



Klinický exom v prenatální diagnostice

MUDr. Věra Hůrková

Klinický exom (CES) je metoda laboratorní diagnostiky vhodná pro prenatální i postnatální diagnostiku, a to především v případech, kdy máme jasný fenotyp, u kterého předpokládáme genetickou etiologii. Vyšetření může indikovat pouze klinický genetik s odborností 208.

Častou příčinou geneticky podmíněných prenatálně diagnostikovaných genetických onemocnění jsou tzv. de novo mutace. Jde o náhodně vzniklé chyby při přepisu DNA v zárodečných buňkách zdravého rodiče (spermii nebo vajíčku), případně k nim může dojít v raném embryonálním stadiu vývoje plodu. V takovém případě je pak riziko opakování v další graviditě velmi nízké.

Dalším důležitým mechanismem jsou autozomálně recesivně dědičná onemocnění, kdy oba rodiče jsou zdravými přenašeči a riziko opakování v další graviditě je 25 %, a X vázaná onemocnění, kdy žena může být zdravou přenašečkou a vada se objeví při přenosu mutovaného genu na plod mužského pohlaví.

V rámci analýzy klinického exomu dokážeme odhalit de novo mutace, autozomálně recesivní onemocnění i onemocnění s X recesivním typem dědičnosti.

Znalost molekulárně genetické podstaty onemocnění nám umožňuje stanovit riziko opakování v dalším těhotenství a nabídnout páru možnost prenatální diagnostiky nebo preimplantačního genetického testování v rámci metod asistované reprodukce.

Vyšetření je prováděno metodou NGS (Next Generation Sequencing) na přístroji NextSeq (Illumina) panelem Clinical Exome Solution (Sophia Genetics). Tento panel obsahuje 5500 klinicky významných genů. V případě detailnější analýzy lze využít analýzu celého exomu (WES), který obsahuje 19 425 genů a analyzuje i mitochondriální DNA.

Vyšetření exomu zahrnuje trio analýzu (postižený jedinec/plod a oba rodiče), která nám pomáhá identifikovat kauzální varianty a k filtraci získaných dat se používají též HPO kritéria dle fenotypu postiženého jedince/plodu.

Získaná sekvenční data jsou analyzována softwarem Sophia DDM. Potenciálně kauzální varianty ověřujeme Sangerovou sekvenací a, pokud lze, i segregací analýzou v rodině.

Omezením při analýze klinického exomu v prenatální diagnostice je především množství a kvalita genetického materiálu, který je pro analýzu k dispozici. S tímto problémem jsme se potýkali také v rámci genetické diagnostiky příčiny postižení plodu v následující kazuistice. Naštěstí díky spolupráci s oddělením patologie Uherskohradištské nemocnice a.s. a také kreativnímu nasazení molekulárních genetiků v laboratoři GHC Genetics, s.r.o., se podařilo diagnózu u plodu odhalit.

KAZUISTIKA

Ke kombinovanému screeningu I. trimestru se na pracovišti PREDIKO, s.r.o., dostavila v 12+1 t.g. těhotná 29letá žena. Ona i její partner byli zcela zdraví, nepřibuzní a v rodině nebyla žádná významnější genetická zátěž.

Kombinovaný screening na základní chromozomální vady byl negativní, ale již v tomto týdnu těhotenství byla zřetelná patologie v oblasti mozečku, rozšířená 4. mozková komora a nedařilo se zobrazit intrakraniální translucenci.

Následná kontrola vývoje mozku plodu byla provedena v 13+6 t.g., kdy byla viditelná dilatace cisterna magna na 6 mm, hyperelorismus (oči daleko od sebe) a bylo vysloveno podezření na Dandy-Walker abnormalitu. Byl již přítomen oligohydramnion (malé množství plodové vody). Placenta byla v nepříznivé poloze nízko vzadu za plodem a nebylo tak technicky možné provedení odběru choriových klků (CVS). Vzhledem k nepříznivému vývoji mozku plodu byl proveden časný odběr plodové vody (AMC). Analýza QF PCR neodhalila některou z nejčastějších chromozomálních vad a následně i karyotyp plodu byl fyziologický.

Při odběru časně AMC je v odebraném materiálu koncentrace DNA natolik nízká, že pro další genetickou

Vzhledem k tomu, že oba partneři byli zdravými přenašeči variant, bylo riziko opakování v další graviditě 25 %.

diagnostiku již nebyla žádná DNA plodu k dispozici a nebyla tak možná ani analýza arrayCGH na mikrodeleční/mikroduplikační syndromy.

Při kontrole v 15+1 t.g. byl zjištěn anhydramnion (prakticky nulové množství plodové vody) a potvrzena vada mozku plodu. Vzhledem k anhydramnionu bylo detailní UZ vyšetření plodu limitované a nebyl možný ani další odběr plodové vody. Prognóza pro plod byla vzhledem k anhydramnionu infaustní. Těhotná se tedy rozhodla v graviditě dál nepokračovat a gravidita byla ukončena. Jako příčina se zvažovala také možná infekční etiologie.

Z pitvy plodu provedené v Uherskohradištské nemocnici a.s. na oddělení patologie následně vyplynul překvapivý nález. Byly potvrzeny vývojové vady mozku plodu, které byly popsány při prenatalním UZ vyšetření – ageneze vermis mozečku, dilatace 4. mozkové komory, ageneze corpus callosum. Byly ale nalezeny také zvětšené ledviny s mnohočetnými cystičkami – oboustranná polycystóza ledvin.

Nález oboustranné polycystózy ledvin byl odpovědní na oligo- a následný anhydramnion a kombinace vrozené vývojové vady mozku s polycystózou ledvin jednoznačně ukazovala na možnou monogenní příčinu. Bylo nutné začít pátrat po příčině vad u plodu. Problémem byla absence DNA plodu.

Na oddělení patologie Uherskohradištské nemocnice byla k dispozici tkáň plodu v parafínových bločcích. Z minulosti víme, že je možné z těchto preparátů DNA extrahovat a vyšetřit. Tyto analýzy jsou prováděny např. ze vzorků nádorů cíleně na konkrétní geny. Analýza je obtížná, protože naložením tkáně do formalínu a následné zalití parafínem vede k fragmentaci DNA, a v tomto případě bylo nutné vyšetřit velké množství genů, abychom se dobrali ke konečné diagnóze.

Analýza byla tedy provedena z tkáně plodu a také ze vzorku DNA od obou rodičů a byla provedena jak analýza klinického exomu, tak celoexomové sekvenování (WES). Data se následně skládala dohromady.

Tímto složitým a časově náročným postupem se nakonec podařilo odhalit příčinu postižení plodu v genu *CEP290*, kde byla v DNA plodu zjištěna přítomnost dvou variant genu *CEP290* (NM_025114) v trans pozici. První variantou byla patogenní varianta c.4962_4963delTT (p.Glu1656AsnfsTer3, rs764309755) v heterozygotním stavu zděděná od matky a druhou

variantou byla pravděpodobně patogenní varianta c.1225delT (p.Ile409PhefsTer5, rs1287628446) zděděná od otce.

Gen *CEP290* je genem s autozomálně recesivním typem dědičnosti a kóduje centrozomální protein vyskytující se v různých typech buněk. Ačkoliv jeho funkce není zcela objasněna, studie naznačují, že má důležitou roli v centrozomech a řasinkách. Centrozomy se podílejí na buněčném dělení, sestavování mikrotubulů sloužících k transportu uvnitř buněk a udržování tvaru buňky. Řasinky (cilie) jsou výběžky na povrchu buněk sloužící k pohybu a podílejí se na přenosu chemických signálů. Jsou také nezbytné pro smyslové vnímání.

Bialelické patogenní varianty v genu *CEP290* jsou spojeny s několika závažnými autozomálně recesivními syndromy (Joubertův syndrom 5, Senior-Lokenův syndrom 6, Meckel syndrom 4, Bardet-Biedl syndrom 14). Tyto syndromy mají řadu příznaků, postihují mnoho částí těla a mezi pacienty se liší. Charakteristický je abnormální vývoj mozku (Dandy-Walker malformace – chybějící cerebelární vermis, dilatace 4. mozkové komory, zvětšení zadní jámy mozkové), očí (retinální dystrofie, kolobom), ledvin (polycystické onemocnění, nefronoftíza), jater, kostry (polydaktylie) a hormonálního systému.

Fenotyp plodu odpovídal tomu, že jde o kauzální příčinu zjištěných vad. Vzhledem k tomu, že oba partneři byli zdravými přenašeči variant, bylo riziko opakování v další graviditě 25 %.

Partnerům byly výsledky vysvětleny a byla s nimi probrána možnost plánování další gravidity. Partneři se rozhodli pro další graviditu pomocí IVF cyklu s provedením preimplantačního genetického testování na toto monogenní onemocnění (PGT-M), kdy pomocí analýzy metodou karyomappingu budou vyřazena embrya, která by měla obě patogenní varianty, aby se naprosto minimalizovalo riziko opakování v dalším těhotenství.

V případě přirozeného otěhotnění je možné provedení invazivní prenatalní diagnostiky (CVS/AMC) s případným ukončením gravidity při průkazu přítomnosti obou variant u plodu.

