



# Moderní laboratorní přístupy v cytogenetice člověka – genetické příčiny mentální retardace



**Vladimíra Vallová**

**Odd. genetiky a molekulární biologie**

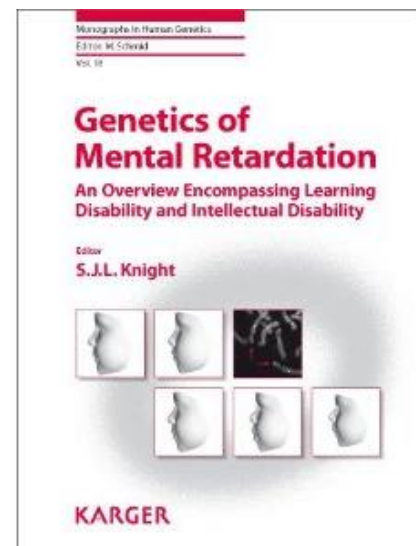
**UEB PŘF MU**

**Odd. lékařské genetiky**

**FN Brno**

# Osnova

- Definice a klasifikace mentální retardace (MR)  
(Definice a klasifikace vrozených vývojových vad)
- Negenetické příčiny MR
- Genetické příčiny MR
  - MR a monogenní dědičnost
  - MR a chromozomové aberace
- Vyšetřovací schéma u pacientů s MR
- Array-CGH a NGS při odhalování příčin MR



# Definice mentální retardace (MR)

- **mental retardation = intellectual disability (ID)** (mental handicap, mental disability, cognitive impairment, intellectual developmental disorder)
- charakterizovaná signifikantně **podprůměrnými intelektuálními funkcemi** s nástupem **před 18 rokem věku** s **narušenými schopnostmi přizpůsobit se okolí**
- narušené schopnosti u dvou a více z následujících dovedností: komunikace, starostlivost o sebe, plnění běžných domácích úkonů, sociální interakce, sebeovládání, zdraví a bezpečnost, práce a zábava, začlenění do společnosti
- **u dětí < 5 let → opoždění vývinu**

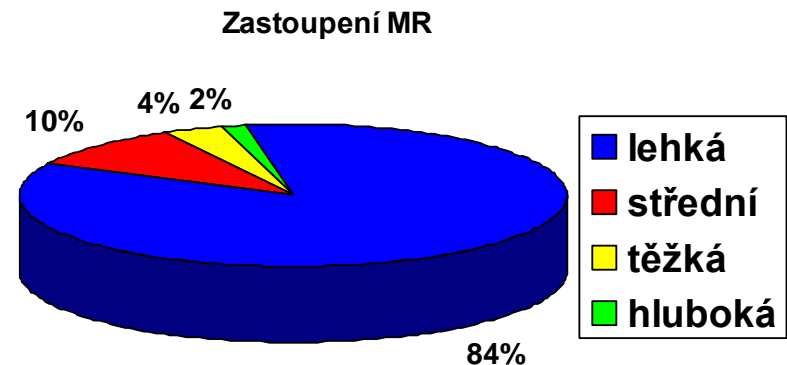
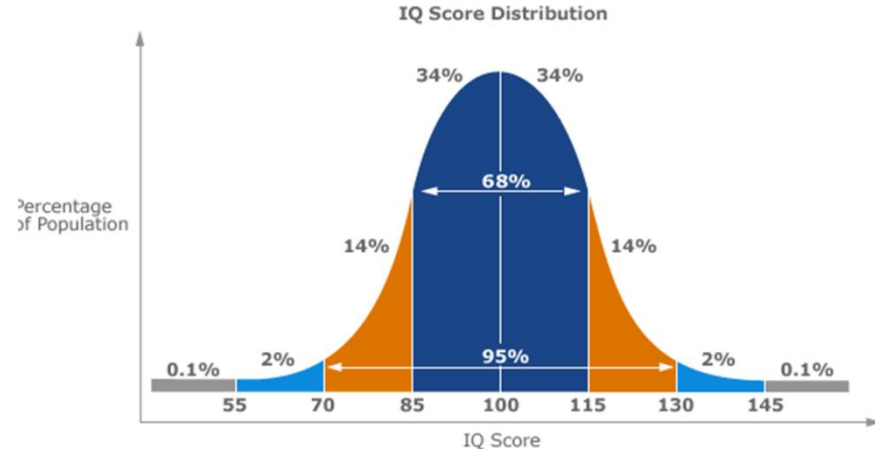


# Klasifikace MR

- založená především na měření IQ (první pokusy o měření rozumových schopností – Francis Galton na konci 19. století; moderní IQ testy: prostorové a verbální dovednosti, paměť)
- subnormalita s poruchami učení (IQ 85-70)
- mírná MR (IQ 50-70)
- střední MR (IQ 35-50)
- těžká MR (IQ 20-35)
- hluboká MR (IQ pod 20)
- neklasifikovatelná
  
- anglosaská literatura: lehká a těžká (IQ < 50) MR

## Prevalence

- postihuje asi **1-3 %** populace
  - 2,5 % lehký defekt
  - 0,3 - 0,5 % těžký defekt
- poměr pohlaví **1,3-2M:1F**



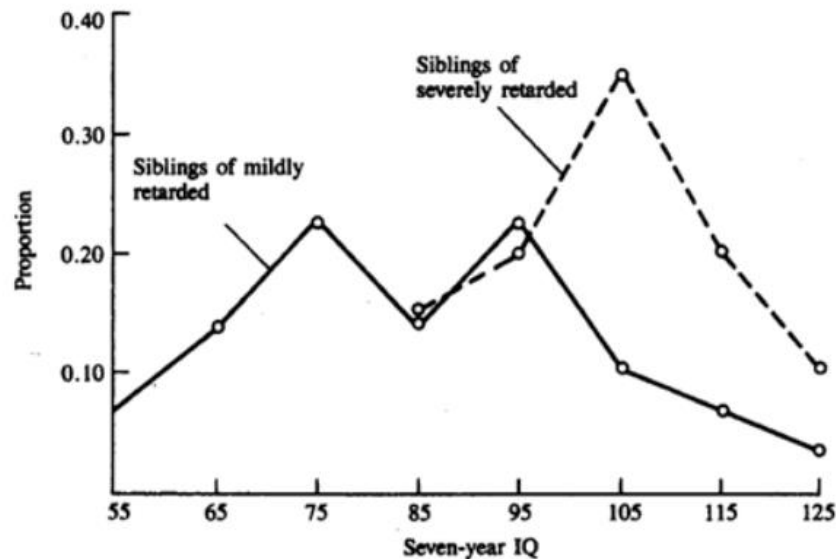
# Lehká vs. těžká MR

## Lehká MR

- statisticky významně vyšší výskyt u socio-ekonomicky znevýhodněných skupin
- příčina **neznámá u 70 %** případů

## Těžká MR

- výskyt rovnoměrně bez ohledu na socio-ekonomický status
- **40 % s neznámou příčinou**



**Figure 8.1** Siblings of mildly retarded children tend to have lower than average IQs. In contrast, siblings of severely retarded children tend to have normal IQs. These trends suggest that mild retardation is familial but severe retardation is not. (From Nichols, 1984.)

# MR syndromická a nesyndromická

## Syndromická (S-ID)

- MR různého stupně (častěji těžká)
- s přidruženou VVV či komplexem VVV,
- viditelná stigmatizace



## Nesyndromická (NS-ID)

- MR různého stupně (častěji lehká)
- bez přidružených VVV
- žádná nebo mírná a nespecifická stigmatizace
- *není jen odrazem naší neschopnosti adekvátně popsat všechny fenotypové odchylky u raritních případů?*

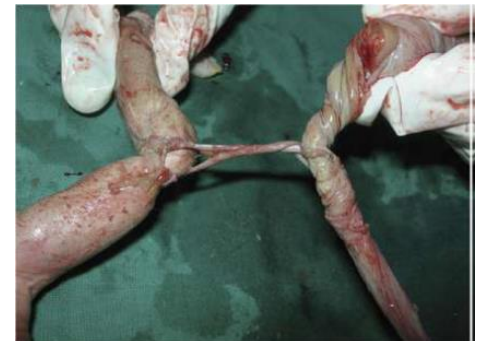


**MR s určenou a neurčenou genetickou příčinou.**

# Vsuvka: Vrozené vývojové vady (VVV)

## Vrozená vývojová vada (VVV) - kongenitální anomálie

- je morfologická/funkční abnormalita
- je následkem abnormálního prenatálního vývoje
- je přítomná při narození dítěte
- je pro svého nositele potenciálně patologická
- **Malformace** - abnormální vývoj tkáně/orgánu, vývoj patologický již od počátku (např. rozštěpové vady)
- **Disrupce** – abnormální vývoj tkáně/orgánu, vývoj narušen až v průběhu určitým zevním zásahem (trauma, infekce, **teratogen**) (např. deformity po thalidomidu)
- **Deformace** - abnormální fyzický zásah (mechanická síla), který naruší vývoj jinak zdravé tkáně/orgánu (např. komprese plodu způsobená oligohydramniem)
- **Dysplázie** - abnormální organizace buněk ve tkáni/orgánu (např. achondroplazie)



# Klasifikace VVV



## Izolovaná vada

- vada vyskytující se samostatně (izolovaná polydaktylie).

## Mnohočetné vady

- napr. součást syndromu

Izolované nevýznamné anomálie lze najít až u 14% novorozenců (Jones, 1997).

## Co vše je vrozená vývojová vada?

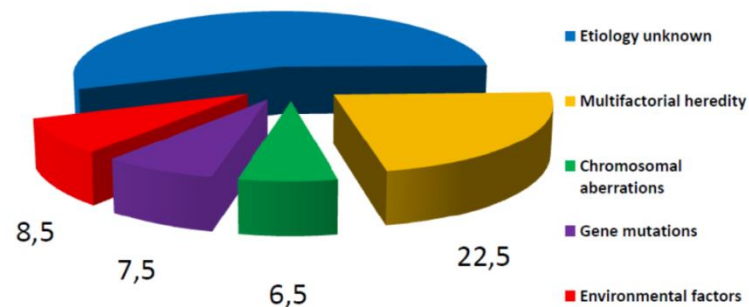
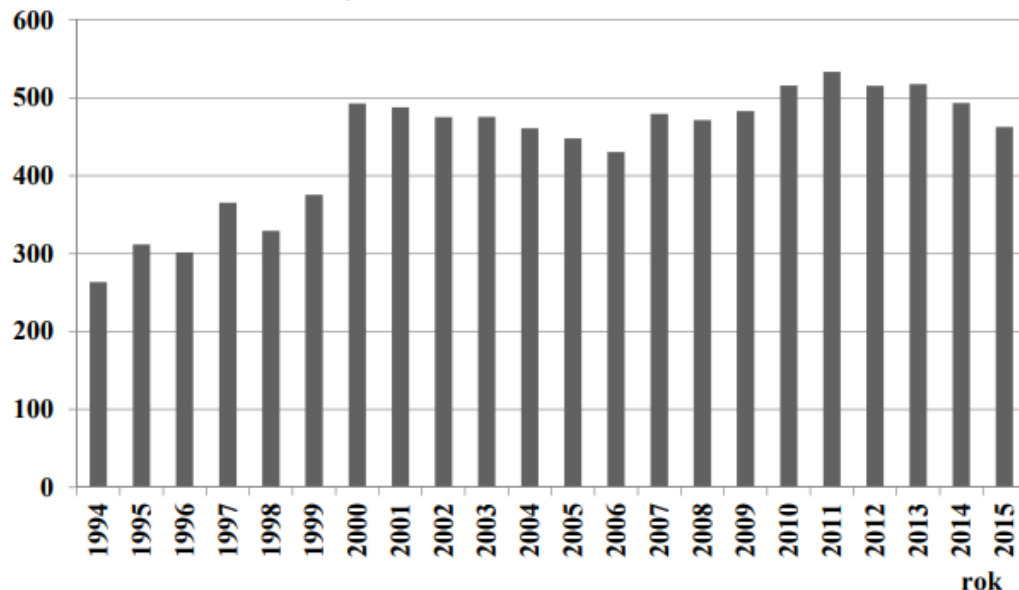
- Vrozené vady orgánů (srdce, ledvin, střev, mozku, míchy, plic, pohlavních orgánů, a dalších)
- Vrozené vady končetin
- Rozštěpy (vrozené rozštěpové vady neurální trubice, vrozené obličejové rozštěpy, vrozené rozštěpové vady břišní stěny)
- Syndromy Downův, Edwardsův, Patauův, Turnerův
- Vrozené choroby (fenylketonurie, cystická fibróza, svalové dystrofie, hematofilie)





Graf číslo 1: Incidence vrožených vad v České republice – celkem

na 10 000 živě narozených



Zdroj: Moore K. L., Persaud T. V. N.; The Developing Human: Clinically Oriented Embryology, 6th Edition; 1998

**Vrožené vady**
**Vrožené vývojové vady**

Informační portál o vrožených vadách a jejich výskytu v ČR

Hlavní Autoři O stránkách Odkazy Spolupráce

**Vrožené vady**

- [Základní informace](#)
- [Podrobné informace](#)
- [Historie a současnost](#)
- [Výskyt VV v ČR](#)
- [Sledované vady](#)

**Genetika**

- [Genetika obecně](#)
- [Informační letáčky](#)

**Primární prevence**

- [Primární prevence](#)
- [Informační materiály](#)

**Mezinárodní den VV**

- [Informace](#)

**IVF**

- [Základní informace](#)

**Percentilové tabulky**

- [Hypotrofie](#)

**Články a prezentace**

- [Prezentace](#)

Hlavní - Vrožené vady - Čtvrtletní data

**Aktuální data**

- Celkové incidence vrožených vad v ČR, 1994-2015**  
 373 kb  
[Celkove\\_Incidence\\_1994-2015.pdf](#)
- Celkové incidence vrožených vad v jednotlivých krajích ČR, 1994-2015**  
 415 kb  
[Incidence\\_Kraje\\_CR\\_1994-2015.pdf](#)
- Absolutní počty vrožených vad (dle skupin) v ČR, 1994-2015**  
 406 kb  
[Pocty\\_VV\\_1994-2015.pdf](#)
- Relativní počty vrožených vad (dle skupin) v ČR, 1994-2015**  
 419 kb  
[Relativni\\_Incidence\\_VV\\_1994-2015.pdf](#)
- Klouzavé průměry incidence vrožených vad (dle skupin) v ČR, 1994-2015**  
 437 kb  
[Klouzave\\_prumery\\_VV\\_1994-2015.pdf](#)
- Trendy incidence vrožených vad (dle skupin) v ČR, 2000-2015**  
 405 kb  
[Trendy\\_Incidence\\_2000-2015.pdf](#)

**Starší - Kvartální data**

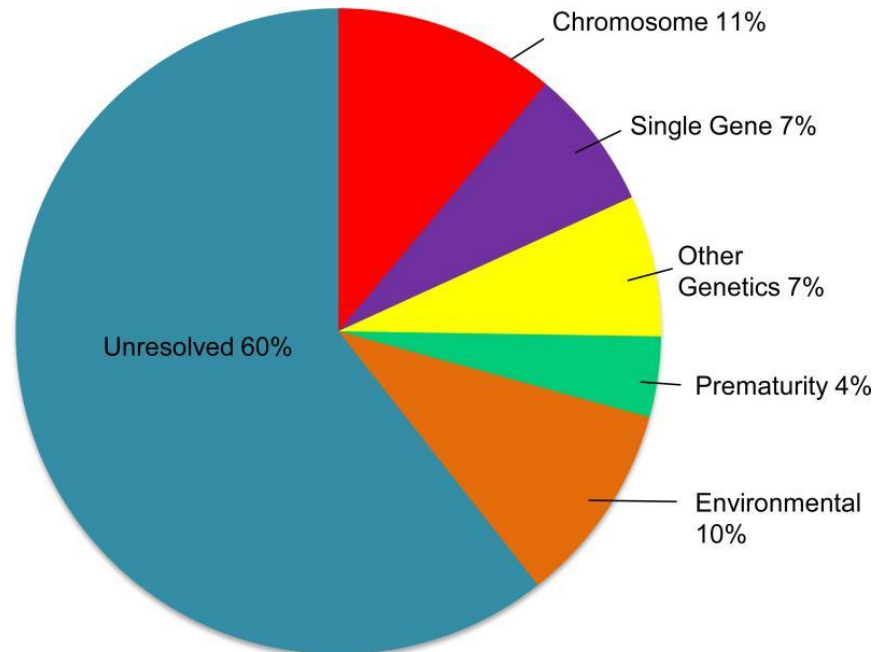
Rok 2011

Partnerské stránky

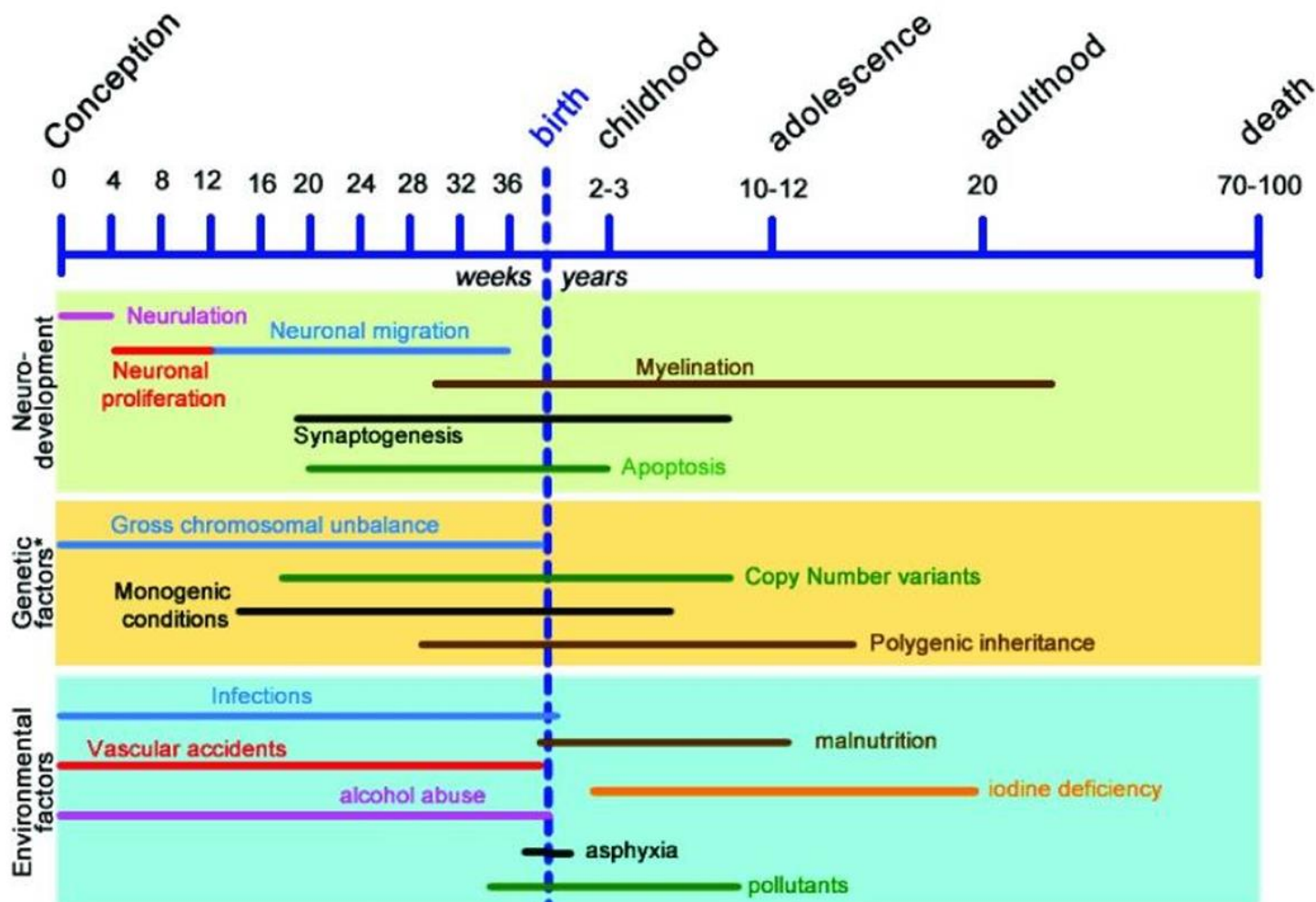
<http://www.vrozene-vady.cz>

# Etiologie mentální retardace

- **komplexní etiologie**; asi u 50-60 % případů nelze zjistit kauzální příčinu (narušení vývoje mozku)
- **negenetické příčiny** (prenatální, perinatální, postnatální)
- **genetické příčiny** (monogenní, chromozomové, multifaktoriální)



# Negenetické příčiny



# Negenetické příčiny MR

## Prenatální období

### Fyzikální faktory

#### RTG záření

- do 10. tt více než 100 mSV – letální efekt
- později více než 100 mSV – PMR, VVV

#### Ionizující záření (gama záření apod.)

- efekt závisí na délce a intenzitě působení (dávce)

#### Vysoká teplota (hypertermie)

- prvních 6 tt
- např. sauna – 3x vyšší riziko VVV
- horečka > 38,5 °C déle než 48h – SA, IUGR, MR, VVV CNS...

**Vyšetření plodu UZV a MR nemá prokázané škodlivé účinky.**

### Chemické faktory

#### Chemikálie

- užívané v průmyslu či zemědělství (organická rozpouštědla, barviva, PCB, těžké kovy)

#### Návykové látky

- **Alkohol** (Fetální alkoholový syndrom)
- **Nikotin** (prokázán byl i teratogenní účinek kouření marihuany)
- **Jiné drogy** (kokain), doping (steroidy)

#### Léky

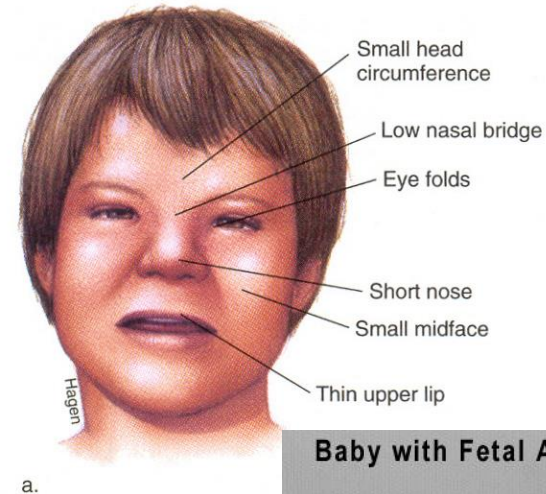
- Cytostatika, antiepileptika, antibiotika, warfarin, ACE-inhibitory, i vysoké dávky vit. A



## Negenetické příčiny MR

# Fetální alkoholový syndrom (FAS)

- incidence **1/1 000 dětí**; poškození nervových buněk alkoholem
- chronické užívání alkoholu (2g/kg/den), nárazová nadměrná konzumace
- alkohol v těhotenství  $\frac{3}{4}$  žen,  $\frac{1}{3}$  do 3. měsíce gravidity
- **Růstová retardace plodu** (novorozenci jsou většinou hypotrofičtí, poruchy růstu často přetrvávají i v dětství, postižené děti celkově neprospívají)
- **Typická kraniofaciální dysmorfie** (různý stupeň mikrocefalie, hypoplastická maxilla, vyhlazené philtrum, plochá střední část obličeje)
- **Poškození CNS** (různý stupeň mentální retardace, kognitivní poruchy, poruchy chování)



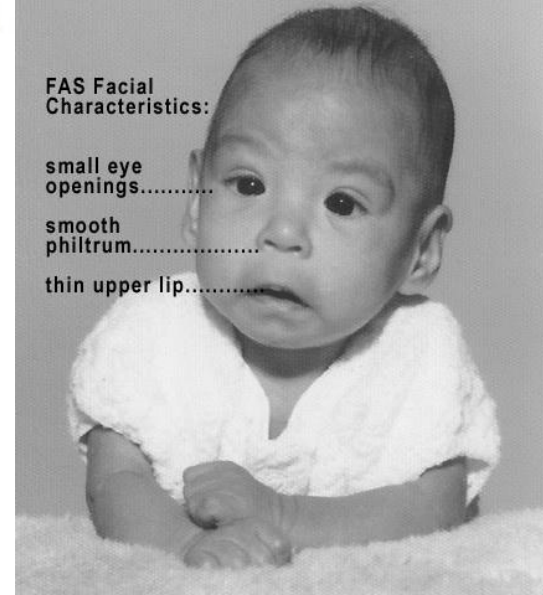
Baby with Fetal Alcohol Syndrome

### FAS Facial Characteristics:

small eye openings.....

smooth philtrum.....

thin upper lip.....



# Negenetické příčiny MR

## Prenatální období

### Biologické faktory

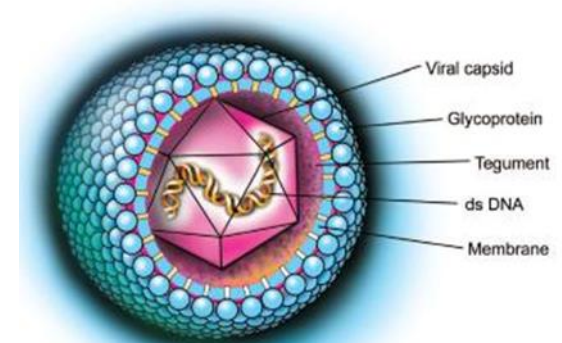
#### Infekční agens

#### TORCH (akronym)

- *Toxoplasma gondii*
- Ostatní (*Treponema pallidum*, HIV atd.)
- Rubivirus
- Cytomegalovirus
- Herpesvirus
- ohrožující jsou zejména primoinfekce

#### Chronické onemocnění matky

- Diabetes mellitus (DM)
- Fenyketonurie (PKU)
- Thyreopatie
- Astma, epilepsie...



HCMV Human Cytomegalovirus

## Negenetické příčiny MR

# Perinatální období

- problémy při porodu - krvácení do mozku, hypoxie
- předčasný porod, nedonošenost
- nízká porodní hmotnost
  - předčasný porod, těhotenství mladistvých, vícečetné porody
  - špatná výživa
  - může vést až k 40-60% redukci mozkových buněk



## Negenetické příčiny MR

# Postnatální období

- infekce (černý kašel, neštovice, meningitida)
  - mohou způsobit MR, pokud není poskytnuta adekvátní lékařská péče
- úrazy hlavy
- intoxikace
  - toxiny v životním prostředí
  - těžké kovy – rtuť, olovo
- špatná výživa





**Negenetické příčiny MR**

# Prevence



**Primární** – prevence vzniku choroby

**Sekundární** – prevence narození postiženého dítěte

(Terciární – prevence komplikací choroby)

## **Primární prevence – plánované rodičovství**

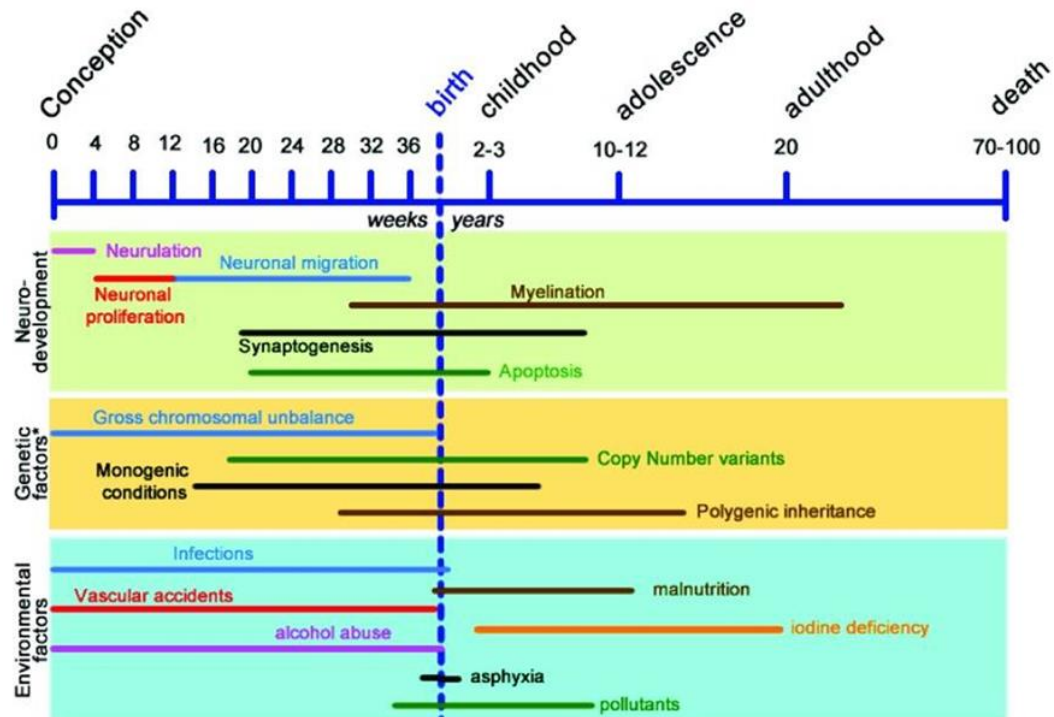
- reprodukce v optimálním věku
- včasná diagnostika léčitelných onemocnění – hypotyreóza
- kompenzace některých onemocnění před početím – diabetes, astma, epilepsie, hypertenze
- úprava některých onemocnění – např. antikoagulační léčba
- vyvarovat se kontaktu s teratogeny - infekce, očkování, minimalizovat radiační zátěž
- zdravý způsob výživy s dostatkem vitaminů a stopových prvků



# Genetické příčiny

# Genetické příčiny MR

- MR spojená s monogenní dědičností
- MR podmíněná poruchami chromozomů - aneuploidie, CNVs
- MR podmíněná multifaktoriálně (polygenně)



# Monogenní dědičnost

- MR jako příznak je popisována u ~ 1000 syndromů popsáných v databázi OMIM...

### Autosomálně recesivní

metabolické vady:

- Fenylketonurie
- Smith-Lemli-Opitz sy...

### Autosomálně dominantní

- Tuberózní skleróza
- Costello syndrom
- Cornelia de Lange...

### X – vázané

- syndrom fragilního X
- Rettův syndrom
- Coffin-Lowry...

**... a u několika stovek genů u tzv. nesyndromické MR - AR, AD, X-vázané**

Curated lists of genes involved in ID have been published by some groups. Gilissen *et al.* created two lists including **528 genes** with a “**confirmed**” **pathogenetic role** and **628 “candidate” genes** with mutations reported in fewer than five patients. Another comprehensive list (DDG2P) was prepared to assist the Deciphering Developmental Disorders Study, including **925 “confirmed” developmental disorder genes** up to November 2013. Yet another **list of 565 genes associated with ID (253 “known” and 312 “candidate”)** has been reported by Grozeva *et al.*, who used the two previous lists as a starting point.

# Monogenní dědičnost - AD

- Intenzivní studium především v posledních letech
- Pravděpodobný model dědičnosti především u NS-ID
- *MBD5* gen (2q23.1), *DOCK8* (9p24)...
- Na odhalení AD genů se využívá mapování míst zlomů u translokací a CNVs spolu se sekvenováním kandidátních genů

### **Cornelia de Lange sy 1** (CDLS 1)

- OMIM: 122470
- mutace v genu *NIPBL* (5p13.1) a vykazuje **autozomálně dominantní dědičnost**.

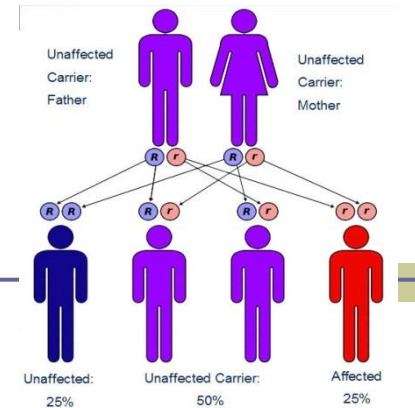
#### **Charakteristika:**

- difúzní svalová hypertrofie
- extrapyramidové poruchy
- psychomotorická retardace



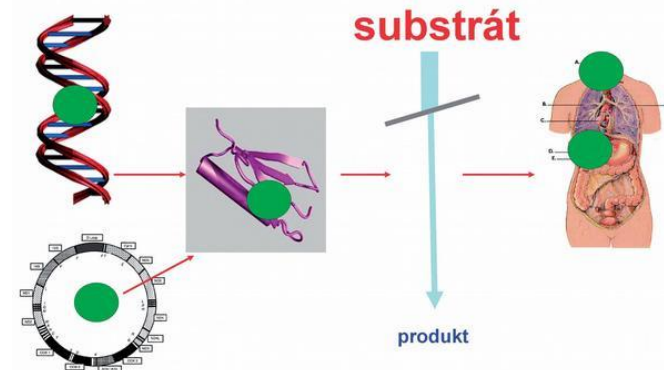
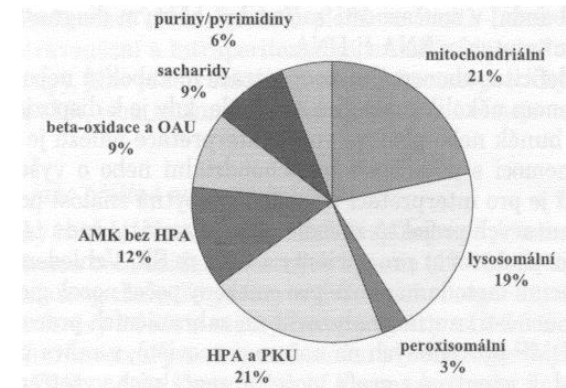
## Genetické příčiny MR

# Monogenní dědičnost - AR



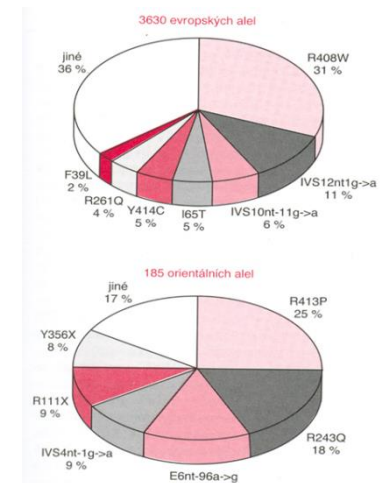
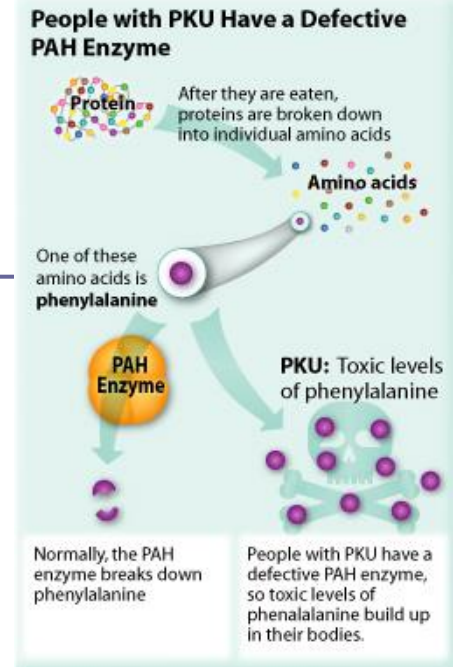
## Metabolické poruchy

- AA Aa **aa** (ztrátové mutace, vadná funkce proteinu)
- téměř vždy AR, heterozygoti s 50% reziduální aktivitou alely jsou klinicky normální
- Všechny patofyziologické důsledky enzymopatií mohou být připsány akumulaci substrátu či nedostatku produktu
- Poruchy metabolismu aminokyselin, cukrů, lipidů, purínů, pyrimidínů aj.
- **fenylketonurie, alkaptonurie, galaktosemie**



# Fenylketonurie (PKU)

- první důkaz genetického defektu jako příčiny mentálních retardací (Fohling, 1934)
- porucha metabolismu fenylalaninu způsobená mutacemi v genu pro fenylalaninhydroxylázu (PAH) – přeměna fenylalaninu na tyrozin
- 1/7-10 000 živě narozených dětí
- u pacientů s PKU dochází k hromadění toxického fenylpyruvátu v organismu – neléčené onemocnění vede k poškození vyvíjejícího se mozku
- fenotyp: mírná stigmatizace, světlé vlasy, modré oči
- léčba: speciální dieta s omezeným množstvím fenylalaninu
- nedodržování diety v graviditě může vést k hyperfenylalaninémii a následnému poškození plodu



- 400 různých mutantních alel
- 6 z nich - 80 % mutací

## Genetické příčiny MR

# Monogenní dědičnost – X-vázané

Asi nejlépe zmapovaný typ dědičnosti  
– díky hemizygozitě u XR dědičnosti

**CENTOGENE**  
THE RARE DISEASE COMPANY



### X-linked intellectual disability

**NON-SYNDROMIC FORMS**

- Only isolated MR/ID
- e.g. Fragile X syndrome, XLMR type 90

**SYNDROMIC FORMS**

- MR/ID + other symptoms
- e.g. Coffin-Lowry syndrome, X-linked alpha thalassemia MR syndrome

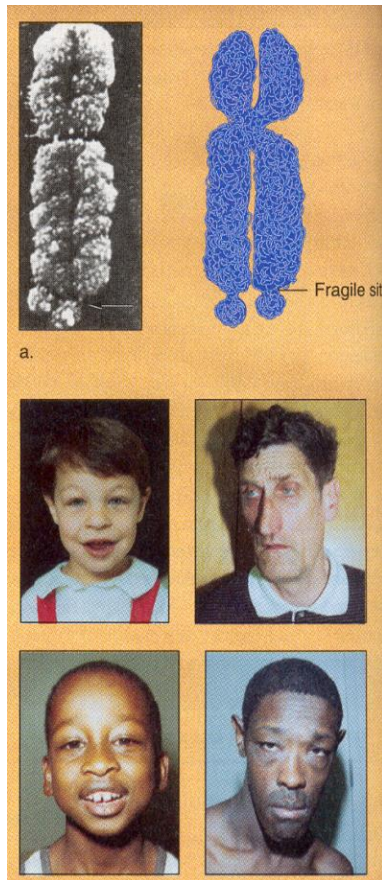
MR = Mental retardation defined as IQ <70    ID = Intellectual disability

Xp22.32-p22.31	NLGN4X	Mental retardation X-linked Autism susceptibility X-linked 2
Xp22.12	RPS6KA3	Coffin-Lowry syndrome Mental retardation X-linked 19
Xp21.3	ARX	Mental retardation X-linked 29 Lisencephaly X-linked 2
Xp21.3-p21.2	IL1RAPL1	Mental retardation X-linked 21/34
Xp11.3-p11.2	SYN1	Epilepsy, X-linked, with variable learning disabilities and behavior disorders
Xp11.23	PQBP1	Renpenning syndrome
Xp11.22	KDM5C	Mental retardation, X-linked, syndromic, Claes-Jensen type
Xq12	OPHN1	Mental retardation X-linked with cerebellar hypoplasia
Xq13.1	NLGN3	Autism susceptibility X-linked 1 Asperger syndrome suscept, X-linked 1
Xq13.2	SLC16A2	Allan-Herndon-Dudley syndrome
	ATRX	Mental retardation-hypotonic facies syndrome, X-linked
Xq21.1	ATP7A	Menkes disease Occipital horn syndrome
	BRWD3	Mental retardation X-linked 93
Xq23	DCX	Lisencephaly, X-linked Subcortical laminar heteropia, X-linked
Xq24	UBE2A	Mental retardation, X-linked syndromic, Nascimento-type
Xq27.1	SOX3	Mental retardation X-linked with isolated growth hormone deficiency
	L1CAM	MASA syndrome, CRASH syndrome Hydrocephalus w. Hirschsprung disease
Xq28	MECP2	Rett syndrome Mental retardation X-linked 13

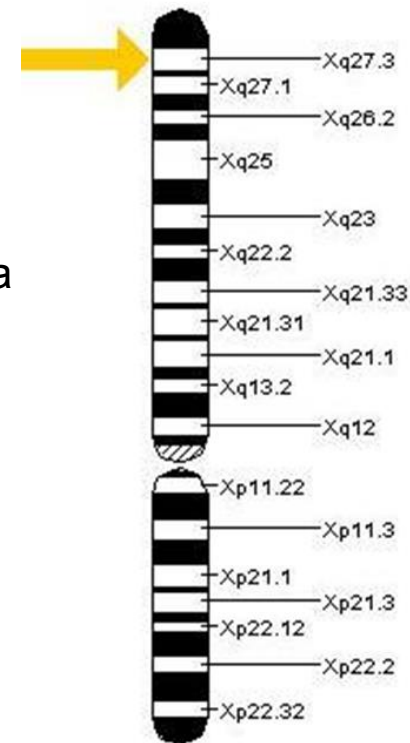
\*All of these genes are included in the CENTOGENE X-linked mental retardation panel.



# Syndrom fragilního X



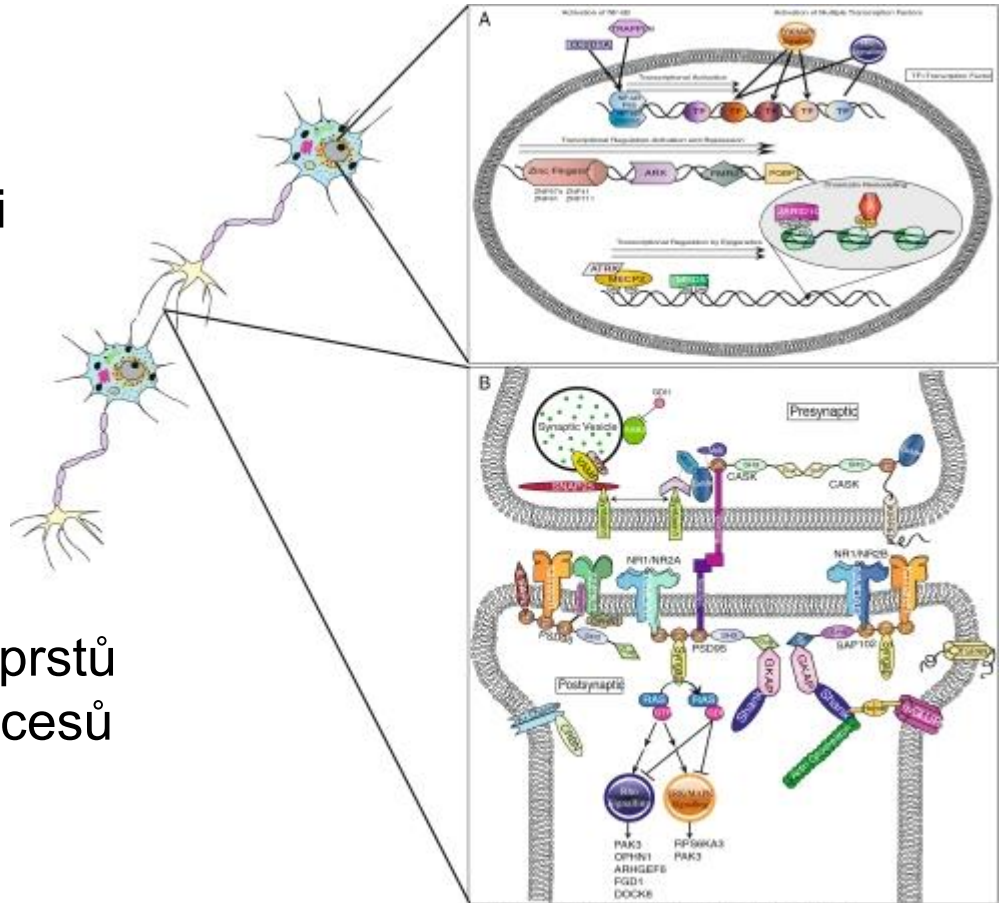
- incidence 1: 4000 chlapců, 1:7000 dívek
  - mentální postižení (IQ 20-60)
  - ženy - méně postižené, ale 25% má MR - IQ<70, většina 75-90
  - X-vázaný dominantní přenos
  - velká hlava, dlouhý obličej, prominující čelo a brada, velké uši, nízký svalový tonus
  - některé rysy autistického chování – nedostatečný oční kontakt, mávání rukama, úzkostná porucha
  - těžké opoždění vývoje řeči a jazykových dovedností
- gen FMR1; Xq27.3
  - příčina: zmnožení repetice CGG
    - 6 – 54 opakování - zdraví
    - 52 – 200 opakování - premutace
    - nad 200 - plná mutace
  - efekt ANTICIPACE



## Genetické příčiny MR

# Geny spojené s MR se podílejí na různých procesech v buňce

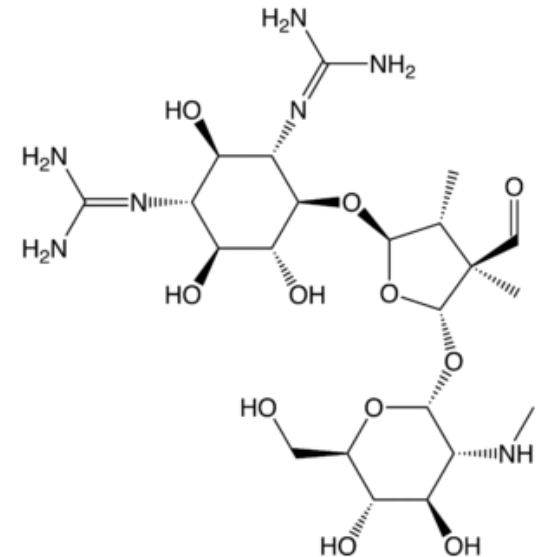
- Synaptické proteiny
- Synaptické vezikuly pro vnitrobuněčnou a mimobuněčnou komunikaci
- Proteiny asociované s membránou
- Signální dráhy
  - Rho GTPázy
  - ERK/MAPK signální dráha
- Regulace transkripce
  - proteíny s motivy zinkových prstů
- Proteiny metabolických procesů
- Degradace proteinů
- Remodelace chromatinu



# Monogenní dědičnost – možnost léčby?

## U monogenně podmíněné MR

- možnost genové terapie
  - např. *MECP2* (Rett sy) – zavedení genu u *MECP2* null myši
- exon skipping
  - využitím antisense oligonukleotidů anebo siRNA
- aminoglykosidy
  - zprostředkované potlačení non-sense mutace



# Chromozomové aberace

## ■ Početní změny chromozomů (aneuploidie) – 50 %

Downův syndrom	trisomie 21	~ 1/700
Edwardsův syndrom	trisomie 18	~ 1/7900
Patauův syndrom	trisomie 13	~ 1/10000-1/200000
Turnerův syndrom	45,X	~ 1/2500
Klinefelterův syndrom	47,XXY	~ 1/1000
Ženy 47,XXX	47,XXX	~ 1/1000
Muži 47,XYY	47,XYY	~ 1/1000
Monosomie 8	mosaikové formy	~ 1/30000

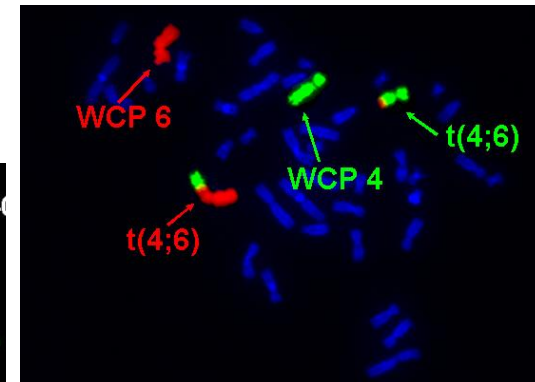
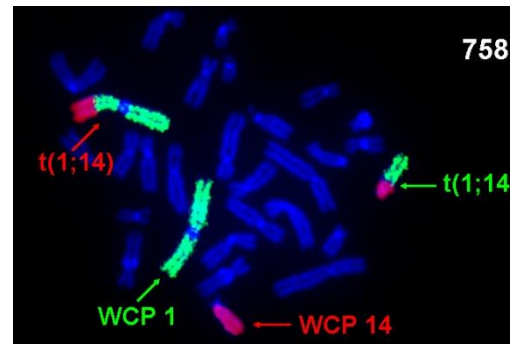
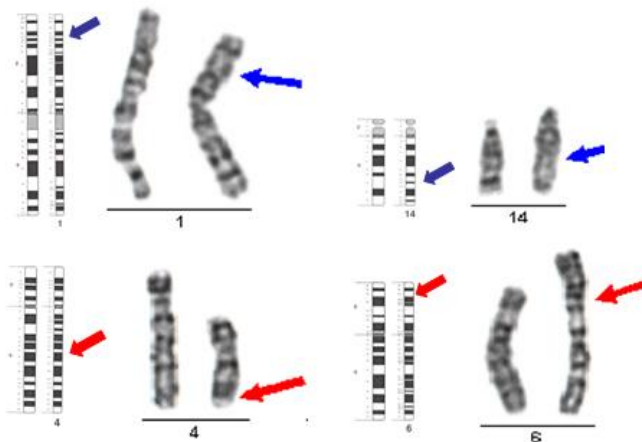
## ■ Strukturní změny chromozomů:

- (mikro)delece/(mikro)duplikace - 10 %
- translokace, komplexní přestavby
- subtelomerické přestavby - 7 %

# Komplexní chromozomové přestavby

- vrozené komplexní přestavby se vyskytují zřídka
- jsou charakterizovány 3 nebo více zlomy lokalizovanými na dvou nebo více chromozomech
- možná asociace s
  - mentální retardací
  - vrozenými anomáliemi
  - opakovanými spontánními aborty

46,XY,t(1;14),(p34;q24),t(4;6)(q25;p23)pat



## Genetické příčiny MR – CHA

# Syndrom kočičího křiku (Cri du chat)

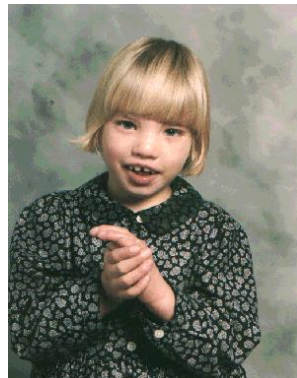
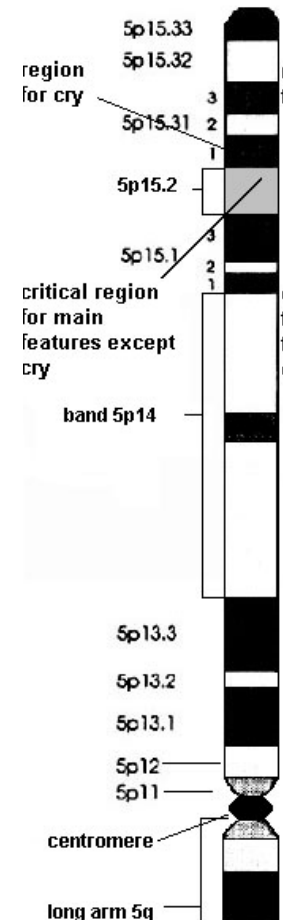


Jerome LeJeune, 1963

- 1 : 50 000
- delecce 5p, kritická oblast 5p15
- 10 – 15 % potomci přenašečů translokace
- typický křik novorozence - laryngomalacie
- mikrocefálie, kulatý obličej PMR, srdeční vady, mikrognátie, hypotonie



Chromosome 5  
Map of Short Arm 5p



## Genetické příčiny MR – CHA

# Submikroskopické přestavby

## – mikrolece a mikroduplikace - CNVs

- skupina geneticky podmíněných chorob, jejichž příčinou jsou drobné delece DNA segmentů, které nejsou detekovatelné klasickými cytogenetickými metodami
- pacienti mají specifické klinické příznaky
- častý výskyt MR

### Nejznámější mikroleční syndromy

Syndrom	Oblast delece
<b>Wolf-Hirschhorn sy</b>	<b>4p16.3</b>
<b>Williams Beuren sy</b>	<b>7q11.23</b>
<b>Prader-Willy/ Angelman</b>	<b>15q11-q13</b>
<b>Smith –Magenis sy</b>	<b>17p11.2</b>
<b>Miller- Dieker sy</b>	<b>17p13.3</b>
<b>Di-George/Velo-Cardio-Facial sy</b>	<b>22q11.2</b>
<b>Kallman sy</b>	<b>Xp22.3</b>
<b>Rubinstein-Taybi sy</b>	<b>16p.13.3</b>



Prader-Willi



Angelman



Williams



velo-cardio  
facial



Langer-  
Giedeon

# Jakou úlohu hraje architektura lidského genomu při vzniku submikroskopických přestaveb?

## Náhodné (non-recurrent) přestavby

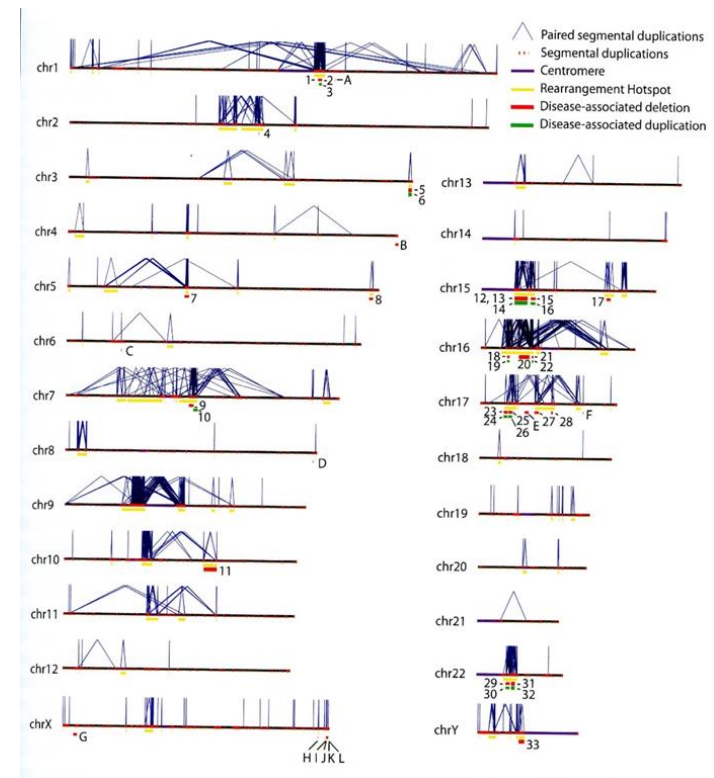
- nacházené u jednotlivců
- liší se velikostí a místy zlomu na chrom.
- můžou vznikat několika různými mechanismy – např. nehomologním spájením konců (NHEJ)

## Opakovaně se vyskytující (recurrent)

- nacházené u vícero pacientů
- stejná velikost a stejné místa zlomů na chromozomech
- vznikají díky specifické architektuře genomu

▪ důležitou úlohu hrají **segmentální duplikace (SD)** (opakovaní s nízkým počtem kopií)

- bloky DNA (1-500 kb), z více než 95% sekvenčně podobné, lokalizovány v různých oblastech genomu



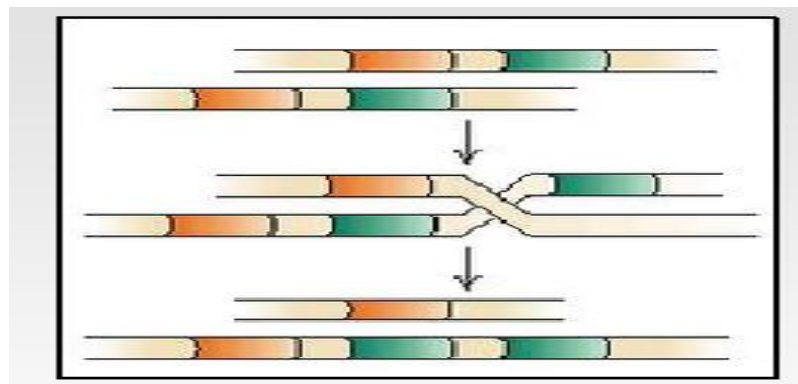
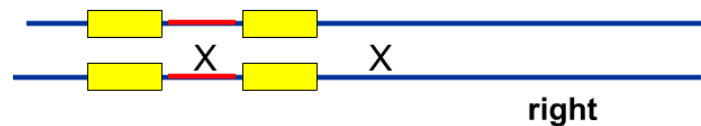
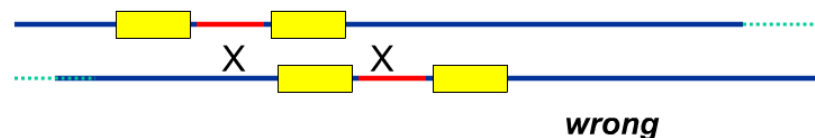
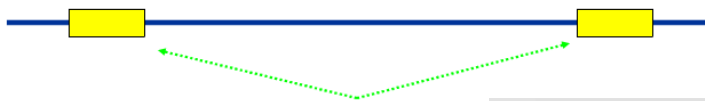


# Vznik mikrodelecí/mikroduplikací - nealelická homologní rekombinace (NAHR)

Díky velikosti a sekvenční homologii, mohou být SD příčinou přestaveb díky **nealeické homologní rekombinaci**.

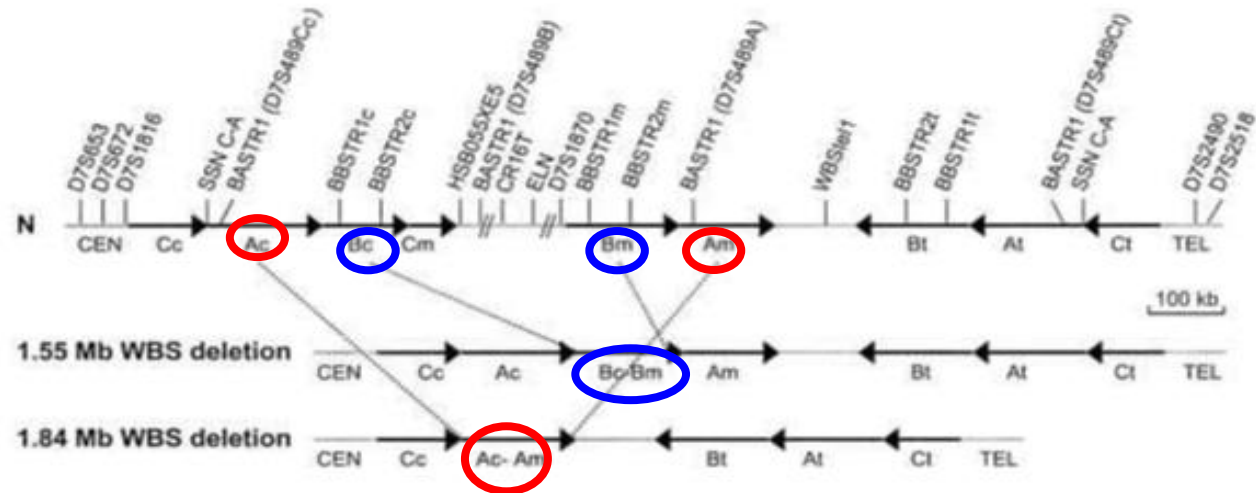
Microdeletion syndromes caused by low-copy repeats

Williams syndrome	7q11
DiGeorge / VCFS	22q11
Smith-Magenis	17p11
Angelman / Prader-Willi	15q12



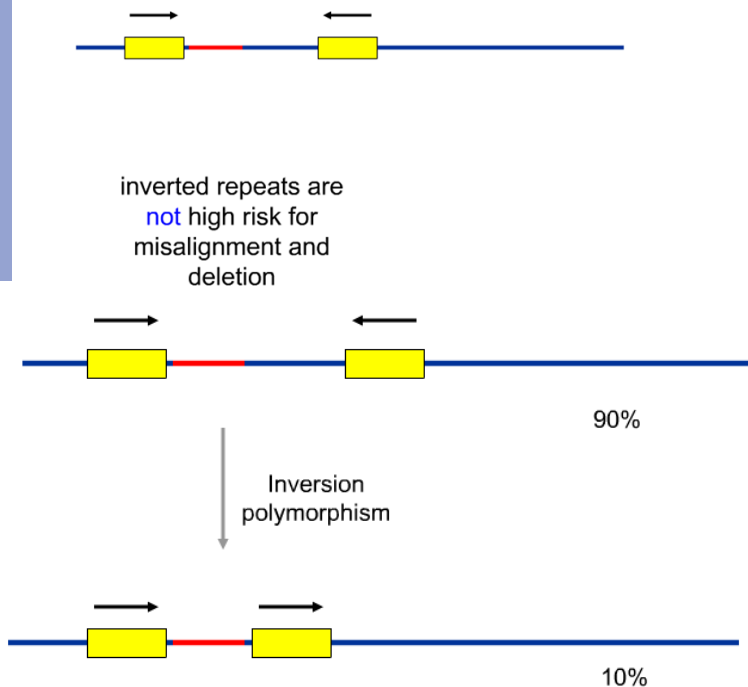
# Rekombinanční hotspots

- preferenční místa rekombinace
- oblast v rámci SD mající 100% sekvenční homologii (1-3 oblasti, o velikosti 300 bp - >2kb)
- nalezeny pro několik známých syndromů (**Williams-Beuren**, Smith-Magenis, Sotos sy, atd.)
- **ovlivňuje rekombinaci polymorfismus v počtu kopií SD bloků u rodičů?**

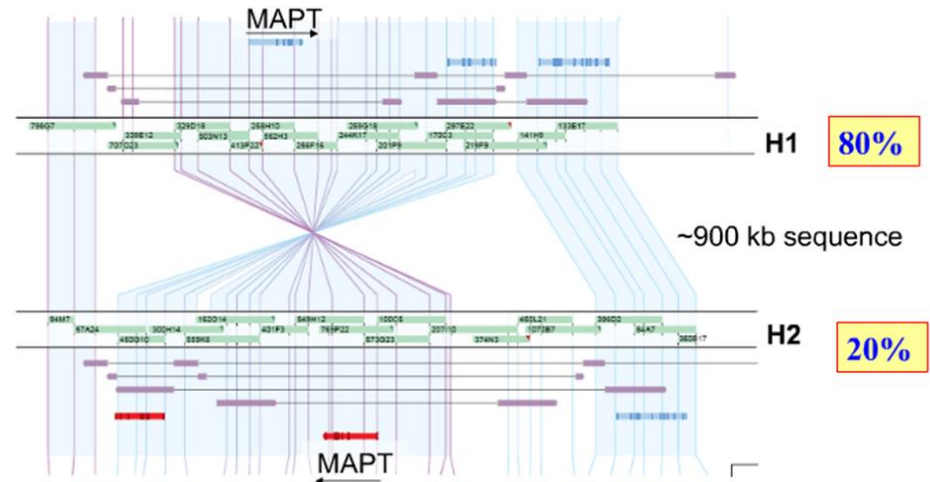


# Nealelická homologní rekombinace (NAHR) – inverze

- další rys lidského genomu, který hraje důležitou roli při vzniku chromozomových přestaveb
- např. Williams-Beuren, Angelman sy – rodiče přenašeči mají inverzi zahrnující deletovanou oblast
- inverze může způsobovat NAHR



17q21.31 microdeletion located in a region showing **inversion** polymorphism in ~20% of Europeans



Nová mikrolece 17q21.31

# Nově objevené mikrodeleční/mikroduplikační syndromy



## Genome wide array analysis – pathogenic CNVs

### New microdeletion (duplication) syndromes:

1q21.1	→ Klopocki et al. 2007
1q21.1	→ Mefford et al. 2008
1q44	→ van Bon et al. 2008
2p16.1p15	→ Rajcan-Separovic et al. 2007
2q23.1	→ Koolen et al. 2004
3q29	→ Willat et al. 2005
12q14.3q15	→ Menten et al. 2007
15q13.3	→ Sharp et al. 2008
15q24	→ de Vries et al. 2005
16p11.2	→ Weiss et al. 2008
17p11.2	→ Potocki et al. 2007
17q12	→ Mefford et al. 2007
17q21.3	→ Koolen et al. 2006

Table 1. Continued

Name	Size (Mb) <sup>a</sup>	LCR	MIM	Clinical features
16p13.1 microduplication	1.6	+	–	Association with autism, significance uncertain
16p13.1 microdeletion	1.6	+	–	MR, MC, epilepsy, short stature, phenotypic variability
17p11.2 microduplication <sup>b</sup>	3.7	+	610883	MR, infantile hypotonia, failure to thrive, autistic features, sleep apnoea, and structural cardiovascular anomalies
17q21.31 microdeletion	0.5	+	610443	MR, hypotonia, epilepsy, FD, e.g. tubular or pear shaped nose with bulbous nasal tip, heart anomalies, and renal/urological anomalies
22q11.2 microduplication	3.7	+	608363	Highly variable. MR, FD, e.g. widely spaced eyes and downsloping palpebral fissures, velopharyngeal insufficiency, conotruncal heart disease
22q11.2 distal microdeletion	1.4–2.1	+	611867	MR, prematurity, prenatal/postnatal growth delay, mild skeletal abnormalities, arched eyebrows, deep-set eyes, smooth philtrum, thin upper lip, hypoplastic alae nasi, small pointed chin
Xq28 microduplication	0.4–0.8	–	–	MR, severe hypotonia, progressive lower-limb spasticity, absent or very limited speech

LCR, low copy repeat; MR, mental retardation; MC, microcephaly; FD, facial dysmorphism

<sup>a</sup> Common region

<sup>b</sup> Potocki-Lupski syndrome

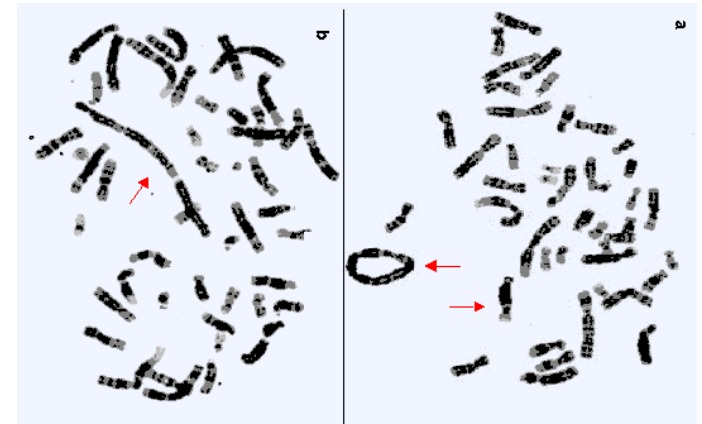
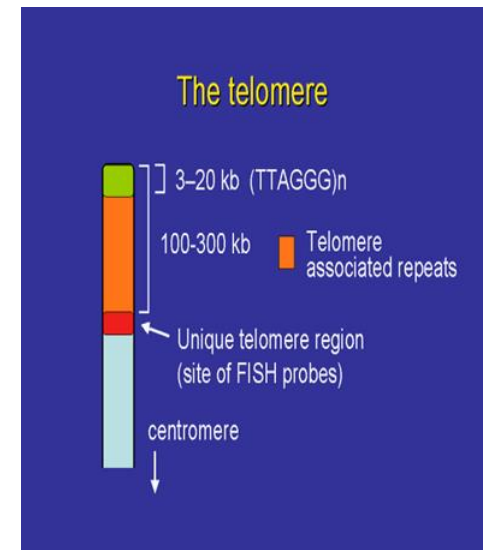


Fig. 2. Patients with newly recognized interstitial microdeletion syndromes. **a** 2p15p16.1 microdeletion, **b** 3q29 microdeletion, **c** 17q21.31 microdeletion and **d** distal 22q11 microdeletion. Informed consent was obtained for publication of photographs.

# Subtelomerické přestavby

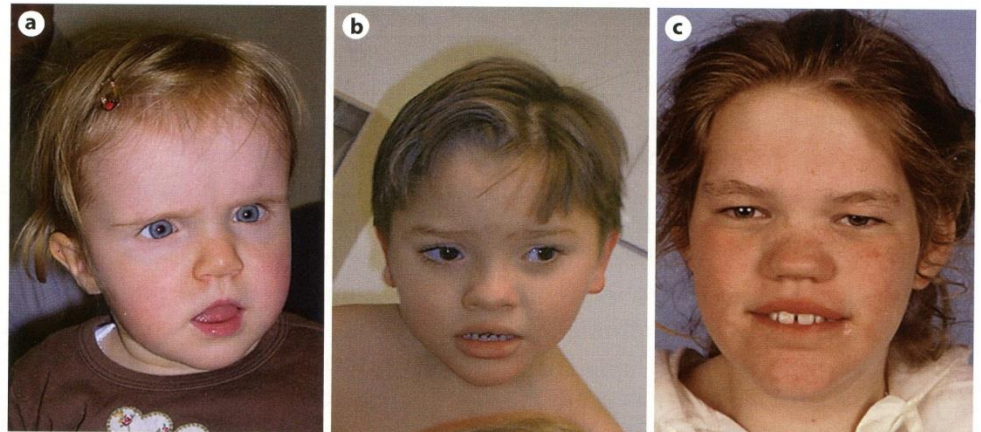
## Telomery

- ochrana konců chromozomů před působením exonukleáz
- párování homologních chromozomů v meióze
- udržují architekturu interfázního jádra
- replikace konců lineární DNA (telomeráza)
- stárnutí buněk – zkracování délky telomer
- pokud chybí → přestavby chromozomů (např. translokace, fúze, kruhové či nestabilní dicentrické chromozomy)



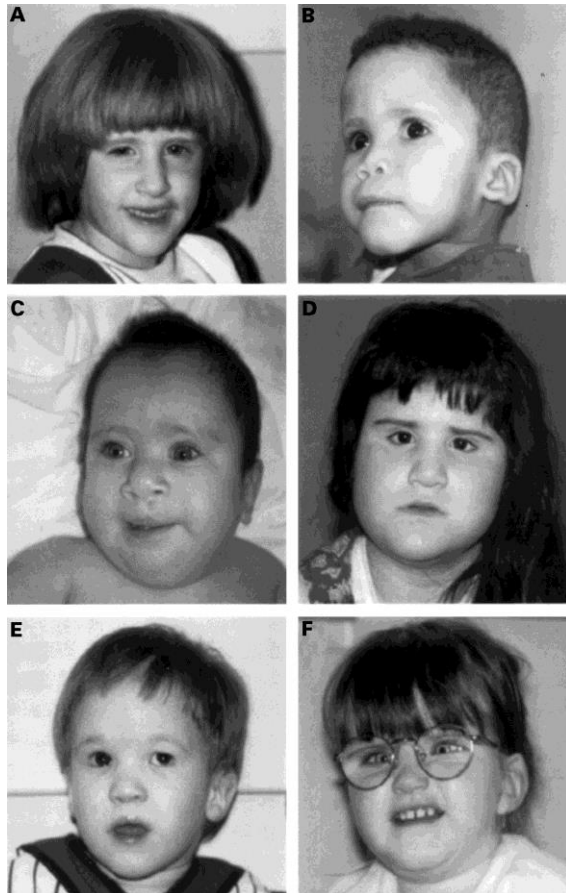
# Klinický význam přestaveb telomer

- subtelomerické oblasti na chromozomech – největší hustota genů v genomu
- aberace v této oblasti - příčina spontánních abortů, VVV a MR
- většinou neexistuje výrazná korelace genotyp-fenotyp
- jsou však i specifické syndromy:
  - delece 1p36 (Slavotinek)
  - delece 9q34
  - delece 22q13 (Phelan-McDermid)



**Fig. 1.** Clinical photographs of patients with subtelomeric deletions. **a** 1p36 deletion, **b** 9q34 deletion and **c** 22q13 deletion. Informed consent was obtained for publication of photographs.

# Jak hledat příčinu u pacientů s MR (a/nebo VVV)?



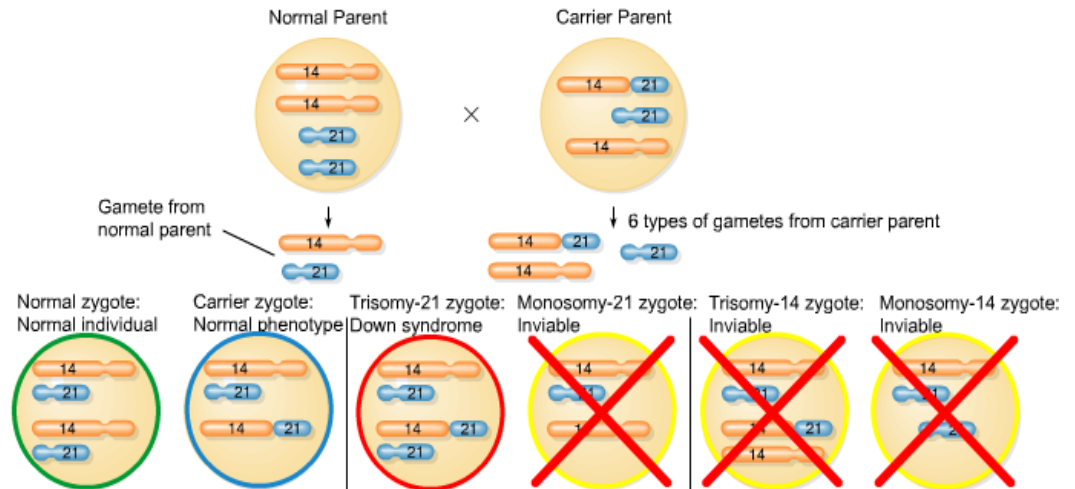
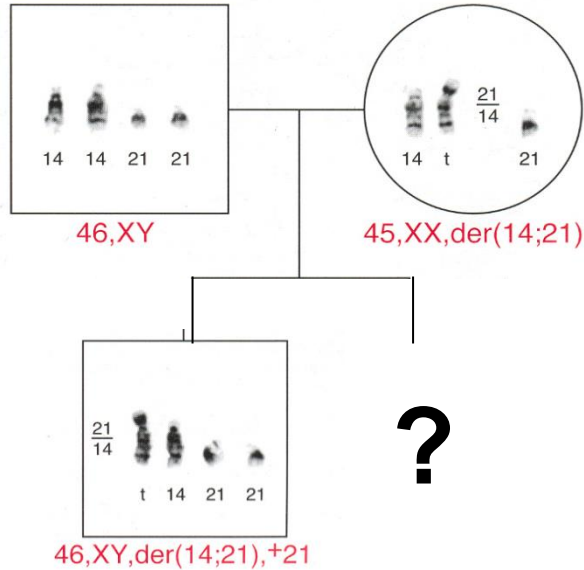
# Proč hledat příčinu MR?

---

- Umožní určit prognózu (především u malých dětí) - stanovení vhodných vyšetření – snížení neefektivních testů
- Umožní stanovit vhodný plán péče a léčbu
- Umožní stanovit riziko pro postiženou rodinu a podklady pro genetické poradenství



# Co by jste jim jako genetici řekli?

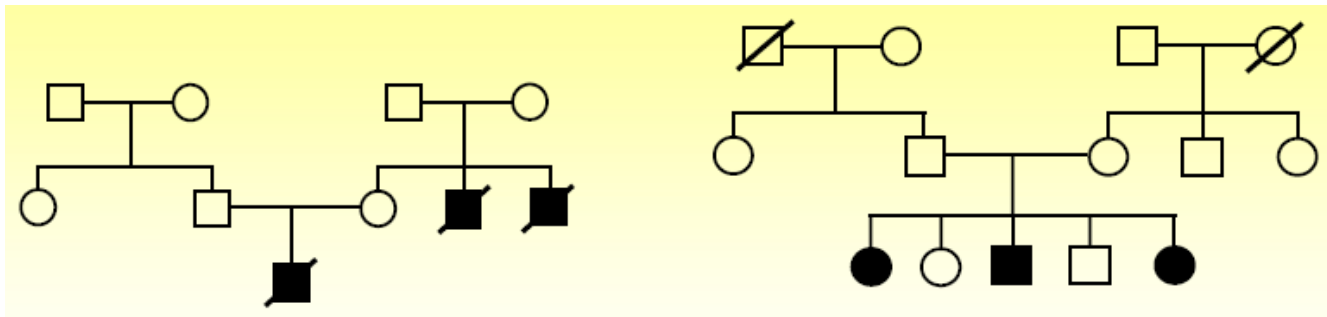


**přenašeč der(14;21) – teoretické riziko postižení dítěte D.S. 33 %  
populační studie – 10 až 15 %**

# Postupy při vyšetřování příčin MR

## Klinická část:

- **genealogická analýza** – solitární výskyt vs. suspektní X-vázané, AR, AD onemocnění, nemendelovský výskyt onemocnění



- **osobní analýza** – hledání možných příčin MR – od prenatálních po postnatální vlivy
- **fyzické zhodnocení** - zhodnocení fenotypu, přidružených VVV, dalších anamnestických dat



**Klinická diagnóza**

# Postupy při vyšetřování příčin MR

## Laboratorní část:

### „Cílené“ genetické vyšetření

- při klinickém podezření na konkrétní jednotku
- karyotypizace, cílené vyšetření mikródelečních syndromů (FISH, MLPA), cílené molekulárně-genetické vyšetření, FRAX

### „Necílené“ genetické vyšetření

- karyotypizace, necílená detekce submikroskopických přestaveb (MLPA), array-CGH, NGS

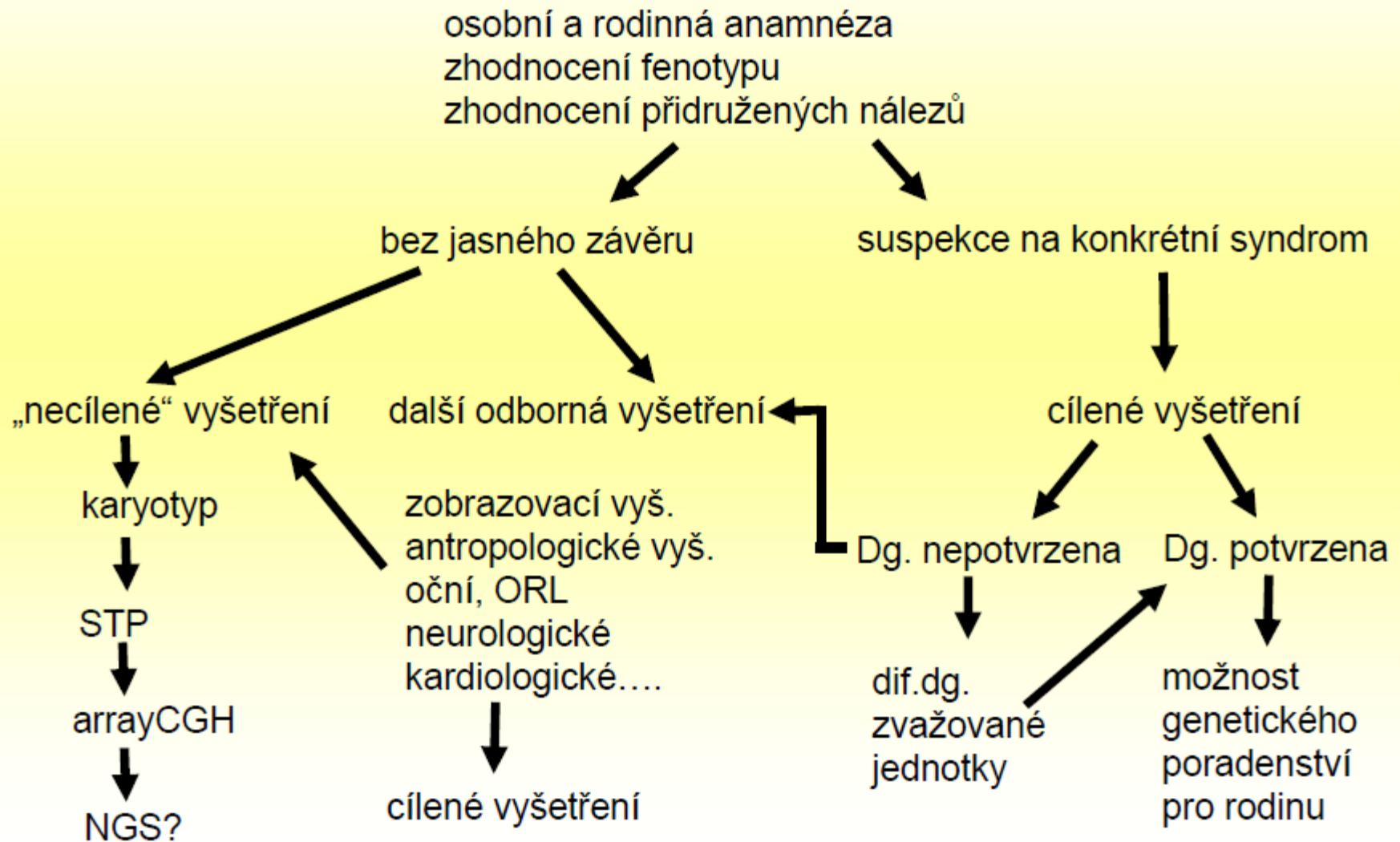
### Specializovaná vyšetření:

- Vyšetření metabolických vad
- Zobrazovací vyšetření a antropologické vyšetření
- Další odborná vyšetření



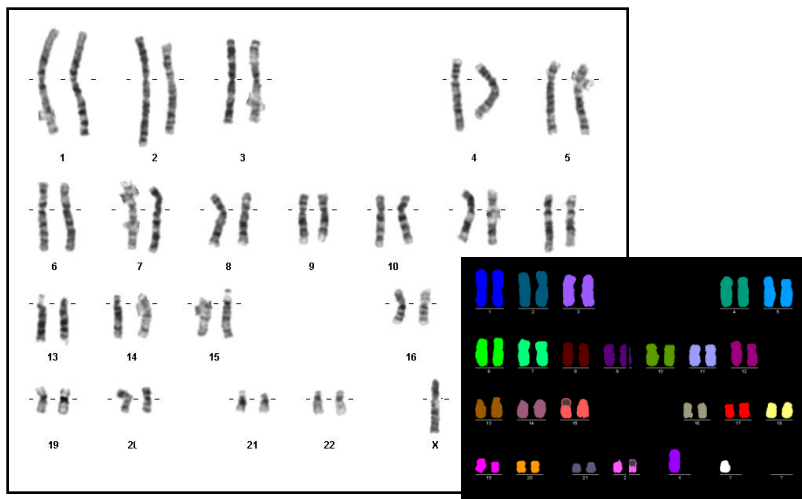
**Konečná diagnóza**

# Postupy při vyšetřování příčin MR



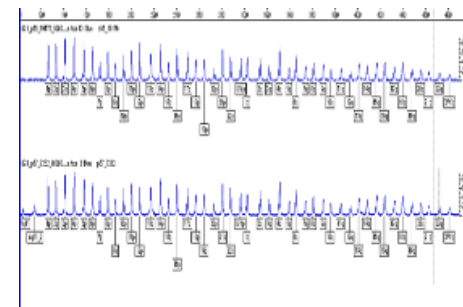
# Metody při vyšetřování příčin MR

- **Metafázní cytogenetika**

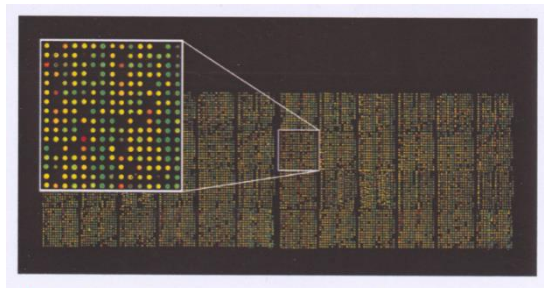


- **Cytogenetika založená na izolaci DNA**

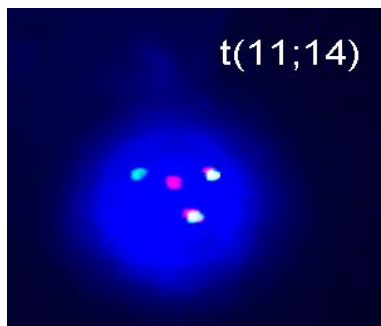
## MLPA



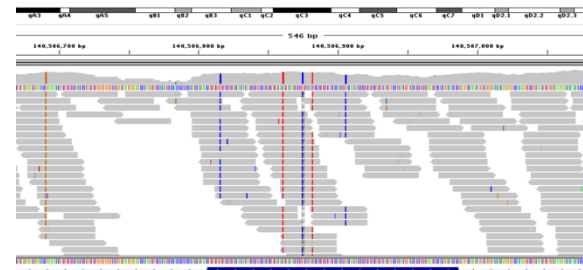
## Mikročipové technologie



- **Interfázní cytogenetika**  
**FISH**



## NGS



# Metody při vyšetřování příčin MR

- **FraX** (záchyt 1-2%)
- **Karyotyp** (balancované přestavby?)
- **FISH** – cílené vyšetření, ověřování nálezů z MLPA a aCGH, mozaiky
- **MLPA** – skrínink subtelomerických přestaveb a známých mikrolečních/duplikačních syndromů, detekce delecí/duplikací v známých genech (MECP2, DMD) u vybraných pacientů
- **aCGH** – celogenomový skrínink u vybraných pacientů (10-15%)
- **NGS** – celogenomový (exomový) skrínink

1970s - conventional karyotyping.

1990s - Sanger sequencing and FISH (+6–10%)

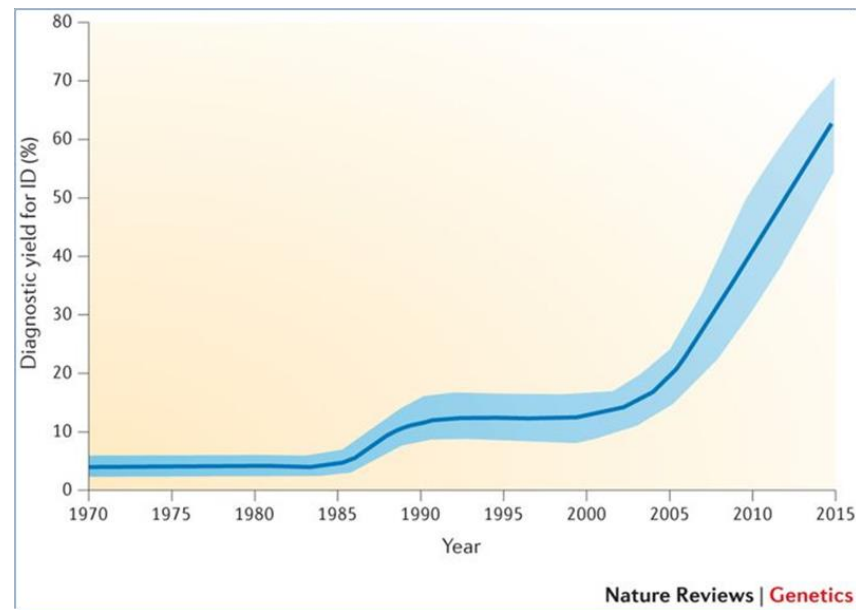
Beginning of this century - genomic microarrays (+15–23%).

2010 – WES (+24–33%)

2014- WGS (+26%),

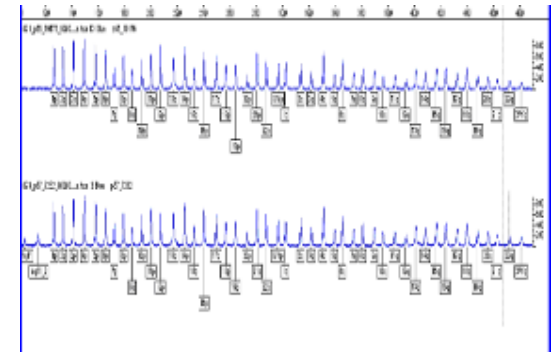
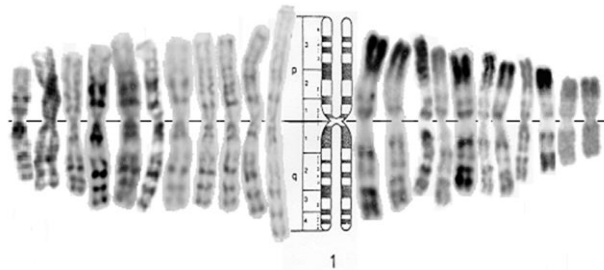
An overall diagnostic yield of 55–70% for moderate to severe ID.

Vissers et al., 2015



# Molekulární karyotypování – 1000x citlivější než klasická cytogenetika

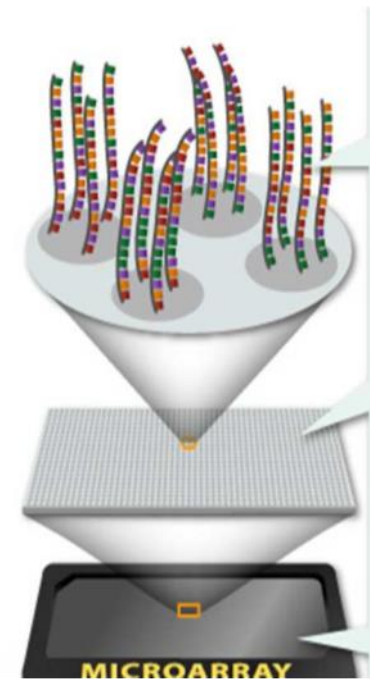
		Resolution	Coverage
<b>a Cytogenetics</b>	Karyotyping	> 10 Mb	Complete
	SKY	> 2 Mb	Complete
	Traditional CGH	> 2 Mb (cytoband)	Complete
	FISH (interphase)	≥ 20 Kb	Probe Specific
	FISH (metaphase)	≥ 100 Kb	Probe Specific
<b>b aCGH</b>	BAC	100 Kb (Spectral Genomics - 2 Mb)	Complete
	cDNA	2 Kb	Genes Only
	Oligo (60-mer)	0.06 Kb	Complete



# Moderní metody analýzy genomu: DNA čipy



- **princip:** hybridizace značené vyšetřované DNA s imobilizovanými sondami na čipu
- **sondy:** jednotlivé **molekuly DNA o známé sekvenci**, které jsou upevněny ve shlucích (spoty) na pevném podkladu (sklo, mikrokuličky...)
- **počet spotů:** od řádově stovek do milionů podle typu čipů
- **historie:** Southern blot (polovina 70. let), skutečné mikročipy - polovina 90. let 20.st., pak masivní rozvoj a vývoj různých adaptací a variací; komerční trh

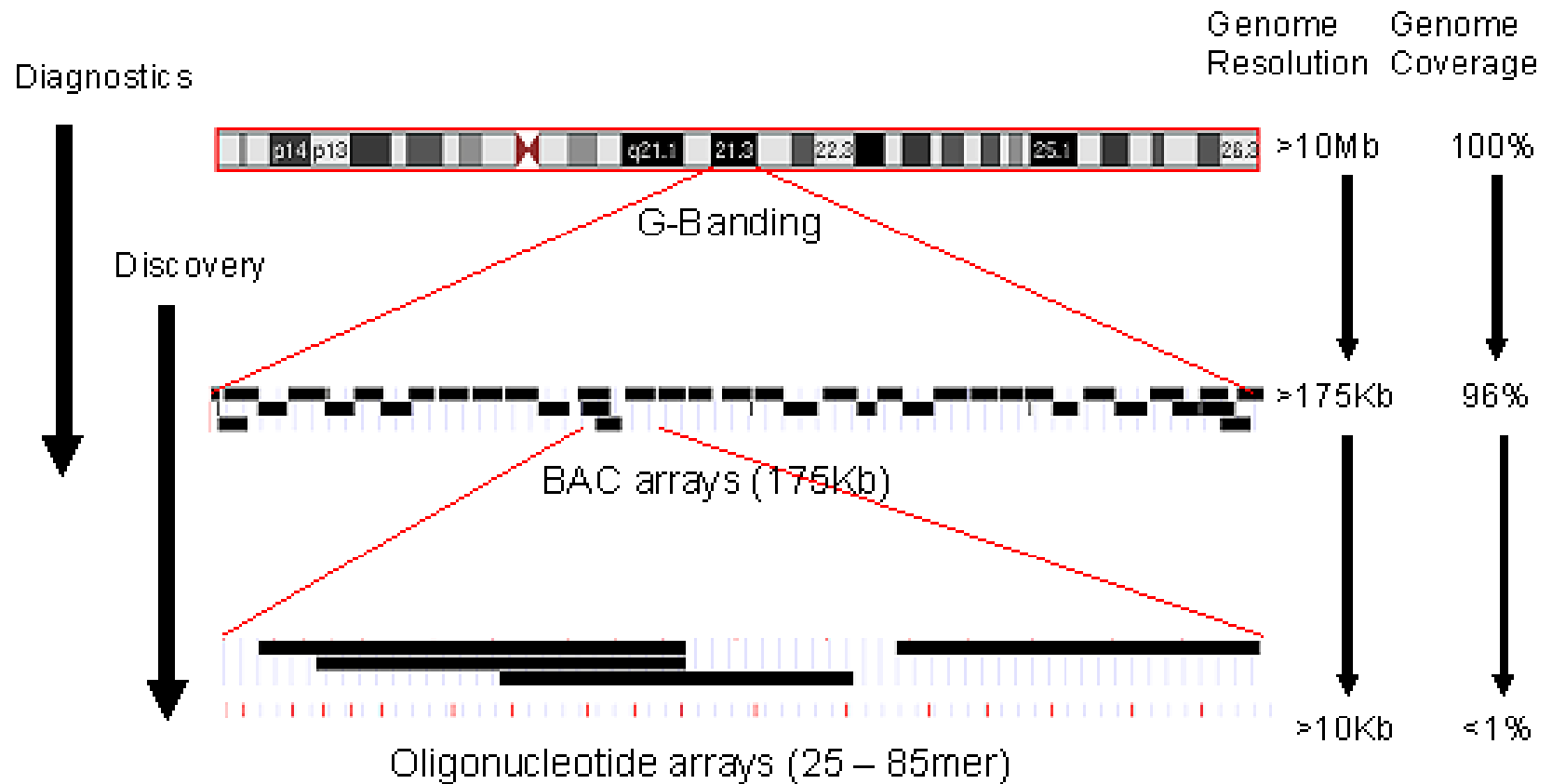


**Array-CGH:** detekce zisků a ztrát na úrovni DNA  
**SNP-arrays:** oblasti ztráty heterozygotnosti (AOH)

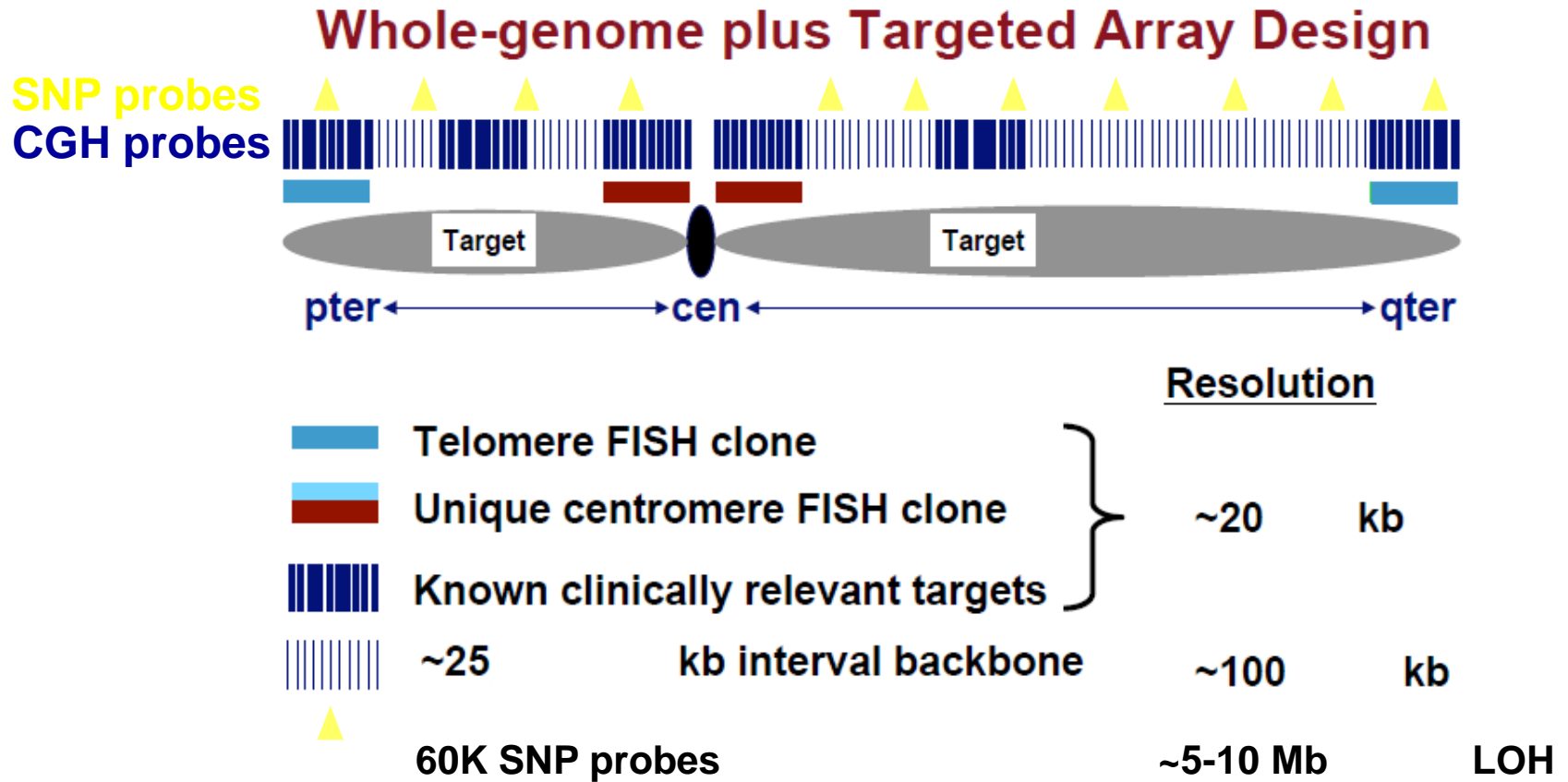


# Typy DNA čipů

## Zdroje cílových DNA

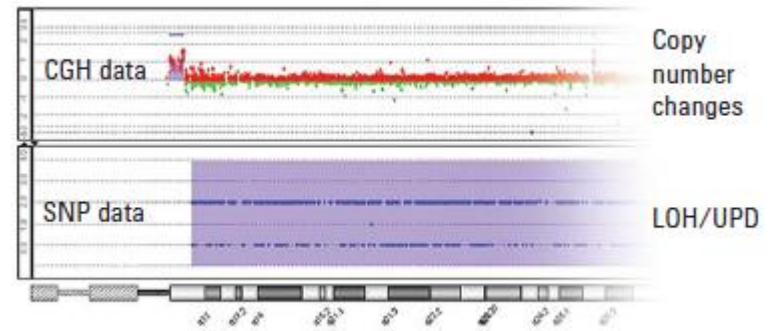
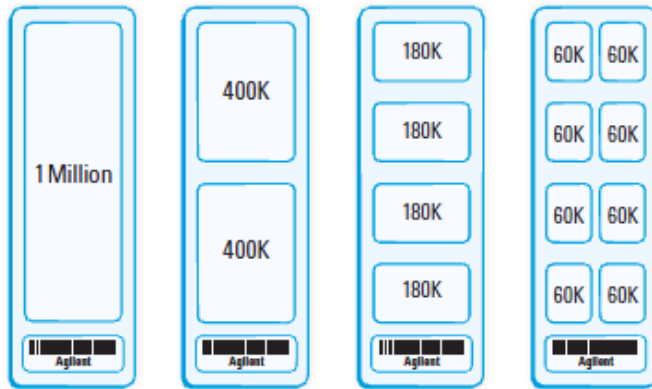


# Agilent ISCA CGH+SNP Microarray



Baldwin et al., Genet Med 2008

# Agilent Human CGH Microarray



## CGH-only

Description	Part Number	Number of targeted ISCA regions	Backbone probe density
ISCA 4x180K v2	G4826A AMADID 031748	~500	25 Kb
ISCA 8x60K v2	G4827A AMADID 031746	~500	60 Kb
ISCA 2x105K v2	G4425B AMADID 031750	~500	35 Kb
ISCA 4x44K v2	G4426B AMADID 031747	~230	75 Kb

Format	Part Number	Median CGH probe spacing	Area of Focus	LOH/UPD resolution
2x400K	G4842A	7kb	Exons	~ 5-10Mb
4x180K	G4890A	25kb	ISCA* regions	~ 5-10Mb

# Array CGH: The Complete Process

Step 1

Patient DNA      Control DNA

Step 2

Step 3

Step 4

HYBRIDIZATION

Equal hybridization      DNA dosage loss      DNA dosage gain

**Steps 1-3** Patient and control DNA are labeled with fluorescent dyes and applied to the microarray.

**Step 4** Patient and control DNA compete to attach, or hybridize, to the microarray.

**Step 5** The microarray scanner measures fluorescent signal intensity.

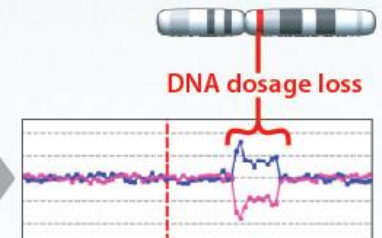
**Step 6** Computer software gathers the data and generates a plot.

Step 5

Step 6



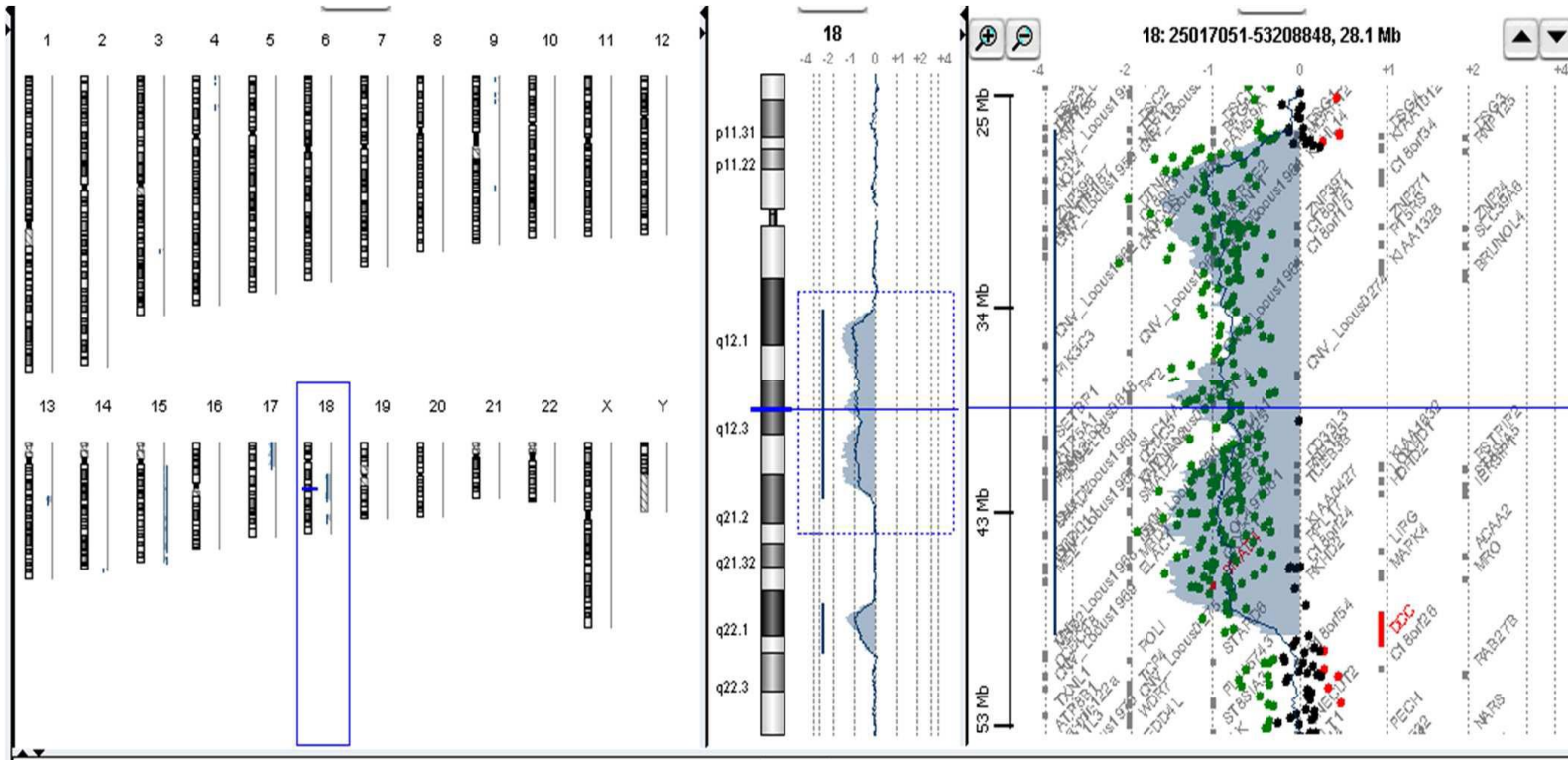
COMPUTER SOFTWARE



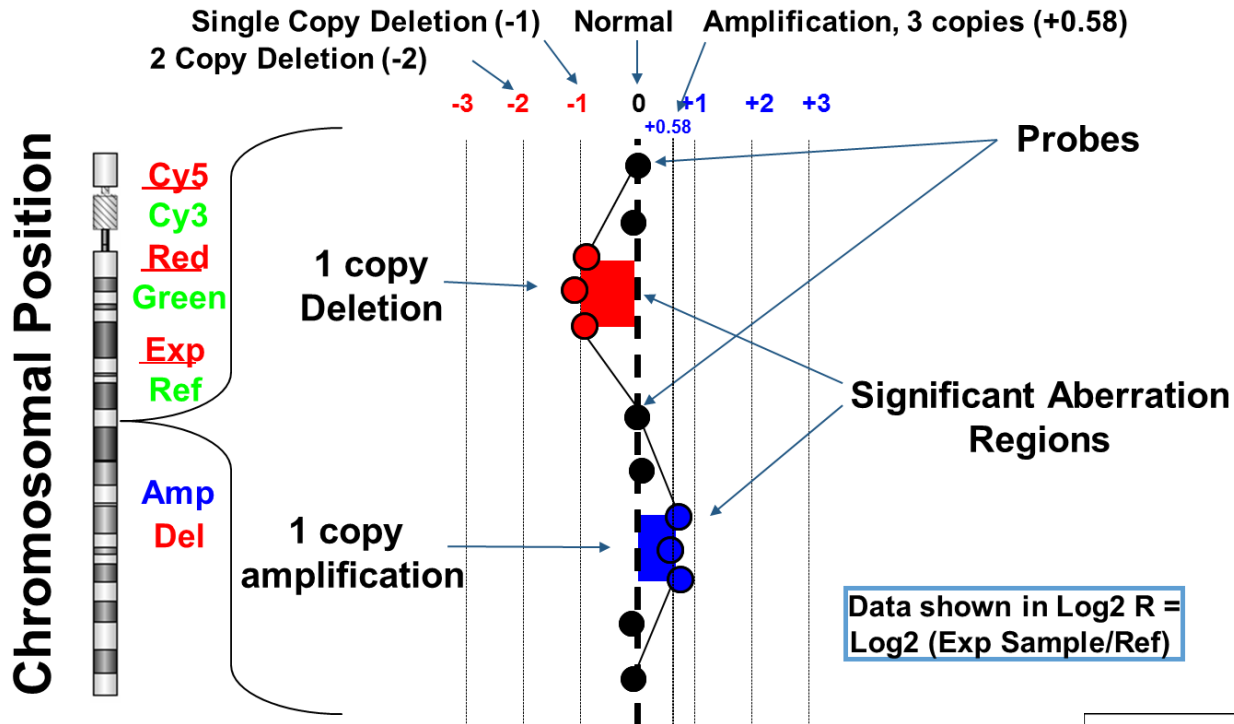
DATA PLOT  
(Chromosome 7)

# Vyhodnocování array-CGH

aCGH Analytics Software, Agilent Technologies



# Princip hodnocení array-CGH dat

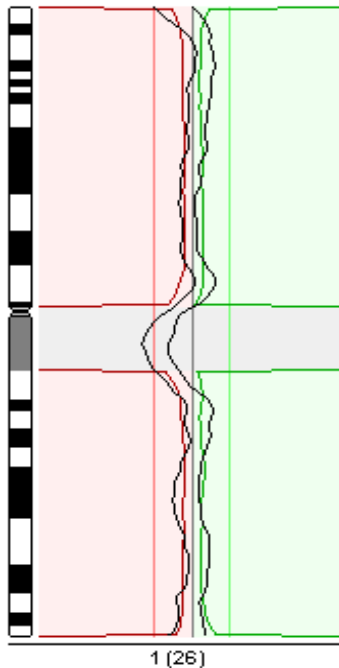


Hodnotíme rozdíl mezi intenzitou fluo signálu mezi vzorkem DNA a referencí vyjádřený jako  $\log_2 X (= \text{vzorek} / \text{reference})$ . Data jsou lehce komprimovaná kvůli biologické variabilitě vzorku

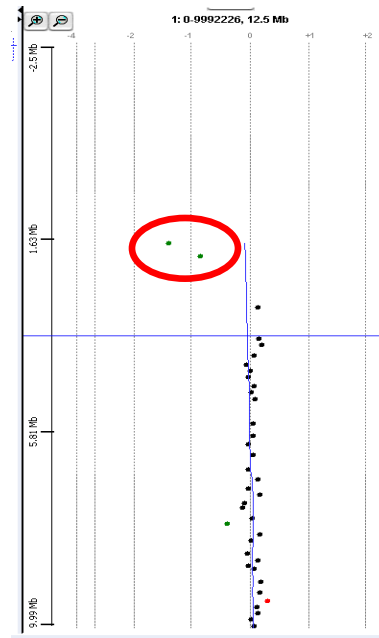
Description	Average Sample CN	Ref CN	Ratio (S/R)	Ideal Log2(Ratio)	Actual data
Diploid	2	2	1	0	0
Deletion	1	2	0.5	-1	-0.9
Trisomy	3	2	1.5	+0.58	+0.53
50% mosaic deletion	1.5	2	0.75	-0.41	-0.37
50% mosaic trisomy	2.5	2	1.25	+0.32	+0.29
20% mosaic deletion	1.8	2	0.9	-0.15	-0.13
20% mosaic trisomy	2.2	2	1.1	+0.14	0.12

# Porovnání záchytu chrom. aberací pomocí HR-CGH a oligonukleotidových čipů – různý formát

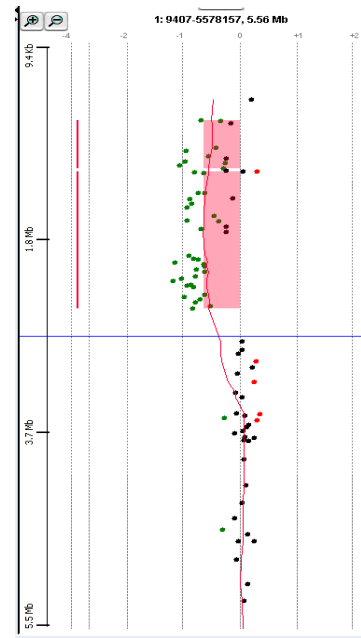
Pacient s del(1)(p36), ~ 3,2 MB



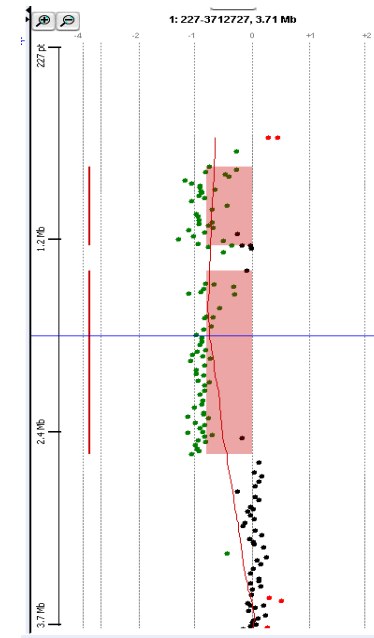
Karyotyp normální  
HR-CGH negativní



8x15K negativní



4x44K del(1)(p36)



2x105K del(1)(p36)

# Výhody a nevýhody array-CGH

## Advantages of array-CGH

- Ability to analyze **DNA from nearly any tissue**, including archived tissue or tissue that cannot be cultured.
- Detection of abnormalities that are **cytogenetically cryptic** by standard G-banded chromosome analysis.
- **Better definition and characterization of abnormalities** detected by a standard chromosome study.
- Ability to **customize the platform** to concentrate probes in areas of interest.
- A ready interface of the data with **genome browsers and databases**.

## Limitations of array-CGH

- The **inability to detect** genetic events that do not affect the relative copy number of DNA sequences, e.g., molecularly **balanced chromosomal rearrangements**.
- **Low-level mosaicism** for unbalanced rearrangements and aneuploidy may not be detected.
- **Ploidy levels** may be difficult to detect.
- Copy number variations (CNVs) of genomic regions not represented on the platform will not be detected.
- Current array-CGHs are not designed to detect duplications and deletions **below the level of detection** according to probe coverage and performance, point mutations, gene expression, and methylation anomalies that may contribute to the patient's phenotype.



# Význam array-CGH u pacientů s MR

- hledání příčin u pacientů s MR, VVV, dysmorfickými črtami a normálním anebo zdanlivě balancovaným karyotypem
- definování a upřesnění mikrolečních/mikroduplikačních syndromů
- původ nadbytečného materiálu, marker chromozomů ...

## REVIEW

### Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects

Gurdeep S. Sagoo, MSc, PhD<sup>1</sup>, Adam S. Butterworth, BA, MSc<sup>2</sup>, Simon Sanderson, MRCP, FFPH<sup>3</sup>, Charles Shaw-Smith, MA, PhD<sup>4</sup>, Julian P. T. Higgins, BA, PhD<sup>5</sup>, and Hilary Burton, MA, FFPH<sup>3</sup>

Table 2 Genetic abnormalities identified by array CGH in idiopathic learning disability and congenital anomalies

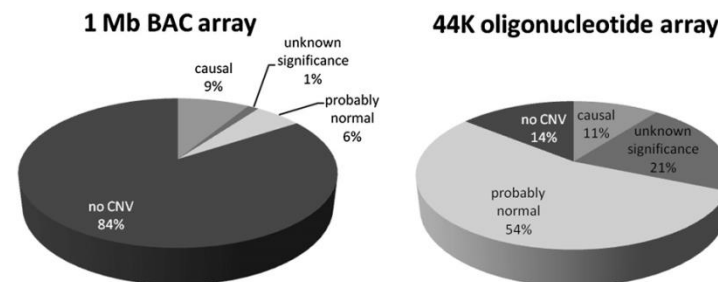
Author (year)	Resolution	Patients	Patients with noncausal abnormality	False-positive yield (%)	Patients with casual abnormality	Diagnostic yield (%)
Visser et al. (2003)	1 Mb	20	1	5.0	2	10.0
Shaw-Smith et al. (2004)	1 Mb	50	5	10.0	7	14.0
de Vries et al. (2005)	50 Kb	100	5	5.0	10	10.0
Schoumans et al. (2005)	1 Mb	41	NS <sup>a</sup>	NS <sup>a</sup>	4	9.8
Menten et al. (2006)	1 Mb	140	9	6.4	19	13.6
Miyake et al. (2006)	1.4 Mb	30	20	66.7	5	16.7
Rosenberg et al. (2006)	1 Mb	81	7	8.6	13	16.0
Sharp et al. (2006)	Targeted	290	7	2.4	16	5.5
Aradhya et al. (2007)	35 Kb	20	3	15.0	7	35.0
Baris et al. (2007)	1 Mb	234	12	5.1	13	5.6
Baross et al. (2007)	30 Kb	100	1	1.0	11	11.0
Engels et al. (2007)	0.5 Mb	60	1	1.7	6	10.0
Fan et al. (2007)	30-35 Kb	100	1	1.0	15	15.0
Lu et al. (2007)	Targeted	2444	231	9.5	171	7.0
Shaffer et al. (2007)	Targeted	8789	445	5.1	604	6.9
Shen et al. (2007)	35 Kb	211	9	4.3	16	7.6
Thureson et al. (2007)	1 Mb	48	2	4.2	3	6.3
Wagenstaller et al. (2007)	23.6 Kb	67	13	19.4	11	16.4
Pickering et al. (2008)	1 Mb	1101	47	4.3	86	7.8

<sup>a</sup>Not stated: a total of 151 copy number polymorphisms (CNP) detected in the cohort; number of patients with CNPs not stated.

Záchyt CNVs pomocí array CGH u pacientů s MR/VVV závisí na:

- typu čipu, rozlišení
- pokrytí známých syndromů
- kritériích výběru pacientů

Literární údaje: 4 až 28 %

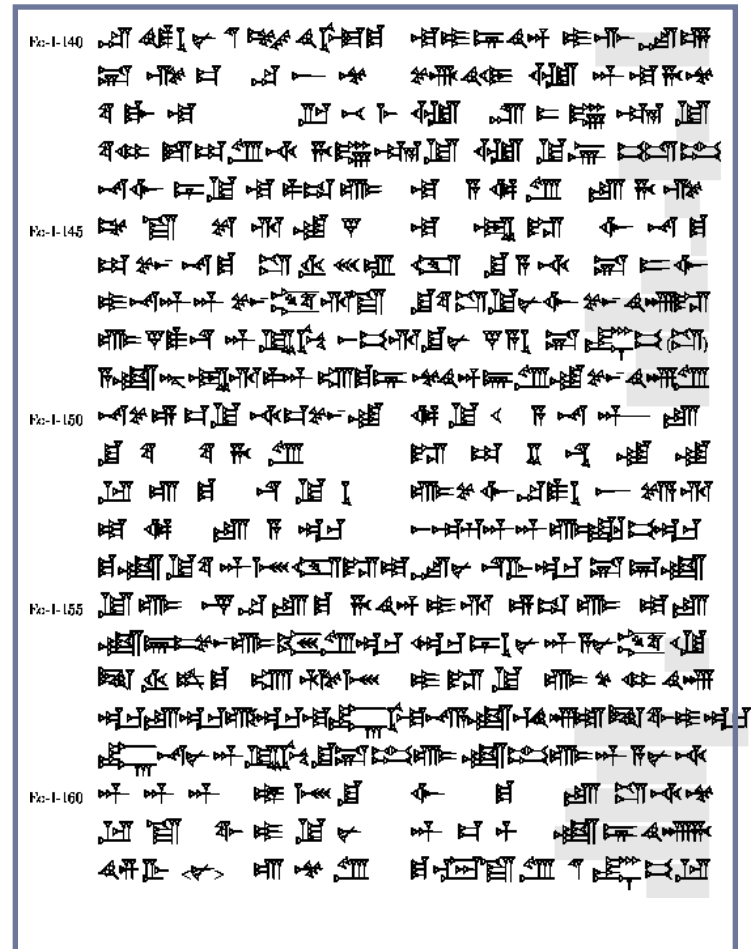


## **Doporučená kritéria určená pro klinickou preselekcí pacientů s MR (de Vries et al. 2001)**

<b>Výskyt MR v rodině</b>	<b>1</b>
<b>Prenatální růstová retardace</b>	<b>2</b>
<b>Postnatální růstové abnormality</b>	<b>2</b>
<b>Mikrocefalie, krátké končetiny, Makrocefalie, dlouhé končetiny</b>	<b>po 1 bodu (max.2)</b>
<b>Faciální dysmorfie – dva a více příznaků, zejména hypertelorismus, anomalie nosu, uší</b>	<b>2</b>
<b>Jiné vrozené abnormality, zejména srdeční vady, hypospadie</b>	<b>po 1 bodu (max.2)</b>
<b>skóre <math>\geq 3</math>, senzitivita = 1.00, specificita = 0.27</b>	

# Array-CGH a variabilita v počtu kopií (CNVs)

- se stále se zvyšujícím rozlišením je stále obtížnější nalézt hranici mezi **benigními** (polymorfními) a **patogeními CNVs**
- získat data je **snadné**
- interpretovat výsledek je **obtížné**
- **existuje normální karyotyp?**



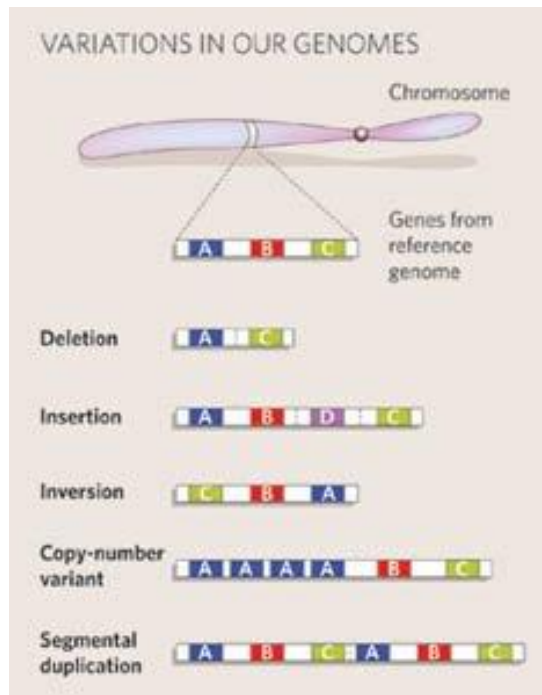
# Array-CGH a CNVs

Global variation in copy number in the human genome

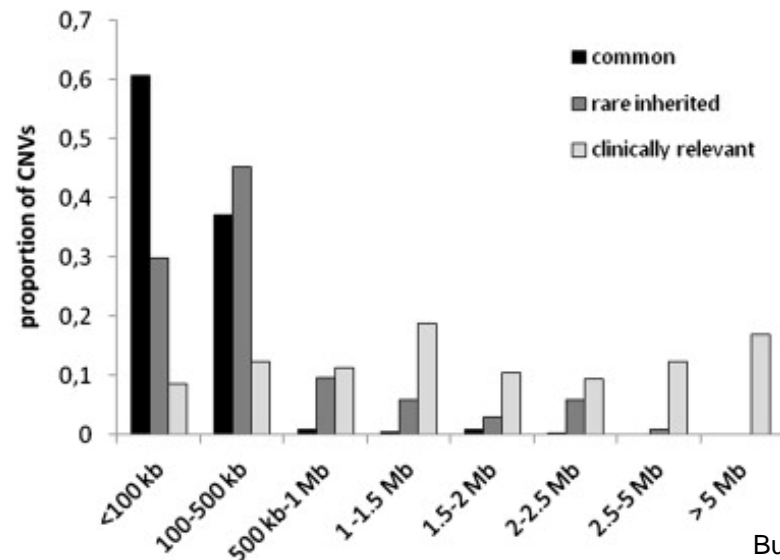
Richard Redon et al.: *Nature*. 2006 November 23; 444(7118): 444–454.

**CNVs – segmenty DNA větší než 1 kb přítomné ve variabilním počtu kopií v porovnání s referenčním genomem**

- doposud detekováno 29 133 CNV
- 12 % lidského genomu obsahuje CNV
- 0,12 - 7,3 % rozdíly v CNV mezi jedinci
- 41 % všech CNV pokrývá geny



**CNV patogenní x benigní**  
**CNV nejasného významu**



# Interpretace CNV nalezených pomocí array-CGH v klinické genetice – rozhodovací kritéria

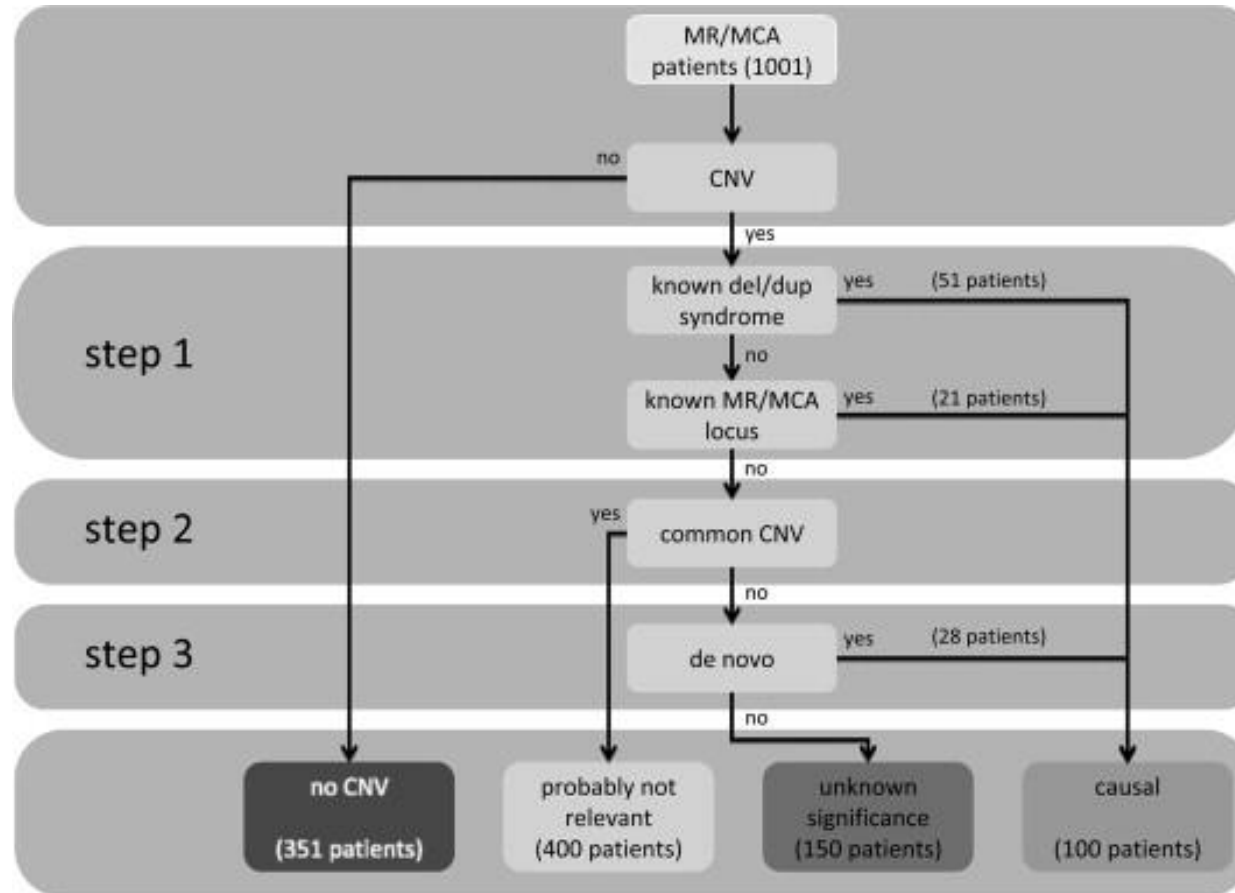
## Risk assessment of CNVs



Major Criteria	Characteristic of Pathogenic CNVs	Characteristic of Benign CNVs
1 a CNV is inherited from a healthy parent b CNV is inherited from an affected parent	X	X
2 a CNV is similar to a CNV in a healthy relative b CNV is similar to a CNV in an affected relative	X	X
3 a CNV overlaps a genomic imbalance in DGV b CNV overlaps a genomic imbalance in Decipher or ECARUCA	X	X
4 CNV contains morbid OMIM genes	X	
5 a CNV is gene rich b CNV is gene poor	X	X

Minor Criteria	Characteristic of Pathogenic CNVs	Characteristic of Benign CNVs
1 a CNV is a deletion b CNV is a homozygous deletion	X X	
2 a CNV is a duplication b CNV is an amplification	X	X
3 CNV is > 3 Mb in size	X	
4 CNV is devoid of known regulatory elements		X

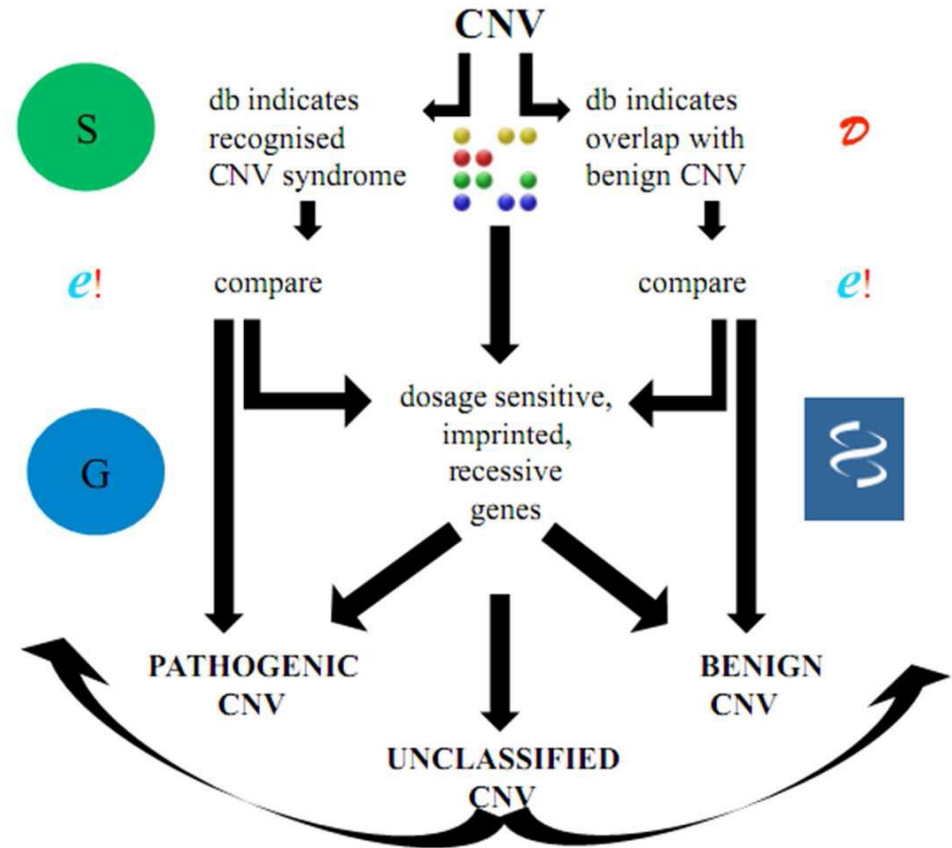
# Používaný algoritmus vyšetření pomocí aCGH



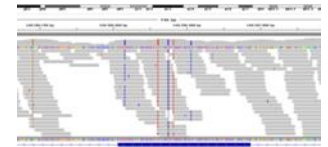
# Interpretace array CGH

## Vždy v kontextu

- s fenotypem pacienta
- s vyšetřením rodičů
- s databázemi

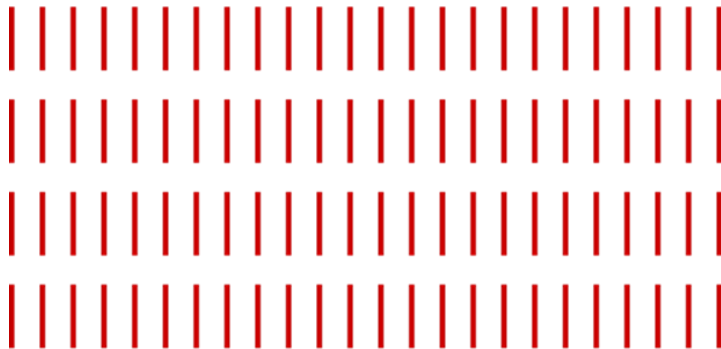


# Moderní metody analýzy genomu: NGS

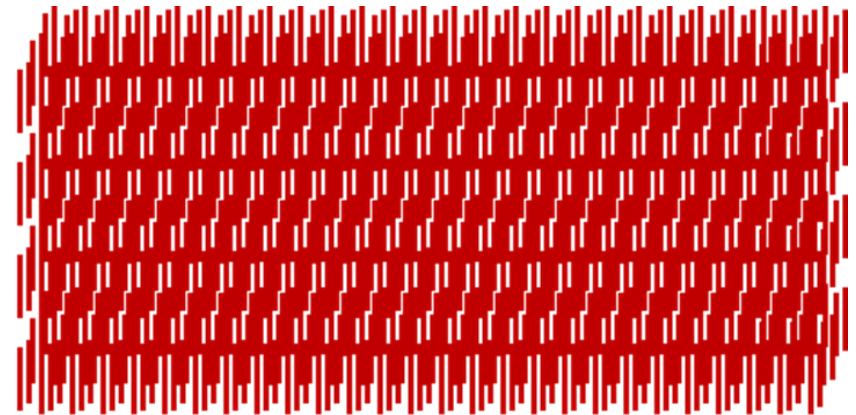


- zavedeno do genetických laboratoří asi před 10 lety
- dnes široce využívána metoda, která nahrazuje (nahradila) klasické sekvenování

## Tradiční sekvenování vs. NGS



96 DNA fragmentů  
sekvenováno zároveň

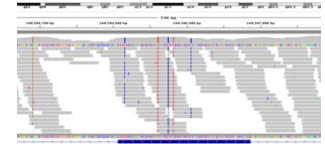


Milión DNA fragmentů  
sekvenováno zároveň





# Využití NGS



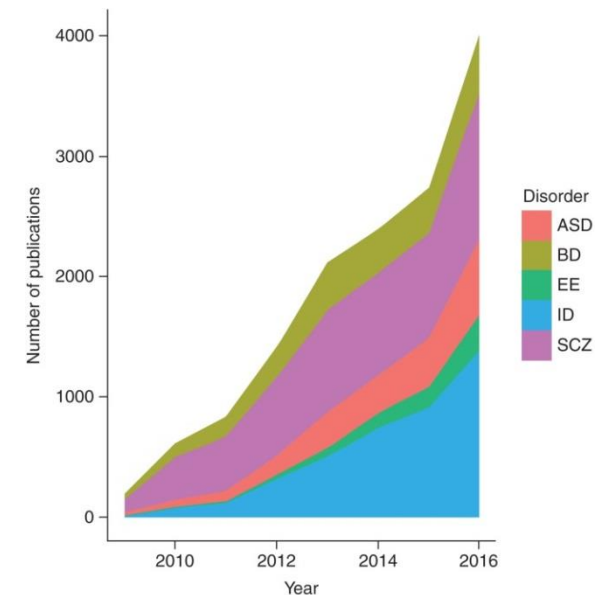
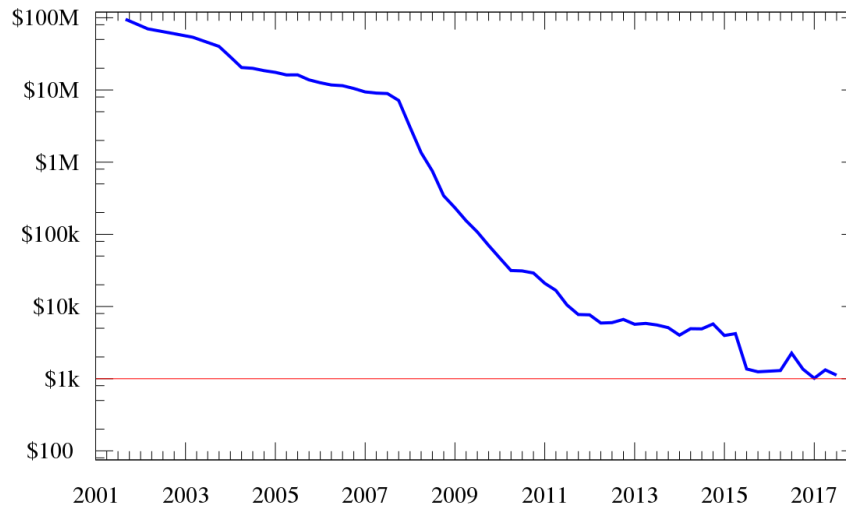
## Výzkum

- objevování nových genů asociovaných s lidskými nemocemi
- odhalování molekulárního podkladu komplexních nemocí

## Diagnostika

- v posledních letech široké využití i v klinické laboratoři
- krátká doba odezvy a **snižující se náklady**
- dědičné nemoci, infekční nemoci, nemoci imunitního systému, neinvazivní prenatální diagnostika i onkologické onemocnění

Cost to sequence a human genome (USD)



Number of publications in PubMed using the search terms "next-generation sequencing," "autism spectrum disorder" (ASD), "intellectual disability" (ID), "epileptic encephalopathy" (EE), "schizophrenia" (SCZ), and "bipolar disorder" (BD) annually since 2009  
Cold Spring Harb Perspect Med. 2017 Mar;7(3):a026864.

# NGS a MR

## Výzkum

- objevování nových genů asociovaných s MR
- Příklad: **Schinzel-Giedion syndrom**
- Zřídkaivé sporadické onemocnění, bez rodinné historie



Variants	Patient with SGS	Genes with variants in other SGS patients
Variants in genes	12,196	3,331
Variants affecting protein	5,556	1,634
Variants not in normal population	180	<b>1</b>

Schinzel & Giedion. Am J Med Genet 1978

Hoischen et al. Nat Genet 2010

Additional proof: Healthy parents do not carry the mutation!

# De novo mutace u pacientů s MR

Diagnostic ex  
in 100

Positive diagnosis

All mutations

De novo mutations

Autosomal domin

X-linked

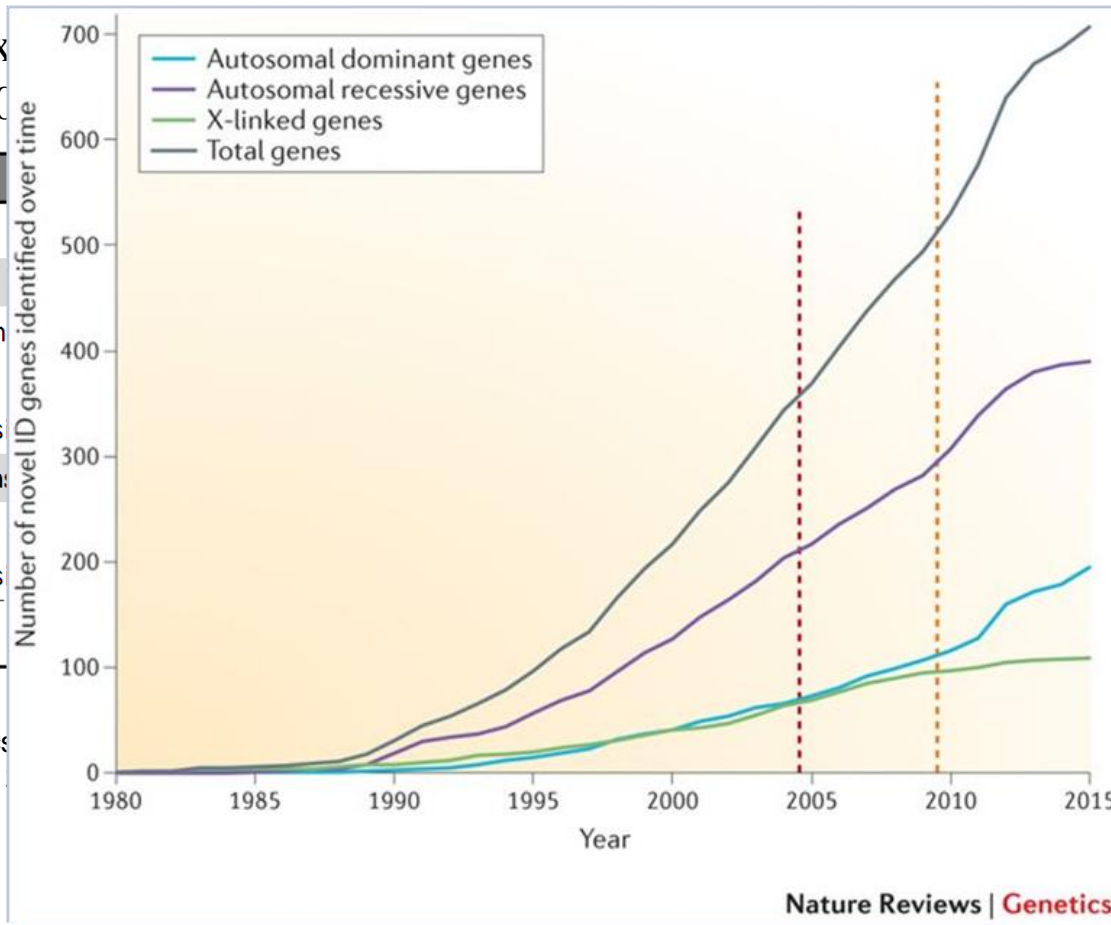
Autosomal recess

Inherited mutation:

X-linked

Autosomal recess

Candidates



didate ID genes

Gene description

synaptic plasticity associated with NMDA  
aling. Depletion of DLG4 changes the ratio of  
inhibitory synapses in hippocampal neurons.

ine phosphatase that mediates a feedback  
p38-p53 signaling, thereby contributing to  
tion and suppression of stress-induced apoptosis.

brane-associated small GTPase involved in  
processes. In the synapses, it mediates the  
F-actin cluster formation by SHANK3.

F-β activity and BMP-SMAD1 signaling. Functions  
optional co-repressor.

of the spliceosome with pleiotropic roles during  
ession. Functions in efficient cotranscriptional  
ing.

scription factors regulating embryonic  
. Plays a critical role in neuronal progenitor  
by regulating the timing of differentiation.

us nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) functioning  
mediated mRNA stabilization complex and SMN  
I in the APOB RNA editing complex.

al activator of matrix metalloproteinase 3  
ator of various other transcriptional activators.

ine kinase regulating chromatin assembly.  
NA replication, transcription and repair and  
ne segregation.

ligase involved in the ubiquitin fusion degradation  
ards against excessive spreading of ubiquitinated  
damaged chromosomes in DNA repair.

Vissers et al. Nature Genetics  
2010; de Ligt et al. NEJM 201

Lelieveld et al. Nature Neuroscience 2016

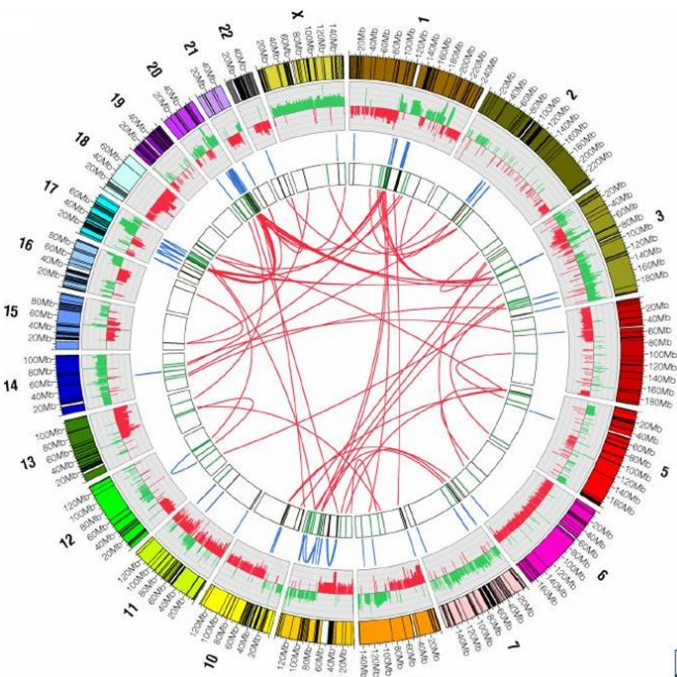
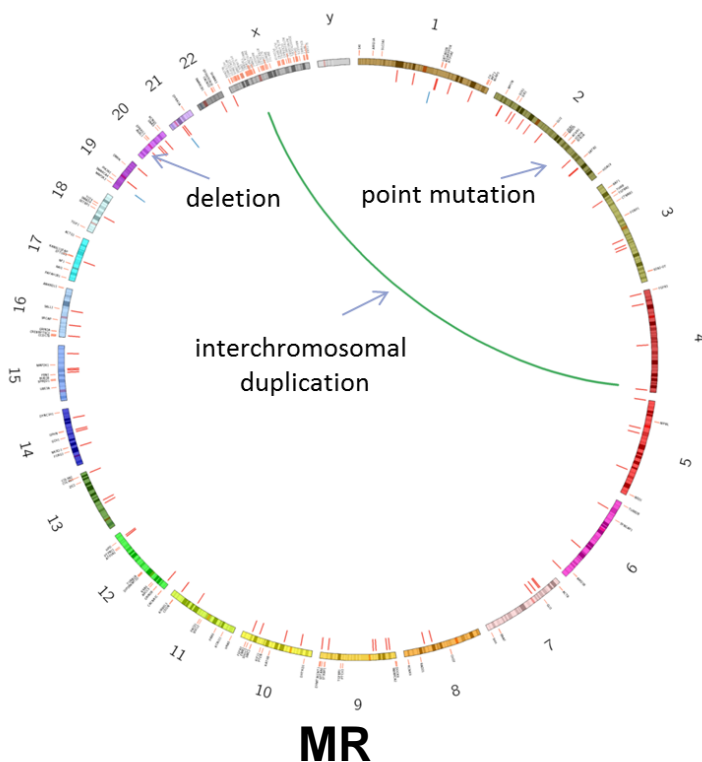
# NGS a MR

```
TTAACCCCTTCGAATGCTCATCAAPCGTATCTCCCGAAATGTCTTTATG  
TATCTTACTCCACCACATATCTACGAATCAATGTTTATGATGGTCAG  
GTTTGTAAACAAGTATTGAATCTGATAATCGCAAGTGTGTAATATGA  
GCAAAATACAAAATCTTGGATTCTATCGATAACAGCCGAGTGCACATC  
TACAAATAAAAAGCTTACTTGGACTTTGACAGTGGACACTCAAAGAA  
TGCAAGTATATATATGGCAACCTATCTCGAGCTGCCAGAGCTTAAT  
TCTATGAATAAACTGGCTTATTGAAGTACCATCTACATTTTAAACAAGT  
TGTTCTTTTAAATCACCTACGAAAGATAACTACTCAAAGCTTCAA  
AAGCTTTCTAACATATCAAAGTGATCATAATTCTGAAAATCCTTATAT  
GATTAGCACAGAAGATGGATTTTAACTTGGCTCTAATTTCCGTGATA  
AAAAAGGAAGAGGAGGTGGTTTGTAACTATTCAGACATCCATCTATC  
CTAATCCAATCTGGTATAATAAAAAGATCAGAAGGTTTACTATTAACAT  
CAAATTCACATCTTTAAAGCTGATTTGATCGAGATGAGATGACAAAT  
CAAATCCCATGTGCCAATCTCAACAAGCTTGTATTGAACCTCAGAAAT  
AAAATCTATAACAAGCAATCAAATGTCGGCTTGGTCCAAGTCAAATACC
```

## Diagnostika

MR – velké množství genů, široké spektrum fenotypových projevů  
NGS

- umožňuje testovat velký počet genů zároveň – finančně výhodné
- „všechny“ varianty v jednom experimentu



Nádorové  
onemocnění



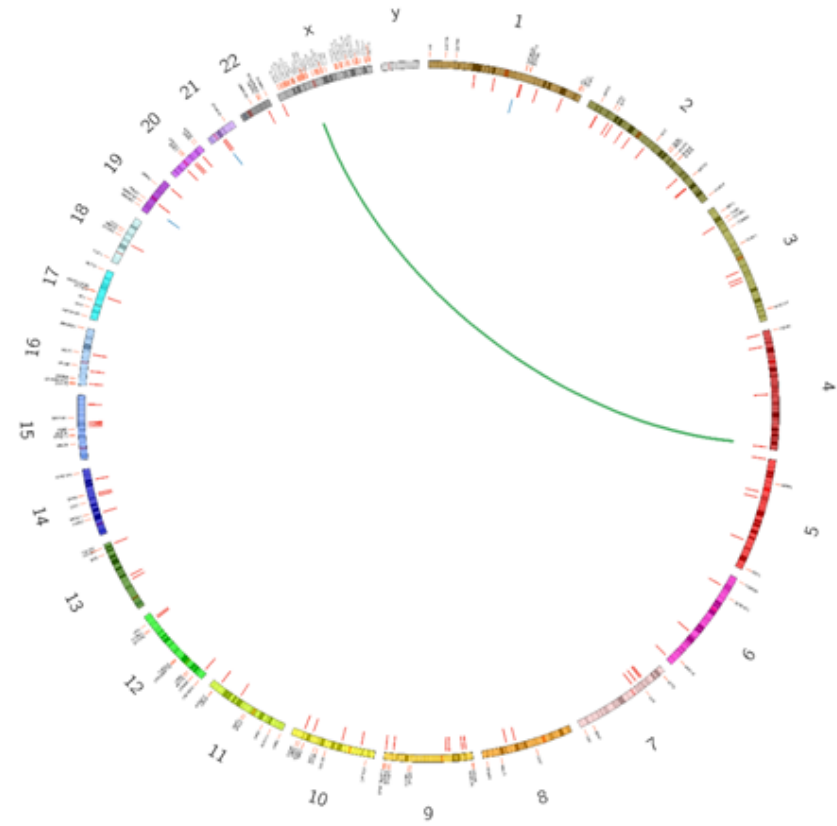
Prof. J. Veltman, Newcastle  
Univerzity, 2018

Patient

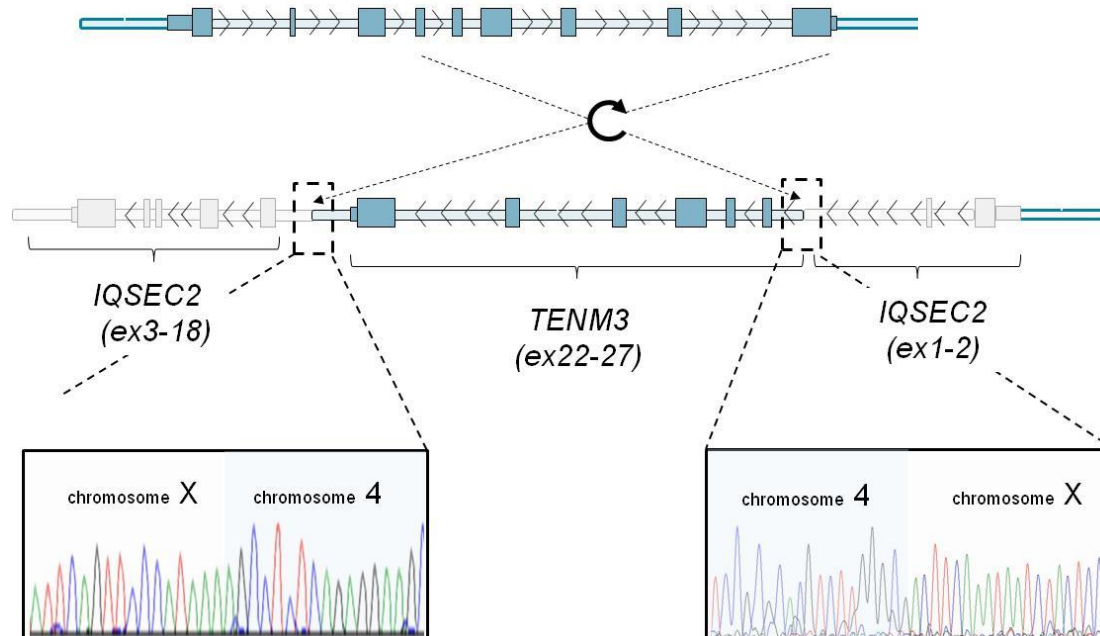
*De novo* duplication on chr 4

Mother

Father



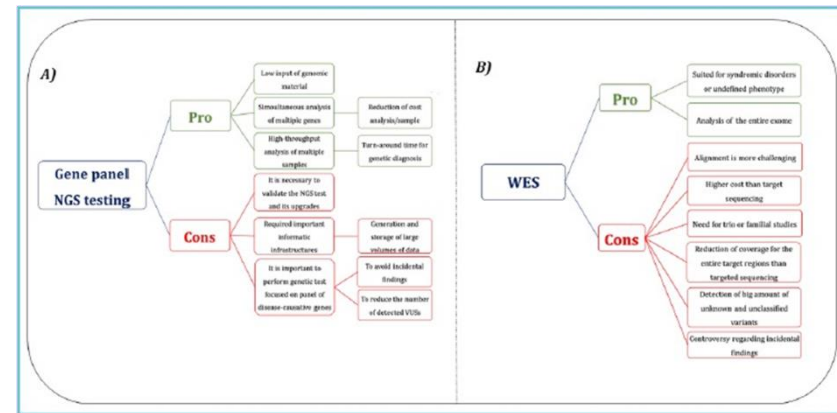
Duplication in chr X



Duplication disturbs IQSEC2 gene

# Jakou strategií NGS testování vybrat?

- Panel genů
- Celoexomové sekvenování (WES)
- Celogenomové sekvenování (WGS)

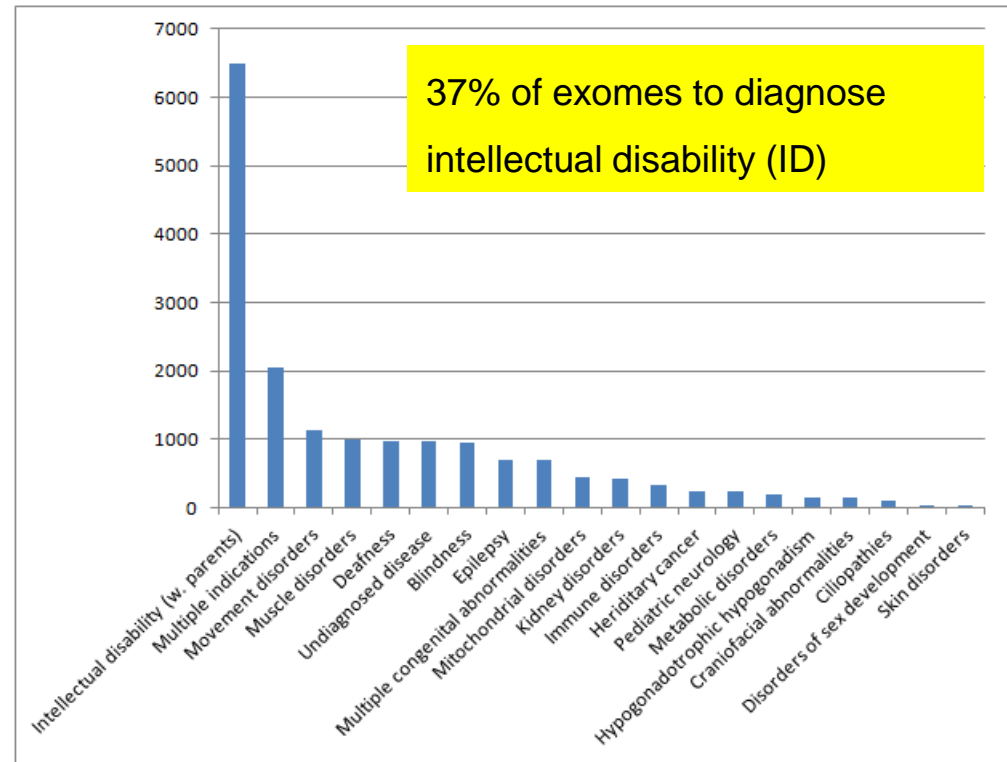
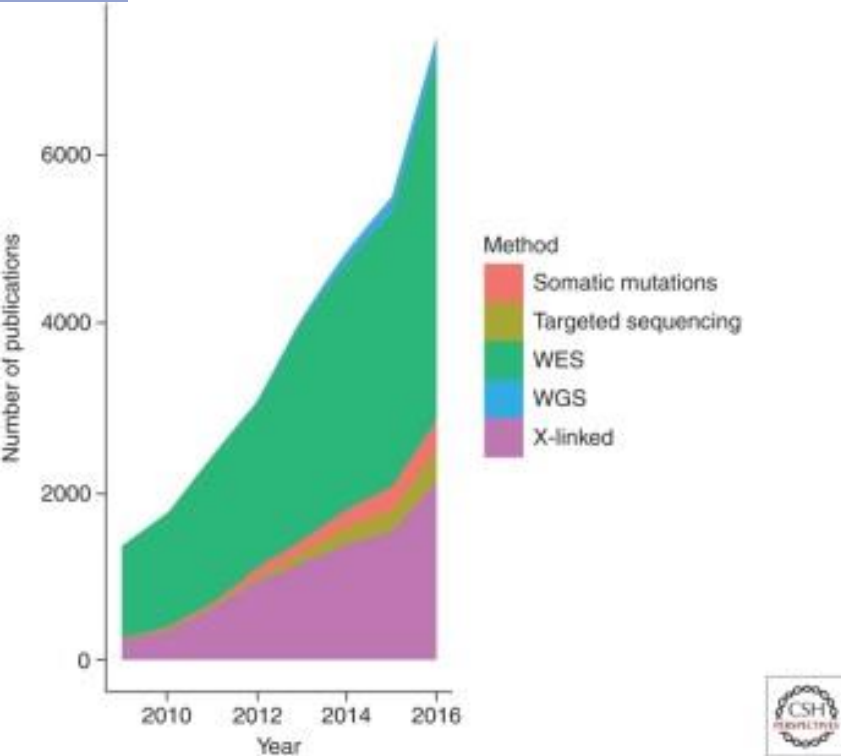


Comparison of Targeted Panels, WES, and WGS Sun et al., 2015

DiResta et al., 2018

	Targeted panel	WES (60× coverage)	WGS (60× coverage)
Relative costs compared with WES (2015)	Depends on size of gene panel	1	~3× as expensive as WES
Gene panel coverage	100%, when complemented with Sanger sequencing	97.5%	>97.5%
Analysis of new disease genes	–	+	+
CNV-calling	Depends on size of gene panel	>3 exons	All
Intronic variants (>30 bp from splice site)	–	–	+
Incidental findings	–	+	+

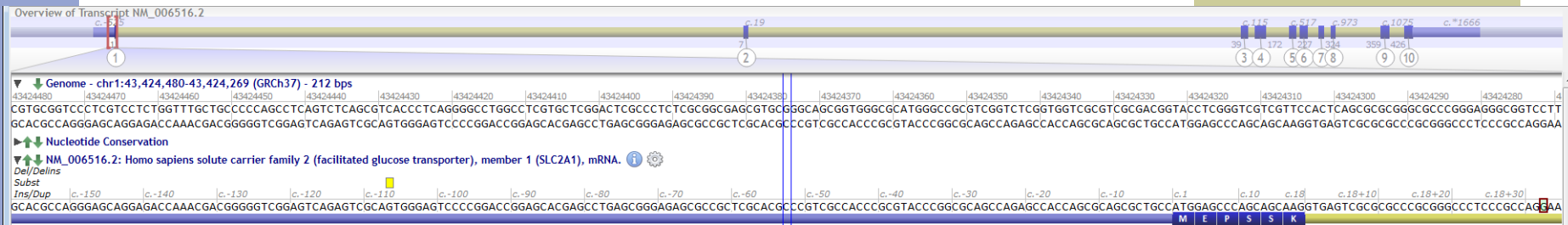
# WES



Number of hits or publications per year in Google Scholar broken down into sequencing strategy, using the search terms “intellectual disability” + “whole-exome sequencing” (labeled WES), “intellectual disability” + “whole-genome sequencing” (labeled WGS), “intellectual disability” + “targeted sequencing” (labeled “Targeted sequencing”), “intellectual disability” + “somatic mutations” (labeled “Somatic mutations”), and “intellectual disability” + “X-linked” + “sequencing” (labeled “X-linked”).

Cold Spring Harb Perspect Med. 2017 Mar;7(3):a026864.

# WGS – nekódující mutace



Normal start site

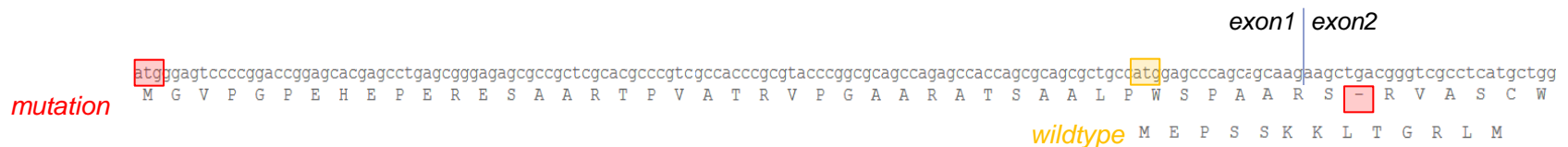
**De novo mutation in 5'UTR of SLC2A1! :**

NM\_006516.2:c.-107G>A

Chr1(GRCh37):g.43424429C>T

p.?

Mutation introduces a novel ATG start site, which would lead to a premature stop codon in exon 2:

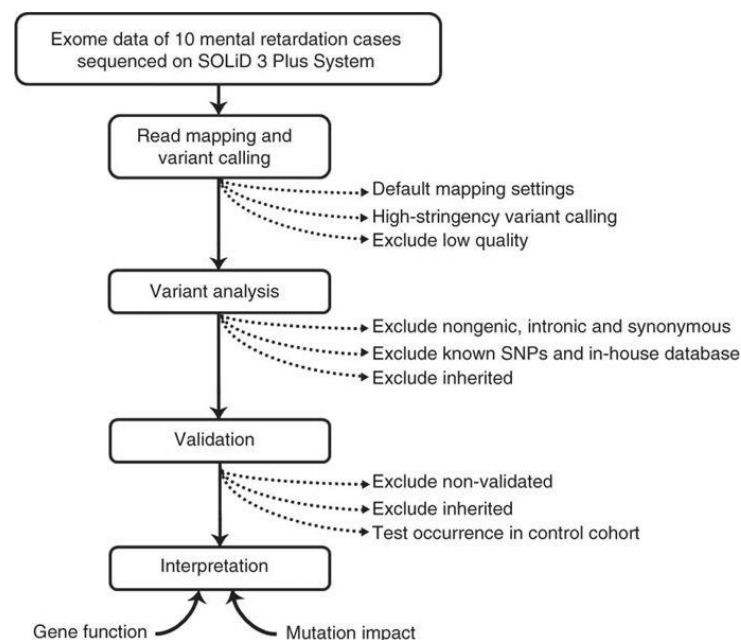




# Problémy NGS v klinické praxi

- Získání relevantních dat – zkušení bioinformatičtí
- Interpretace získaných dat – co se všemi těmi variantami?

Variant type	Variants in Genome	Variants in Exome
SNV	3,440,782	21,575
Insertion	263,282	272
Deletion	272,266	242
Deletion/Insertion	90,263	380
CNVs	270	45
<b>Total</b>	<b>4,066,863</b>	<b>22,514</b>



Trio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Average
High-confidence variant calls	20,810	21,658	21,338	22,647	17,694	22,333	21,369	22,658	24,085	22,962	21,755
After exclusion of nongenic, intronic and synonymous variants	5,556	5,665	5,691	5,991	4,607	5,567	5,716	5,628	5,985	5,994	5,640
After exclusion of known variants	165	159	157	155	120	136	120	149	96	171	143
After exclusion of inherited variants	4	7	3	7	7	2	2	6	6	7	5

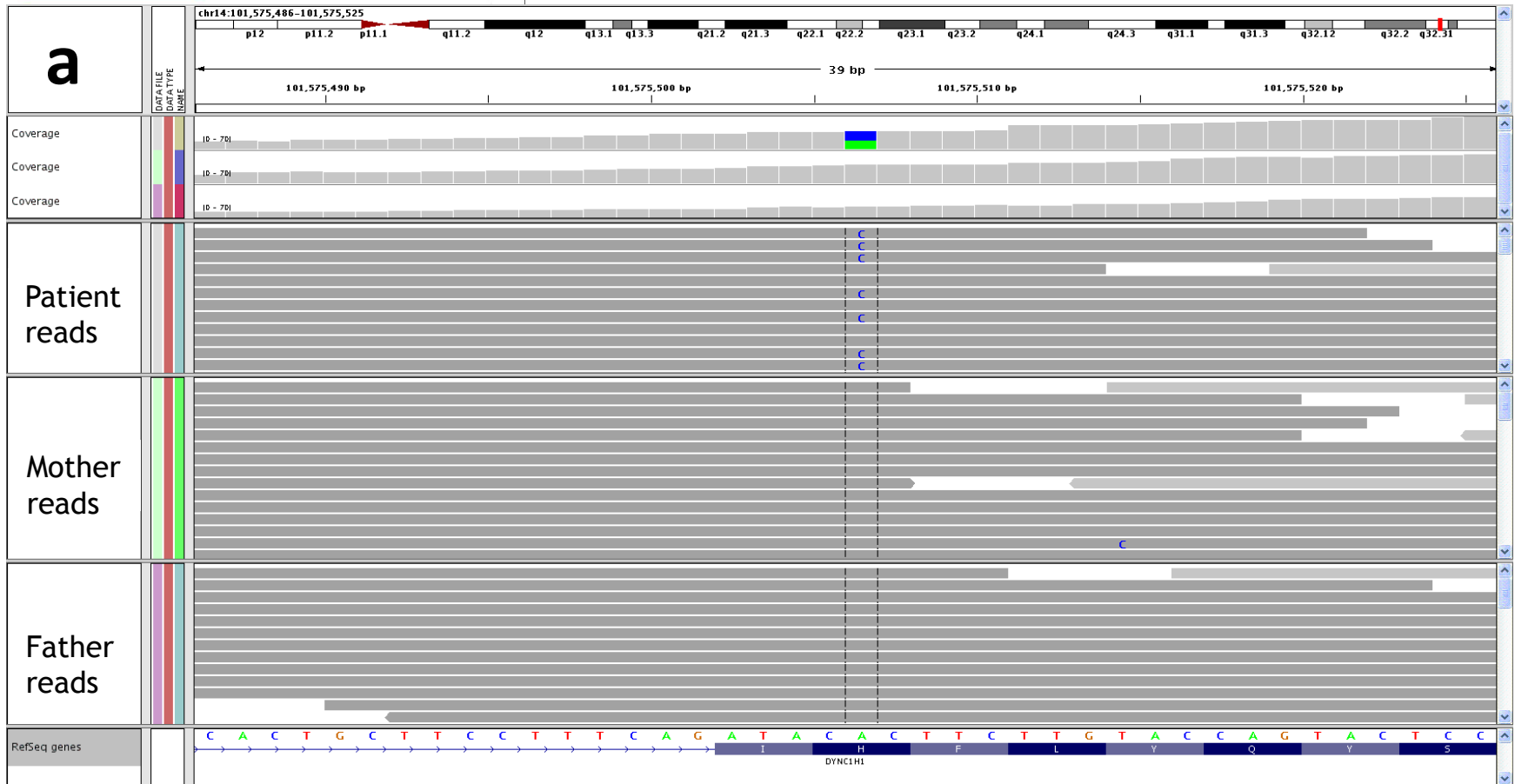
# Interpretace nalezených variant

Interpretace založena na **klinických nálezech, populačních frekvencích, publikovaných případech, predikčních databázích**

Kritéria hodnocení nálezů stanovena podle „American college of medical genetics and genomics“ (**ACMG**)

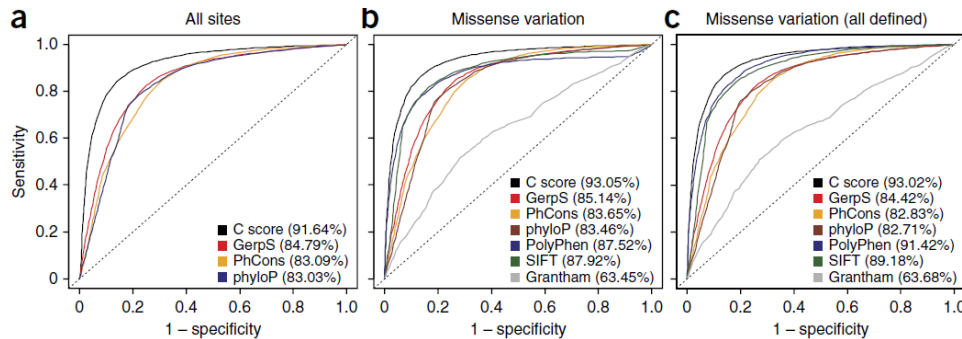
- a. **disease causing** (class V): the sequence variation is previously reported and recognized as causative of the disorder
- b. **likely disease causing** (class IV): the sequence variation is not previously reported as expected to cause the disorder, frequently in a known disease gene
- c. **variant of unknown clinical significance (VUS)**; (class III): the sequence variation is unknown or expected to be causative of disease and is found to be connected with a clinical presentation;
- d. **likely not disease causing** (class II): the sequence variation is not previously reported and it is probably not causative of the pathology;
- e. **not disease causing** (class I): the sequence variation is already reported and documented as neutral variant.

# Vyšetřování „trií“ – pacient + rodiče

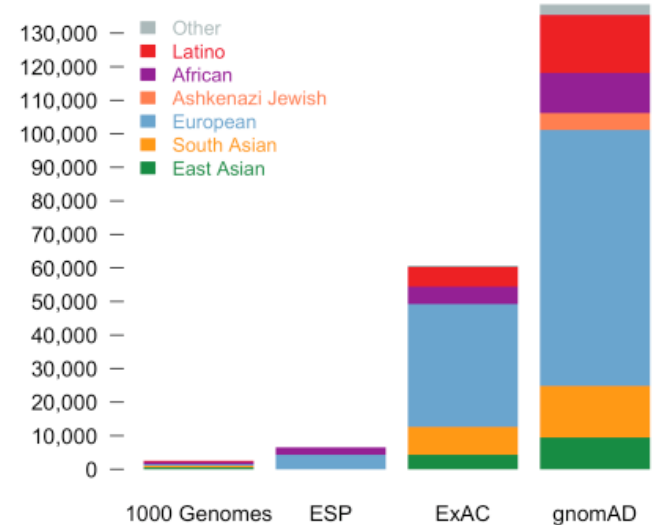


4 million inherited variants, 100 new mutations per person

# Predikční programy, populační studie



CADD	Combined 63 annotations into one meta-score (C score) for the entire genome based on a SVM	<a href="http://cadd.gs.washington.edu/">http://cadd.gs.washington.edu/</a>
Eigen	Spectral approach to the functional annotation of genetic variants in coding and non-coding regions.	<a href="http://www.columbia.edu/~ii2135/eigen.html">http://www.columbia.edu/~ii2135/eigen.html</a>
DANN	DANN used the same feature set and training data as CADD to train a deep neural network (DNN).	<a href="https://cbcl.ics.uci.edu/public_data/DANN/">https://cbcl.ics.uci.edu/public_data/DANN/</a>
FitCons	Predictions of pathogenicity for the entire genome based on evolutionary conservation and functional data	<a href="http://compgen.cshl.edu/fitCons/">http://compgen.cshl.edu/fitCons/</a>
SPANR/SPIDEX	Trained a model optimized for the prioritization of splice site variants with a deep learning approach	<a href="http://www.deepgenomics.com/spidex">http://www.deepgenomics.com/spidex</a>
HAL	Prioritization of splice site variants based on their effect of (alternative) RNA splicing	<a href="http://splicing.cs.washington.edu">http://splicing.cs.washington.edu</a>
PHIVE	Analysis of exome variants by computing phenotype similarity between human disease phenotypes and phenotype information from knockout experiments in model organisms	<a href="http://www.sanger.ac.uk/resources/databases/exomise">http://www.sanger.ac.uk/resources/databases/exomise</a>
RVIS	The Residual Variation Intolerance Score or RVIS is a gene based score to prioritize disease genes based on intolerant to genetic variation	<a href="http://genic-intolerance.org/">http://genic-intolerance.org/</a>



## The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes

Konrad J. Karczewski<sup>1,2,\*</sup>, Ben Weisburd<sup>1,2</sup>, Brett Thomas<sup>1,2</sup>, Matthew Solomonson<sup>1,2</sup>, Douglas M. Ruderfer<sup>3</sup>, David Kavanagh<sup>3</sup>, Tymor Hamamsy<sup>3</sup>, Monkol Lek<sup>1,2</sup>, Kaitlin E. Samocha<sup>1,2</sup>, Beryl B. Cummings<sup>1,2</sup>, Daniel Birnbaum<sup>1,2</sup>, The Exome Aggregation Consortium, Mark J. Daly<sup>1,2</sup> and Daniel G. MacArthur<sup>1,2</sup>

## Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans

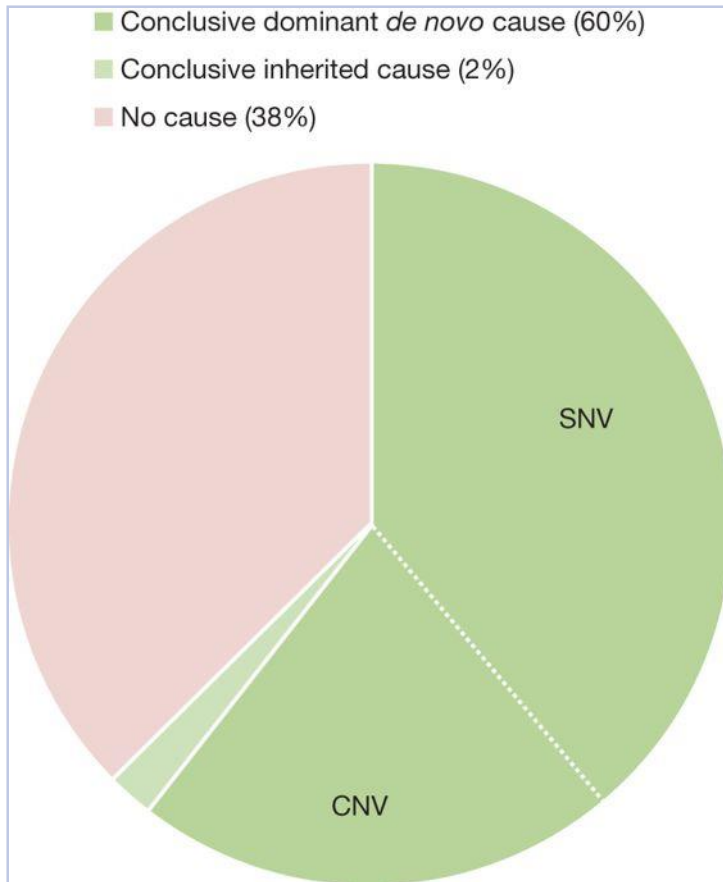
Monkol Lek<sup>1,2,3,4</sup>, Konrad J. Karczewski<sup>1,2\*</sup>, Eric V. Minikel<sup>1,2,5\*</sup>, Kaitlin E. Samocha<sup>1,2,5,6\*</sup>, Eric Banks<sup>2</sup>, Timothy Fennell<sup>1</sup>, Anne H. O'Donnell<sup>1</sup>, Luria<sup>1,2,7</sup>, James S. Ware<sup>2,8,9,10,11</sup>, Andrew J. Hill<sup>1,2,12</sup>, Beryl B. Cummings<sup>1,2,5</sup>, Tara Jukla<sup>1,2,13</sup>, Daniel P. Birnbaum<sup>1</sup>, Jack A. Kosmicki<sup>1,2,6,13</sup>, Laraine E. Duncan<sup>1,2,6</sup>, Karol Estrada<sup>1,2</sup>, Fengmei Zhao<sup>1,2</sup>, James Zou<sup>1</sup>, Emma Pierce<sup>1</sup>, Hoffman<sup>1,2</sup>, Joanne Benghoul<sup>1,4,13</sup>, David N. Cooper<sup>1,6</sup>, Nicole DeLuca<sup>1,7</sup>, Mark DePristo<sup>1,8</sup>, Ron Do<sup>1,9,20,21,22</sup>, Jason Flannick<sup>2,23</sup>, Menachem Fromer<sup>1,6,19,20,24</sup>, Laura Gauthier<sup>1,8</sup>, Jackie Goldstein<sup>1,2,6</sup>, Namrata Gupta<sup>2</sup>, Daniel Howrigan<sup>1,2,6</sup>, Adam Kiezun<sup>1,8</sup>, Mitja I. Kurki<sup>1,2,5</sup>, Ami Levy Moonshine<sup>1,8</sup>, Pradeep Natarajan<sup>1,2,6,27,28</sup>, Lorena Orozco<sup>2</sup>, Gina M. Peloso<sup>1,2,27,28</sup>, Ryan Poplin<sup>1,8</sup>, Manuel A. Rivas<sup>2</sup>, Valentin Ruano-Rubio<sup>1,8</sup>, Samuel A. Rose<sup>9</sup>, Douglas M. Ruderfer<sup>1,9,20,24</sup>, Khalid Shakir<sup>1,8</sup>, Peter D. Stenson<sup>1,2</sup>, Christine Stevens<sup>2</sup>, Brett P. Thomas<sup>1,2</sup>, Grace Tiao<sup>1,8</sup>, Maria T. Juste-Luna<sup>1,2</sup>, Ben Weisburd<sup>2</sup>, Hong-Hee Won<sup>1,3</sup>, Dongmei Yu<sup>1,6,27,28</sup>, David M. Altshuler<sup>1,2,5</sup>, Diego Artissano<sup>1,2</sup>, Michael Boehnke<sup>1,2</sup>, John Danesh<sup>1,2</sup>, Stacey Donnelly<sup>4</sup>, Roberto Elosua<sup>1,7</sup>, Jose C. Florez<sup>1,2,28,27</sup>, Stacey B. Gabriel<sup>1,7</sup>, Gad Getz<sup>1,8,26,28</sup>, Stephen J. Glatt<sup>1,9,40,41</sup>, Christina M. Hultman<sup>4,2</sup>, Sekar Kathiresan<sup>1,2,6,27,28</sup>, Markku Laakso<sup>4,1</sup>, Steven McCarroll<sup>1,6,8</sup>, Mark L. McCarthy<sup>1,4,45,46</sup>, Dermot McGovern<sup>4,7</sup>, Ruth McPherson<sup>1,8</sup>, Benjamin M. Neale<sup>1,2,6</sup>, Aarno Palotie<sup>1,2,5,49</sup>, Shaun M. Purcell<sup>1,9,20,24</sup>, Danish Saleheen<sup>50,51,52</sup>, Jeremiah M. Scharf<sup>1,2,6,25,27,32</sup>, Pamela Sklar<sup>1,9,20,24,53,54</sup>, Patrick F. Sullivan<sup>55,56</sup>, Jaakko Tuomilehto<sup>1,7</sup>, Ming T. Tsuang<sup>58</sup>, Hugh C. Watkins<sup>41,59</sup>, James G. Wilson<sup>60</sup>, Mark J. Daly<sup>1,2,6</sup>, Daniel G. MacArthur<sup>1,2</sup> & Exome Aggregation Consortium<sup>\*</sup>

# Databáze



<http://www.matchmakerexchange.org/>

# WES/WGS jako vynikající nástroj pro odhalování příčin MR vs. vedlejší (nechtěné) nálezy



Gilissen et al. Nature 2014

According to the European Society of Human Genetics (ESHG) guidelines, the targeted diagnostic testing should be performed **minimizing** the likelihood of detecting **incidental findings**, focusing only on genes clinically actionable.

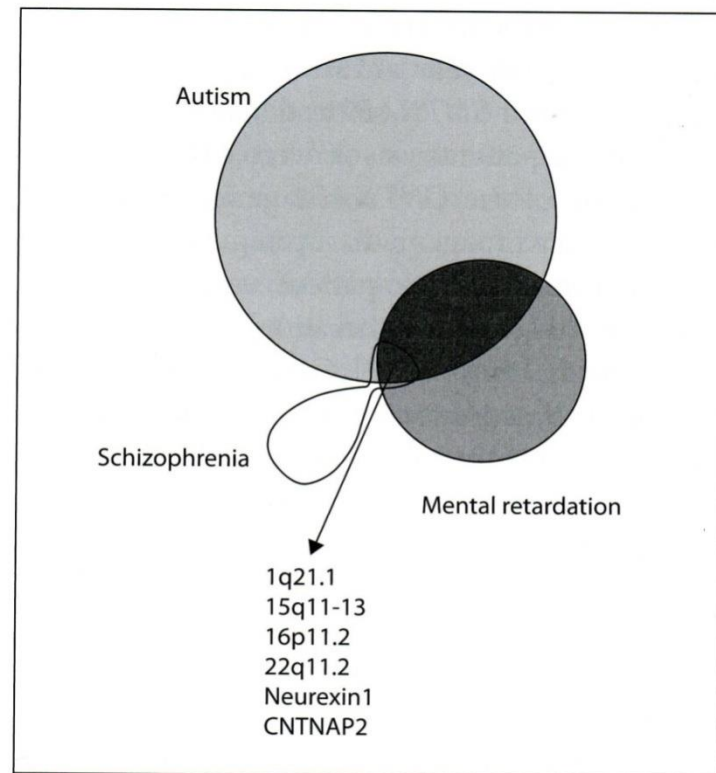
It means that genetic testing should aim to analyze the causative genes associated to the primary clinical questions, even if a broader panel of genes or the WES/WGS sequencing has been performed.

DiResta et al., 2018

In particular, if it can bring minor consequences or if a clinical intervention is possible, then the variant should be reported. On the contrary, if the variant is associated to a late onset disorder or has major consequences, counselling and consent will determine if and when the variant can and should be reported to the patient.

# Genetické přesahy u pacientů s MR a autismem

- MR a ASD – dvě diagnózy s výrazným přesahem
  - Autismus – problémy s řečí, sociální a stereotypy
    - Vyskytují se i u pacientů s MR
    - Naopak až 67 % pacientů s autizmem má nějakou formu MR
- Mnoho genů je asociováno jak s MR tak s ASD  
Častá neúplná penetrance těchto genů



**Fig. 2.** Schematic overview of genetic overlaps between mental retardation, autism and schizophrenia.

# Závěr

---

- etiologie mentální retardace je stále nedořešený problém a představuje výzvu nejen pro genetické poradenství
- množství příčin způsobujících MR svědčí o komplexnosti lidské inteligence - je proto poměrně snadné její vývoj poškodit geneticky i negeneticky
- se vzrůstajícím rozlišením moderních metod prudce roste počet nalezených variant
- moderní technologie „předběhly“ naše klinické znalosti, často tedy nejsme schopni získané výsledky správně interpretovat
- pouze v případě prokázané asociace je možno poskytnout rodině cílené genetické poradenství



# DĚKUJI ZA POZORNOST

---

