

# Celoexomové sekvenování, nová epocha testování přinášející naděje i zklamání, kazuistiky pacientů OLG.

## 22. celostátní conference DNA diagnostiky, 22. 11. - 23. 11. 2018 České Budějovice

Autoři: Ruszová E.<sup>1</sup>, Švorcová M.<sup>1</sup>, Petrová L.<sup>2</sup>, Hrochová K.<sup>2</sup>, Skutilová V.<sup>1</sup>, Šenkeříková M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Oddělení lékařské genetiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové

<sup>2</sup> Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Podpořeno: MZ ČR – RVO (FNHK, 00179906, Z1/8141, 2017)

### Úvod

Jedno z forem NGS, stále častěji používáno, je v současnosti takzvané celoexomové sekvenování (WES). Na Oddělení lékařské genetiky FNHK se WES nepoužívá jako rutinní vyšetření a vyšetření jsou prováděna pouze v rámci výzkumu. Co se týče výběru pacientů, opakovaně se vracíme k pacientům doprovázeným normálním nálezem aCGH s dosud neobjasněnou genetickou etiologií potíží. Snažíme se tak dopátrat příčin XLMR v rodinách, Pierre Robin sekvencí - nesyndromových roštěpů rtu/patra (CL/PL) a hormonálních komplexních poruch.

### Příprava WES knihoven a NG sekvenace

Příprava WES knihoven probíhá pomocí techniky "obohacení cílů" za použití RNA-baits a SureSelect QXT kitu firmy Agilent (SureSelect), následuje monitor na mikročipové analýze (MultiNA, Shimadzu), kvantifikace KAPA kvantifikačním kitem (KAPA) a vlastní sekvenace na MiSeq přístroji pomocí Reagent v.2 kitu (Illumina, 2x100bp).

### Vyhodnocování a anotace variant

Vyhodnocování probíhá v SureCall software (Agilent) a k dodatečné anotaci dochází v nástroji wANNOVAR (Chang X, Wang K. wANNOVAR: annotating genetic variants for personal genomes via the web. J Med Genet. 2012 Jul;49(7):433-6).

### Kontrola kvality

QC reporty mají tyto výstupní atributy: počet readů: cca 10mil, čtení nacházejících se v cílovém regionu-80%, z toho pokrytí: nejméně 5 čtení 97%, nejméně 10 čtení 91%, počet duplikátů cca 10%.

V této práci nastíním 3 naše kazuistiky.

- 1. N. Č.** (r. nar. 1996) –malý vzrůst, lehká forma PMR, primární hypothyreóza v substituci, pancytopenie, strabismus, hypotermie, bradykardie, vertigo, recid. pankreatida, poruchy příjmu potravy, sekundární amenorea, hemoragie. Karyotyp normální. aCGH-normální ženský profil.
- 2. M. P. S.** (r. nar. 2017) –karyotyp normální, aCGH-normální ženský profil. Závěr klinického genetika: bilaterální roštěp měkkého i tvrdého patra, mikrognácie, společně s glossoptózou do obrazu Pierre-Robin sekvence.
- 3. J. C.** (r. nar. 1969) – MR + zátěž s mentálními defekty nejasné etiologie u mužských příbuzných v rodině. FRAXA –negativní, karyotyp- normální, Xarray-normální mužský profil.

Nález WES	Konfirmace nálezu metodou Sanger z DNA nebo cDNA	Pozvání probanda/ příbuzných pro další šetření v rodině	Úspěšnost opakovaných pozvání	Komentář
<b>1. N. Č.</b> Serpina7: genotyp n=[c.909G>T, p. Leu303Phe, TBG-variant P](;)[c.631G>A, p.Ala211Thr, TBG-variant A]. obě mutace uvedeny v databázi ClinVar jako patogenní v.)	+	+	-	nelze rozhodnout, zda jde o pozici variant <i>cis</i> nebo <i>trans</i> , vše nasvědčuje na hypothyreózu
<b>2. M. P. S.</b> BMP4: c. 272C>G, p. Ser91Cys v heterozygotním stavu (rs121912767-dle ClinVar patogenní změna spojována s OMIM OFC11_ 600625, varianta se nachází ve vysoce konzervované doméně) FOXE1: c.278A>C, p. Asn93Thr v heterozygotním stavu [podpora v HGMD]	+	+	+	
<b>3. J. C.</b> GRIA3(NM_000828: exon13: c.2324+2T>C, splice site) v hemizygotním stavu (MRX94_ OMIM300699)	-	+	-	nelze ověřit, zda varianta má vliv na sestřih pre-mRNA, nelze potvrdit kauzalitu bez vyšetření J.C. nebo zdravých přenašečů v rodině

### Diskuze

Ad1) Globulin vázající tyroxin (TBG =proteinový product genu *Serpina7*) je jaterní glykoprotein, který transportuje hormon štítné žlázy do séra. Substituce v jednom z kodonů byla dříve popsána a existuje v některých etnických skupinách jako polymorfismus<sup>1</sup>. Zdá se, že osamoceně nemusí měnit vlastnosti genového produktu. Druhá změna zřejmě poškozuje biosyntézu TBG nebo jeho sekreci nebo strukturu tak, že neváže T4<sup>2</sup>. Porucha je X vázaná a vede k částečnému nebo kompletnímu TBG deficitu.

Ad2) Oba dva geny, BMP4 i FOXE1 jsou reportovány v asociaci se sub-epiteliálními defekty svalových vláken (BMP4)<sup>3</sup> a rozštěpem rtu a/nebo patra (CL/PL)<sup>4</sup>. Tyto konzistentní výsledky naznačují multifaktoriální podstatu malformace, nicméně nejsou důkazem toho, že samotný CL/PL je významně spojen s mutacemi v genech FOXE1 a BMP4.

Ad3) Ionotropní glutamátový receptor *GluR3* je genovým produktem *GRIA3* genu, jehož pre-mRNA podléhá editaci. Komplementární vysoce konzervovaná intronická sekvence (ECS) se nachází právě 5' donorovém sesřihovém místě intronu 13<sup>5</sup>. Editace ovlivňuje sestřih pre-mRNA s důsledky na funkci neurotransmise. *GluR* podmiňuje učení a paměť a jeho dysfunkce je zapojena v patogenezi neurologických a psychiatrických onemocnění<sup>6</sup>.

### Závěr

Nespolupráce rodin významně sťažuje až znemožňuje biologickou i klinickou interpretaci námi odhalených variant v rámci WES ve výše popsaných případech. V rodinách nebylo možné provést konfirmaci výsledků WES na úrovni cDNA nebo provést segregaci analýzu za účelem identifikace pozice suspektní varianty: *cis* nebo *trans*. S tím souvisí neschopnost odhalit mechanismy účinku (např. zda se uplatňuje inaktivace X-chromosomu), a většina nálezů zůstává ve stavu suspektních variant.

### Literatura

- Bertenshaw et al. 1991, Am J Hum Genet, 48:741-744
- Mori et al. 1990, JCE & M, 70(3)
- Suzuki et al. 2009, Am J Hum Genet, 84, 406-411
- Liu et al. 2015, Br J Oral Maxillofac Surg
- Seeburg et al. 1998, Brain Res. Brain Res. Rev. 26 (2-3): 217-29
- Nakagawa et al. 2005, Biol Chem. 2006;387(2):179-87

CTGGAGGGTG...CCACCGGCC...GACAGCGAGC...ATGCAG...  
AGCTCGGGAG...GGCCAGGCGG...GGAAGGCGCA...CCCCCA...  
TCCTGACTTT...TCGCTGGTGG...TTGAGTGGAC...CCCAGG...  
AGCTCGGGAG...GGCCAGGCGG...GGAAGGCGCA...CCCCCA...  
CAAGATGCCA...GTCCCCGGCC...CCTGCTGCTG...GCTCTC...  
CTGGAGGGTG...CCACCGGCC...GACAGCGAGC...ATGCAG...