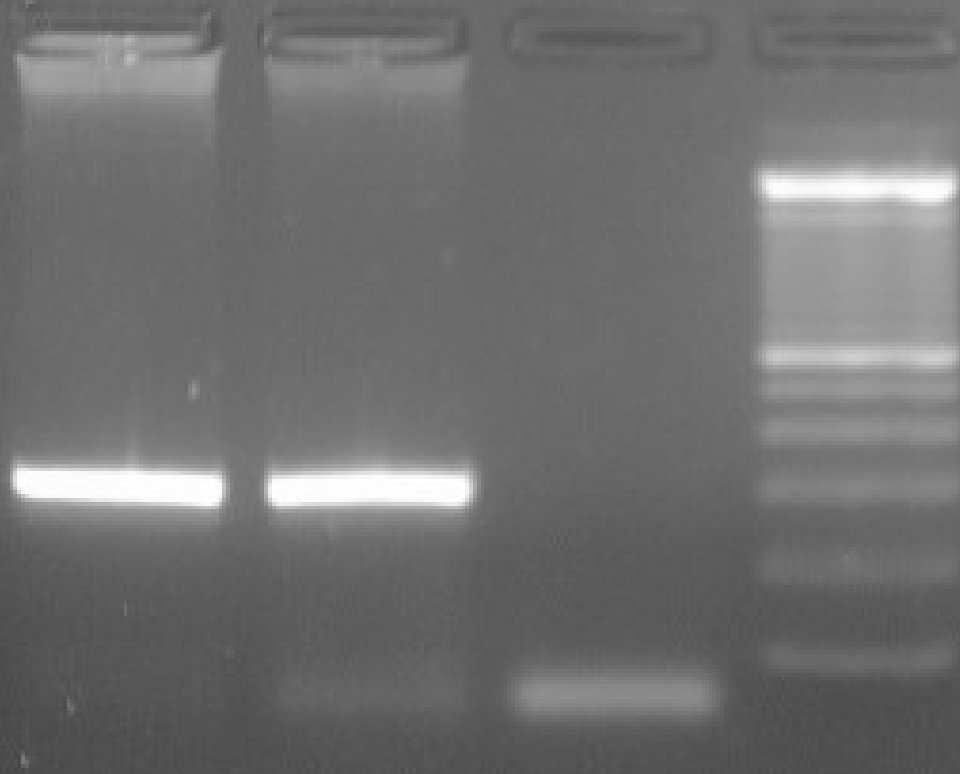


**marker**

**BTK**

**2/66**

**2/wt**



**specifický produkt PCR →**

**dimery primerů →**

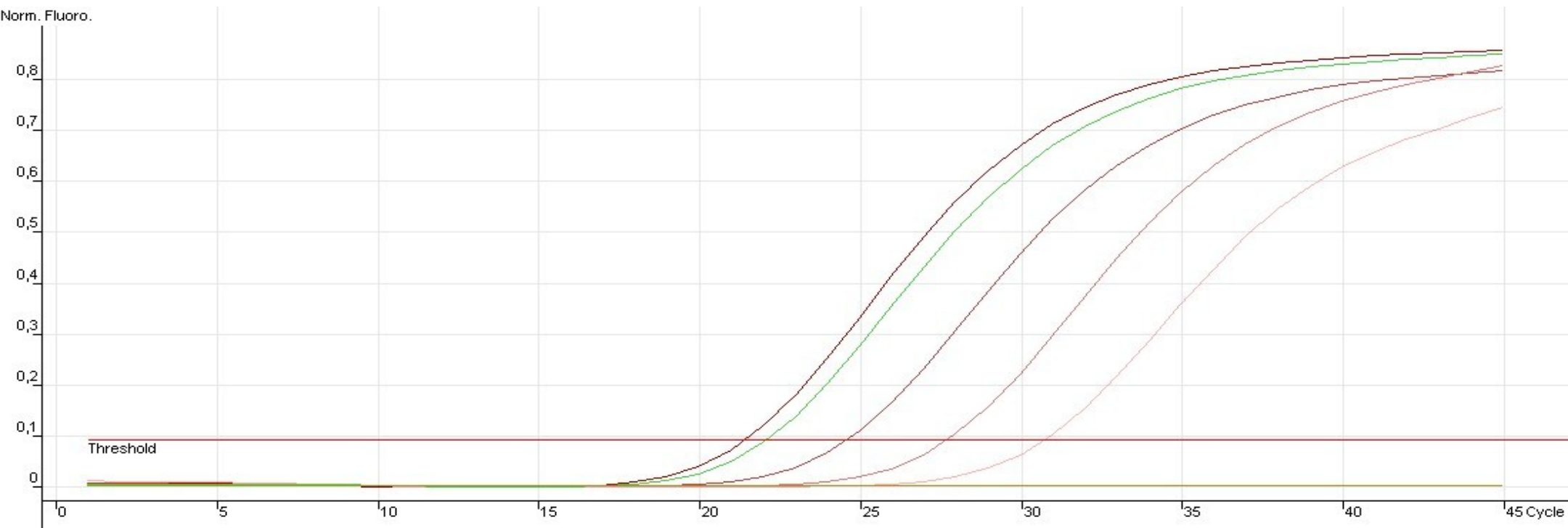


# „Varianty“ PCR

---

- PCR-SSP, ARMS
  - PCR se sekvenčně specifickými primery
  - amplification refractory mutation system
- RT-PCR
  - reverzní PCR
- multiplex PCR
- real-time PCR
- ostatní (ACRS...)

# Real-time PCR





---

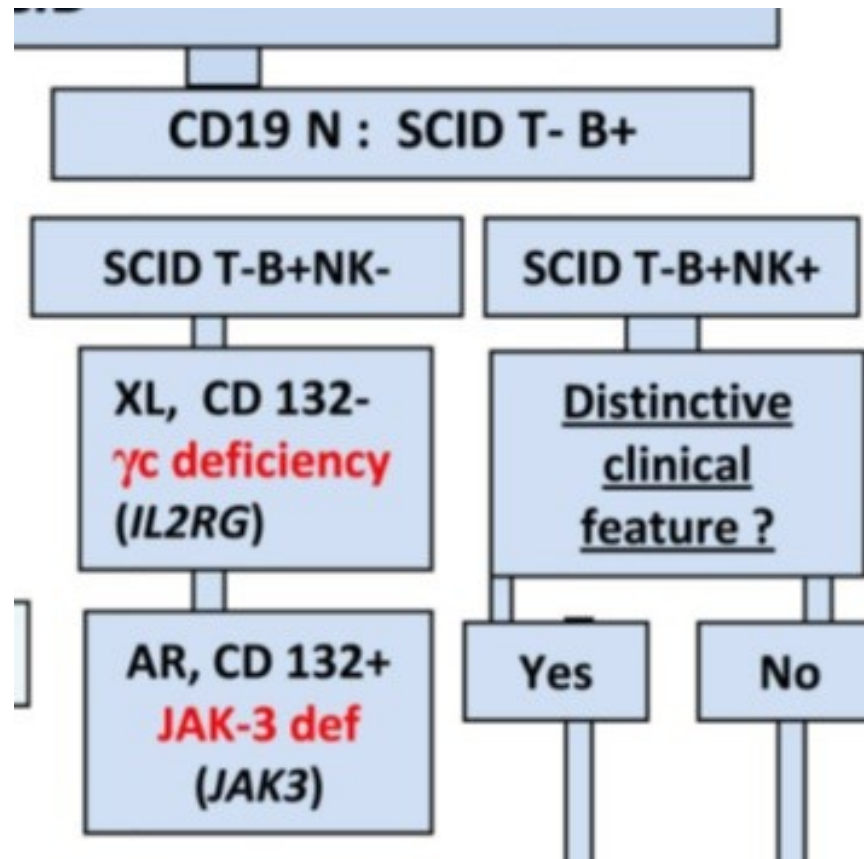
# **MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ VYŠETŘENÍ U PID**

# Indikace molekulární genetikého vyšetření – metody

---

- **Jasný klinický a laboratorní fenotyp – jeden /několik málo kandidátních genů**
  - Jedna /několik prevalentních mutací (C2 deficiencie)
    - jednoduchá PCR
  - Mutace v celém rozsahu genu/ genů (většina PID)
    - screeningové metody s následným Sangerovým sekvenováním HISTORIE
    - Sangerovo sekvenování celého genu
    - cílené masivní paralelní sekvenování – panel genů ? - počet genů, velikost genů, urgence...
- **Jasný/nejasný klinický a laboratorní fenotyp – více/ mnoho kandidátních genů**
  - Mutace v celém rozsahu jednotlivých genů (většina PID)
    - cílené masivní paralelní sekvenování (NGS) – panel genů
    - celoexomové masivní paralelní sekvenování (WES)
    - (celogenomové masivní paralelní sekvenování (WGS))

# Fenotypem „řízená“ genetická diagnostika

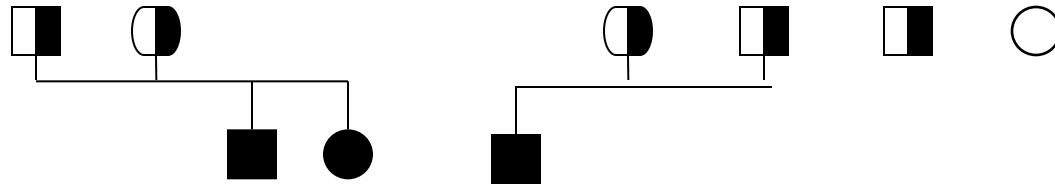


# Indikace molekulární genetikého vyšetření – metody

---

- **Jasný klinický a laboratorní fenotyp – jeden /několik málo kandidátních genů**
  - **Jedna /několik prevalentních mutací (C2 deficiencie)**
    - **jednoduchá PCR**
  - Mutace v celém rozsahu genu/ genů (většina PID)
    - screeningové metody s následným Sangerovým sekvenováním HISTORIE
    - Sangerovo sekvenování celého genu
    - cílené masivní paralelní sekvenování – panel genů ? - počet genů, velikost genů, urgence...
- **Jasný/nejasný klinický a laboratorní fenotyp – více/ mnoho kandidátních genů**
  - Mutace v celém rozsahu jednotlivých genů (většina PID)
    - cílené masivní paralelní sekvenování (NGS) – panel genů
    - celoexomové masivní paralelní sekvenování (WES)
    - (celogenomové masivní paralelní sekvenování (WGS))

# Přímý průkaz mutace pomocí PCR – deficit C2



# Indikace molekulární genetiky – metody

---

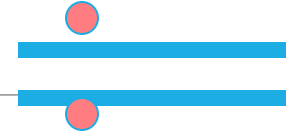
- **Jasný klinický a laboratorní fenotyp – jeden /několik málo kandidátních genů**
  - Jedna /několik prevalentních mutací (C2 deficiencie)
    - jednoduchá PCR
  - **Mutace v celém rozsahu genu/ genů (většina PID)**
    - **screeningové metody s následným Sangerovým sekvenováním**     **HISTORIE**
    - Sangerovo sekvenování celého genu
    - cílené masivní paralelní sekvenování – panel genů     ? - počet genů, velikost genů, urgence...
- **Jasný/nejasný klinický a laboratorní fenotyp – více/ mnoho kandidátních genů**
  - Mutace v celém rozsahu jednotlivých genů (většina PID)
    - cílené masivní paralelní sekvenování (NGS) – panel genů
    - celoexomové masivní paralelní sekvenování (WES)
    - (celogenomové masivní paralelní sekvenování (WGS))

# SSCP - PRINCIP

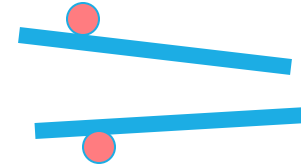
wt DNA



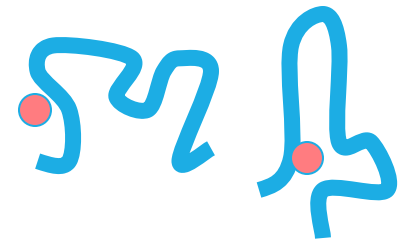
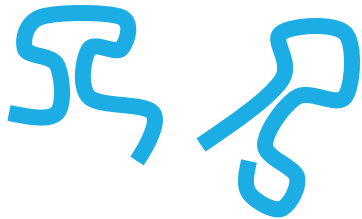
mutant DNA



denaturace



rozdílná migrace jednotlivých denaturovaných vláken DNA na nedenaturujícím PA gelu

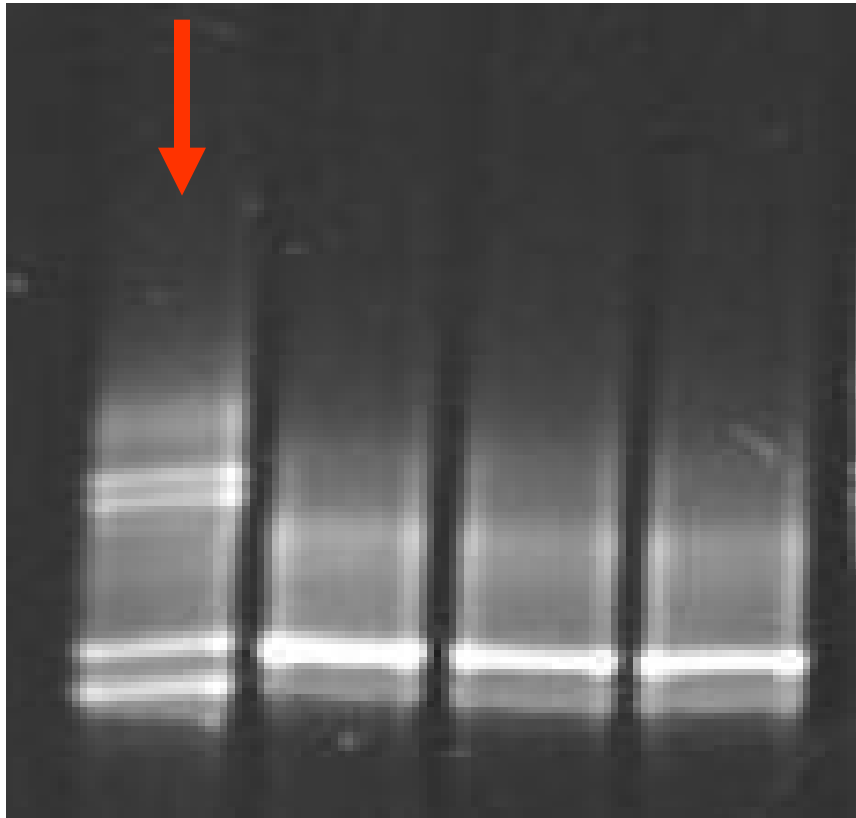


wt	m
==	—
==	—

# Mutačně screeningové metody

**DGGE**

**SSCP**

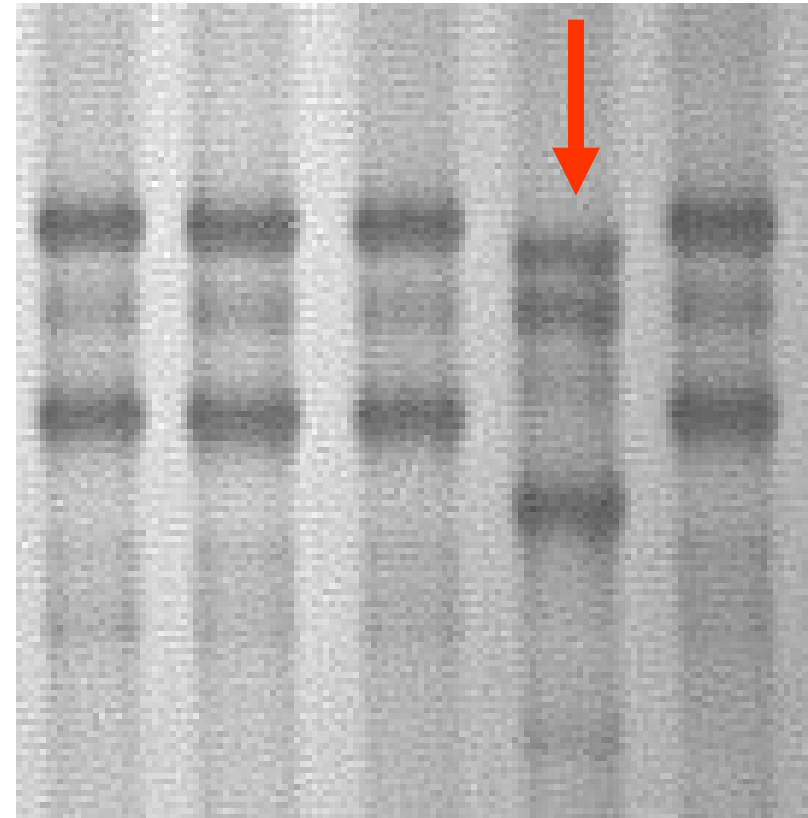


**m**

**wt**

**wt**

**wt**



**wt**

**wt**

**wt**

**m**

**wt**

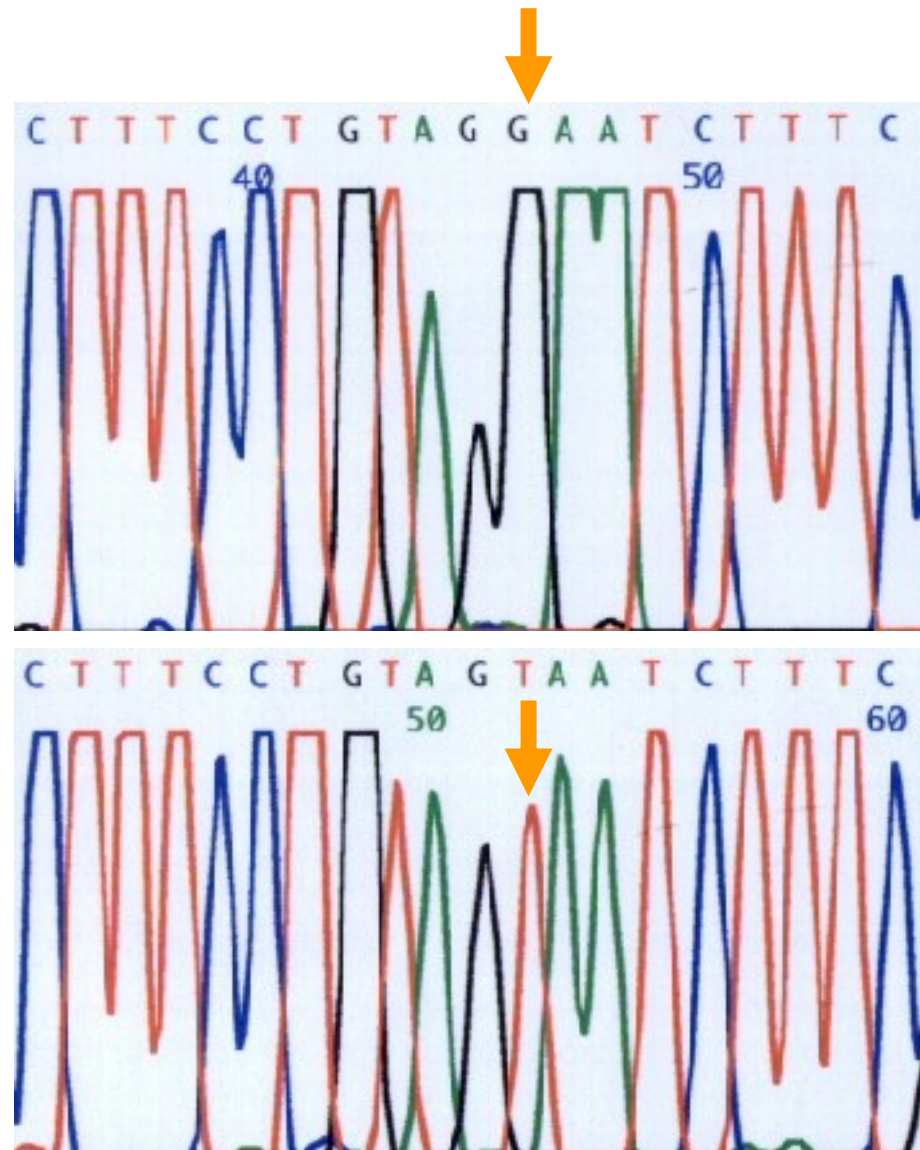


# Sangerovo sekvenování

AG**G**



AG**T**



# Molekulárně genetické vyšetření – vývoj technik

TRENDY

## - Jasný klinický a laboratorní fenotyp – jeden /několik málo kandidátních genů

- Jedna /několik prevalentních mutací (C2 deficiencie)
  - jednoduchá PCR
- **Mutace v celém rozsahu genu/ genů (většina PID)**
  - screeningové metody s následným Sangerovým sekvenováním HISTORIE
  - **Sangerovo sekvenování celého genu**
  - **cílené masivní paralelní sekvenování – panel genů** ? - počet genů, velikost genů, urgence vyšetření...

## - Jasný/nejasný klinický a laboratorní fenotyp – více/ mnoho kandidátních genů

- Mutace v celém rozsahu jednotlivých genů (většina PID)
  - cílené masivní paralelní sekvenování (NGS) – panel genů
  - celoexomové masivní paralelní sekvenování (WES)
  - (celogenomové masivní paralelní sekvenování (WGS))

# NEXT GENERATION SEQUENCING



APLIKACE

Celoexomové/celogenomové sekvenování

➔ Cílené sekvenování – panel genů

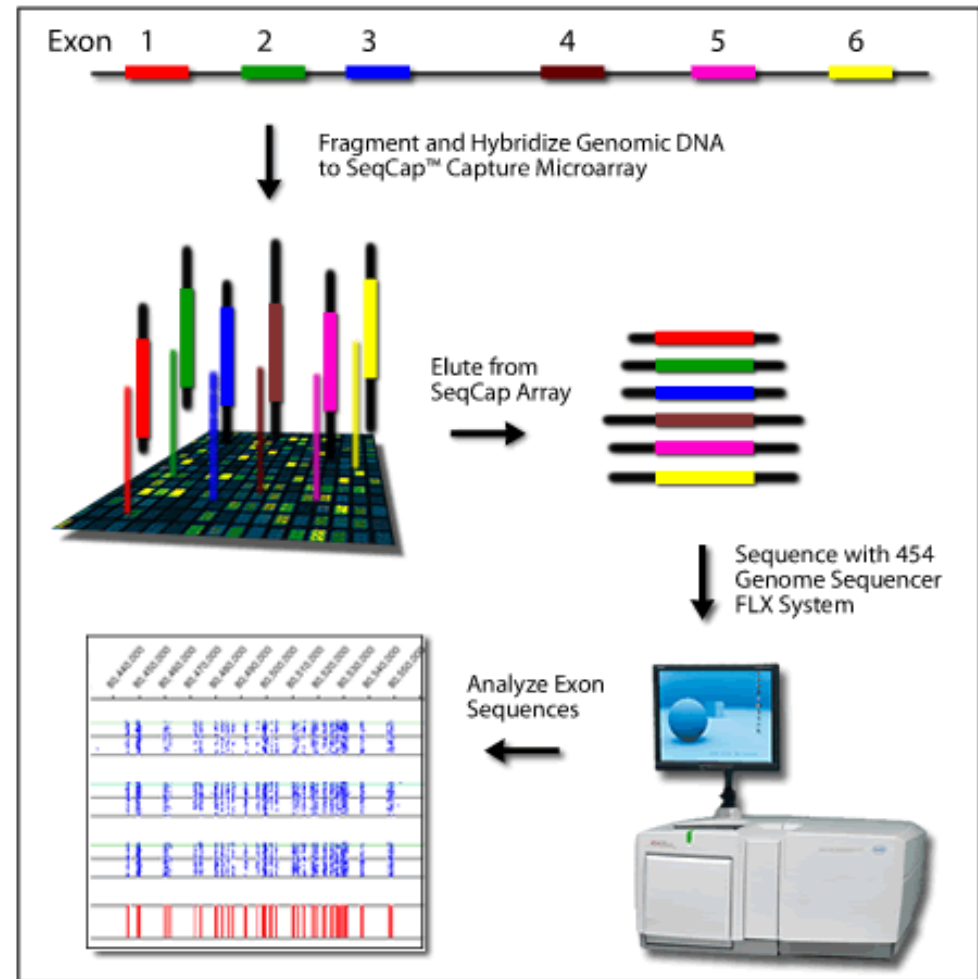
Analýza transkriptomu (RNAseq)

Digital gene expression

ChIP sequencing

Methylome sequencing

Small RNA sequencing



# Molekulárně genetické vyšetření – vývoj technik

---

- **Jasný klinický a laboratorní fenotyp – jeden /několik málo kandidátních genů**
  - Jedna /několik prevalentních mutací (C2 deficiencie)
    - jednoduchá PCR
  - Mutace v celém rozsahu genu/ genů (většina PID)
    - screeningové metody s následným Sangerovým sekvenováním HISTORIE
    - Sangerovo sekvenování celého genu
    - cílené masivní paralelní sekvenování – panel genů
- **Jasný/nejasný klinický a laboratorní fenotyp – více/ mnoho kandidátních genů**
  - Mutace v celém rozsahu jednotlivých genů (většina PID)
    - cílené masivní paralelní sekvenování (NGS) – panel genů
    - celoexomové masivní paralelní sekvenování (WES) ? - počet genů, velikost genů, urgence vyšetření...
    - (celogenomové masivní paralelní sekvenování (WGS))

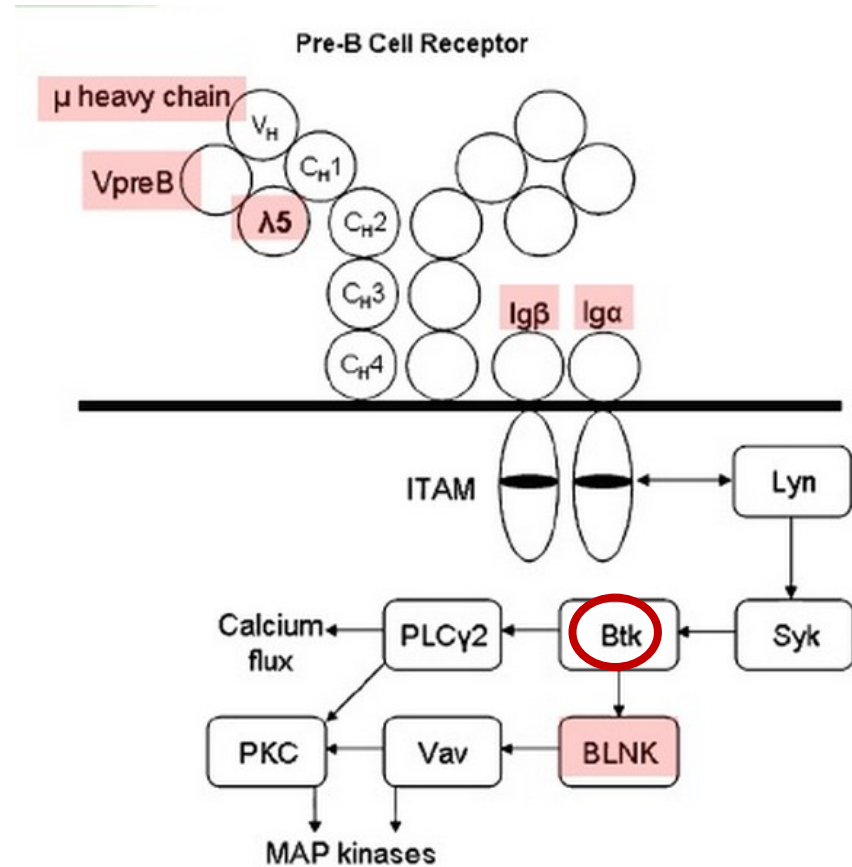
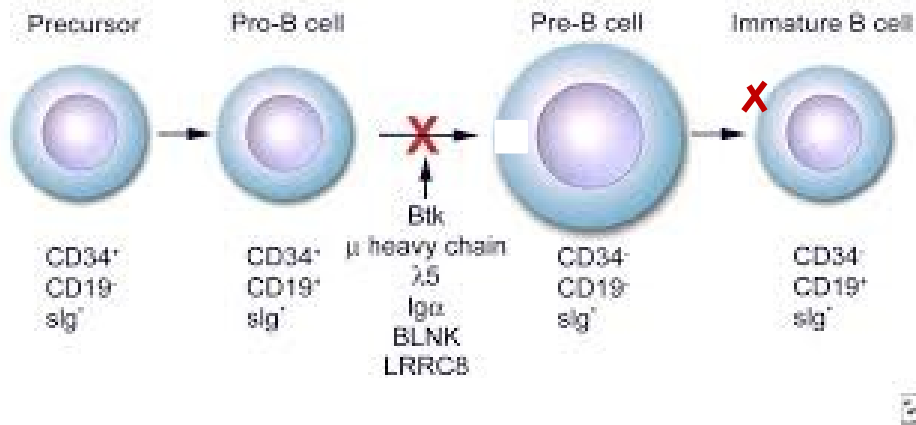
# Fenotypem „řízená“ diagnostika - **limitace**

---

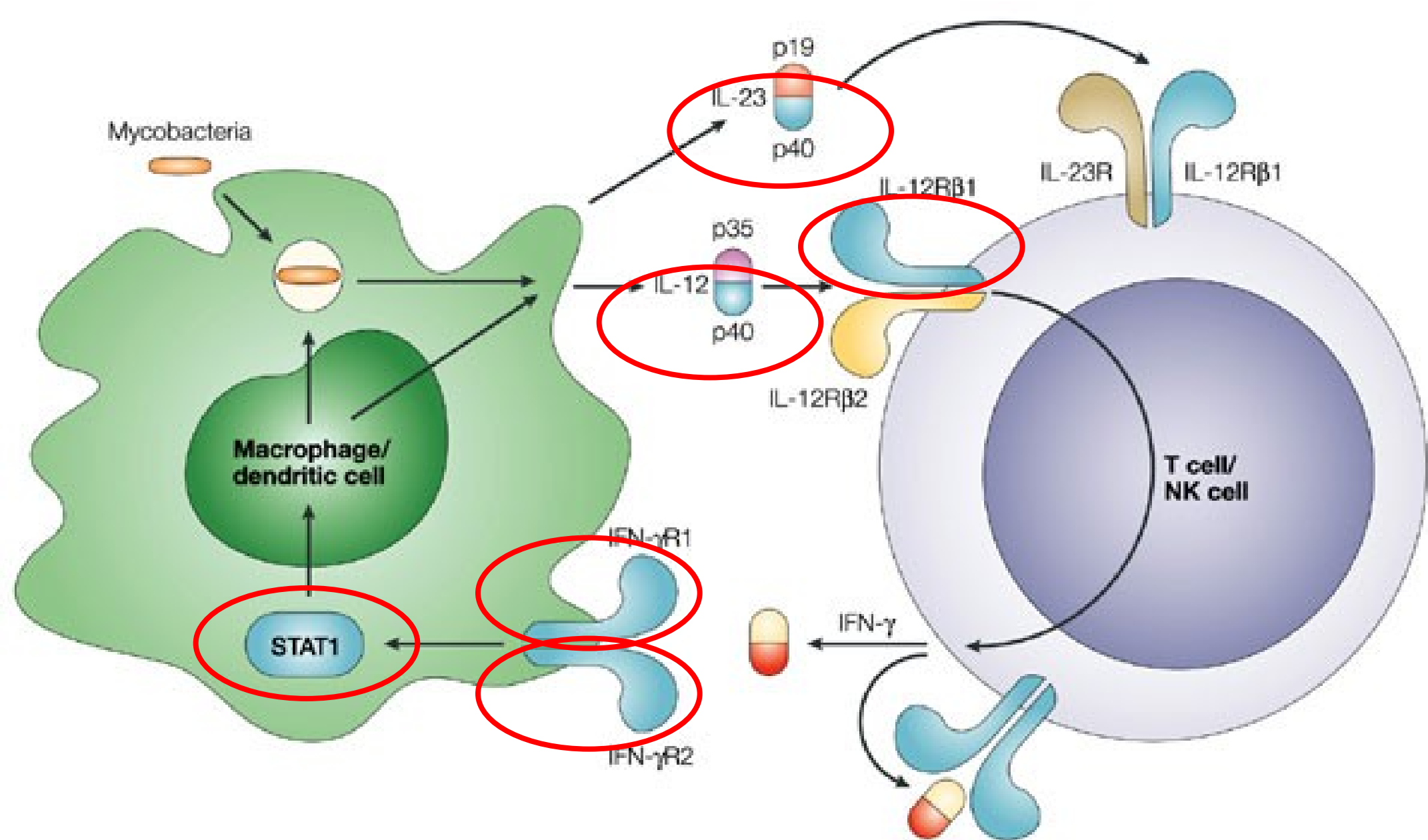
## Vysoká heterogenita PID

- 1 klinický a laboratorní fenotyp – různé geny
- 1 gen – různé fenotypy
  - různé projevy u nositelů stejné mutace (i v rámci rodiny)
  - gain-of function vs. loss-of-function mutace

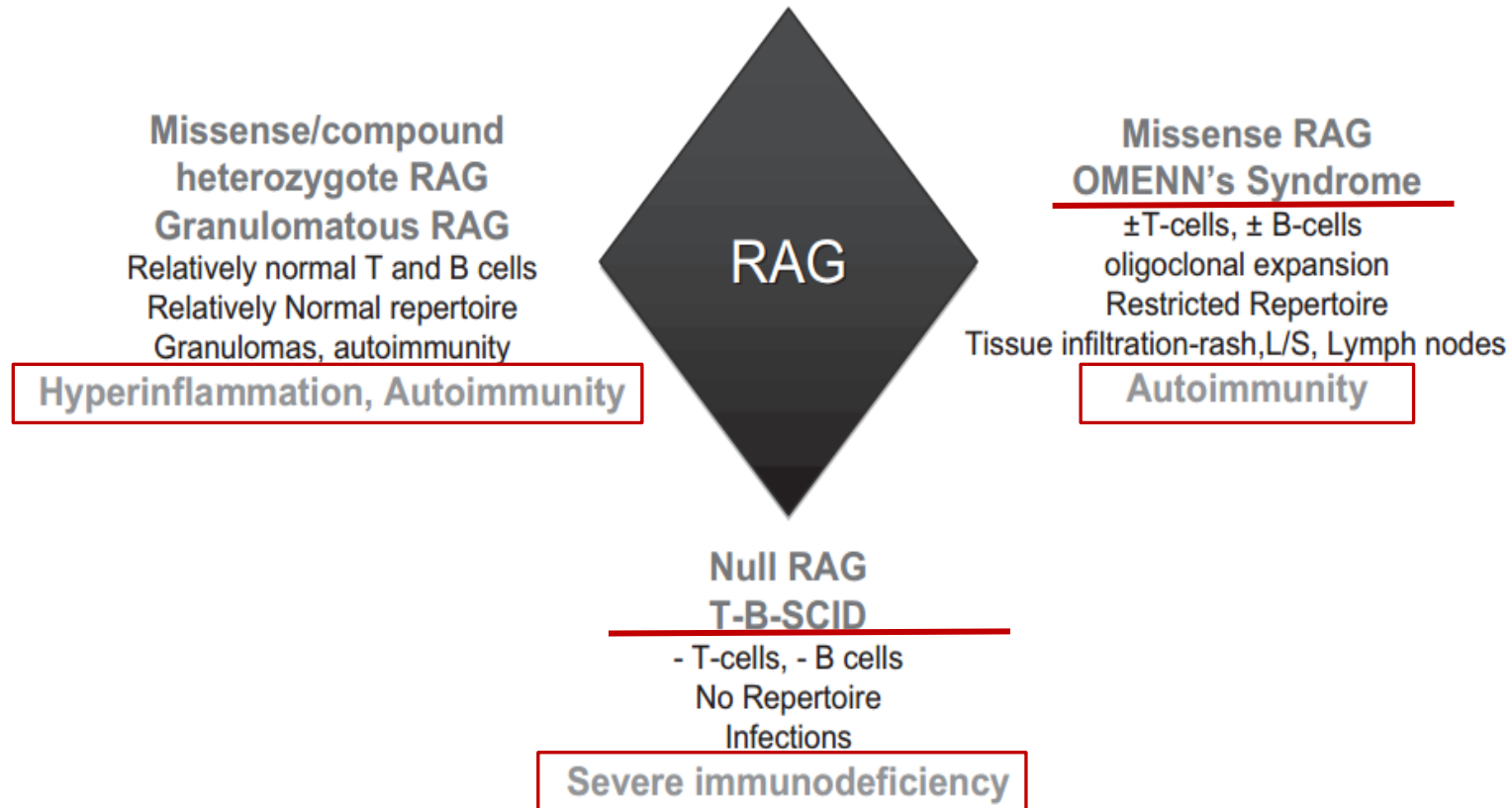
# 1 fenotyp – různé geny



X-vázaná agamaglobulinemie  
AR agamaglobulinemie



# jeden gen – různé fenotypy

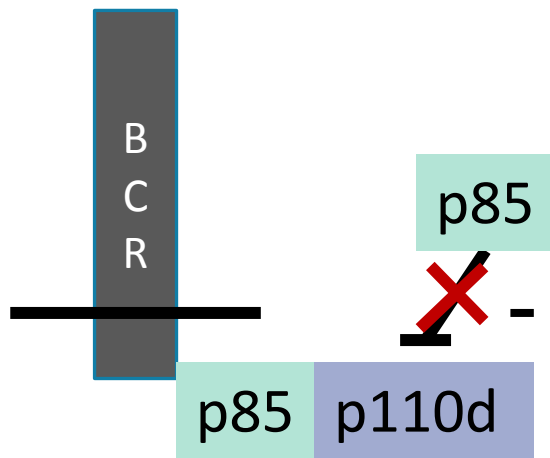


De Ravin et al, Blood 2010, 116(8)



# 1 gen – různé fenotypy

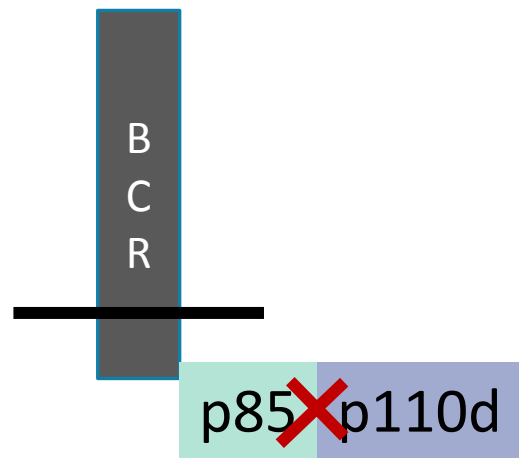
mutace PIK3R1 (p85 PIK3)



HETEROZYGOTNÍ LOSS OF FUNCTION

ztráta inhibičního vlivu na p110d =  
„gain of function“ p110 delta

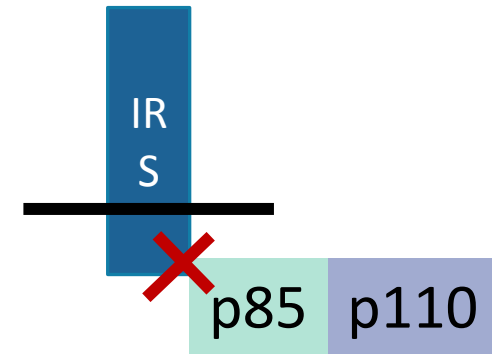
AD APDS



HOMOZYGOTNÍ LOSS OF FUNCTION

ztráta stability = „loss of function“  
p110 delta

AR AGAMAGLOBULINEMIE



HETEROZYGOTNÍ LOSS OF  
FUNCTION

snížená interakce s IRS

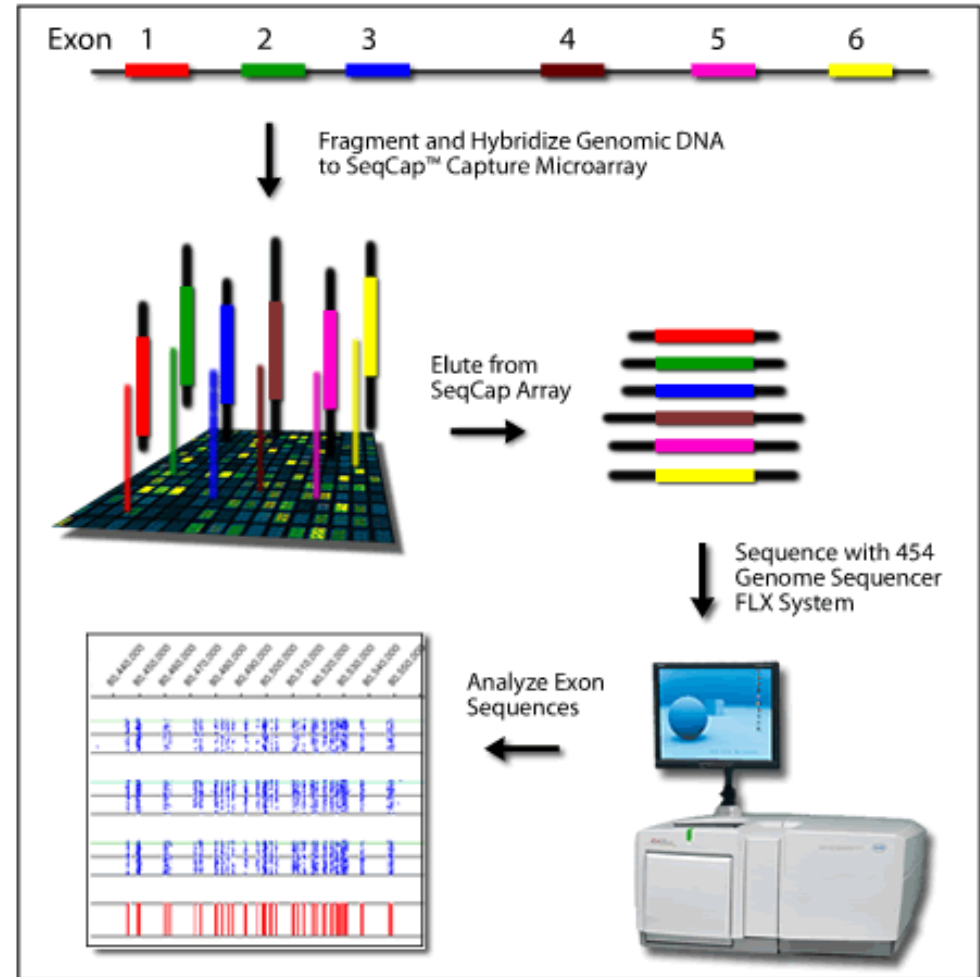
SHORT syndrom, AD

# Molekulárně genetické vyšetření – vývoj technik

TRENDY

- Jasný klinický a laboratorní fenotyp – jeden /několik málo kandidátních genů
  - Jedna /několik prevalentních mutací (C2 deficiencie)
    - jednoduchá PCR
  - Mutace v celém rozsahu genu/ genů (většina PID)
    - screeningové metody s následným Sangerovým sekvenováním HISTORIE
    - Sangerovo sekvenování celého genu
    - cílené masivní paralelní sekvenování – panel genů ? - počet genů, velikost genů, urgence vyšetření...
- Jasný/nejasný klinický a laboratorní fenotyp – více/ mnoho kandidátních genů
  - Mutace v celém rozsahu jednotlivých genů (většina PID /xGOF mutace)
    - cílené masivní paralelní sekvenování (NGS) – panel genů
    - celoexomové masivní paralelní sekvenování (WES)
    - (celogenomové masivní paralelní sekvenování (WGS))

# NEXT GENERATION SEQUENCING



## APLIKACE

➤ **Celoexomové/celogenomové sekvenování**

**Cílené sekvenování – panel genů**

**Analýza transkriptomu (RNAseq)**

Digital gene expression

ChIP sequencing

Methylome sequencing

Small RNA sequencing

# Porovnání cíleného a celoexomového sekvenování (WES)

TRENDY

Cílený panel genů	WES
Rychlejší, méně nákladné	Pomalejší, dražší
Lepší pokrytí genů zájmu, delší intronové sekvence	Menší průměrné pokrytí, menší záběr intronů
Ověřené geny pro danou skupinu onemocnění	Možnost objevu nového genu, nečekaných souvislostí
Méně variant, snazší interpretace	Více variant, obtížnější interpretace
První krok	Další krok v případě negativního výsledku panelu (ev. > WGS)

# Molekulárně genetické vyšetření – interpretace výsledků

---

- pokročilé technologie (NGS...) – čím dál **snažší detekovat** mutace

## Interpretace

- Varianty již studované a popsané jako kauzální/ funkčně významné (patogenní)
  - **kauzální**
- Nové varianty – **obtížné interpretovat**
  - **Jsou funkčně významné?** – mají skutečně vliv na mRNA, strukturu a/nebo funkci proteinu, fenotyp pacienta

# WES – filtrování variant

---

## Sequence Read Alignment

266-fold coverage of protein coding regions Intronic?

## SNV Discovery

819,220 single-nucleotide variants (SNVs)

819,220 SNVs

## Gene annotation

8,464 nonsynonymous SNVs Synonymous?

8,464 non-synonymous SNVs

## dbSNP-based Filtering

443 nonsynonymous SNVs not in dbSNP

443 non-synonymous SNVs not in dbSNP

## 1000GP-based Filtering

294 nonsynonymous SNVs not in 1000GP

294 non-synonymous SNVs not in 1000GP

## In-house SNV DB-based Filtering

143 sample-specific nonsynonymous SNVs

143 sample specific non-synonymous SNVs

## Homozygous Classification

4 homozygous, nonsynonymous SNVs

4 homozygous, non-synonymous SNVs

## Computational identification of damaging SNVs

1 damaging, homozygous stop-gain in CARD11

1 damaging, homozygous stop-gain in CARD11

# Jsou nově detekované varianty funkčně významné?

---

## Co pomůže?

- výskyt varianty v kontrolní (zdravé) populaci
- odpovídající fenotyp, segregace s fenotypem (v rodině)
- typ mutace (předčasný stop kodon vs. záměna aminokyseliny)
- predikce významu *in silico*

## Co je klíčové?

- **funkční analýzy**

(- analýza transkriptomu /RNAseq)

# Kauzalita mutací

---

## Pravděpodobně patogenní

- Nonsense
- Malé frameshift delece/duplikace
- Velké delece/duplikace
- Porušující sestřih mRNA
- Komplexní



Předčasné ukončení  
translace a/nebo  
významná část proteinu  
chybí

## Nejasného významu

- Missense
- Malé in-frame delece/inserce
- Promotorové varianty
- Tiché substituce
- **Intronové varianty**



## Vliv na

- vazbu ligandu?
- terciární strukturu?
- přenos signálu?
- transkripci?
- sestřih?
- ...



# Molekulárně genetické vyšetření – interpretace výsledků

## LIMITACE

---

### Falešně negativní výsledky

- mutace není použitými technikami zachycena
  - metody nemají 100% senzitivitu; některé metody navíc nedetekují velké inserce či delece
- mutace leží mimo sledovanou oblast (3` nepřekládaná oblast, introny...)
- varianty hodnocené jako VUS mají funkční význam (alternativní sestřih mRNA...)

> negativní výsledek nevylučuje diagnózu

### Správně negativní výsledky

- nejedná se o dané onemocnění (= defekt leží v jiném genu)

# Molekulárně genetické vyšetření – interpretace výsledků

**LIMITACE**

---

Falešně **pozitivní** výsledky

- **detekovaná změna** nemá funkční význam a **nesouvisí se vznikem onemocnění**
- selhání metody + nedostatečná kontrola

# Vyšetření TREC – screening SCID

---

# T-Cell Receptor Excision Circles (TRECs)

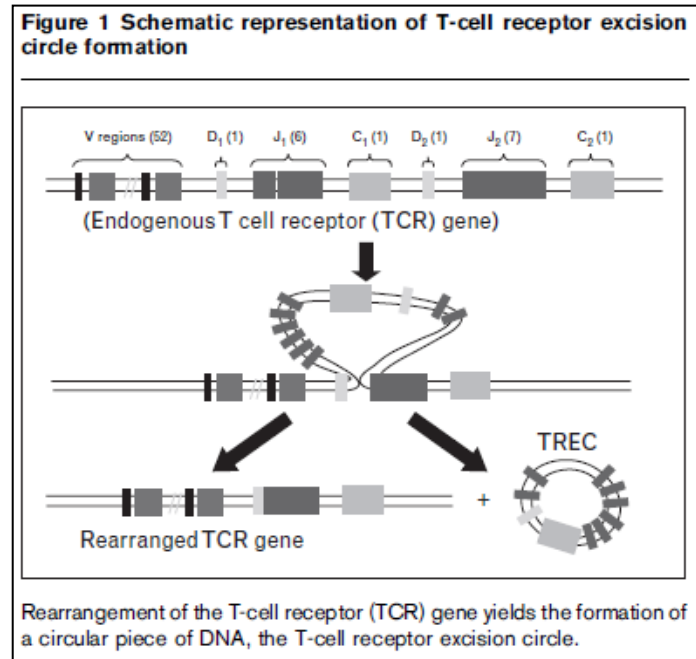
V brzlíku dochází k vytváření unikáních T-buněčných receptorů (TCR) V(D)J rekombinací jednotlivých TCR regionů



Vedlejším produktem jsou excisní kroužky DNA (TRECs)

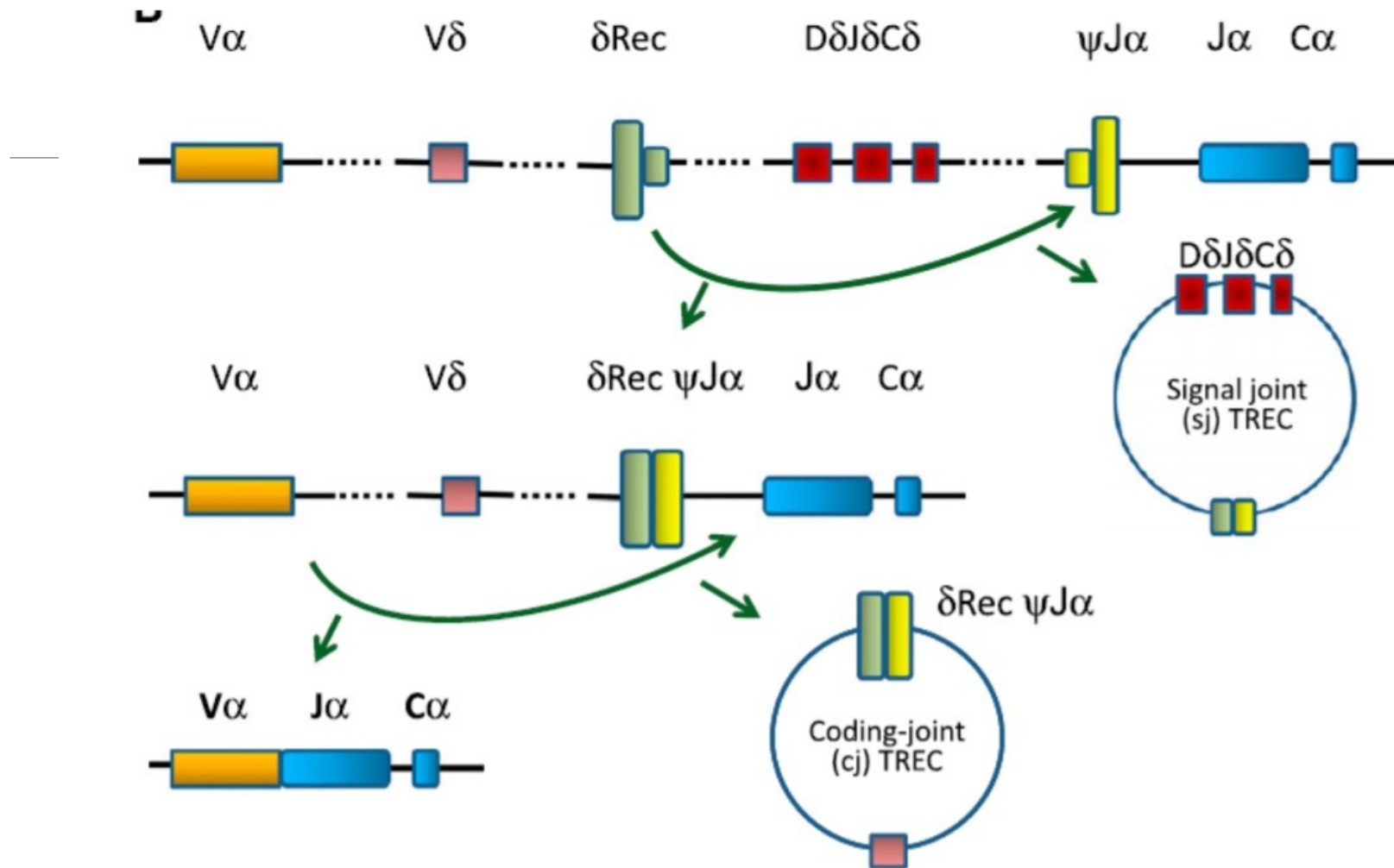
Množství TRECs koreluje s počtem naivních T-buněk v krvi

qPCR kvantifikace TRECS je vhodný diagnostický marker SCID



Převzato z Chase. Curr. Opin. All. Imm. 2010, 10:521–5256

# TCRA



# Kappa-deleting receptor excision circles (KRECs)

Obdoba TRECs u vývoje B-lymfocytů

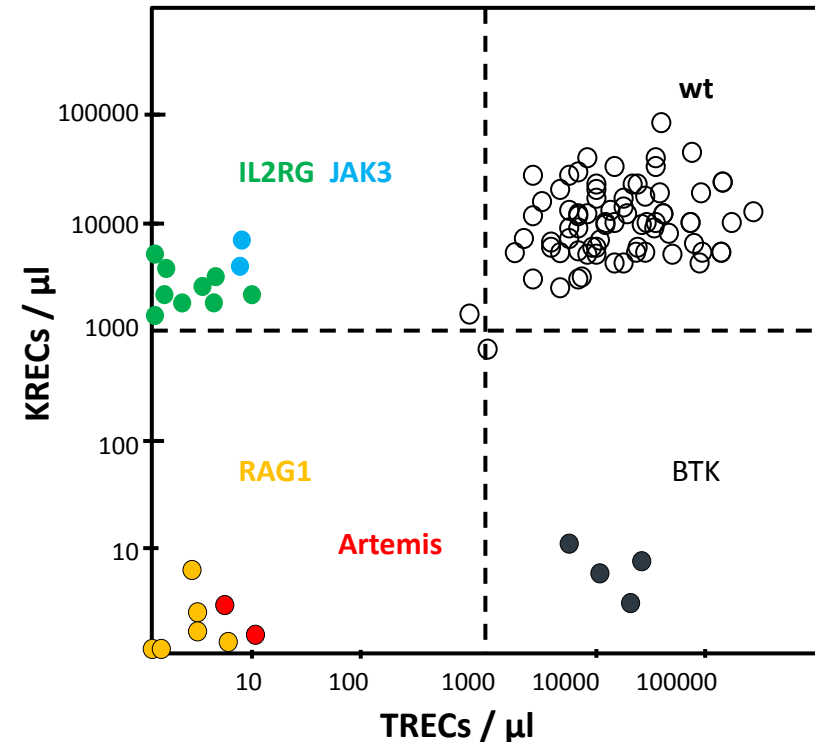
Marker vývoje B-buněk, koreluje s množstvím naivních B-buněk

## Kvantifikace TRECs a KRECs

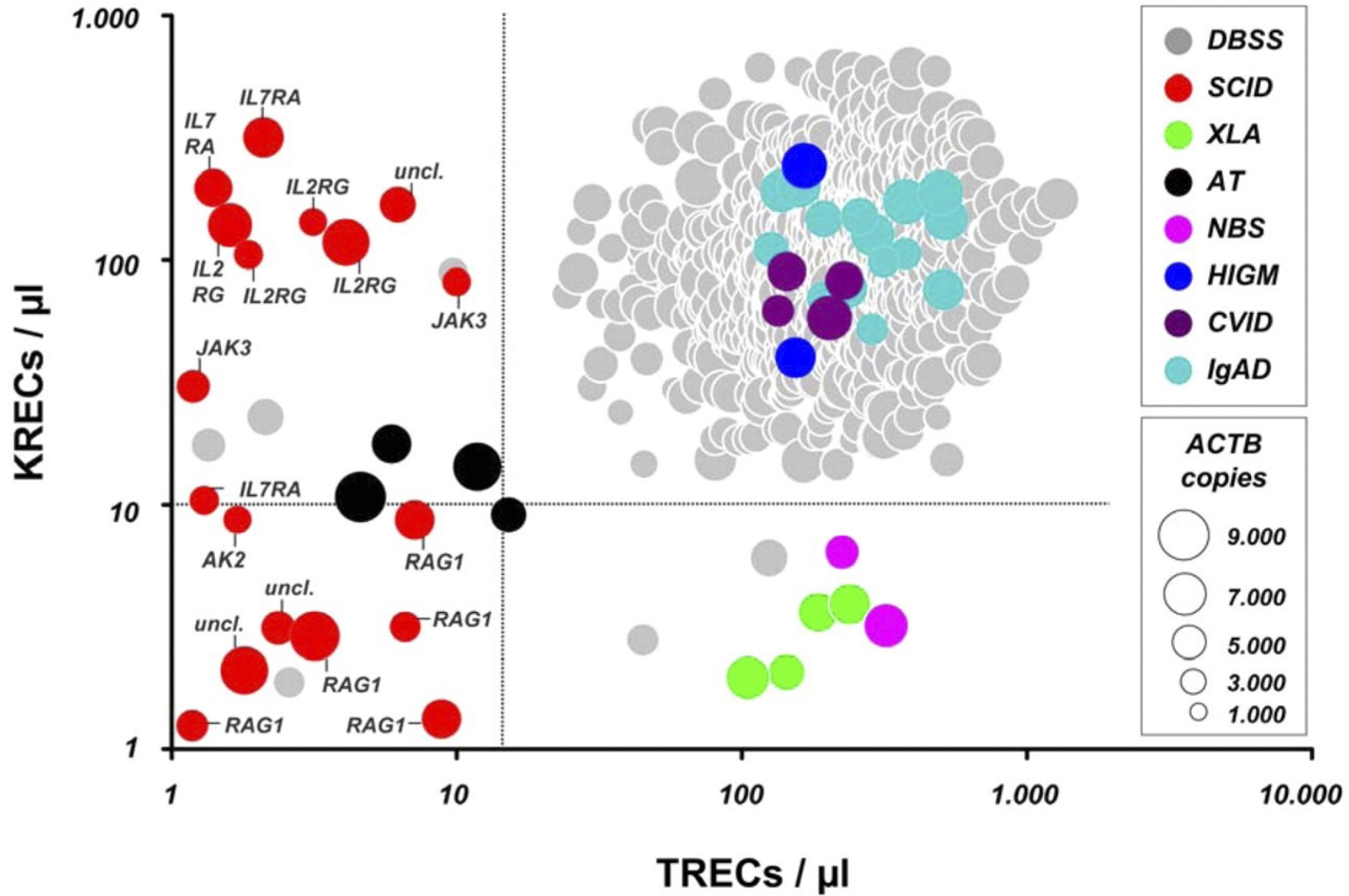
Izolace DNA z krevní skvrny



qPCR



TREC and KREC copy numbers in dried blood spot samples (DBSS) from anonymized Guthrie cards and retested samples and in patients diagnosed with SCID, XLA, AT, NBS, X-HIGM, CVID, or IgAD



Stephan Borte et al. Blood 2012;119:2552-2555

# THM

---

## Molekulárně genetické vyšetření je velmi silným nástrojem v diagnostice PID

- Masivní paralelní sekvenování - panel genů > WES – analýza velkého množství genů v krátkém čase
- Náročná interpretace výsledků - nález mutace neznamená automaticky, že se jedná o příčinu onemocnění
- Negativní výsledek nevylučuje danou diagnózu
- Funkční studie jsou často nezbytné k průkazu vlivu nových mutací na mRNA a/nebo strukturu a funkci proteinu

**TRENDY**

**LIMITACE**