

AZ ÚJGENERÁCIÓS MOLEKULÁRIS DIAGNOSZTIKAI MÓDSZEREK LEHETŐSÉGEI AZ ENDOKRINOLÓGIÁBAN

APPLICATION OF NEXT GENERATION SEQUENCING IN CLINICAL ENDOCRINOLOGY

Balla Bernadett^{1, a, b}, Kocsis-Deák Barbara^{2, a, b}, Kósa János^{3, a, b}, Árvai Kristóf^{4, a, b}
Tobiás Bálint^{5, b}, Takács István^{6, a}, Lakatos Péter^{7, a, b}

¹PhD, tudományos munkatárs
bernadett.balla@pentacorelab.hu

²MSc, PhD-hallgató

³PhD, laboratóriumvezető, tudományos főmunkatárs

⁴MSc, tudományos munkatárs

⁵PhD, tudományos munkatárs

⁶DSc, klinikaigazgató

⁷DSc, laboratóriumvezető, egyetemi tanár

^aSemmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. sz. Belgyógyászati Klinika, Budapest

^bPentaCore Laboratóriumok, Budapest

ÖSSZEFOGLALÁS

A genetika központi szerepe a modern betegellátásban napjainkban megkérdőjelezhetetlen. Az újgenerációs DNS-szekvenálási (NGS) módszerek megjelenése paradigmaváltást hozott a géndiagnosztikába. Korábban az endokrin betegségek diagnózisának felállítására rutinszerűen a fizikális vizsgálatokból, a laboratóriumi tesztek és képalkotó vizsgálatok elvégzéséből állt. A genetikai háttér felderítésére csak a jól körülhatárolható, monogénes kórképeknél volt lehetőség. A nagy átérésztőképességű újgenerációs szekvenálási platformok bevezetésével megváltozott a klinikai gyakorlat, amelyben ma már sokkal nagyobb hangsúlyt kapnak a genetikai vizsgálatok, valamint az eredmények diagnosztikus ereje is egyre meghatározóbb. Mivel számos endokrin betegség komplex multifaktoriális vagy multigénes etológiájú, ezért sokgénes átfogó panelek vagy akár a teljes genom kódoló régiójának költséghatékony vizsgálata válik szükségessé, kiegészítve a rutin klinikai tesztekkel. Számos példát találhatunk arra, hogy a klinikumban és a differenciáldiagnosztikában sikerrel alkalmazták az NGS-stratégiát, mint például a multifaktoriális endokrinopátiák, az átfedő fenotípust mutató kórképek, az endokrin tumorok, illetve megemléltendő prenatális használata is az endokrin vonatkozású nemi kromoszóma-rendellenességek szűrése kapcsán. Az újgenerációs technológia használatával amellet, hogy biztosabb diagnózist kaphatunk, mélyebb részleteiben érthetjük meg egy-egy összetett endokrin tünetegyüttes patogenetikai hátterét, feltérképezhetünk betegségmódosító génvariációkat, illetve új terápiás célpontok felé is utat nyithatunk.

ABSTRACT

Opportunities provided by genetic testing is now an unquestionably principal role in today's patient care. The emergence of next generation DNA sequencing (NGS) techniques has brought paradigm shift in gene diagnostics. Even recently, the diagnosis of various endocrine diseases consisted of routine physical examinations, laboratory and imaging tests, and it was only possible to identify the genetic background of the well-defined monogenic diseases. The launching of high-throughput next generation sequencing platforms has fundamentally changed the clinical practice. Genetic tests are becoming more prominent and the diagnostic power of results is increasingly important. Numerous endocrine diseases have complex multifactorial etiology, therefore a cost-effective sequencing of multigene panels, or even the whole exom is required to complete the routine clinical tests. There are many examples of successful use of the NGS strategy in clinical practice and in case of differential-diagnostical problems, such as: multifactorial endocrinopathies, overlapping phenotypes, endocrine tumors, or in prenatal application regarding to screening of endocrine-related sex chromosome disorders. Using next generation technology, in addition to providing a more reliable diagnosis, we can reveal the pathogenetic background of complex endocrine syndromes in more details, highlight disease-modifying gene variants, and find new therapeutic targets as well.

Kulcsszavak: klinikai endokrinológia, újgenerációs szekvenálás, géndiagnosztika

Keywords: clinical endocrinology, next generation sequencing, genetic diagnostics

Az elmúlt években páratlan fejlődésnek lehettünk szemtanúi a molekuláris genetika, ezen belül pedig elsősorban a DNS-szekvencia-meghatározás területén. Az újgenerációs szekvenálási módszerek (next generation sequencing, NGS) megjelenése paradigmaváltást eredményezett a géndiagnosztikában. Hatására sok esetben megváltozott a klinikai gyakorlat, amelyben ma már sokkal nagyobb hangsúlyt kaphatnak a genetikai vizsgálatok. Még a 2000-es évek közepén is az endokrin betegségek diagnózisának felállítása rutinszerűen a fizikális vizsgálatokból, a laboratóriumi tesztek és képalkotó vizsgálatok elvégzéséből állt. A genetikai háttér felderítésére főként a jól körülhatárolható, monogénes kórképeknél volt lehetőség. Ennek oka, hogy a hagyományos Sanger-féle szekvenálási eljárás a rövid génszakaszok analizését teszi lehetővé. Továbbá, csak olyan gének esetén alkalmazható relevánsan, ahol előre determinált pozíciókban, gyakran fordul elő hiba (mutációs *hot spot*). Emellett a meghatározásokat sokszor gátolta annak technikai bonyolultsága, igen magas költsége vagy rendkívül hosszú átfutása, illetve az, hogy a vizsgálat legtöbbször csak erre specializálódott munkacsoportokban, kutatási szinten volt megvalósítható.

A felsorolt nehézségek kiküszöbölése vált lehetővé a nagy áteresztőképességű újgenerációs szekvenálási platformok bevezetésével. Közös tulajdonságuk, hogy a szekvenálási reakció sokszorosan párhuzamosítva zajlik, vagyis egyszerre több

millió DNS-szál gyors és pontos leolvasása történik meg. Egyrészt ugyanazon reakcióban több tíz vagy száz gén szekvenciáját határozhatjuk meg teljes részletességgel. Így hatalmas mennyiségű genetikai információt kapunk sokkal rövidebb idő alatt, ráadásul sokkal kedvezőbb áron. A keletkező nagy mennyiségű adat elemzéséhez pedig ma már bioinformatikai szoftverek és *online* adatbázisok állnak rendelkezésre. Napjainkban világszerte működnek akkreditált minőségbiztosítási szervezetek, melyek feladata, hogy a géndiagnosztikai vizsgálatok minőségét javítsák külső minőségértékelő körvizsgálatok lebonyolításával, így téve egyre megbízhatóbbá a molekuláris genetikai laboratóriumokat és a teljes folyamatsort a mintavételtől a validált eredményekig.

Az NGS-technológia forradalmasította az endokrinológia területét is. Mivel számos endokrin betegség komplex multifaktoriális vagy multigénes etológiájú, valamint több hasonló fenotípust mutató állapot is merőben eltérő genetikai háttérrel rendelkezik, ezért az NGS-stratégia előnyösen integrálható a differenciáldiagnosztika sorába. Az újgenerációs szekvenálással egy adott génben nemcsak az esetleges hot spotok státusza azonosítható, hanem a gén komplett bázissorrendje is maradéktalanul leolvasható, az összes kódoló exonnal, intronikus szakaszokkal, esetenként promóter és nemtranszlálódó (UTR) régiókkal együtt. A célzott génpanelek összeállítása mellett pedig akár a teljes genom kódoló régiója is költséghatékonyan vizsgálható, kiegészítve a rutin klinikai tesztekkel. Az újgenerációs technológia használatával amellet, hogy biztosabb diagnózist kaphatunk, mélyebb részleteiben érthetjük meg egy-egy összetett endokrin tünetegyüttes patogenetikai hátterét, feltérképezhetünk betegségmódosító génvariációkat, illetve új terápiás célpontok felé is utat nyithatunk. Mára egyes újonnan átdolgozott szakmai irányelvek és revideált kritériumrendszerek szerint a genetikai eredmények diagnosztikus ereje egyre meghatározóbb. Sokszor a diagnózis felállításához nem szükséges megvárunk több jellemző fenotípusos marker egyidejű megjelenését, ha a betegségre utaló akár egyetlen klinikai tünet mellett fedünk fel bizonyítottan kóroki mutációt.

Mint minden módszernek, az NGS-technológiának is vannak korlátai. Ezek közé tartozik, hogy az analízis során átlagosan egy–néhány tíz nukleotid eltérést képes megbízhatóan detektálni. Csak bizonyos kritériumok mellett használható a kópiaszám-változással járó nukleotid variációk vizsgálatára. Valamint a rövid nukleotid ismétlődéseket nem lehet pontosan meghatározni, mert a referencia-szekvenciához történő illesztés során műtermékek keletkezhetnek. Továbbá a gének kódoló szakaszától viszonylag távol elhelyezkedő promóter vagy szabályozó régiókat – ha azok kiemelt klinikai jelentőséggel nem bírnak – a szekvenálási reakció tervezése során többnyire mellőzik.

A bemutatott limitációk egy részét a korszerű digitális kariotipizálás (vagy más néven komparatív genom hibridizáció – array CGH) segítségével léphetjük át. A technika használatával képesek vagyunk a nagyobb kromoszómaszakaszok átrendeződésének, deléciójának vagy duplikációjának vizsgálatára, illetve a kó-

piaszám-változások kimutatására is a teljes genom szintjén. További előnye, hogy a hagyományos kromozómafestéshez képest jóval érzékenyebb, nagyobb felbontású (50–60 Kb), és nem szükséges sejtenyészítés a metafázisos kromozómák létrehozásához. A kétféle megközelítéssel gyakorlatilag a genetikai eltérések teljes spektruma felderíthető.

Az endokrinológiában számos példát találhatunk arra, hogy a klinikai gyakorlatban sikerrel alkalmazták az újgenerációs DNS vizsgáló módszereket. Ide sorolhatók a különböző multifaktoriális endokrinopátiák, az átfedő fenotípust mutató kórképek, az endokrin tumorok, illetve megemlítendő prenatális használata is, például az endokrin vonatkozású nemi kromoszóma-rendellenességek szűrése kapcsán.

KONGENITÁLIS HIPOPARATIREÓZISOK

Komoly differenciáldiagnosztikai kihívás elé állítja az endokrinológusokat a hipoparatireózis. A klinikai kép csökkent szérum kalcium- és emelkedett foszfátszinteket mutat, míg a keringő parathormon mennyisége nagyon alacsony, akár mérhetetlen. A hipoparatireózisok jelentős hányada másodlagosan szerzett állapot, leggyakrabban a nyak elülső részén végzett sebészeti beavatkozások, illetve a pajzsmirigy eltávolításának következménye. Emellett tumoros infiltráció, ionizáló besugárzás vagy autoimmun folyamat is vezethet a mellékpajzsmirigy destruktójához. A primer vagy kongenitális hipoparatireózisok molekuláris genetikai háttere és öröklésmenete pedig rendkívül változatos. Egyaránt érintett lehet a mellékpajzsmirigy szövetállományának embrionális fejlődése, valamint a parathormon (PTH) képződésének és szekréciójának folyamata is. A primer formát feloszthatjuk szindrómás hipoparatireózissra, ahol egy komplex öröklött betegség része a mellékpajzsmirigy alulműködés. Autoszomális domináns öröklődést mutató típusa például: a DiGeorge-szindróma 1 és 2, a *TBX1*- vagy *NEBL*-gén hibáival, ahol a hipoparatireózishoz jellemzően timusz aplázia, immundeficiencia és szívfejlődési rendellenesség társul. A HDR-szindrómában, melynek oka a *GATA3*-gén mutációja, a hipoparatireózis fő kísérő tünete az idegeredetű siketség és a diszpláziás vesék előfordulása. A hipoparatireózis a Kenny–Caffey-szindrómáknak is részét képezi. További szimptomái az alacsony növény, az oszteoszklerózis és a hosszú csöves csontok kortikális megvastagodása. Kialakulásáért a *TBCE*- és *FAM111A*-génekben bekövetkezett eltérés felelős. Esetükben leírtak mind domináns, mind recesszív öröklődést. A hipoparatireózis komponense lehet olyan kórképeknek is, melyek mitokondriális géndefektusokra vezethetők vissza (például a Kearns–Sayre-, MELAS-, MTPDS-szindrómák). A nem szindrómás, önállóan előforduló hipoparatireózisok közé tartozik a mellékpajzsmirigyek izolált hiánya vagy a familiáris hipoparatireózis. Ezek molekuláris hátterét egyrészt a *GCM2*-génhiba adhatja. A gén által kódolt *glial cells missing homolog 2* ki-

zárólag a mellékpajzsmirigyben kifejeződő, elsődleges transzkripciót szabályozó faktor. Másrészt a parathormont kódoló *PTH*-gén sérülése is okozhat ilyen klinikai képet, mert ennek következtében nincs működőképes parathormon-elválasztás. Illetve a kalciumszenzor (*CASR*) gén aktiváló mutációja, mely blokkolja a *PTH*-felszabadulást. A betegség X-kromoszómához kapcsolt recesszív formájában a *SOX3* regulátor gén szerepét igazolták.

Ahogy a felsorolásból is látszik a primer hipoparatiroidizis etiológiája nagyon különböző molekuláris genetikai eltérésekre vezethető vissza. Major tünetként pedig minden esetben hipokalcémiát és szinte detektálhatatlan szérumban *PTH*-szintet tapasztalunk. Ezért nagy segítséget nyújt, ha a diagnosztikai lépések közé lehetőségünk van beiktatni a megfelelő kandidáns géneket célzó újgenerációs szekvenálást. Az átfogó génpanel tartalmazza a mellékpajzsmirigy fejlődési rendellenességeiben feltárt géneket, melyek főleg a csíralemezek differenciálódását és mRNS expresszióját kontrolláló transzkripció faktorokat kódolnak (például *GATA3*, *GCM2*, *TBCE*, *TBX1*, *SOX3*), a *PTH*-jelátvitelért és -szekrécióért felelős géneket (például *CASR*, *FAM111A*, *PTH*) és a mitokondriális géneket. Az akkreditált laboratóriumokban jelenleg elérhető géndiagnosztikai csomagok 8–17 releváns gén mutációanalízisét tartalmazzák. A különböző platformokon végzett módszerek analitikai szenzitivitása minden esetben meghaladja a 99%-ot. A tesztek kiegészíthetők a nagy deléciók/duplikációk vizsgálatával is, azonban a hipoparatiroidizishoz kapcsolt géneknél az irodalom szerint ezek elenyészve vagy egyáltalán nem fordulnak elő. A DNS-szekvenálás eredménye egyrészt megerősítheti a klinikai diagnózist, ezenkívül a megfelelő kezelés megválasztását is biztosabbá teszi. Sok esetben az aszimptomatikus egyenesági rokonok hordozóságának szűrésére és korai terápiájának elindítására is lehetőséget ad. Az NGS klinikai gyakorlatban való használatával az is megállapítható, hogy *de novo* mutációról van-e szó, vagyis az index páciens az első érintett-e a családban. Az NGS-eredmények akár módosíthatják az eddigi ismereteinket új patogén mutációk szerepének megvilágításával. Egy tanulmányban sikettségel és/vagy vese diszpláziával társult hipoparatiroidizisos betegeket vizsgáltak. Az esetek egy részében alátámasztották a korábban leírt *GATA3*-gén szerepét, azonban a csoport másik részében *GATA3*-génmutáció nem volt azonosítható. Ez a megfigyelés is felhívja a figyelmet a sokrétű és változatos genetikai háttérre és a nagy hatékonyságú szekvenálási módszerek jelentőségére.

KÖTŐSZÖVETI BETEGSÉGEK

Hasonló differenciáldiagnosztikai nehézséget okoz bizonyos kötőszöveti betegségek elkülönítése. Ezen genetikai kórképek közös klinikai jellemzője a szív- és érrendszer, a szem és a vázrendszer különböző mértékű érintettsége. Ide sorol-

ható az autoszomális domináns módon öröklődő Marfan-szindróma, melynek kulcsfontosságú jegyei a gyenge érfal, a kitágult aorta, a magas és vékony alkat, gerincdeformitások, a hipermobilis, laza ízületek és a pókszerű ujjak megjelenése, valamint a szemlencse elmozdulása vagy rendellenes elhelyezkedése. Alapja a kötőszöveti rostok egyik alkotóelemét, a fibrillin-1-molekulát kódoló nagyméretű *FBNI*-gén hibája. Eddig több mint háromezer különféle pontmutációja ismert, amelyek aminosavcserét, kereteltolódást vagy korai fehérjeszintézis terminációt is okozhatnak. Azonban néhány betegben a teljes gén kiesését is dokumentálták. Így, bár a betegség monogénes, rendkívül heterogén betegsócsoportot eredményez. A modern DNS-vizsgáló technológiák alkalmazásával azt is felismerték, hogy egyes marfanoid fenotípust mutató páciensek nem hordoznak *FBNI*-eltéréseket. Ezen esetekben a transzformáló növekedés faktor-béta receptorok (*TGFBR1* és *TGFBR2*) patogén variánsait kóroki tényezőként Loeys B. L. és Dietz H. C. publikálta 2005-ben a *Nature Genetics*-ben. A róluk elnevezett szindróma genetikája azóta a kanonikus TGFB jelátviteli út egy másik tagjának (SMAD3) szerepével is bővült. Az Ehlers–Danlos-szindróma (EDS) vaszkuláris, IV-es típusa szintén az előzőekhez hasonló képet mutat; arteriális komplikációk, főként aneurizmák, elvékonyodott hám, hajlékony és instabil ízületek. Kialakulása a *COL3A1* domináns mutációjából adódó kollagén metabolizmus zavarával hozható összefüggésbe. Emellett vaszkuláris kockázatot mutat a kollagén lizil hidroxiláz I enzim (*PLODI*-gén) hiányában létrejött EDS ritka, recesszív VI-os típusa is, ahol a progresszív gerincferdülés kifejezettebb.

Érthető, hogy milyen fontos az átfedő klinikai manifesztációjú kötőszöveti betegségek pontos definiálása, illetve ezeknek a három fő szervrendszert is érintő szisztémás kórképeknek az elkülönítése, például az önállóan kardiovaszkuláris jeget mutató, kardinálisan aortatágulattal és -repedéssel járó familiáris mellkasi aorta aneurizmától (fTAAD) vagy a kanyargós artéria szindrómától (ATS). Továbbá a legfőképpen szkeletális vonatkozású Shprintzen–Goldberg-szindrómától és a veleszületett ízületi kontraktúrával járó pókujúságtól (CCA), végül a főleg szemészeti anomáliákkal jellemezhető ektopia lentisz, illetve Weill–Marchesani-szindrómáktól.

Az esetek felismerése legtöbbször csak az életveszélyes és nem ritkán halálhoz vezető aortadisszekció után történik meg. Korai diagnózissal és időben elvégzett profilaktikus beavatkozásokkal a súlyos szövődmények elkerülhetők. A különböző laboratóriumok általában kiterjesztett, harmincgénes paneleket kínálnak, de a Marfan-szerű és az egyéb öröklődő kötőszöveti betegségekhez asszociáltan akár 67 gén egyidejű vizsgálatát is lehetővé teszik. Az utóbbi években egyre könnyebben hozzáférhető NGS-applikációknak köszönhetően nagy mennyiségű genetikai adat birtokába jutottunk, amely részletesebb betekintést enged ezen betegségek patomechanizmusába. Az új felfedezések alapján már körvonalazódni látszik a TGFB-út vonal és annak regulációs zavara mint közös kórleltani háttér. Ez idővel

megváltoztathatja akár az osztályozást is. Emellett gyógyszeres kezelések felé is utat mutathat, mivel a közelmúltban ismertté vált, hogy a TGFB-kaszád effektív antagonistái az egyébként hemodinamikai szabályzó angiotenzin II receptorblokkolók. Amellett, hogy csökkentik a vérnyomást, és ezáltal hatásosak az aneurizma formáció és az aortarepedés megelőzésében, a felborult, illetve felerősödött kaszkád gátlásában is részt vesznek.

METABOLIKUS CSONTBETEGSÉGEK

Egy további, a különböző szakmák együttműködését igénylő betegség az oszteogenezis imperfekta (OI). A tünetek széles skálájával jellemezhető, azonban legfontosabb klinikai jegyei a kis traumára bekövetkező gyakori csonttörések, egyéb vázrendszeri deformitások, a szklera kékes elszíneződése és a hallásvesztés. Gyakoribb típusait az I. típusú kollagént kódoló gének (*COL1A1* és *COL1A2*) heterozigóta mutációja okozza, melyből eddig több mint 2500 féléét közöltek. Az I. típusú kollagén az extracelluláris mátrixban nagy mennyiségben megjelenő szerkezeti fehérje, így nem meglepő, hogy ezen gének mutációi pleiotróp hatásúak. A domináns forma mellett autoszomális recesszív öröklést is leírtak, elsőként 2006-ban a *CRTAP*-gén funkcióvesztésével. Mára további recesszív géneket is megismertünk, melyek a kollagén bioszintézisében, a tripla helikális struktúra kialakításában és a láncok keresztkötésében érintettek. A betegség súlyosságát a mutációk típusa nagyban meghatározza, a recesszív formák súlyosabb klinikai manifesztációt mutatnak.

Az oszteogenezis imperfekta esetében is az NGS-éra megjelenésével párhuzamosan új nomenklátúra került bevezetésre 2010-ben. Ez alapján a betegség klasszifikációjában sokkal nagyobb hangsúlyt kap a genetikai eredmény. A részletes genetikai tesztek jelentősége nemcsak az, hogy azonosítja az egyes OI-altípusokat, illetve elkülöníti a betegséget az egyéb multiplex csonttörésekkel vagy csökkent csonttömeeggel járó átfedő fenotípusoktól, hanem segít eldönteni, hogy a visszatérő fraktúrák háttérben esetlegesen gyermekbántalmazás áll-e. Ez utóbbi akkor lehet alapvető, amikor nincs családi kórelőzmény, és az egyetlen uralkodó tünet a kisgyermekkoriban gyakori csonttörés. Epidemiológiai adatok szerint az újszülöttek és csecsemők körében a fizikai bántalmazás prevalenciája sokkal nagyobb, mint az OI előfordulási gyakorisága. Egy következő diagnosztikai nehézség, hogy az OI néhány klinikai képe, mint például a kék szklera, csecsemőkben normális jelenség is lehet.

Az OI patogenezisében szerepet játszó gének nagy mérete (például: a *COL1A1*-gén több mint ötven kódoló exonból áll) és száma, valamint változatos mutációs mintázata miatt jó hatékonysággal alkalmazható az újgenerációs szekvenálási módszer. Elég széles körű, húsz-harminc releváns gént magában foglaló, előre

megtervezett NGS-panelek érhetők el. Ezek lefedik az oszteogenezis imperfekta autoszomális domináns formáit (*COL1A1*, *COL1A2*, *IFITM5*, *PLS3*), a rosszabb életkilátásokkal járó recesszív variánsokat (*BMP1*, *CREB3L1*, *CRTAP*, *FKBP10*, *P3H1/LEPRE1*, *PLOD2*, *PPIB*, *SERPINF1*, *SERPINH1*, *SP7*, *TMEM38B*, *WNT1*), az X-kromoszómához kapcsolt oszteoporózist (*PLS3*), a hipofoszfátáziát (*ALPL*) és az oszteoporózis pszeudoglioma-szindrómát (*LRP5*). A molekuláris genetikai laboratóriumok többsége a szekvenálást kiegészíti a nagyobb génszakaszokat érintő hibák vizsgálatával. Ezek az OI esetén kb. 1%-ot képviselnek, elsősorban a *COL1A1*- és *COL1A2*-génekből.

ENDOKRIN DAGANATOK

A multiplex endokrin neopláziák (MEN-szindrómák) esetén szintén előrelépést hozott az NGS-metodika. Habár a genetikai háttér viszonylag régóta ismert és jól definiált, ennek ellenére a kiterjedt és részletes szekvenálás lehetősége további előnyöket szült. A MEN-tumorszindrómákat klinikai megjelenésük és okozati génhibáik szerint négy fő csoportra oszthatjuk (MEN1–4). Közös jellemzőjük, hogy öröklődésük egyaránt domináns jellegű. A leggyakoribb forma a MEN1-típus, amelyben rendszerint mellékpajzsmirigy adenóma, entero-pankreatikus neuroendokrin daganat és hipofízistumor társulhatnak. Penetranciája ötvenéves korig közel 100%. A betegséget okozó *MEN1*-gén által kódolt menin fehérje hatással van a génátíródás, a genomstabilitás, a sejt differenciálódás és proliferáció szabályozására. A *MEN1*-mutációkra nagyfokú diverzitás jellemző, a gén 1830 bázispárból álló kódoló régiójában eddig több mint 1300 pontmutációt írtak le. A klasszikus genetikai analízisek célpontja a 2–10 exonokkal határolt kódoló génszakasz. Azonban 5–25%-ra becsülik azon betegek arányát, akiknél ebben a régióban nem sikerül szekvenciaeltérést azonosítani. Ilyen esetekben lehetséges, hogy a *MEN1*-gén egyéb, promóter vagy UTR-szakaszán lokalizálódik a kóros mutáció. Előfordulhat a gén részleges vagy teljes deléciója, amelyet a szekvenálás nem lát.

A MEN1-asszociált tumoros betegben valamely hasonló fenotípust eredményező gént is érinthet a hiba. Ez további három gén eshetőségére világít rá: a transzkripciót szabályozó *CDC73* – hipoparatiroidizis állkapocstumor szindróma (HPT-JT), a szérumban kalciumérzékelő *CASR* – familiáris hipokalkiuriás hiperkalcémia (FBHH) és a tumorszuppresszor *AIP* – familiáris izolált hipofízis adenóma (FIPA). A genetikai vizsgálat elvégzése indokolt, ha két MEN-szindrómára jellemző tumor egyszerre jelenik meg, ha erősen gyanítható a MEN1 diagnózis (például: többszörös mellékpajzsmirigy adenómák negyvenéves életkor előtt, visszatérő hiperparatiroidizis, a hasnyálmirigy szigetsejtes daganata), vagy ha a MEN1 atípusos megjelenésű, továbbá, ha a családban előfordult a betegség.

A genetikai vizsgálat legfőbb haszna, hogy az igazoltan MEN1-szindrómás családokban a mutációhordozó állapot kizárása feleslegessé teszi a további klinikai szűrővizsgálatokat. Míg a tüneteket nem mutató családtag hordozóságának megállapítása segítheti az esetleg kialakuló daganatok korai felfedezését. A *de novo* állapotokban vagy ha a célzott génszekvenálás negatív eredményt ad, érdemes kiterjedt NGS-panelt végeztetni, ahol a *MEN1* kódoló szakaszai mellett a további regulátorrégiók is analízisre kerülnek, illetve az egyéb átfedő szindrómák génjei is, melyek segítik a differenciáldiagnózist és a kezelés helyes megválasztását.

A medulláris pajzsmirigy karcinómával járó MEN2-szindróma érdekessége, hogy a kialakulásáért felelős *RET*-protoonkogén 90%-ban meghatározott pozíciókban mutálódik. Ezek a 10. és 11. exonok cisztein aminosavat kódoló (609, 611, 618, 620 és 634) kodonjaiban fordulnak elő a MEN2A esetén. A MEN2B-szindrómában pedig a 16. exon 918-as kodonjának és ritkábban a 15. exon 883-as kodonjának aminosavcseréi okozzák a betegséget. A *RET*-mutációk azonosítása mind a kórisme, mind a kezelési stratégiák tekintetében kritikus. Megfigyelték, hogy a *RET* M918T-mutáció esetén a tumor sokkal agresszívebb viselkedést produkál, ezért a diagnózist követően a lehető leghamarabb totális pajzsmirigy-eltávolítás javasolt. Valamint, ha a *RET* gén 634 kodonjában igazolódik az eltérés, még ötéves kor előtt szükséges a pajzsmirigy teljes szövetállományának preventív ablációja. Mivel ilyen szoros az összefüggés a genotípus és a betegség kifejeződése között, ezért nagyon fontos a talált mutáció patogénitásának meghatározása és klinikai interpretálása. A nagy átérésztőképességű NGS-technológiával a *RET*-protoonkogén teljes kiterjedésében, nagyszámú populációs mintán elemezhető, így a rohamosan gyarapodó szekvenciainformációkra támaszkodva az újonnan feltérképezett ritka variánsok patogén vagy polimorf jellege könnyebben értelmezhető. Öröklött *RET*-mutáció a sporadikus medulláris pajzsmirigyrákos esetek 1–7%-ában is jelen lehet, ezért ilyenkor is indokolt a genetikai vizsgálat, különösen, ha a tumor fiatalon jelentkezik.

Az újgenerációs nagy felbontású genetikai vizsgálati módszerek nemcsak az öröklődő betegségek és a csírasejtes mutációk vizsgálatának lehetőségét forradalmasították, hanem még inkább átszötték a tumorgenetika területét. Használatukkal a szomatikus variánsok sokkal kisebb tumorarány mellett, akár 10% alatti allélfrekvencia esetén is detektálhatóvá váltak. Ez a határérték a klasszikus Sanger-szekvenálásnál még átlagosan 30% volt. Azonban ez egyfajta kihívást is jelent a megtalált klinikailag jelentős variánsok validálása terén.

Az endokrin vonatkozású daganatok közül viszonylag elterjedt a petefészekrák, mely igen rossz prognózisú, mivel megfelelően érzékeny és hatékony szűrő-módszerek híján általában előrehaladott stádiumban kerül felfedezésre. Az esetek kb. 10%-a vezethető vissza örökletes okokra, háttérben legtöbbször a *BRCA1*- és 2-gének hibájával. Pozitív diagnosztikai teszteredmény esetén – a talált mutáció típusától is függően –, önmagában a *BRCA1*-mutáció hordozása 40%-os ri-

zíkóemelkedést jelent petefészekrákra. Emellett egyéb, nem BRCA-gének is érintettek lehetnek a daganat kifejlődésében, melyek ugyancsak a DNS-hibajavító rendszer alkotóelemei; a bázispárosodási hibák és a DNS kettősszál törések helyreállításában, illetve a tumorszuppresszióban vesznek részt (például: *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CHEK2*, *MLH1*, *MSH2,6*, *RAD51C,D*, *PALB2* és *TP53*). A petefészekrák szövettanilag, morfológiailag és funkcionálisan is meglehetősen heterogén csoportot képez. A klinikai és molekuláris genetikai tulajdonságok alapján azonban a sporadikus petefészek-tumороkat két nagy csoportra oszthatjuk. Egyfelől összetartoznak azok, melyek relatív stabil genommal és lassabb, lépésről lépésre haladó lokális tumorgenezissel jellemezhetők. A szerzett génhibák ez esetben a *KRAS*-, *BRAF*-, *ERBB2*-, *PIK3CA*-, *ARID1A*-, *CTNNT1*- és *PTEN*-génekben található. Másfelől a sokkal agresszívebben viselkedő és kedvezőtlenebb kimenetelű, rosszul differenciált tumороk nagyfokú genomi instabilitással bírnak. Vezető genetikai anomáliaként itt pedig a *TP53*-, majd a *BRCA1/BRCA2*-gének szomatikus inaktivációja állapítható meg.

Mára legkevesebb tizenhat különböző génről ismert, hogy az öröklött petefészek-daganatok kialakulásának patomechanizmusában szerepet játszik. Az újgenerációs DNS-tesztek megoldást kínálnak a tumorhajlamot fokozó gének egyidejű vizsgálatára, valamint segítségükkel kialakítható a molekuláris diagnózis. Az Európai Klinikai Onkológiai Társaság előírása szerint egy új, a célzott terápia alapját képező gyógyszercsoport, az ún. poli-ADP-ribóz polimeráz enzim- (PARP) gátlók személyre szabott tumorterápiás használatához ismerni kell a *BRCA*-gének státuszát. Az NGS mint eszköz a már sokszor emlegetett előnyeivel (érzékenység, precizitás, gyorsaság és költséghatékonyság) a terápiás döntéshozatal elengedhetetlen részévé vált.

PAJZSMIRIGYDAGANATOK

Végül, de nem utolsósorban a leggyakoribb endokrin malignitások, a pajzsmirigy-tumороk genetikai aspektusa sem hagyható említés nélkül. Az NGS-alapú genetikai tesztek térnyerése e területen is megteremtette a molekuláris diagnosztika lehetőségét. A pajzsmirigy rosszindulatú daganatainak döntő többsége a folliculus epitélisejtekből kiinduló jól differenciált papilláris vagy folliculáris karcinóma. Az esetek 85%-át képviselő papilláris rákokban elsőként és azóta egybehangozóan a pajzsmirigy-rák-genetika mára kritikussá vált egyik szereplőjét, a *BRAF* V600E szomatikus mutációját azonosították. Ez a funkciónyeréssel járó génhiba a MAPK-út vonal konstitutív aktivációját eredményezi, és kimutatható a papilláris tumороk több mint 50%-ában. Egyre növekszik azon bizonyítékok száma, miszerint a tumor *BRAF*-státusza és klinikai jellemzői – mint kiújulás, áttétképződés vagy agresszivitás – között összefüggés mutatkozik. Emellett a *BRAF*-mu-

tációt hordozó tumorok jobban ellenállnak a radiojód terápiának. Az eddig elért tumorgenetikai eredmények alapján az Amerikai Pajzsmirigy Társaság 2015-ben ajánlást fogalmazott meg, miszerint két célzott hatóanyag (sorafenib és lenvatinib) alkalmazható a *BRAF*-mutáns, progresszív, lokálisan előrehaladott, radioaktív jódkezelésre refrakter pajzsmirigy-tumorok kezelésében. Sokkal csekélyebb arányban, de a papilláris karcinómákban *TERT*-promóter-mutáció is előfordulhat, amely nagyban növeli a kiújulás és a halálozás kockázatát. A follikuláris típusú tumorok, illetve a papilláris rákok follikuláris variánsainak 30-45%-ában, más adatok szerint akár 70%-ában a *RAS*-gének mutációit köztölték, melyek az MAPK mellett egy másik növekedési faktor jelátviteli útvonalat, a PI3K/AKT-kaszkádot is képesek stimulálni. A pontmutációkon kívül a pajzsmirigy-tumorokban gyakran génátrendeződések (RET/PTC és PAX8/PPARG) is találunk, amelyek szintén befolyásolják a daganat klinikai viselkedését.

Azonban a már meglévő daganatok molekuláris tipizálása mellett sokkal kiemeltebb jelentőséget kapott a pajzsmirigy-göbökben származó tübiopsziás minták genetikai vizsgálata. A klinikai gyakorlatban ultrahangvezérelt aspirációs mintavételezéssel nyernek sejteket egy gyanúsnak ítélt pajzsmirigy-göbökben. Ennek citológiai feldolgozása során ítélik meg a malignitásra utaló jeleket. Az aspirációs citológiai módszer igen érzékeny, azonban az esetek kb. 20%-ában nem ad egyértelmű eredményt. Ilyenkor a diagnosztika nélkülözhetetlen részévé válhat a genetikai eredménnyel kiegészített citológiai lelet. A génmutációk jelenléte akár jóindulatú, atípusos vagy nem egyértelmű citológiát mutató göbökben egyaránt előrejelezhető a rosszindulatú átalakulás lehetőségét, így segítve a műtéti eltávolítás szükségességének megítélését. A pajzsmirigyben lévő tapintható és látható göbök gyakorisága a lakosság körében 4–7%, az 1–1,5 cm-nél kisebb göbök előfordulása nőknél eléri a 20–30%-ot is. Az epidemiológiai adatokból látszik, hogy nagy számban történik rutin biopsziás mintavétel, amelyet sok esetben genetikai vizsgálat is kiegészít.

Több biotechnológiai cég fejlesztett kimondottan a pajzsmirigyszövet géndiagnosztikai elemzésére alkalmas NGS-módszert (Európában elsőként magyar fejlesztésű génpanel érhető el). A tesztek kiemelkedő szenzitivitási és specifikitási mutatókkal, egy-két hetes átfutással adnak megbízható eredményt. A mutációs panelek a tumorgenom atlaszban megtalálható, a karcinogenezissel összefüggésben leírt géneket foglalják magukba különböző felbontásban és számban. A pajzsmirigy-rákra jellemző, ún. *driver* gének mellett sokszor gyengébb vagy más tumorok esetén bizonyított hatású egyéb tumorszuppresszor és onkogéneket is tartalmaznak. Az újgenerációs platformokon pedig nem kizárólag a tumor-asszociált gének szekvenenciaanalízisét végzik, hanem párhuzamosan génátrendeződések és akár mikroRNS-expressziót is detektálnak. Az így összegyűlt genetikai információkból komplexebb képet alkothatunk a pajzsmirigy-daganatok kialakulásáról, mutációs mintázatáról, annak időbeni változásáról, vagy éppen a klinikai megjelenést, illetve terápiát módosító hatásairól.

PRENATÁLIS VIZSGÁLATI LEHETŐSÉGEK

A bemutatott NGS-technológiák ezeken felül már a magzati kromoszóma-rendellenességek szűrésében is használatban vannak. Az ún. nem invazív prenatális tesztek (NIPT) az anyai vérben keringő szabad magzati DNS-t kinyerve képesek a magzati kromoszómák számbeli eltéréseinek és bizonyos mikrodeléciók szindrómáinak kimutatására. Így például az endokrin vonatkozású, nemi kromoszómákat érintő aneuploidiak már születés előtt azonosíthatók, ami lehetőséget biztosít a pszichoszociális vonatkozások mellett az optimális orvosi kezelés megkezdésére.

A genetika központi szerepe a modern betegellátásban immáron megkérdőjelezhetetlen. Az újgenerációs módszerek bevonultak a rutin diagnosztika eszközei közé, és Magyarországon is egyre inkább elérhetőek. Azonban az ilyen komplex genetikai vizsgálatok során minden esetben javasolt a humángenetikai konzultáció, ahol szakember jelenlétében tájékozódhatunk az adott teszt előnyeiről és korlátairól. Továbbá célszerű mindig a célzott és leginkább a klinikai tüneteknek megfelelő, releváns génpanel kiválasztása annak érdekében, hogy a betegséget okozó eltérés azonosítása egyértelmű legyen. Minél kisebb mennyiségben keletkezzenek olyan genetikai információk, amelyek klinikai összefüggéseit még nem tudjuk magyarázni. Azonban, ha egy feltételezett kórkép hátterét az elsődlegesen célzott vizsgálattal nem sikerül felderíteni, alkalmazhatunk kiterjesztett, akár exomszintű szekvenálást is – manapság már rutinszerűen. Így olyan új, eddig ismeretlen patogén génavariációkat és potenciális géneket is adatbázisokba helyezhetünk, amelyek az adott betegség molekuláris patomechanizmusának jobb megértését szolgálják.

IRODALOM

- Byers, P. H. – Krakow, D. – Nunes, M. E. et al. (2006): A Genetic Evaluation of Suspected Osteogenesis Imperfecta (OI). *Genetics in Medicine*, 8, 6, 383–388. DOI: 10.1097/01.gim.0000223557.54670.aa, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3110960/>
- Cha, Y. J. – Koo, J. S. (2016): Next-generation Sequencing in Thyroid Cancer. *Journal of Translational Medicine*, 14, 1, 322. DOI: 10.1186/s12967-016-1074-7, <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-016-1074-7>
- Clarke, B. L. – Brown, E. M. – Collins, M. T. et al. (2016): Epidemiology and Diagnosis of Hypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.*, 101, 6, 2284–2299. DOI: 10.1210/jc.2015-3908, <https://academic.oup.com/jcem/article/101/6/2284/2804730>
- Van Dijk, F. S. – Sillence, D. O. (2014): Osteogenesis Imperfecta: Clinical Diagnosis, Nomenclature and Severity Assessment. *American Journal of Medical Genetics A*, 164A, 6, 1470–1481. DOI: 10.1002/ajmg.a.36545, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4314691/>
- Hoffjan, S. (2012): Genetic Dissection of Marfan Syndrome and Related Connective Tissue Disorders: An Update 2012. *Molecular Syndromology*, 3, 2, 47–58. DOI: 10.1159/000339441, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3542934/>

- Marini, F. – Giusti, F. – Brandi, M. L. (2015): Genetic Test in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 Syndrome: An Evolving Story. *World J Exp Medicine*, 5, 2, 124–129. DOI: 10.5493/wjem.v5.i2.124, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4436936/>
- Salani, R. – Chang, C. L. – Cope, L. et al. (2006): Digital Karyotyping: An Update of Its Applications in Cancer. *Mol Diagn Ther.*, 10, 4, 231–237. DOI: 10.1007/BF03256461
- Suresh, P. S. – Venkatesh, T. – Tsutsumi, R. et al. (2017): Next-generation Sequencing for Endocrine Cancers: Recent Advances and Challenges. *Tumor Biology*, 39, 5. DOI: 10.1177/1010428317698376, <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1010428317698376>
- Toss, A. – Tomasello, C. – Razzaboni, E. et al. (2015): Hereditary Ovarian Cancer: Not Only BRCA 1 and 2 Genes. *Biomed Research International*, 341723. DOI: 10.1155/2015/341723, <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/341723/>
- Wells, S. A, Jr. – Pacini, F. – Robinson, B. G. et al. (2013): Multiple Endocrine Neoplasia Type 2 and Familial Medullary Thyroid Carcinoma: An Update. *J Clin Endocrinol Metab.*, 98, 8, 3149–3164. DOI: 10.1210/jc.2013-1204, <https://academic.oup.com/jcem/article/98/8/3149/2833379>
- Zolotov, S. (2016): Genetic Testing in Differentiated Thyroid Carcinoma: Indications and Clinical Implications. *Rambam Maimonides Medical Journal*, 7, 1, DOI: 10.5041/RMMJ.10236, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4737515/>