

# Genetická diagnostika familiárních onemocnění krvetvorby

## Genetic diagnostics of familial hematopoietic disorders

Vrzalová Z.<sup>1,2</sup>, Radová L.<sup>2,3</sup>, Staňo Kozubík K.<sup>1,2</sup>, Štika J.<sup>2,3</sup>, Trizuljak J.<sup>1-3</sup>, Pospíšilová Š.<sup>1-3</sup>, Doubek M.<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup> Centrum molekulární biologie a genetiky, Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno

<sup>2</sup> Středoevropský technologický institut (CEITEC), MU Brno

<sup>3</sup> Ústav lékařské genetiky a genomiky, LF MU Brno

### Souhrn

**Východiska:** Familiární onemocnění krvetvorby (familial hematopoietic disorders – FHD) jsou vzácnou a heterogenní skupinou onemocnění, do které se řadí dědičné anemie, dědičné trombocytopenie, vrozené neutropenie a vrozené syndromy selhání kostní dřeně. Pro FHD je charakteristická variabilní klinická expresivita a neúplná penetrance fenotypu i v rámci jedné rodiny, což znesnadňuje určení správné anamnézy. Molekulární genetické defekty FHD se nachází ve > 300 genech zodpovědných zejména za buněčné procesy, jejichž funkční poruchy vedou k symptomatické cytopenii, dysfunkci orgánů, poškození tkání a k rozvoji syndromů. Některé varianty genů predisponují ke vzniku závažných hematologických malignit či vzácněji solidních nádorů. Na našem pracovišti jsme zavedli genetickou analýzu u rodin s podezřením na dědičné hematologické onemocnění. Naše zaměření je v rámci ČR unikátní. **Soubor pacientů a metody:** Od roku 2017 se věnujeme výzkumu a diagnostice vzácných nemocí FHD. Celkem jsme zanalyzovali 92 rodin s podezřením na FHD pomocí moderních genomických přístupů jako je celoxomové sekvenování, predikční analýza *in silico*, metoda MLPA a Sangerovo sekvenování. **Výsledky:** U 70 rodin jsme detekovali již známou patogenní / pravděpodobně patogenní variantu nebo novou variantu nejasného klinického významu (variant of unclear clinical significance – VUS), jejichž záchyt vedl k potvrzení nebo upřesnění diagnózy. Pozitivní nálezy poukázaly na výskyt dědičných trombocytopenií (geny *TUBB1*, *ETV6* a *ANKRD26* – riziko rozvoje hematologických malignit), Glanzmannových trombastenii (*ITGA2B*), anemií, talasemií, ale také na výskyt vzácných syndromových onemocnění, v ČR např. Bernard-Soulier (*GP1BA*); Heřmanský-Pudlák (*HPS1*); Wiskott-Aldrich (*WAS* – zvýšené riziko výskytu malignit); Shwachman-Diamondův syndrom (SBDS – 30% riziko myeloidních malignit) a Sebastianův syndrom (*MYH9*) apod. **Závěr:** Genetická diagnostika se stala součástí standardního vyšetření pacientů s dědičným hematologickým onemocněním. Zároveň pomohla objasnit mnohé nevyřešené případy a poukázala na výskyt vzácných variant klasifikovaných jako VUS, u nichž je nutné prokázat jejich funkční dopad pomocí proteomických technologií. Potvrzení diagnózy pacienta má také kladný dopad na jeho individualizovanou péči a ke stanovení rizika vzniku malignit či jiných přidavných onemocnění.

### Klíčová slova

familiární onemocnění krvetvorby – genetická analýza – vzácné varianty

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare that they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



Ing. Zuzana Vrzalová, Ph.D.

CEITEC MU a FN Brno

Kamenice 753/5

625 00 Brno

e-mail:

zuzana.vrzalova@ceitec.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 25. 8. 2023

Přijato/Accepted: 4. 10. 2023

doi: 10.48095/ccko2023S131

## Summary

**Background:** Familial hematopoietic disorders (FHD) are a rare and heterogeneous group of disorders that include hereditary anemias, hereditary thrombocytopenias (inherited thrombocytopenias – IT), congenital neutropenias and congenital bone marrow failure syndromes. FHD is characterized by variable clinical expressivity and incomplete penetrance of the phenotype even within a single family, making it difficult to determine a correct history. The molecular genetic defects of FHD are found in > 300 genes mainly responsible for cellular processes whose functional disorders lead to symptomatic cytopenia, organ dysfunction, tissue damage and syndromes. Some gene variants predispose to the development of severe hematological malignancies or, more rarely, solid tumours. At our institution, we have introduced genetic analysis in families with suspected hereditary hematological diseases. Our focus is unique in the Czech Republic. **Patients and methods:** In total, we analyzed 92 families with suspected FHD using modern genomic approaches such as whole-exome sequencing (WES), *in silico* predictive analysis, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and Sanger sequencing. **Results:** In 70 families, we detected an already known pathogenic/probably pathogenic variant or a novel variant of unclear clinical significance (VUS), the detection of which led to confirmation or refinement of the diagnosis. Positive findings indicated the occurrence of hereditary thrombocytopenias (*TUBB1*, *ETV6* and *ANKRD26* genes – risk of the development of hematological malignancies), Glanzmann thrombasthenia (ITGA2B), anemias, thalassemias, but also the occurrence of rare syndromic diseases in the Czech Republic, e.g. Bernard-Soulier (*GP1BA*); Heřmanský-Pudlák (*HPS1*); Wiskott-Aldrich (*WAS* – increased risk of malignancies); Shwachman-Diamond syndrome (*SBDS* – a 30% risk of myeloid malignancies) and Sebastian syndrome (*MYH9*), etc. **Conclusion:** Genetic diagnosis has become part of the standard examination of patients with hereditary hematological diseases. It has also helped to clarify many unsolved cases and highlighted the occurrence of rare variants classified as VUS, for which it is necessary to determine their functional impact. Confirming a patient's diagnosis also has a positive impact on their individualized care and on determining their risk of malignancies or other additional diseases.

## Key words

familial hematopoietic disorders – genetic analysis – rare variants

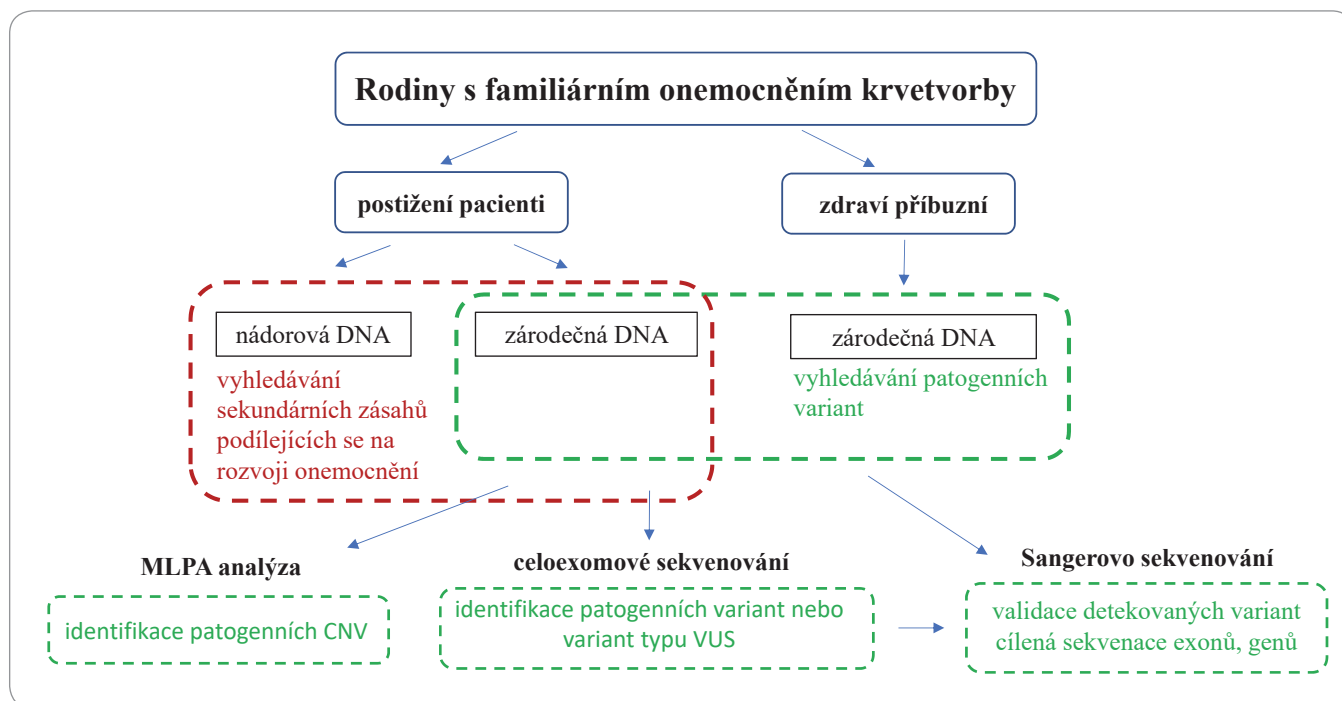
## Úvod

Familiární poruchy krvetvorby (familial hematopoietic disorders – FHD) se řadí mezi vzácná a heterogenní onemocnění, pro které je charakteristická variabilní klinická expresivita a neúplná penetrance fenotypu i v rámci jedné rodiny. Stanovení přesné klinické anamnézy na základě standardních vyšetřovacích postupů je velmi obtížné a často dochází k určení nesprávné diagnózy. Ke komplexnímu vyšetření včetně molekulárně genetické analýzy se většinou přistupuje až s rozvojem závažnějších příznaků (např. symptomatická cytopenie, orgánová dysfunkce nebo rozvoj hematologické neoplazie) v pozdějším věku [1]. Molekulární genetické defekty FHD zasahují do genů odpovědných za buněčné procesy, jako je buněčný růst, aktivace kontrolního bodu buněčného cyklu, biogeneze ribozomů, udržování telomer, homologní rekombinace a procesy opravy DNA [2,3]. Nejčastější skupinou FHD jsou hereditární anemie (HA) charakterizované anemií různého stupně a nekorelací genotypu s fenotypem. HA jsou způsobeny variantami ve > 70 genech, které řídí tvorbu a strukturu erytrocytů (red blood cells – RBC) a ovlivňují hladiny hemoglobinu (talasemie), diferenciaci a proliferaci RBC (hyporegenerativní anemie), strukturu buněčné membrány (defekty erytrocy-

tární membrány) a aktivitu erytrocytárních enzymů (hemolytické anemie) [4]. Další heterogenní skupinou FHD jsou dědičné trombocytopenie (inherited thrombocytopenias – IT) projevující se variabilní expresivitou sklonu ke krvácení u jednotlivých pacientů [5]. Dosud je známo > 40 genů spojených s IT. Některé z nich predisponují k rozvoji hematologických malignit. Patogenní varianty genů jsou často jedinečné, rodinně specifické a vedou k poruchám produkce krevních destiček nebo k jejich strukturálnímu a funkčnímu defektům [6]. Pro vrozené neutropenie (congenital neutropenias – CN) je typická porucha vyžívání neutrofilních granulocytů. Pacienti s těžkou vrozenou neutropenií jsou již od narození náchylní k opakovaným život ohrožujícím infekcím. Součástí klinického obrazu bývá také cytopenie. Genetické defekty se vyskytují ve > 24 genech a nejčastěji zasahují geny *ELANE*, *HAX1* a *SBDS* [7]. Diagnóza CN představuje pro pacienty 10–60% riziko vzniku hematologické malignity jako leukemie, lymfomu a myelodysplastického syndromu (MDS) a také predisponuje k rozvoji dalších orgánových dysfunkcí [8]. Dědičné cytopenie a vrozené syndromy selhání kostní dřeně (inherited bone marrow failure syndromes – IBMFS) se významně překrývají. IBMFS jsou charakterizovány poruchou funkce kostní

dřeně (asi 30 % případů přechází do hematopoietické aplazie) a nádorovou predispozicí buď k leukemii, nebo k některým solidním nádorům v 5–50 % případů. V posledních letech bylo identifikováno > 60 genů souvisejících s IBMFS. Nejčastěji uváděnými IBMFS jsou Fanconiho (geny řady FANC-) a Diamond-Blackfanova anemie (*RPS-* a *RPL-* geny), Shwachman-Diamondův syndrom (*SBDS*) a Dyskeratosis congenita (*TER-* geny, *DKC1*). U několika IBMFS je také zvýšené riziko vzniku solidních malignit, např. nádorů hlavy a krku, spinocelulárních karcinomů anogenitální oblasti nebo sarkomů měkkých tkání [1].

Cílem našeho projektu bylo využít moderní genomické přístupy pro vyhledávání zárodečných variant u postižených rodin s hematologickým onemocněním. K tomuto účelu bylo využito celomomového sekvenování (whole exome sequencing – WES), Sangerova sekvenování a metody MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). Použité diagnostické metody u jednotlivých pacientů se odvíjely od hereditární etiologie jejich onemocnění. Pokud byla zjištěna varianta predisponující k malignímu onemocnění, stanovili jsme riziko progresu spojené s touto variantou a pomocí molekulárně-genetických a cytogenetických metod hledali další patogenní varianty.



Obr. 1. Základní schéma diagnostického přístupu u našeho souboru pacientů.  
CNV – změna počtu kopií, VUS – varianta nejasného klinického významu

### Soubor pacientů a metody

V období 2017–2022 byla provedena genetická analýza u 92 nepříbuzných rodin (celkem 175 vzorků od pacientů a jejich rodinných příslušníků) s podezřením na dědičné hematologické a onkologické onemocnění. Všichni pacienti zařazení do projektu byli indikováni z ambulance klinického genetika ve Fakultní nemocnici Brno (FN Brno), kde současně podepsali informovaný souhlas s genetickým vyšetřením. Na našem pracovišti byla z periferní krve (v případě malignit i z bukalního stěru) pacientů izolována DNA použitím Mag-Core Genomic DNA Whole Blood Kit (RBC Bioscience). Biologický materiál všech vzorků byl následně uschován v biobance CEITEC. Metodický přístup se odvíjel u každé rodiny v závislosti na suspektní diagnóze pacienta, vzhledem k předpokládanému počtu kauzálních genů, typu dědičnosti a velikosti souboru analyzovaných vzorků. Základní schéma diagnostického přístupu v našem projektu je znázorněno ve schématu 1. Nicméně vzhledem k heterogenitě fenotypu FHD a širokému spektru defektních genů u většiny diagnóz byla využita analýza WES. Metodický přístup

WES zahrnoval přípravu sekvenační knihovny podle protokolu KAPA HyperCap Workflow (dle aktuální verze firmy Roche) a vlastní sekvenování probíhalo na platformě NextSeq 550 (Illumina). Surová WES data byla mapována na lidský referenční genom Hg38 (GRCh38) pomocí algoritmu BWA-mem a PCR duplikáty byly identifikovány a odstraněny programem MarkDuplicates (Picard). K detekci a anotaci variant sloužil GATK HaplotypeCaller a Annovar. Od-filtrovány byly synonymní varianty, varianty v intronové oblasti a varianty s pokrytím menším než 15 čtení. Rovněž bylo využito cílených virtuálních panelů genů odpovídajících příslušnému fenotypu a následné haplotypizační analýzy v rámci jedné rodiny, kdy byl porovnáván výskyt variant u postižených a zdravých jedinců. Pro identifikaci potenciálně klinicky relevantních jednonukleotidových variant a krátkých inzercí a delecí (SNV/indelů) byla využita frekvence výskytu v populačních databázích (1000 genomes, gnomAD, ExAC) pod 1 %. Pravděpodobná patogenita variant byla určena pomocí predikčních programů (Align GVGD, PROVEAN, Mutation Taster, SIFT atd.), z výsledků

softwaru AlamutTM Visual Plus, databáze HGMD [9], případně pomocí krystalografické analýzy programu STRIDE. Následně byly identifikované SNV/indely klasifikovány do skupin klinické významnosti podle mezinárodních standardů (ACMG/AMP guidelines) [10]. Přítomnost germinálních variant segregujících s daným fenotypem byla potvrzena pomocí Sangerova sekvenování, které zároveň sloužilo k cílenému ověření variant u dalších rodinných příslušníků. Současně Sangerovo sekvenování bylo metodou první volby pro detekci SNV/indelů v genech s menším počtem exonů např. u diagnostiky talasemie a hereditární hemoragické teleangiectázie (HHT). U obou onemocnění bylo nutné detekovat změny v počtu kopií (copy number variation – CNV), které se vyskytují až v 50 % případů. K tomuto účelu byla vybrána metoda MLPA s využitím chemie a sond P140 HBA, P102 HBB a P093 HTT/HPAH (MRC Holland), připravené PCR produkty byly analyzovány na genetickém analyzátoru ABI 3500 (ThermoFisher Scientific) a surová data byla zpracována pomocí analytického softwaru Coffalyser.net (MRC Holland).

## Výsledky

V našem souboru vzorků byla provedena genetická analýza u 92 rodin, tzn. u pacientů se suspektním fenotypem FHD a u jejich rodinných příslušníků (celkem 175 vzorků). Vyšetřovaná kohorta byla analyzována přístupem WES, Sangerovým sekvenováním nebo metodou MLPA, v závislosti na hereditární etiologii vyšetřovaných rodin. U 70 rodin tzn. v 76 % případů byly úspěšně identifikovány potenciálně kauzální varianty typu SNV/indely nebo CNV segregující s fenotypem a stanovena/upřesněna diagnóza postižených členů rodiny. Nejčastěji se jednalo o detekci vzácných, rodinně-specifických variant klasifikovaných jako patogenní, pravděpodobně patogenní nebo dosud nepopsané varianty nejasného klinického významu – VUS. Přehled významných identifikovaných genetických variant segregujících s fenotypem FHD v naší vyšetřované kohortě pacientů je uveden v tab. 1.

V naší kohortě pacientů představovaly největší skupinu rodiny s fenotypem **dědičné trombocytopenie**, která je molekulárně geneticky velmi heterogenní a kde kauzální varianta v některém z genů může predisponovat k nádorovým onemocněním. Příkladem jsou pozitivní nálezy germinálních variant ve vysoce penetrantních genech *RUNX1* a *ETV6*, jejichž přítomnost byla posléze ověřena i v nádorovém vzorku pacientů. V rámci prvního případu s výskytem germinální dominantně negativní varianty c.866delG v *RUNX1* u 7 členů rodiny, byl u všech jedinců zaznamenán snížený počet trombocytů ( $40\text{--}111 \times 10^9/l$ ) korelující s diagnózou IT, ovšem bez krvácivých stavů. Detekce varianty *RUNX1* vedla k rozvoji MDS u jednoho člena rodiny, který následně progredoval do akutní myeloidní leukemie (AML), což vedlo po chemoterapeutické léčbě k následné sepsi organismu ve 45 letech [11]. V nádorovém vzorku pacienta byly charakterizovány sekundární zásahy (varianty v genech *PHF6*, *BCORL1* a *BCOR*), které velmi pravděpodobně vedly k rozvoji MDS a k progresi. U 6 členů další rodiny s fenotypem IT a počtem trombocytů ( $73\text{--}93 \times 10^9/l$ ) byla charakterizovaná nová, dosud nepopsaná varianta c.1138T>A v genu

*ETV6*. Nicméně u jednoho člena této rodiny propukla akutní lymfoblastická leukemie (ALL) ve věku 15 let a u druhého jedince myeloproliferativní neoplazie (MPN) ve věku 35 let. Byly nalezeny sekundární zásahy v podobě: 1) stavu vysoké hyperdiploidie společně s exonovou delecí v *IKZF1* genu u pacienta s rozvojem ALL; 2) somatické varianty v genu *JAK2* pravděpodobně zodpovědné za rozvoj MPN. Následně se naše pracovní skupina zaměřila na provedení funkční analýzy vzácné varianty *ETV6*, kdy se úspěšně podařilo prokázat inaktivitu mutovaného proteinu [12]. U probandky s **familiární esenciální trombocytemií** byly detekovány zárodečné varianty v genech *TRPM7* (c.223A>G) a *ANKRD26* (c.-140C>G) a při rozvoji MPN byla detekována somatická varianta v genu *JAK2*. V další rodině jsme u probandky detekovali variantu c.3076C>T v genu *ITGA2B*, která je asociovaná s hereditární erytrocytózou s atypickými megakaryocyty a dále variantu v genu *JAK2* predisponující k rozvoji hematologických malignit. Následovalo prediktivní testování obou variant u všech 8 rodinných příslušníků, jelikož se v rodinné historii, kromě hematomů a epistaxí, vyskytovaly opakovaně také myeloidní malignity a rakovina žaludku. V případě autozomálně recesivně (AR) podmíněné **Glanzmannovy trombastenie** byly detekovány dvě varianty (c.2965G>A; c.2944G>A) v genu *ITGA2B*. V dalších rodinách s diagnózou IT byly nalezeny germinální varianty ve známých genech jako jsou např. *VWF*, *THPO*, *CYCS*, *MAP3K9* atd. Klinicky odlišná kazuistika se týkala probanda a jeho matky s fenotypem IT, nicméně u obou jedinců došlo k rozvoji těžké formy plicní fibrózy. Celkem u pěti členů rodiny včetně probanda a matky byla detekována dosud nepopsaná, raritní varianta c.532G>A v genu *SFTPA1*, která byla velmi pravděpodobně zodpovědná za projev intersticiální plicní fibrózy a úmrtí matky i probanda ve středním věku [13].

Dále jsme se u diagnózy IT zaměřili na screening promotorové oblasti genu *ANKRD26*, kde jsou popsány varianty predisponující ke vzniku IT 2. typu a k rozvoji hematologických malignit v 8–10 % případů [14]. Celkem jsme ana-

lyzovali 5'-nepřekládanou oblast genu *ANKRD26* u 35 rodin se suspektním fenotypem IT, tzn. 75 vzorků od postižených jedinců a jejich zdravých příbuzných. Výsledkem byla detekce vzácné patogenní varianty c.-118C>T u tří postižených členů v rodině, kdy nález c.-118C>T varianty segregoval s fenotypem nízkého počtu trombocytů ( $25\text{--}35 \times 10^9/l$ ). Dále zajímavým vědeckým zjištěním pro nás byla stanovená hodnota frekvence (6,5 %) známé patogenní varianty c.-140C>G. Tato varianta se vyskytovala nejen u pacientů s IT ale ještě častěji u zdravých příbuzných. Vzhledem k nově aktualizované frekvenci varianty v databázi dbSNP (6,2 % u nefinské evropské populace) se nabízí otázka, zda se jedná o patogenní variantu, nebo o populační polymorfismus. Toto téma je předmětem našeho dalšího výzkumu.

Nalezení kauzální varianty se často nedařilo v případech rodin s diagnózou vrozené neutropenie, hereditární polyglobulie a HHT. Nicméně několik případů ve vyšetřované kohortě se podařilo objasnit. Výskyt vrozené neutropenie u dvou sourozenců byl vysvětlen nálezem dvou variant (c.536C>T; c.355T>C) v genu *SBDS*, který je příčinou **Shwachman-Bodian-Diamondova syndromu**. Přítomnost variant byla následně potvrzena segregací analýzou. Oba pacienti od 10 let věku trpěli na rekurentní infekce (počet neutrofilních granulocytů:  $0,16\text{--}0,40 \times 10^9/l$ ) a chronickou gingivitidu. K upřesnění diagnózy pomocí genetické diagnostiky došlo až v dospělém věku sourozenců, nicméně současně přispělo k pravidelnému hematologickému sledování kvůli 30% riziku rozvoje MDS/AML. U rodiny s výskytem **leukocytopenie** jsme u dvou postižených členů rodiny detekovali vzácnou heterozygotní variantu c.2974A>C v genu *VPS8*. Diagnóza **HHT** byla potvrzena v případě dvou sourozenců detekcí heterozygotní varianty c.1120C>T v genu *ACVRL1*.

Molekulárně genetická analýza FHD vedla také k potvrzení diagnózy dalších vzácných syndromů. Identifikací variant v genu *HPS1* jsme potvrdili diagnózu **syndromu Heřmanský-Pudlák** (AR dědičnost), který se u probandky manifestoval zejména vrozeným albinismem, trombocytopenií a rozvojem zá-

Tab. 1. Přehled významných identifikovaných genetických variant segregujících s fenotypem FHD v naší kohortě pacientů.

Typ FHD	Dědičnost	Kauzální gen	Transkript: detekovaná varianta
vrozená trombocytopenie	AD	<i>RUNX1</i>	NM_001001890:c.866delG
	AD	<i>MAP3K9</i>	NM_033141:c.2156G>A
	AD	<i>THPO</i>	NM_000460:c.G582C
	AD	<i>ETV6</i>	NM_001987:c.1138T>A
	AD	<i>CYCS</i>	NM_018947:c.59C>T
familiární esenciální trombocytémie	AD	<i>ANKRD26</i>	NM_014915.3:c.-118C>T
	AD	<i>TRPM7</i>	NM_017672:c.223A>G
<i>TUBB1</i> -asociovaná makrotrombocytopenie	AD	<i>TUBB1</i>	NM_030773:c.320C>T
hereditární erytrocytóza	AD	<i>ITGA2B</i>	NM_000419:c.3076C>T;
Glanzmannova trombastenie	AR	<i>ITGA2B</i>	NM_000419:c.2965G>A; NM_000419:c.2944G>A
Bernard-Soulierův syndrom	AD	<i>GP1BA</i>	NM_000173.5:c.98G>A
			NM_000173.5:c.176T>G
von Willebrandova nemoc	AD	<i>VWF</i>	NM_000552:c.8333G>A
		<i>VWF</i>	NM_000552:c.2561G>A
porucha agregace trombocytů	AD	<i>SYTL3</i>	NM_001242394:c.682C>T
leukocytopenie	AD	<i>VPS8</i>	NM_001009921:c.2974A>C
hereditární sférocytóza	AD	<i>SLC4A1</i>	NM_000342:c.2057+1G>A
makrocytární korpuskulární hemolytická anemie	digenní	<i>SPTA1; SPTB</i>	SPTA1:NM_003126:c.3012_3025del; SPTB:NM_001355436:c.40C>T
hereditární polyglobulie	AD	<i>EGLN1</i>	NM_022051:c.616G>C
Shwachman-Bodian-Diamondův syndrom	AR	<i>SBDS</i>	NM_016038:c.536C>T; NM_016038:c.355T>C
Wiskott-Aldrichův syndrom	X-vázaná	<i>WAS</i>	NM_000377:c.998G>C
Heřmanský-Pudlák syndrom	AR	<i>HPS1</i>	NM_000195:c.1507C>T; NM_000195:c.1189delC
			NM_000195:c.1189delC (homozygot)
Sebastianův syndrom	AD	<i>MYH9</i>	NM_002473:c.3493C>T
hereditární hemoragická teleangiektázie	AD	<i>ACVRL1</i>	NM_001077401:c.1120C>T
β-talasemie	AR	<i>HBB</i>	NM_000518.4:c.79G>A
α-talasemie	AR	<i>HBA1; HBA2</i>	HBA1:NM_000558.3:delMED1; HBA2:NM_000516.3:a-3,7-delece
Smíšená α- a β- talasemie	AR	<i>HBB, HBA1; HBA1; HBA2; HBB</i>	HBB:NM_000518.4:c.52A>T; HBA1:NM_000558.3:c.2T>C
	AR		HBA2:NM_000516.3:a-3,7-delece (homozygot); HBB:NM_000518.4:c.20delA
intersticiální plicní fibróza	AD	<i>SFTPA1</i>	NM_005411:c.532G>A
plicní fibróza s rozvojem MDS	AD	<i>CTC1</i>	NM_025099:c.1360delG

AD – autozomálně dominantní, AR – autozomálně recesivní, FHD – familiární onemocnění krvetvorby, MDS – myelodysplastický syndrom

važné pulmonární fibrózy v 57 letech. V tomto případě se nám podařilo charakterizovat novou, dosud nepopsanou variantu c.1189delC (typu *nonsense*) na maternální alele, přičemž na paternální alele byla identifikována patogenní varianta c.1507C>T [15]. V další rodině jsme u dvou sester detekovali opětovně vzácnou variantu c.1189delC v genu *HPS1* v homozygotním stavu. Probandka (ročník 1979) trpí vrozeným albinismem, plicním postižením, nystagmusem, zvýšenou krvácivostí a léčí se s vysokým krevním tlakem. Zatímco mladší sestra (ročník 1985) fenotypově odpovídající vrozenému albinismu je zatím bez symptomů nemoci. Pomocí WES byla také vyšetřována pacientka s fenotypem IT a makrotrombocytózou (střední objem trombocytů – MPV: 15 fl), která od dětství trpěla diparetickou formou dětské mozkové obrny, mentální retardací a sekundární epilepsií. Na podkladě jasného záchytu varianty c.3493C>T v genu *MYH9* byl u ní diagnostikován **Sebastianův syndrom**. V tomto případě se pravděpodobně jednalo o variantu vzniklou *de novo* [16]. Dále byla v jedné rodině charakterizována nová vzácná varianta c.998G>C v genu *WAS* asociovaná s výskytem syndromu **Wiskott-Aldrich**. Tento nálezn pomohl upřesnit diagnózu a nastavit správnou léčbu, jelikož pacient byl původně diagnostikován jako Bernard-Soulierův syndrom. Raritní monoalelický Bernard-Soulierův syndrom byl detekován ve dvou rodinách s makrotrombocytopenií a mírnými krvácivými projevy. V prvním případě byla identifikovaná vzácná varianta c.176T>G v genu *GP1BA* u šesti postižených členů rodiny s hodnotou trombocytů ( $62\text{--}126 \times 10^9/l$ ) a ve druhém případě byla detekována pravděpodobně patogenní varianta c.98G>A v genu *GP1BA* u čtyř pacientů (trombocyty:  $12\text{--}102 \times 10^9/l$ ; MPV:  $10\text{--}15$  fl) [17,18].

V naší kohortě pacientů jsme také vyšetřovali několik rodin cizího etnika s diagnostikovanou těžkou anemií, mikrocytózou a suspektní  $\alpha$ - $\beta$ -talasemií. Metodický přístup se odlišoval použitím Sangerova sekvenování pro detekci SNV/indelů a metodou MLPA pro detekci CNV v genech *HBA1*, *HBA2* a *HBB*. Byly popsány jak známé sekvenační va-

rianty c.52A>T a c.20delA v genu *HBB*, tak i rozsáhlé delece označované jako -MED1 (*HBA1P1* pseudogen, promotorová oblast *HBA2* genu, *HBA2* gen, jeho 3'-nepřekládaná oblast) a jako delece  $\alpha$ -3,7 (*HBA2* gen, promotorová oblast *HBA1* genu) v heterozygotním i homozygotním stavu.

### Diskuze a závěr

Výzkumně se dlouhodobě zabýváme charakterizací genetických variant u rodin s FHD a stanovením predispozic k rozvoji onkologického onemocnění. Vzhledem k heterogenitě fenotypů a širokému spektru defektních genů se nám u většiny diagnóz osvědčilo využití metodického přístupu WES, doplněného o Sangerovo sekvenování a metodu MLPA. V analyzované kohortě 92 rodin jsme u 70 rodin dokázali identifikovat kauzální genetickou variantu segregující s fenotypem v rodině, což vedlo ke stanovení/upřesnění diagnózy u pacientů a k objasnění mnoha dosud nevyřešených případů. Ukázalo se, že většina kauzálních variant je unikátní pro konkrétní rodinu a v širší populaci se nevykytuje. Pozitivní záchyty představovaly nejen již popsané patogenní varianty, ale také velmi často nové varianty typu VUS. Některé z těchto variant navíc predisponovaly k rozvoji malignit v rodině či jiných orgánových dysfunkcí v průběhu života jedince. Naše údaje o nových variantách rozšiřují obecné znalosti v této oblasti, nicméně zároveň poukazují na nutnost prokázat funkční dopad VUS variant pomocí proteomických technologií.

Ve FN Brno se genetická analýza postupně stala součástí standardního hematologického vyšetření u pacientů suspektních pro FHD. Správná diagnostika a identifikace germinální varianty genu jsou klíčové pro stanovení rizik spojených s diagnózou. Potvrzení diagnózy pacienta má také kladný dopad na jeho individualizovanou péči a následnou léčbu.

### Dedikace

Práce byla podpořena grantovým projektem MZ ČR (grant AZV NU20-08-00137), grantovým projektem A-C-G-T z EFRR (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_026/0008448), MZ ČR – RVO (FNBr, 65269705) a MUNI/A/1224/2022.

### Literatura

- Bluteau O, Seberr M, Leblanc T et al. A landscape of germ line mutations in a cohort of inherited bone marrow failure patients. *Blood* 2018; 131(7): 717–732. doi: 10.1182/blood-2017-09-806489.
- Bodine D, Berliner N. Introduction to the review series on "bone marrow failure". *Blood* 2014; 124(18): 2755. doi: 10.1182/blood-2014-08-587394.
- Collins J, Dokal I. Inherited bone marrow failure syndromes. *Hematology* 2015; 20(7): 433–434. doi: 10.1179/1024533215Z.000000000381.
- Russo R, Andolfo I, Manna F et al. Multi-gene panel testing improves diagnosis and management of patients with hereditary anemias. *Am J Hematol* 2018; 93(5): 672–682. doi: 10.1002/ajh.25058.
- Savoia A. Molecular basis of inherited thrombocytopenias. *Clin Genet* 2016; 89(2): 154–162. doi: 10.1111/cge.12607.
- Noris P, Pecci A. Hereditary thrombocytopenias: a growing list of disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2017; 1: 385–399. doi: 10.1182/asheducation-2017.1.385.
- Vandenbergh P, Beel K. Severe congenital neutropenia, a genetically heterogeneous disease group with an increased risk of AML/MDS. *Pediatr Rep* 2011; 22; 3 (Suppl 2): e9. doi: 10.4081/pr.2011.s2.e9.
- Salavoura K, Kolialexi A, Tsangaris G et al. Development of cancer in patients with primary immunodeficiencies. *Anticancer Res* 2008; 28(2B): 1263–1269.
- Stenson PD, Mort M, Ball EV et al. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet* 2017; 136(6): 665–677. doi: 10.1007/s00439-017-1779-6.
- Richards S et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17(5): 405–424. doi: 10.1038/gim.2015.30.
- Staňo Kozubík K, Radová L, Pešová M et al. C-terminal RUNX1 mutation in familial platelet disorder with predisposition to myeloid malignancies. *Int J Hematol* 2018; 108(6): 652–657. doi: 10.1007/s12185-018-2514-3.
- Kozubík KS, Radová L, Reblova K et al. Functional analysis of germline ETV6 W380R mutation causing inherited thrombocytopenia and secondary acute lymphoblastic leukemia or essential thrombocythemia. *Platelets* 2021; 32(6): 838–841. doi: 10.1080/09537104.2020.1802416.
- Doubková M, Staňo Kozubík K, Radová L et al. A novel germline mutation of the SFTPA1 gene in familial interstitial pneumonia. *Hum Genome Var* 2019; 6: 12. doi: 10.1038/s41439-019-0044-z.
- Noris P, Favier R, Alessi MC et al. ANKRD26-related thrombocytopenia nad myeloid malignancies. *Blood* 2013; 122(11): 1987–1989.
- Doubková M, Trizuljak J, Vrzalová Z et al. Novel genetic variant of *HPS1* gene in Hermansky-Pudlak syndrome with fulminant progression of pulmonary fibrosis: a case report. *BMC Pulm Med* 2019; 19(1): 178. doi: 10.1186/s12890-019-0941-4.
- Sýkora M, Vrzalová Z, Vondráková J et al. Dědičná trombocytopenie na podkladě patogenní varianty genu *MYH9* diagnostikovaná u dospělé ženy. *TAHD* 2020; 26(4): 327–332.
- Trizuljak J, Staňo Kozubík K, Radová L. et al. A novel germline mutation in *GP1BA* gene N-terminal domain in monoallelic Bernard-Soulier syndrome. *Platelets* 2018; 29(8): 827–833. doi: 10.1080/09537104.2018.1529300.
- Skalníkova M, Staňo Kozubík K, Trizuljak J et al. A *GP1BA* variant in a Czech family with monoallelic Bernard-Soulier syndrome. *Int J Mol Sci* 2022; 23(2): 885. doi: 10.3390/ijms23020885.