

Molekuláris genetikai vizsgálatok klinikai genetikai laboratóriumunkban

Dr. Endreffy Emőke
SZTE Gyermekgyógyászati Klinika

Genetikailag a humán betegségek 3 csoportra oszthatók:

1. Monogénes betegségek (egy gén hibája okozza, mendeli öröklődésmentet követnek, számuk:>4000).
2. Komplex genetikai betegségek (több gén hibája és környezeti hatás okozza, pl. cardiovascularis betegségek, hypertonia, arthritis, diabetes, tumorok stb.).
3. Szerzett („minimálisan” genetikai) betegségek (pl. kanyaró vagy bal-eset miatti).

Vizsgálati módszerek a klinikai molekuláris genetikában

I. *Monogénes* betegségek: az adott betegség génje és a betegséget okozó mutációk nagyrészt ismertek:

1. Direkt mutációs diagnosztikával (ismert kb. 500–600 gén esetében), pl.: cystas fibrosis, Duchenne/Becker izomdystrophia, Leiden mutáció, haemochromatosis gén C282Y, metilén-tetrahidrofolát reduktáz (MTHFR) gén C677T, prothrombin G20210A stb. esetén.
2. Indirekt diagnosztikával (kapcsoltsági vizsgálatok): pl. Alport sy., polycystas vesebetegség, Lesch-Nyhan-sy. Marfan-sy. stb. esetén.

–Cél: molekuláris genetikai diagnosztika, carrier (génmutációt hordozó-e?) vizsgálat és magzati diagnosztika.

II. *Polygénes* betegségek: fogékonyság vizsgálata (pl.: coeliákiára HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1 genotipizálással).

Monogénes betegségek vizsgálata:

Direkt mutációs analízissel:

- *Leiden mutáció vizsgálata*

A fokozott thrombózis hajlam öröklődő tényezőjének a kimutatása. *Oka:* az Va véralvadási faktort kódoló gén (1q21-25) G1691A (R506Q) mutációja esetén az aktivált protein C nem képes az Va faktort elhasítani (aktivált protein C, vagyis APC rezisztencia alakul ki).

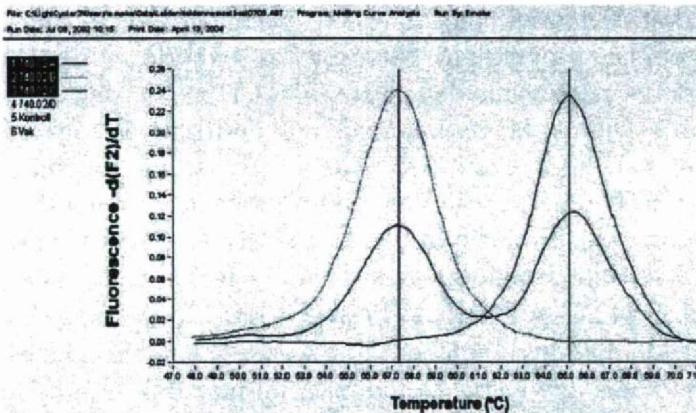
A heterozygóta *géngyakorisága:* 2–7%, rizikójuk mélyvénás thrombosisra kb. 7-szeres, a homozygótáké (1/5000) kb. 50-100-szoros az átlag populációhoz képest.

Kockázati tényezők: tartós immobilizáció, terhesség, szülés, orális fogamzásgátlók szedése.

Újszülöttek, kisgyermek protein C rendszerének a kapacitása csökkent lehet (+ Leiden mutáció: prothromboticus állapot?)

Prothrombin G20210A:

A prothrombin gén G20210A mutációja is növeli a thrombosis hajlomot (a lakosság 2%-át érinti).



Pontmutáció vizsgálata „real-time” polimeráz lánreakcióval és olvadáspont analízissel (LightCycler)

A haemochromatosis C282Y génmutációjának kimutatása:

Európai eredetű népességben az egyik leggyakoribb öröklődő betegségről van szó (homozygóta gyakoriság: 1:300, AR kórkép), a betegek kb. 80-100%-a a Cys282Tyr (C282Y) mutációt hordozza (6p21.3). Ekkor a parenchymás szövetek károsodásával járó vastűlterhelés lép fel (cirrhosis, diabetes, cardiomyopathia) és ekkor kerül sor általában a kimutatására. *Korábbi kimutatás:* a prevenciót szolgálhatná!

Metiléntetrahidrofolát redukáz enzim génjének (1p36.3) C677T mutációja (a lakosság kb. 11%-a homo-, 45%-a heterozygóta) hyperhomocysteinaemiát okozhat.

A homocisztein (Hcy) -szint emelkedés káros hatásai:

1. az endotheliumra: oxidatív stressz (prooxidánsok jelenlétében). Plazmából való elimináció kb. 70%-a a vesén keresztül történik. Hcy - korai stádiumban is gyorsíthatja a krónikus vesebetegség progresszióját. Haemodialysált betegekben elősegíti az arteriosclerosist.
2. a thrombocytá aggregációra: koagulációs kaszkád indukció.
3. korai abortuszok hátterében állhat, velőcső záródási rendellenességeket okozhat, Down sy hátterében állhat.

Mikor kell gondolni alacsony folát/folsav szint valószínűségére és az MTHFR TT genotípus homocisztein-szintet emelő kockázati szerepére?

Táplálkozási hiány, bizonyos betegségek (pl. idült veseelégtelenség, ALL, psoriasis stb.) esetén, egyes gyógyszerek szedése, pl. folsav antagonistáké (methotrexát), levodopa adásakor Parkinson kórban, B12 vitamin hiány esetén.

Cystas fibrosis: A leggyakoribb autoszóm recesszív kórkép európai populációban (1:3500-4000 hazánkban). 25-30 új beteg születik évente. Rossz prognózisú, gyorsan progrediáló betegség: az exocrin mirigyek generalizált elváltozása, megemelkedett verejték Cl⁻ szint, pancreas insufficiencia, fiúkban sterilitás, lányokban csökkent fertilitás és légzési elégtelenséghez, majd halálhoz vezető krónikus tüdőbetegség jellemzi. Gén: 7q31.3, 250kb, CFTR fehérje: 1480 aa, eddig megismert mutációk: >1200. Az általunk reverz slot blotot hibridizációval (INNO-LiPA CFTR 19, INNOGENETICS, Ghent, Belgium) vizsgált 19 leggyakoribb mutáció: F508del, I507del, G542X, N1303K, 1717-1(G→A), 1282X, G551D, R553X, S1251N, R560T, 3905insT, Q552X, C→A) vizsgálatával a betegek kb. 50-60%-ában tudunk egy vagy két génmutációt igazolni.

Dystrophinopathiak (Duchenne: DMD, Becker: BMD)

XR öröklődésű, lethalis, progresszív izomvesztéssel járó neuromuscularis genetikai kórkép (incidencia DMD-ben: 1/3 500 fiú, BMD 1/30 000 fiú). A betegek: 2/3-a deletios, 1/3-a új mutációt hordoz. A gén: Xp21 régióban, 2.5Mb nagyságú (a legnagyobb humán gén), 79 exon, 2 deletios "forró pont" jellemzi, minimum 8 szövet specifikus promóter és számos splice variáns mRNS-e: 14kb nagyságú, a kódolt fehérje (dystrophin): 3685 aminosavból épül fel, 427kDa nagyságú, 4 domainből áll, subsarcolemmalis fehérje. A dystroglikan komplex részeként lehorgonyozza a cytoskeletális mikrofilamentumokat a dystrophinen és lamininen keresztül az extracelluláris matrixhoz. Expresszió: izomban (váz-, szív-, simaizom) és az agyban. Geno/fenotípus összefüggések: frameshift hipo-

tézis (kb. 92%-ba igazolódott). Oki terápia: jelenleg nincs, majd a génterápia lesz. Molekuláris genetikai vizsgálatok célja: diagnózis megerősítése, (prognózis?), carrier kimutatás, praenatalis diagnosztika. A beteg fiúknál 19 génszakasz (Pm és 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 60 exonok) meglétét vizsgáljuk, melyek leggyakrabban szenvednek deletiot. Eddig 96 deletiós fiúbeteget találtunk (60%), nem deletiós volt 66 (40%). Családvizsgálatot 8 STR (short tandem repeat) markerrel [Dys I, Dys II, STR-44, -45, -49, -50, STRHI, 3'(CA)] 120 családban végeztünk. Prenatalis diagnosztika: 46 volt, 29 fiúmagzataból 24 egészségesnek, 5 betegnek igazolódott. 17 leánymagzat esetleges carrier statusának a vizsgálata 16-18 éves korukban indokolt.

A *Lesch-Nyhan kór* (LN) ritka (1/200 000 fiú), XR örökletességű genetikai betegség.

Oka: a hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz enzim hiánya (HPRT1 gén kódolja, helye: Xq26-q27.2, 57kb, 9 exon, 8 intron, mRNS: 1,6kb, fehérje: 217 aminosav, a purin metabolizmus enzime). Génmutációk lehetnek akárhol: del, ins, dupl., kóros splicing, pontmutációk, a betegek kb. 30%-a új mutáció eredménye. A leánytestvérek esetleges carrier statusának a vizsgálata örökletesség esetén pl. HPRTB (AGAT) n markerrel (a 3. intronban található) (a gén kis mérete miatt ezen intragenikus markerrel minimális a rekombináció lehetősége a mutáció és a marker között) lehetséges.

Indirekt diagnosztikával:

(Nem mutációt igazolunk, csupán a gént hordozó kromoszómák öröklődésmenetét vizsgáljuk az érintett családokban.)

Polycystas vesebetegség: *PKD1* típus (16p13.3, 46 exon, ismétlődés: e1-32, mRNS: 14kb, fehérje: 4302 aminosavból épül fel, „two-hit” modell) a betegek kb. 80-85%-ánál mutatható ki. Korábbi kezdet, agresszívabb klinikai lefolyás jellemzi, veseelégtelenség kb. 45%-nál ~50 év körül jelentkezik. 10% sporadikus, 90% familiáris. Markereink: D16S663, KG8, D16S291 familiáris formánál. A *PKD2* típus (4q21-23, 15 exon, mRNS: 5kb, fehérje: 968 aminosav) kb. 15-20%-nál igazolódott. Veseelégtelenség gyakran: >70 év. Fehérje termékeik (polycystin-1 és -2) egy receptor/ion-csatorna komplex részei. Allél variánsok, módosító gének, környezeti faktorok szerepe kimutatható. Markereink: D4S1563, AFM353tc familiáris formánál.

Néhány esetben pedig eddig ismeretlen gén szerepe vetődött fel. Az autoszóm recesszív polycystas vesebetegség (ARPKD, 6p21-p12) génje 469 kb nagyságú, 86 exonból áll, mRNS: 8,5-13kb (alternatív splicing). Fehérje termék: 4074 aminosavból áll: polyductin/fibrocystin. Markereink: D6S295, D6S427, D6S436, D6S465, D6S466, D6S1714 magzati diagnosztika esetén.

IV-es típusú kollagén nephropathiák:

A *vékony bazalis membrán nephropathia (VBMN)* benignus familiáris haematuria, monosymptomás betegség. Öröklődése: AD, a Col(IV)A3/A4/ gének mutációja okozza kb. 40%-ban. (Gyakori? 1-14%?).

Az *Alport sy (AS)* haematuriával, proteinuriával járó progresszív, öröklődő nephropathia, mely sensoneurális hallás károsodással és az esetek kb. 15%-ában minor ocularis laesiókkal társul. A végstádiumú vesebeteggek kb. 3%-át adják. Nagy fenotípusbeli heterogenitás figyelhető meg a progressziót illetően. A betegek kb. 85%-ánál X kromoszómához kötött domináns öröklődés figyelhető meg (Col(IV)A5 gén mutációk), a többi autoszóm recesszív (14%) vagy domináns (1%) öröklődésmentet mutat (Col(IV)A3/A4 gének mutációi). Incidenciája 1:5000-1:10 000. Az elsődleges defektus a IV-s típusú kollagénnel kapcsolatos, mely a GBM fő strukturális komponense. A IV-s típusú kollagén 3 a láncból épül fel (tripla helikális molekula). Eddig 6 különböző típusú a (IV) láncot írtak le, génjeik különböző kromoszomális elhelyezkedésűek. Lokalizációjuk: szövet specifikus. Ha a Col(IV)A3/A4/ gének markerei (CA11, D2S401 és intragenikus Hae III RFLP) egy-egy beteg családjában 2-es kromoszómához köthetőséget igazolnak, és egy mutáció valószínűsíthető, ez a tény a VBMN diagnózisát támasztja alá. Amennyiben az öröklődésmentet az X kromoszómán lévő Col(IV)A5 génhez köthetőséget igazol (DXS456, 2B6, 2B20), ez lányoknál gyakran csak haematuriát okoz, fiúknál viszont XD Alport szindrómát.

Familiáris *Marfan szindrómás betegek* családvizsgálata: AD öröklődésű betegség, melyben a fibrillin (FBN1) gén mutációját mutatták ki a 15q21 régióban. A 15-ös kromoszóma *öröklődésmentének* vizsgálatát az érintett és örökletességet mutató családokban a következő markerekkel végezzük: D15S119, D15S126, D15S1028, RsaI RFLP, MTS1, MTS2, MTS3, MTS4.