

Molekuláris genetikai diagnosztika, a jelenleg alkalmazott módszerek diagnosztikus értéke

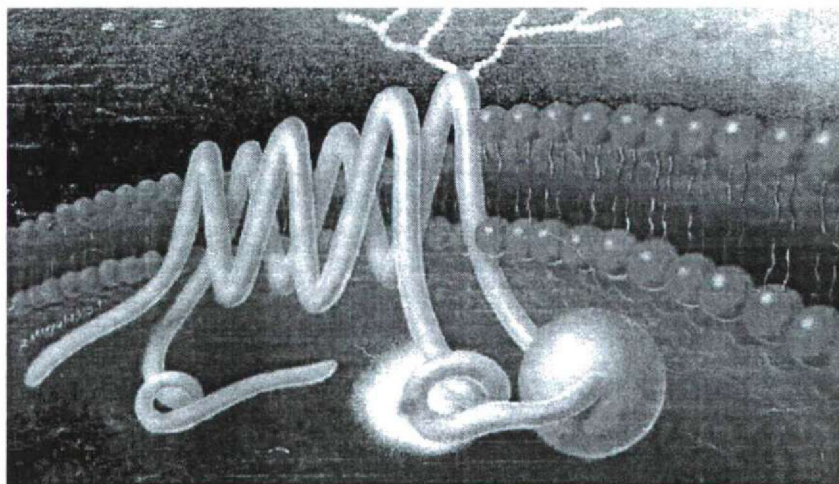
Dr. Endreffy Emőke

SZTE ÁOK Gyermekgyógyászati Klinika és Gyermekegészségügyi
Központ, Szeged

Cystas fibrosis esetén

A leggyakoribb AR kórkép európai populációban (1:4000 hazánkban). 25–30 új beteg/év megszületésével kell számolni.

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 aminosavból épül fel, eddig megismert mutációk: >1200.



1. ábra: A CFTR fehérje sematikus képe az epithelialis sejtek apicalis membránjában

19 leggyakoribb (F508del, I507del, G542X, N1303K, 1717-1(G→A), 1282X, G551D, R553X, S1251N, R560T, 3905insT, Q552X, CFTRdel 2,3(21kb), 711+1G→T, 3272-26A→G, 1898+1G→A, I148T, 3199del 6, 3120+1G→A) kimutatása: slot blot hibridizációval történik (INNO-LiPA CFTR19, Innogenetics, Ghent, Belgium). A mutációk kóros fehérje szerkezetet és emiatt klorid ion transzport zavart okoznak.

Az elmúlt 16 év alatt: 1481 mutációs analízist végeztünk „CF” betegekben és családjukban.

A 222, klinikai tünetek, biokémiai és részben genetikai vizsgálatok alapján gondozásba vett beteg közül:

75 esetben (34%) találtuk meg mind a két mutációt, mellyel alátámasztottuk a diagnózist. Ezek közül: 59 volt F508del homozygóta (79%), 16 (21%) volt u.n. compound heterizygóta:

6 beteg G542X, 4 W1282X, 2 R553X, és 1-1 G551D, N1303K, 1717-1G→A és 2 exont érintő deletio.

76 esetben (34%) csak egy mutációt tudtunk kimutatni (a gyanút fenntartja, de nem támasztja alá). 70 esetben (92%) F508del igazolódott, 3 N1303K, 1-1 G542X, R553X, W1282X. 71 esetben (32%) nem találtuk meg a gén egyik mutációját sem (a CF gyanút sem megerősíteni, sem kizárni nem tudtuk)!

A CF genetikai diagnosztika jövőbeli feladata: az országban legalább egy (de inkább 2!) helyen olyan módszer beállítása, mely megtalálja a génmutációkat – ha vannak, vagy kizárja, ha nincsenek (pl. DHPLC-vel, génszekvenálással 28 kódoló szakasz vizsgálata).

Dystrophinopathiák (Duchenne/Becker típus, DMD/BMD) mol. genet. vizsgálata

DMD: XR öröklődésű, lethalis, progresszív izomvesztéssel járó neuromuscularis genetikai kórkép (1/3 500 fiú, BMD 1/30 000 fiú).

Betegek: 2/3-a deletios, 1/3-a új mutációt hordoz

Gén: Xp21 régió, 2.5Mb, 79 exon, 2 deletios ”forró pont ”

mRNS: 14kb. **Dystrophin:** 3685 aminosavból épül fel, 427kDa, 4 domain, subsarcolemmalis fehérje (”lehorgonyzó szerep”).

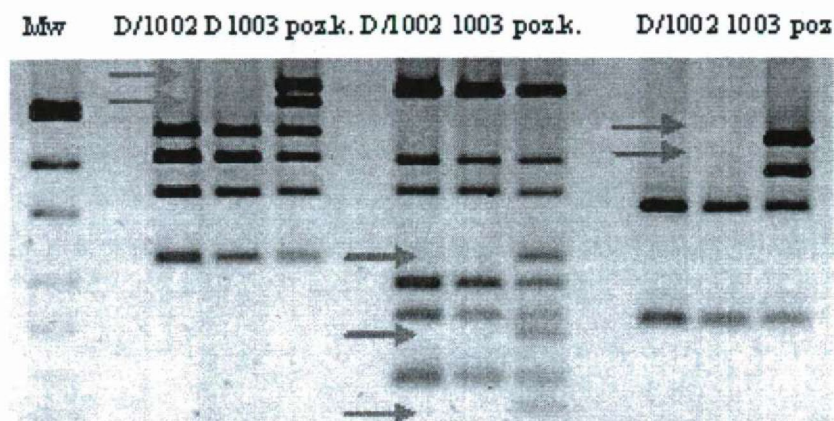
Expresszió: izomban (váz-, szív-, simaizom) és az agyban.

Genoffenotípus: frameshift hipotézis (92%).

Oki terápia: jelenleg nincs, majd a génterápia lesz.

Molekuláris genetikai vizsgálatok célja: diagnózis megerősítése, carrier kimutatás, praenatalis diagnosztika.

Az érintett fiúbetegeknél a következő 19 génszakasz meglétét ill. hiányát vizsgáljuk: izom specifikus promóter (Pm) és a 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 60 exonok.



2. ábra. 45-52-es exonokra deletios, Becker myopathiás fiúbetegek gélfotója. A nyilak a deletios génszakaszokat jelölik!

Eddigi vizsgálatainkban deletiósnek talált fiúbetegek száma: 110 (60%, a diagnózist alátámasztottuk!), nem deletiós 74 (40%) volt.

X kromoszóma öröklődésment vizsgálata dystrophin gén STR (short tandem repeat) markerekkel carrier, valamint magzati diagnosztika céljából

1. táblázat. X kromoszóma öröklődésment vizsgálatára használt markerek és adataik

STR marke és helye	Allélek száma/nagysága	Heterozigótaság (%)
Dys I 5' (végi szegélyező marker)	A1-A5/177-185 bp	60
Dys II (5' végi szegélyező marker)	A1-A8/214-228 bp	77
STR44 (intron marker)	A1-A12/174-204 bp	85
STR45 (intron marker)	A1-A15/156-184 bp	87
STR49 (intron marker)	A1-A19/227-257 bp	91
STR50 (intron marker)	A1-A10/233-251 bp	70
STRHI (intron 64 TAA-n)	A1-A7/90-102bp	68
3' (CA) _n (3' nem transzlálódó régióban)	A1-A4/131-137 bp	50

STR-45 (korábbi vizsgálati módszerrel)



D/569: P. E. (apa) D/570: G. E. (anya) D/571: P. E. (DMP-s fiú) D/572: R. E. (leány-testvér)

3. ábra. Gélfotó STR-45 markerrel végzett családvizsgálat bemutatására. Ugyanazt a kromoszómát ugyanazzal az árnyalattal jelöltük.

Ezek a marker vizsgálatok lehetővé teszik, hogy egy beteg családjában az X kromoszómák öröklődését nyomon követhessük a gén intronjaiban, vagy szegélyező régiójában található (de együtt öröklődő) dinukleotid (pl. CA) polimorfizmusok vizsgálatával. A beteg fiú X kromoszómájára kell figyelni, hogy még *ki hordozza* ugyanezt a család nőtagjai közül. Ő ugyanis ezt *magzatába* 50%-os eséllyel tovább örökítheti.

Mindez csak *megfelelő számú és információt adó STR marker* vizsgálatlal lehetséges.

Lehetővé teszik: deletió kimutatását/megerősítését (betegeknél, carrier nőknél),

anyai sejt kontamináció kizárását a CVS-ben (a fiúmagzat DNS-e csak az egyik anyai allélt jelezheti),

apaság megerősítését,

génrekombináció kimutatását (esélye kb. 3-12%).

92 családban 50 *prenatalis diagnosztika* történt, ebből: 31 fiúmagzat: egészségesnek bizonyult 25 (81%), betegek: 6 (19%). 19 leánymagzat: carrier vizsgálat: 16-18 éves korukban (EU szabály. De: él-e még akkor a beteg rokon? Lesz-e elegendő, jó minőségű DNS tárolva valahol?).

Polycystas vesebetegek mol. genet. vizsgálata

Az *autoszóm domináns polycystas* vesebetegség (ADPKD) (1–2,5%), általában felnőttkorban, de kb. 2%-ban már gyermekkorban is jelentkezhet. Szisztémás elváltozás, elsősorban a vesék érintettek. A dializáltak kb. 8–10%-át adják. *PKD1 típus* (16p13.3, 46 exon, mRNS: 14kb, fehérje: 4302aa) a betegek kb. 80-85%-ánál mutatható ki. Korábbi kezdet, agresszívebb klinikai lefolyás jellemzi, veseelégtelenség kb. 45%-nál ~50

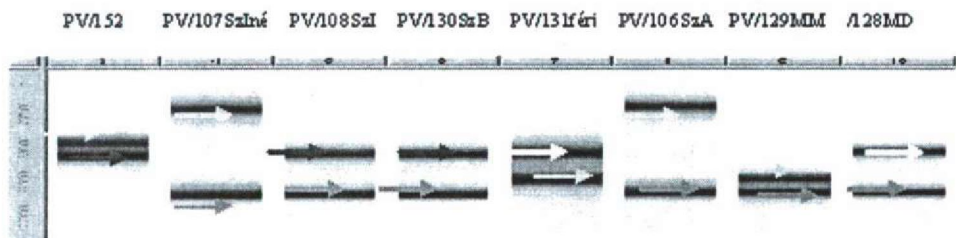
év körül, kb. 90% familiáris. A *PKD2* típus (4q21-23, 15 exon, mRNS: 5kb, fehérje: 968aa) kb. 15–20%-nál igazolódott. Veseelégtelenség gyakran: >70 év.

Az *autosom recesszív polycystas vesebetegség* (ARPKD, PKHD1) klinikai képe változatos, a súlyos korai gyermekkori formától az enyhébb, késői gyermekkori formáig (1:20 000). Génlocusa: 6p21-p12.

Jelenleg: 16., 4., 6. kromoszóma öröklődésment vizsgálatra történik a gének STR markereivel.

PKD1 markerek: D16S663, KG8, D16S291. PKD2 markerek: D4S1563, AFM353tc. ARPKD markerek: D6S436, D6S427, D6S1344, D6S245, D6S1714, D6S295. *Diagnosztikus értékük:* a klinikai tüneteket, leleteket (pl. UH) alátámasztják (pl. PKD1 vagy PKD2 típus, vagy ARPKD). ARPKD esetén magzati diagnosztika végezhető, PKD1 esetén is merült fel igény magzati diagnosztikára!

Ha preasymptomás tesztelés történik valamelyik családtagnál, ennek szakmai/etikai szabályait be kell tartani!



4. ábra. Ugyanannak a 16-os kromoszómának az öröklődése 3 nemzedéken át okozza a PKD1 tüneteit a vizsgált családban!

IV-es típusú kollagén nephropathiák: a vékony bazális membrán nephropathiától az Alport szindrómáig

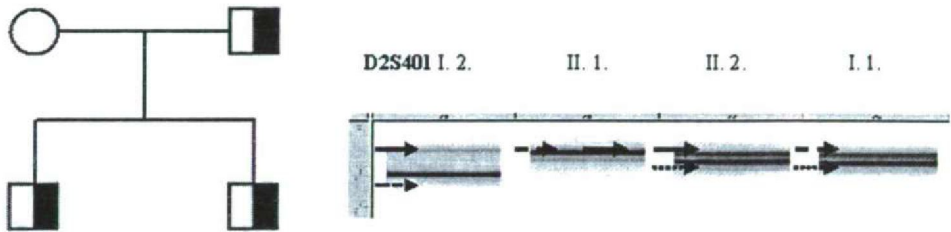
A IV-es típusú kollagén nephropathiák közé a Goodpasture syndroma, a vékony bazális membrán nephropathia, valamint az Alport syndroma tartoznak. A két utóbbit a IV-es típusú kollagén molekula alfa láncait (Col(IV)A3,A4,A5) kódoló gének mutációi hozzák létre.

A *vékony bazális membrán nephropathia* (VBB) többnyire familiáris, autoszóm dominánsan öröklődik, az érintettek 40%-ánál a haematuriát a Col(IV)A3 és/vagy a Col(IV)A4 gén (2q35-37) egy-egy mutációja okozza.

Az Alport syndroma (AS) az esetek 85%-ában X kromoszómához kötötten szemidominánsan öröklődik, a mutációk a Col(IV)A5 gént

(Xq22-25) érintik. A fennmaradó esetek fiúkban és lányokban is autoszóm recesszív (14%), vagy domináns (1%) öröklődésűek [Col(IV)A3 vagy A4 génmutációk szerepe].

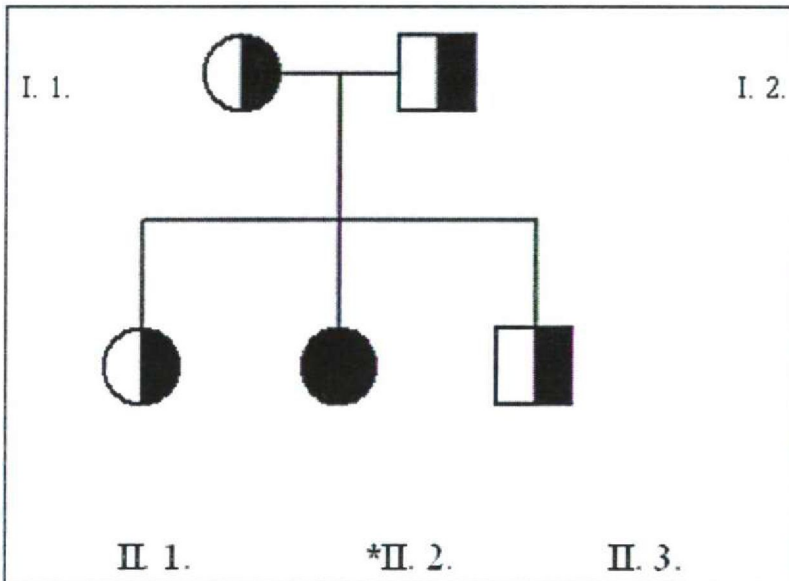
Markerek: Col(IV)A3: CA11 és D2S401; Col(IV)A4: Hae III/RFLP; Col(IV)A5: DXS456, 2B6, valamint 2B20.



5-6. ábra. X kromoszómához (DXS456, 2B6, és 2B20): nem köthető az öröklődés a feltüntetett családfán. Ezt igazolja a mellette lévő gélfotó is!

COL(IV)A3 (CA11, D2S401): a két fiú ugyanazt az apai allélt örökölte, de nem ugyanazt az anyait. **COL(IV)A4 HaeIII/RFLP:** részben informatív marker.

A IV-es típusú kollagén nephropathiák öröklődésmenetének/genetikai alapjainak a tisztázása a jövőben a korrekt diagnosztika és genetikai tanácsadás előfeltétele lesz.



7. ábra.
Családfa

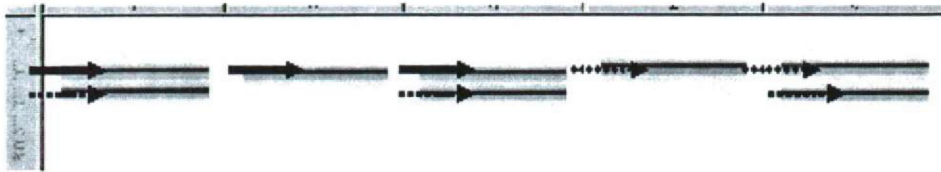
2B6: *II. 2.

I. 2.

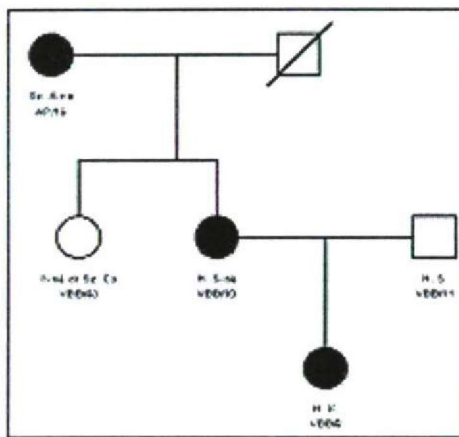
II. 1.

II. 3.

I. 1.



8. ábra. Gélfotó. X kromoszóma markerekhez (DXS456, 2B6, és 2B20):nem köthető az öröklődésmenet. COL(IV)A3 markerek (CA11, és D2S401):részben, ill. nem informatív markerek. COL(IV)A4 marker (Hae III/RFLP):részben informatív marker



9. ábra.

X kromoszóma markerek:
Köthető a betegség ehhez a kromoszómához. Mutációs screening szükséges (ColIVA5 génmutáció?)! COL(IV)A3 CA11: részben informatív próba.
COL(IV)A3 D2S401: részben informatív próba.
COL(IV)A4 Hae III: részben informatív próba

A IV-es típusú kollagén nephropathiák öröklődésmenetének/genetikai alapjainak a tisztázása a jövőben a *korrekt diagnosztika és genetikai tanácsadás* előfeltétele lesz.