

Indikace a principy molekulárně-genetického vyšetření

Seemanová E.

Oddělení klinické genetiky, Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK, Praha
vedoucí MUDr. M. Havlovicová

Klíčová slova: molekulárně-genetické vyšetření, genetické choroby, chromosomální aberace, klasifikace genových mutací, přímá a nepřímá DNA analýza

Indication and Principles of Molecular-Genetic Investigation

Key words: molecular-genetic investigation, genetic diseases, chromosomal aberrations, classification of gene mutations, direct and indirect DNA analysis

G.

Úvod

Genetické choroby se vyskytují ve všech medicínských oborech, genom však ovlivňuje nejvíce začátek ontogeneze, a proto se s genetickými poruchami setkávají především pediatri. Chromosomální aberace jsou cytogenetickými metodami zjistitelné již 40 let a nové metody přinášejí zpřesnění detekce, monogenně determinované afekce byly donedávna diagnostikovány výhradně analýzou fenotypu a rodokmenu.

Nové možnosti molekulárně-genetických vyšetření dovolily objasnit nejen příčiny genových afekcí, ale poučily nás i o různých příčinách ovlivňujících stejný patogenetický proces a přinesly tak nová kritéria pro jejich klasifikaci. Molekulárně-genetické vyšetření je vysoce specifické, dosud velmi náročné a nákladné, a proto jeho indikace musí být uvážlivá a cílená. Klinik má přesně definovat požadavky, na něž očekává odpověď, a zvážit omezení jejich výpovědní hodnoty. Tak jako nepřímá molekulárně-genetická analýza přivedla k renesanci pečlivé genealogické vyšetření (exaktní znalost postavení vyšetřovaného v rodokmenu je podmínkou správné interpretace získaných výsledků), tak přímá molekulárně-genetická diagnostika nutně vede k renesanci podrobné analýzy fenotypu probanda.

Připomeňme si rozdíly mezi těmito typy DNA diagnostiky.

Přímá DNA diagnostika

Přímá DNA diagnostika odhaluje kauzální **mutaci**, která odpovídá za manifestaci poruchy, je tedy maximálně přesná a dovoluje:

a) Potvrdit u pacienta **genetickou** etiologii poruchy a tak její odlišení **od fenokopii** např. teratogenních embryopatií či perinatálních poruch (např. dědičnou kongenitální kataraktu od rubeolózní embryopatie, dědičnou kongenitální sluchovou poruchu od embryopatie či perinatálního ototoxického vlivu léčiv, chondrodystrofii punctata gonosomálně recesivně dědičnou od warfarinové embryopatie). Potvrzení genetické příčiny poruchy dítěte, před níž nikdo nejsme chráněni, mnohdy zbaví rodiče trýznivých výčitek, čeho se mohli v těhotenství vyvarovat, co mohli ovlivnit.

b) **Potvrzení diagnózy** pacienta i u **atypických** či abortivních **manifestací** nebo průběhů poruchy.

c) Zjistit **přenašeče** mutace (heterozygoty) autosomálně a gonosomálně recesivně dědičných poruch nejen v rodině pacienta, ale i v populaci (např. u jejich snoubenců, manželů). U některých gonosomálně recesivních poruch odhalí příčinu obtíží u přenašeček (např. syndromu fragilního X chromosomu, Duchennovy muskulární dystrofie, Fabryho choroby), v jejichž rodině se dosud nevykytl postižený hemizygot – mužský jedinec s klasickou formou poruchy.

d) Zjistit mutaci v **preklinickém** období u autosomálně dominantně dědičných chorob abio-

trofického charakteru (manifestace odložená do dospělosti) pro dispenzarizaci, včasnou diagnostiku či prevenci a léčbu komplikací určitých onkologických, neurologických, nefrologických, gastroenterologických chorob, jako např. Li Fraumeni syndromu, Gardnerova syndromu, Huntingtonovy choroby, dystrofické myotonie, okulofaryngeální myopatie, polycystózy ledvin dospělého věku. Některé z nich (10 % případů polycystózy ledvin dospělého typu, až 30 % průvodních hypertenzí nebo 10 % familiární adenomatózní polypózy střeva) mohou být problematikou dětského věku. Jiné např. vlivem genomického imprintingu (Huntingtonova choroba děděná od otce nebo dystrofická myotonie děděná od matky) se manifestují v dětském věku a jejich klinický obraz je odlišný od klasického obrazu dospělých.

e) Zjistit mutaci v plodových buňkách, získaných již v 11. gestačním týdnu choriovou biopsií pro **prenatální** diagnostiku závažných poruch s vysokým rizikem (25–50 %) postižení plodu.

Úskalí a limitace metody

I tato exaktní diagnostická metoda má svá úskalí a limitace, které má klinik zvažovat a mít na paměti při dalším postupu.

a) Průkaz mutace nic neprozradí o její **expresivitě** u konkrétního jedince, tedy neinformuje, kdy, jak závažně, příp. zda vůbec se mutace bude manifestovat. Některé faktory ovlivňující genovou expresivitu známe – genomický imprinting, mozaiky, premutace, pohlaví nositele, jiné jen tušíme – modifikující geny či zevní faktory, lyonizace.

b) **Heterogenita** genetická (různé geny) nebo molekulární (různé mutace stejného genu), kdy stejná klinická jednotka může být projevem poruchy funkce několika genů, které ovlivňují stejnou patogenetickou cestu a rezultují ve stejné příznaky. Ne vždy se tedy i u nesporných klinických obrazů podaří mutaci odhalit (např. u neurofibromatosis Recklinghausenovy se udává v 85 %, u ataxie teleangiectatické v 50 %, u Fanconiho anémie v 50 %, u adrenogenitálního syndromu ve 40 %, u Rubinsteinova-Taybiho syndromu v 54 %). Není-li mutace nalezena, **nevyvrací** to klinickou **diagnózu**.

c) **Digenická determinace** – souvisí s genetickou heterogenií. Tak jako molekulární heterogenie vede běžně k složeným heterozygotům autosomálně recesivně dědičných poruch (např. Fanconiho anémie, Louis-Barové syndrom), tak také genetická heterogenita se může klinicky projevit u dvou recesivních mutací, ale v různých genech, ovlivňujících stejnou patogenezi (např. sluchové vady z defektu connexinu 26 a connexinu 30).

d) Využití pro prenatální diagnostiku je spojeno s dalšími dilematy při rozhodování o osudu jedince, u něhož nic nevíme o expresivitě mutace, a navíc choroba, kterou způsobuje, může být v budoucnu **léčitelná**.

K přímé DNA analýze vždy indikujeme **pacienta** a jeho **rodiče**, aby bylo možno rozhodnout, zda mutace vznikla **de novo**, nebo je **děděná** (pak od kterého z rodičů, aby bylo možno rizikovým jedincům v jeho rodině zajistit genetickou prevenci, pokud o ni projeví zájem). Přímá DNA diagnostika umožňuje zjistit mutaci i v **populaci**, tedy i nepříbuzných snoubenců (např. syndrom fragilního X chromosomu, Friedreichova ataxie, spinální muskulární atrofie, okulofaryngeální myopatie), pokud ovšem není známa genetická a molekulární heterogenie, nebo existuje významně vysoká incidence predominantní mutace (třeba v určité populaci jako např. delta F508 u cystické fibrózy nebo 35delG u kongenitální hluchoty v evropské populaci, 657del5 u Nijmegen breakage syndromu ve slovanské populaci).

Nepřímá molekulárně-genetická diagnostika

Nepřímá molekulárně-genetická diagnostika spočívá na principu **genetické vazby** mezi genem a těsně vedle na stejném chromosomu lokalizovaným znakem, jehož zjištění je snadné. Genetické vazby bylo využíváno dávno před obdobím DNA diagnostiky, když bylo pozorováno, že některé choroby se dědí společně např. s krevní příslušností k určité skupině jako např. Waardenburgův syndrom se systémem ABO, eliptocytóza s Rh systémem. V některých rodinách se hluchota nebo jen heterochromie duhovek či polioza dědila s alelou A, v jiné s alelou O či B a podle podílu rekombinantních osob v rodině (krevní skupina nesouhlasila s očekávaným klinickým obrazem, např. slyšel ten, který měl krevní skupinu jako ostatní neslyšící v rodině, nebo neslyšel ten, který měl nerizikovou krevní skupinu pro tuto rodinu) byla zjištěna vzdálenost 5 cM (centi-Morganů, tj. procento crossing-overů). Dnes jsou pro genetickou vazbu užívány polymorfismy délky restrikčních fragmentů (RFLP).

Nepřímá DNA analýza má podobné cíle jako přímá DNA diagnostika, její spolehlivost je však omezená:

1. **Nemůže potvrdit** diagnózu, neboť nezjišťuje mutaci, nýbrž jen sledovaný „rizikový“ haplotyp v genu, jehož mutace je pravděpodobně odpovědná za afekci, která nás zajímá. O diagnóze musíme mít klinicky maximální jistotu a předpokládat, že se nejedná o genetickou heterogenii.

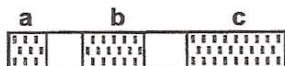
Přímá DNA dg

typy genetické determinace fenotypu mendelovsky dědičných poruch

a) etiologie geneticky homogenní



Jeden gen s jednou prevalentní mutací (např. NBS1)



Amplifikace tripletů: a - normální alela, b - premutace, c - plná mutace (fragilní X, Friedreichova ataxie, Huntingtonova chorea, myotonická dystrofie)

b) molekulární (alelická) heterogenita

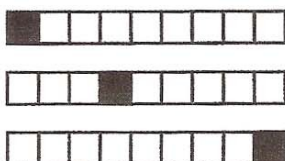


Jeden gen s jednou prevalentní mutací a stovky dalších "privátních" mutací (CFTR u cystické fibrosy, GJB2 u hluchoty)

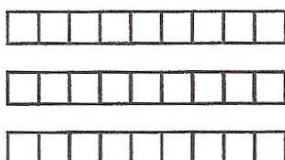


Jeden gen s žádnou prevalentní mutací, vesměs "privátní" mutace (NF1 pro neurofibromatosis, ATM pro ataxia telangiectasia)

c) genetická heterogenita

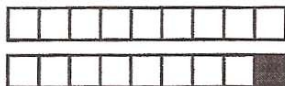


Několik genů s prevalentními i dalšími mutacemi (CMT neuropatie na chromosomu 1,17 i X; Noonanův syndrom v 50 % PTPN11, další v K-RAS genu; ADPKD na chromosomu 4,16, a ???)



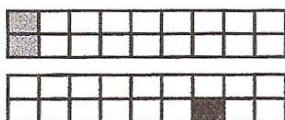
Několik genů s mnoha privátními mutacemi (Fanconiho anémie, hluchota, retinitis pigmentosa, xeroderma pigmentosum)

d) digenická determinace



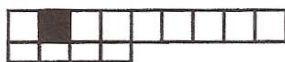
Mutace ve dvou různých genech ovlivňující stejnou patogenesu (GJB2 a GJB6 u sluchových vad)

e) trialelická determinace



Teprve tři mutace ve dvou různých genech vedou ke klinické manifestaci (Bardet-Biedlův syndrom)

f) pseudogeny



Část genu překryta pseudogenem a nedovolí v překrytém úseku mutaci detekovat (adrenogenitální sy.)

g) jeden gen - více fenotypů



Mutace v různých úsecích jednoho genu jsou příčinou různých fenotypů (fibrilínový gen - Marfanův sy, kontrakturální arachnodaktylie, Bealsův sy; RMRP gen - anauxetická dysplasie, cartilago-hair sy, metafyzéální dysplasie)

Obr. 1. Přímá DNA analýza a její limitace.

2. **Nemůže být použita** v případě první manifestace dominantní poruchy důsledkem **čerstvé mutace**, neboť není možno vazbu zjistit (obr. 2-IV).

3. Zjištěná vazba u nemocného může informovat o pravděpodobném **přenosu poruchy na potomky**, **nikoli** však o přítomnosti poruchy u jeho **předků**, neboť nevíme, kdy mutace vznikla (obr. 4a, b).

4. **Může předpokládanou diagnózu vyloučit**, a to tehdy, zjistíme-li identický polymorfismus u nemocného a jeho zdravého sourozence, nebo když dva stejně postižení sourozenci mají rozdílné haplotypové polymorfismy (obr. 5a, b). Proto je nezbytné vždy vyšetřit polymorfismy všech sourozenců, ať zdravých či nemocných.

5. **Může zjistit non-paternitu – cizí polymorfismus**, podobná situace jako při vyšetřování krevních skupin (obr. 7).

6. **Nemůže vyloučit genetickou heterogenitu** – potvrzení vazby požadujeme proto u více příbuzných.

7. **Může být neinformativní** – je-li osoba s poruchou homozygotní pro sledovaný polymorfismus vázaný s poruchou, není možno rozlišit, zda předá polymorfismus, který je ve vazbě s poruchou, nebo polymorfismus bez vazby (obr. 2-III). Řeší se použitím jiných polymorfismů. Pro získání tak závažné informace, jako je přenašečství, preklinická a prenatalní diagnostika, jsou požadovány alespoň 3 informativní polymorfismy. Informativní nález poskytne jedinec heterozygotní pro sledovaný polymorfismus (obr. 2-I, II).

8. **Nemůže vyloučit rekombinaci** – vznikne-li crossing-over mezi mutací odpovědnou za

poruchu a sledovaným polymorfismem (obr. 3 a 6), je interpretace podle sledovaného polymorfismu chybná, neboť již není ve vazbě s poruchou.

Jaké jsou indikace nepřímé DNA analýzy?

a) Lokalizace genu je již známa (např. 8q21), ale gen dosud nebyl identifikován. Využíváme polymorfismy regionu 8q21. S rozvojem molekulární genetiky těchto situací ubývá.

b) Gen je již znám, je však příliš velký a má mnoho mutací, z nichž žádná není predominantní (většinově se vyskytující), jak známe u neurofibromatosy von Recklinghausen, Marfanova syndromu, nedeleční formy Duchennovy muskulární dystrofie aj.

c) U složených heterozygotů autosomálně recesivně dědičných poruch se podaří najít jen jednu mutaci, což nám potvrzuje, že jsme našli gen odpovědný za poruchu a vyšetření druhé mutace můžeme nahradit sledováním rizikového polymorfismu.

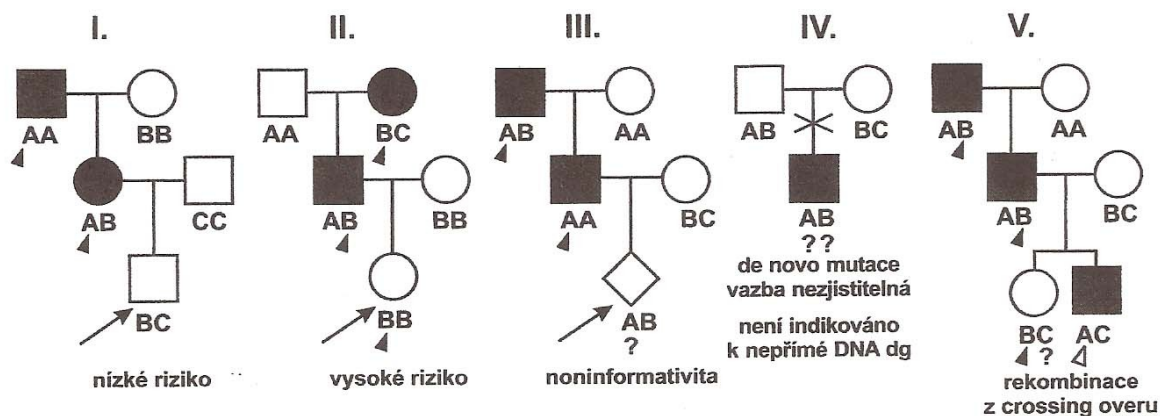
d) V případech, kdy je vhodné ověřit paternitu nebo zygositu dvojčat.

e) Vazbu můžeme zjistit jen vyšetřením zdravých i nemocných osob ve dvou- i třígenerační rodině, je použitelná, jen spolupracuje-li široká rodina.

Jaké jsou podmínky použití nepřímé DNA analýzy?

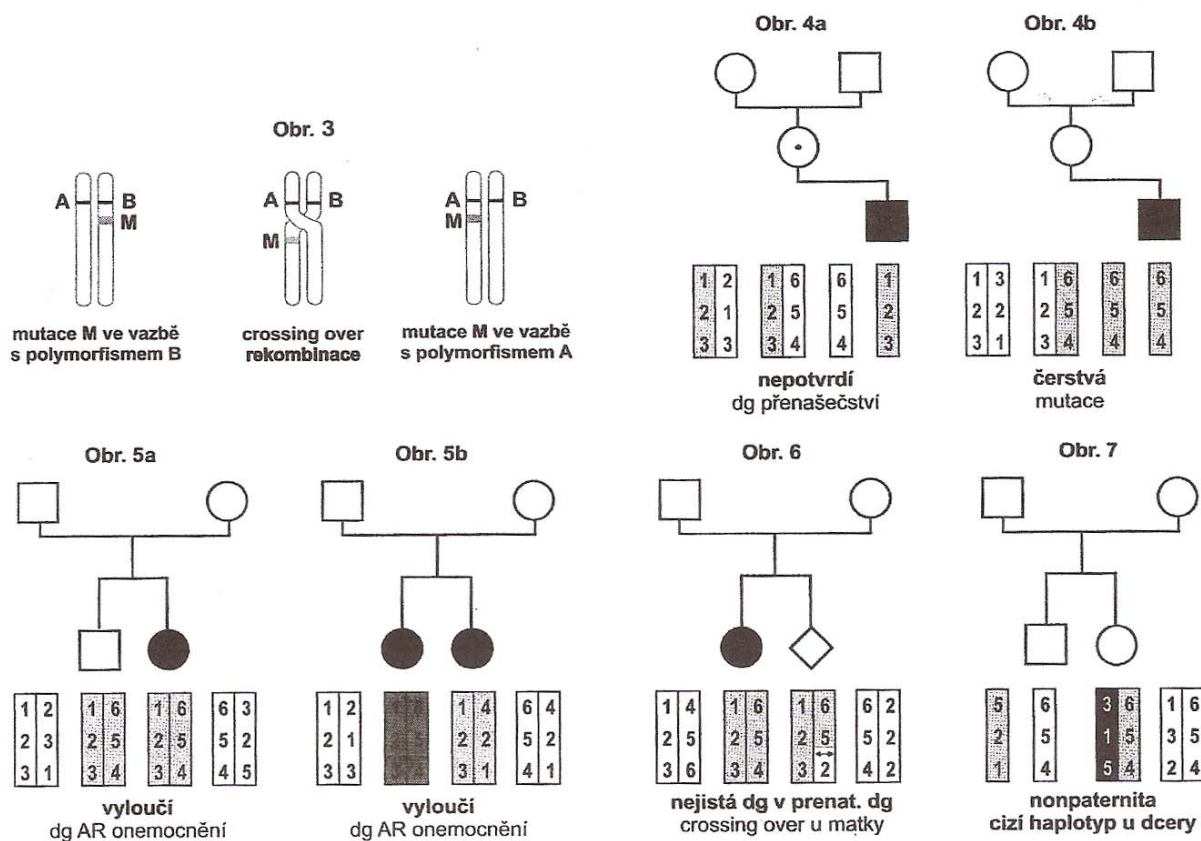
a) **Musí být k dispozici exaktní rodokmen** s jednoznačnou identifikací postavení vyšetřovaných osob v rodině a jejich vztahy k nemocnému – odlišení plných sourozenců a polosourozenců, kteří mohou být maternální či paternální, jednoznačné rozhodnutí, zda vyšetřovaný je zdravý či

Nepřímá DNA dg



Obr. 2. I, II, III, IV: Nepřímá DNA analýza – informativní a neinformativní znak, V – rekombinace.

Nepřímá DNA dg



Obr. 3. Nepřímá DNA analýza – genetická vazba a rekombinace.

Obr. 4. Nepřímá DNA analýza. a) Stejný haplotyp neinformuje, zda je přítomna i mutace (babička chlapce s hemofilií A má normální hladinu antihemofilického globulinu, zatímco matka má antihemofilický globulin snížen), b) stejný haplotyp jako chlapec s gonosomálně recesivně dědičnou chorobou má i jeho maternální praděd, který byl zdravý.

Obr. 5. Nepřímá DNA analýza – a) vyloučila diagnózu uvažované autosomálně recesivní poruchy, neboť zdravý i nemocný sourozenec mají identické haplotypy, b) dva nemocní sourozenci mají rozdílné haplotypy.

Obr. 6. Nepřímá DNA analýza – u matky došlo k rekombinaci a nelze zjistit, zda zděděná část rizikového chromosomu u plodu obsahuje mutaci.

Obr. 7. Nepřímá DNA analýza – non-paternita – dítě má jiný haplotyp než otec.

nemocný, u konsanguinních spojení přesný stupeň pokrevního příbuzenství.

b) **Musí být zachován buněčný jaderný materiál postiženého** (tkáňová kultura, histologické preparáty, krevní skrvny na papírcích pro screening metabolických poruch), aby bylo možno zjistit rizikový haplotyp, který je klíčový pro sledování jeho výskytu u příbuzných.

c) **Musí se jednat o familiární výskyt** poruchy, aby bylo možno zjistit genetickou vazbu mezi předpokládanou mutací a sledovaným polymorfismem.

Indikace k přímé a nepřímé DNA analýze se mohou kombinovat v těchto případech:

a) nepodaří se identifikovat mutaci a o klinické diagnóze není pochyb (např. v 15 % neurofibromatosy von Recklinghausen, kdy je přímá DNA analýza neefektivní),

b) porucha je etiologicky heterogenní (např. deleční a non-deleční forma Duchennovy muskulární dystrofie, Holtova-Oramova syndromu aj.). Mikrodeleční mutace, které způsobují ztrátu i několika genů, se obvykle manifestují závažněji (mentální opoždění u mikrodeleční formy neuro-

fibromatózy, závažnější mentální defekt a nevyvinutí řeči u Angelmanova syndromu, závažnější srdeční anomálie u Holtova-Oramova syndromu).

Molekulárně-genetické vyšetření může být pro klinika velmi účinným **diagnostickým nástrojem**. Podle typu mutace může hodnotit:

a) **klinickou prognózu** nositelů mutace (germinální mutace onkogenu u Costello syndromu, germinální mutace tumor supresor genu u ataxie telangiektasie, mikrodelece a bodové mutace u neurofibromatosis von Recklinghausenovy nebo u Angelmanova syndromu apod.),

b) při genetické **heterogenii charakter přenosu** – dominantní či recesivní, autosomální či gonosomální – pro posouzení, u koho dále vyšetření indikovat,

c) **genetickou prognózu** reprodukce nositelů mutace a zda, jak a kdy je možno čelit genetickému riziku.

Před indikací molekulárně-genetického vyšetření, jejichž celou paletu dnes nabízí i některé soukromé laboratoře, by si lékař měl rozvážit, zda výsledky odpoví na jeho otázky, s jakou spolehlivostí (porovnat s výskytem klinických signálních příznaků – např. vysoká hladina AFP u 98 % pacientů s ataxie telangiektasie, kongenitální retinální dysplazie u 98 % pacientů s Gardnerovým syndromem apod.) a jaké podmínky musí být splněny, aby výsledky byly interpretovatelné.

Závěr

Efektivní využívání moderních možností molekulární genetiky předpokládá dobrou klinickou znalost fenotypové šíře různých poruch, jejich etiologické heterogenity, znalost signálních příznaků pro diferenciální diagnostiku a dobrou mezioborovou spolupráci, neboť většina genetiky determinovaných poruch má multisystémový charakter. V současné době již existuje řada konzultačních diagnostických systémů běžně dostupných na internetu (OMIM, PubMed) a jejich informace jsou cenné zejména pro vzácněji se vyskytující afekce. Nové zprávy o rozpoznání nových genů, genetické a molekulární heterogenii tak zvyšují efektivitu molekulárně-genetického vyšetření.

Literatura

1. **McKusick VA.** Mendelian Inheritance in Man. Johns Hopkins Univ. Press – on line <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>.
2. **Thompson M, Thompson M.** Klinická genetika. Praha: Triton, 2004.

Prof. MUDr. Eva Seemanová, DrSc.

Oddělení lékařské genetiky

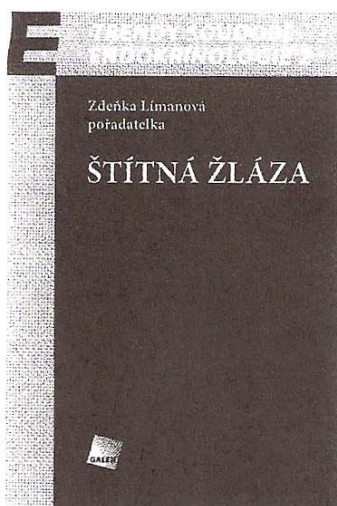
Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK

V Úvalu 84

150 06 Praha 5-Motol

Redakční poznámka:

Kontrolní otázky k tomuto článku jsou uveřejněny na vložené příloze v tomto čísle.



ŠTÍTNÁ ŽLÁZA

Trendy soudobé endokrinologie. Svazek 2

Zdeňka Límanová, pořadatelka

Druhý svazek edice Trendy soudobé endokrinologie je věnován problematice štítné žlázy. Autorský kolektiv zkušených odborníků z několika klinických pracovišť zpracoval dané téma komplexně, od diagnostiky, přes popis jednotlivých onemocnění štítné žlázy až po terapii a genetiku. Publikaci uvítají nejen endokrinologové, ale zaujme jistě i praktické lékaře, internisty a lékaře jiných odborností, kteří se s onemocněním štítné žlázy setkávají.

Vydal Galén v roce 2006, ISBN 80-7262-400-8, format 155 x 225 mm, váz., bar., 3712 str., cena 490 Kč.

Objednávku můžete poslat na adresu: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz