Molekuláris biológiai vizsgálatok

Dr. Patócs Attila, PhD
Egyetemi docens
MTA-SE Lendület Örökletes Endokrin daganatok Kutatócsoport,
Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika
Laboratóriumi Medicina Intézet

Molekuláris genetikai vizsgálatok megközelítése

- ***Monogénes betegségek***:
  - ismert öröklődésmenet
  - egy gén felelős
  - mutációk: ritka genetikai variánsok
  - kimutatás: DNS vizsgálómódszerek (SSCP, TTGE, DGGE, szekvenálás)

- ***Komplex öröklődésű betegségek:***
  - nem ismert öröklődésmenet
  - több gén
  - Polimorfizmusok (SNP): gyakori genetikai variánsok
  - Vizsgálatok: több, akár 500000-1000000 SNP egyidejű vizsgálata (microarray)

Lehetőségeink és feladataink a *monogénesen* öröklődő szindrómában szenvedő betegek diagnosztizálása és kezelése során

Diagnózis felállítása:

pontos klinikai diagnózis, lehetőség szerint *családfa elemzéssel* kiegészítve (klinikai genetikus). Célja: öröklődésmenet tisztázása

molekuláris biológiai vizsgálatokkal a diagnózis igazolása a géneltérés kimutatásával *(molekuláris diagnosztikai* laboratórium feladata). Cél: betegséggel összefüggő géneltérés igazolása. Ezt követően: az egyenes ági rokonok szűrése

Kezelés: *szűrővizsgálatok* a phenotypusban előforduló eltérések mielőbbi kimutatása illetve *preventív beavatkozások* végzése

Betegek hosszútávú nyomonkövetése
Családtervezés: genetikai tanácsadás

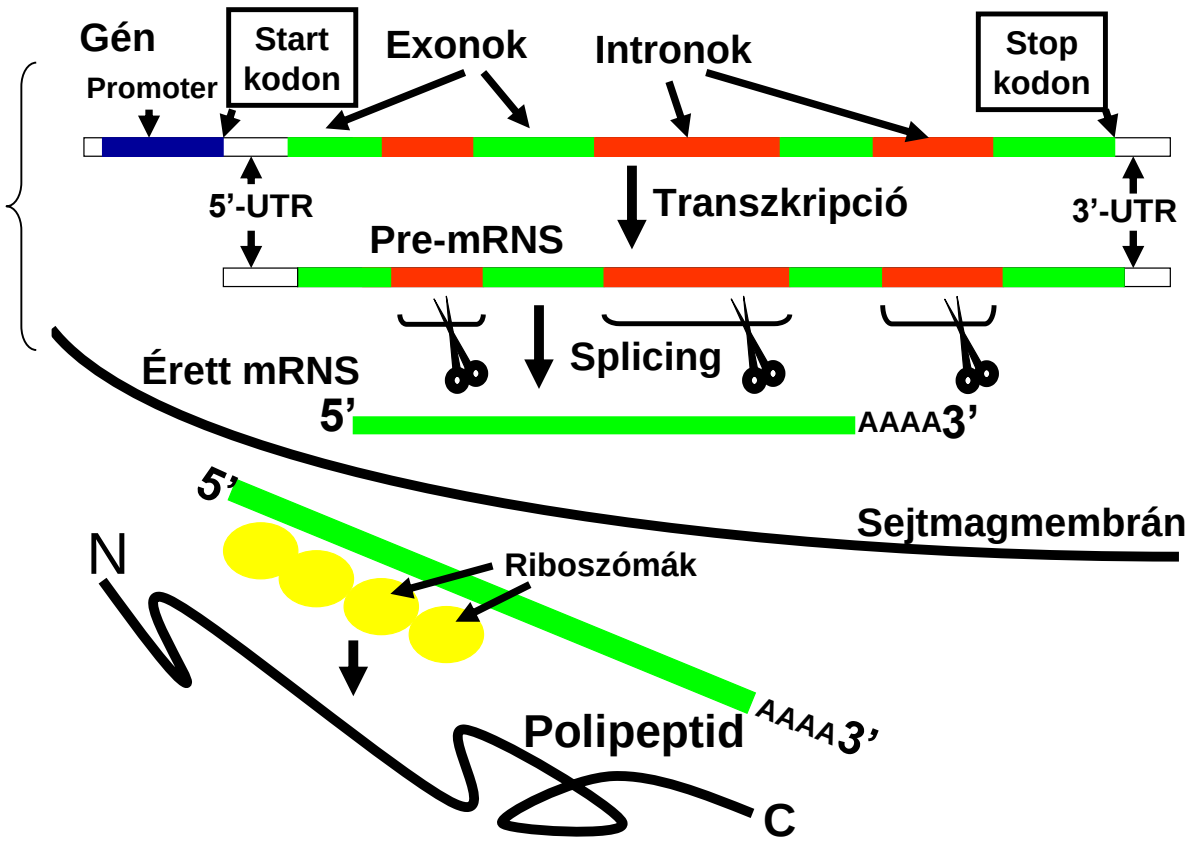
Csapatmunka: belgyógyász, endokrinológus, gyermekgyógyász, onkológus….

***Komplex* öröklődésű betegségek esetében**
Rizikó becslés, ún. hajlamosító tényezők ismertetése

Transzkripció-transzláció, örökítő anyag

Mi a gén?

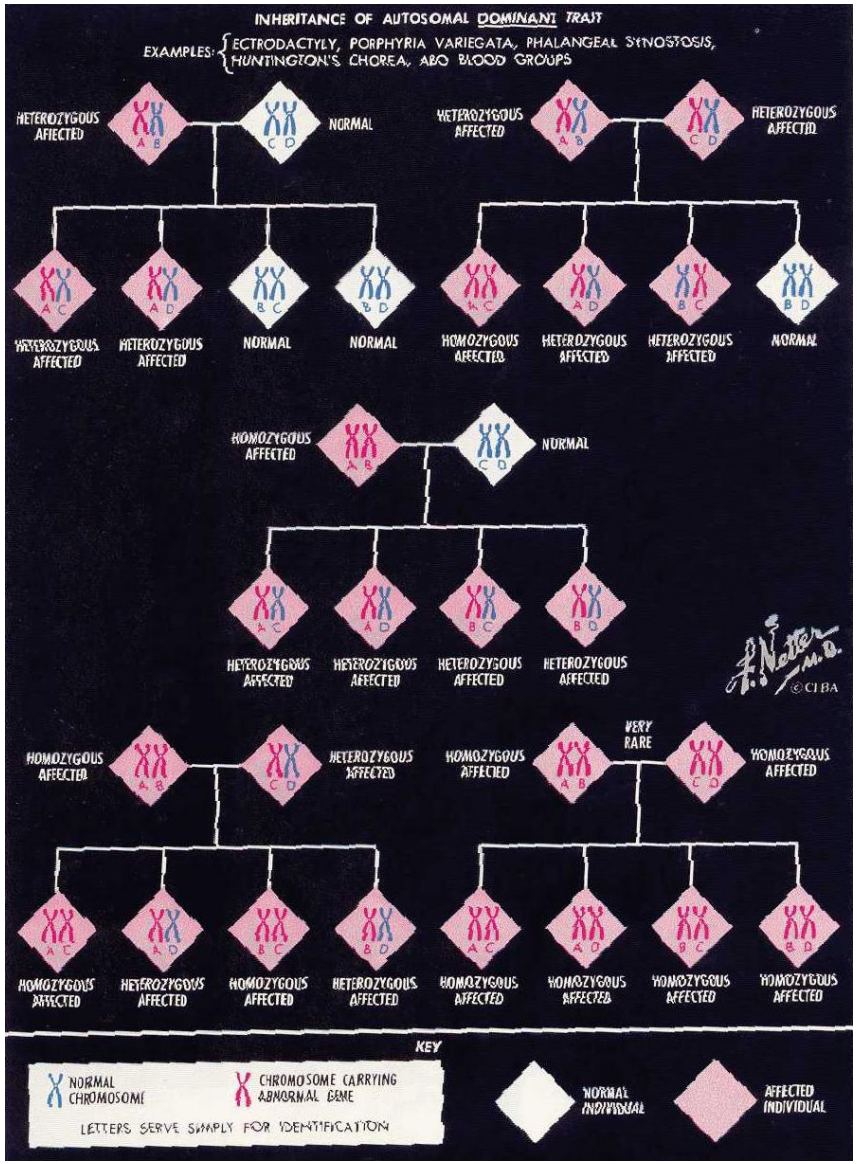
Molekuláris genetikai laboratórium feladata



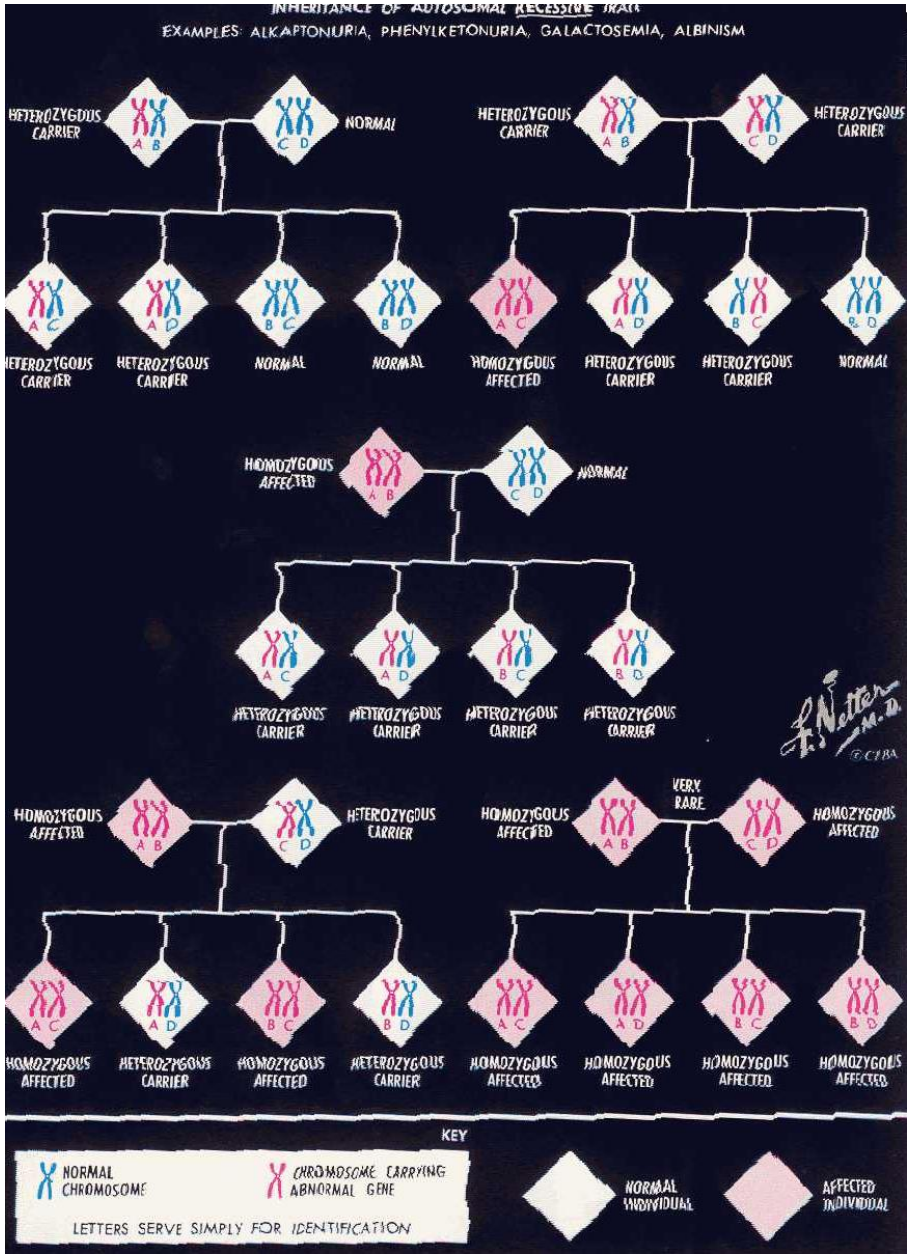
Részlet a készülő Endokrinológiai genetika című könyvből (Igaz P, Patócs A, Rácz K)

Öröklődés menet	Genotípus	Fenotípus
Domináns öröklődés	AA	Beteg
	Aa	Beteg
	aa	Egészséges
Recesszív öröklődés	AA	Egészséges
	Aa	Egészséges (tünetmentes hordozó)
	aa	Beteg

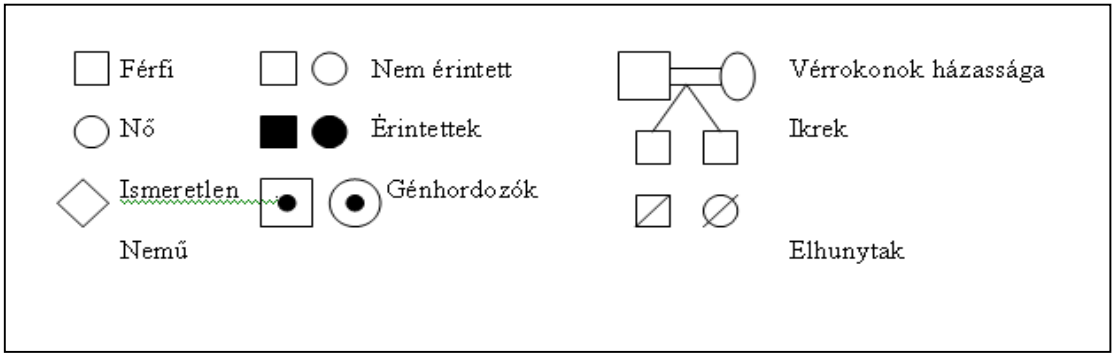
Autoszomális domináns öröklődés

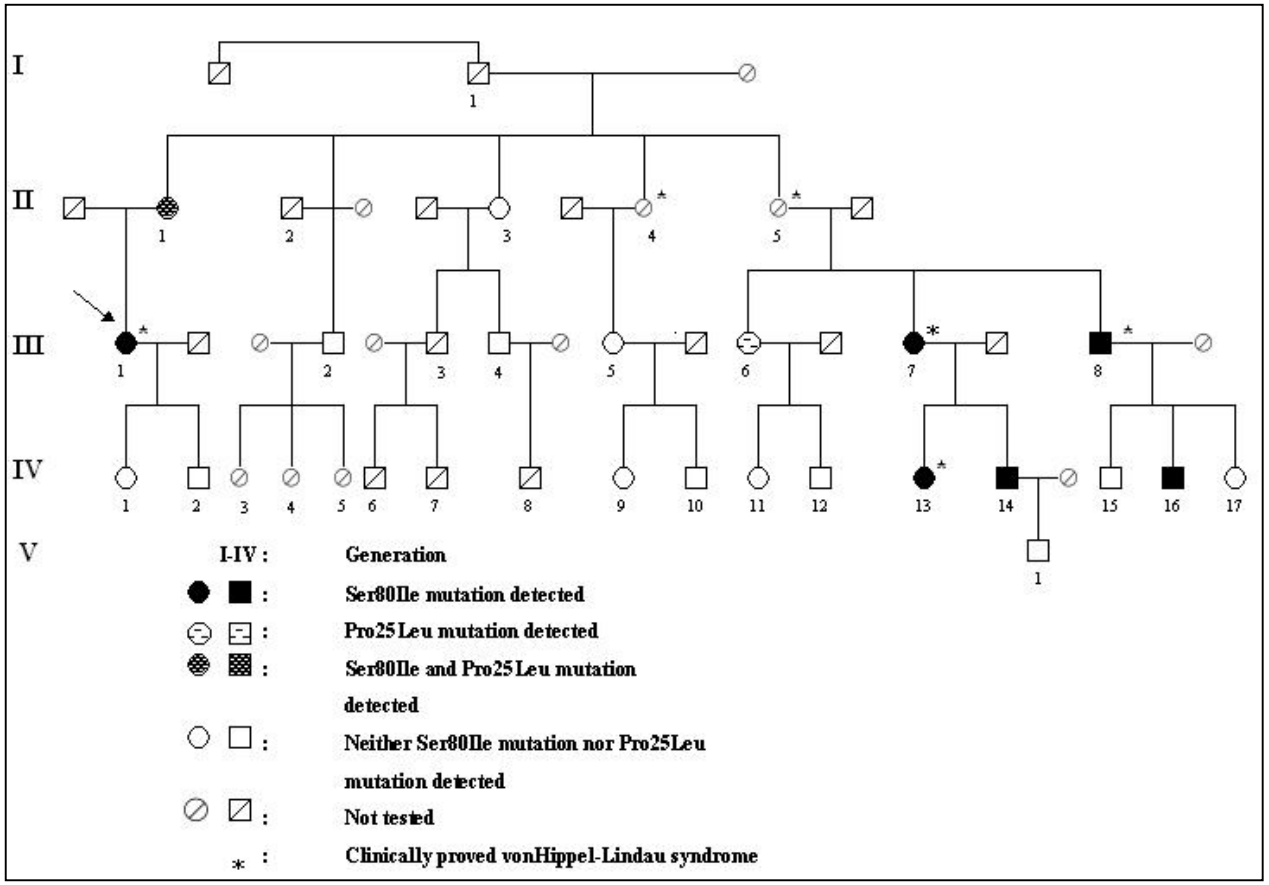


Autoszomális recesszív öröklődés



A családfa szerkesztés során használt egyezményes jelek





Genetikai vizsgálatok célja

1. Molekuláris *diagnosztikai* labor feladata

Ismert géneltérések kimutatása betegek vizsgálata (mutációszűrés, polimorfizmusok gyakoriságának meghatározása):

-**betegség-okozó mutációk azonosítása**	**Szűrőmódszerek:**
Monogénes kórképek esetében	
-MEN1:	TTGE
-MEN2:	SSCP, majd restrikciós enzim emésztés
-*CYP21A2*:	allél-specifikus amplifikálás
-*GR* receptor polimorfizmusok kimutatása:	allél specifikus PCR restrikciós enzim emésztés

Szűrőmódszerek alkalmazása után a beazonosított eltérés megerősítése egy másik módszerrel, általában DNS szekvenálás

Genetikai vizsgálatok célja

2. Betegség, vagy valamilyen fenotípus hátterében álló genetikai eltérés azonosítása (genomikai kutatások), genetikai hajlomosító tényezők feltárása

Jellemzők: poligénes, komplex öröklődésmenetű kórképek esetében

- Nincs ismert gén
- Teljes genom vizsgálata szükséges
- Case-control vizsgálatok
    - -Kapcsoltsági vizsgálatok
    - -Asszociációs vizsgálatok
- Nagy volumenű, relatív olcsó módszer szükséges
- Elsősorban kutató laboratóriumok feladata

Vizsgálandó genetikai eltérések

Mutáció: a DNS bizonyos részeinek spontán elváltozásai, melyek megváltoztatják a kódolt utasításokat, hibás fehérjét vagy hibás funkciót eredményeznek

Epidemiológiai definició:

1. **mutáció**, melynek gyakorisága az átlag populációban kisebb mint 1 %,
2. **polimorfizmus** (SNP): gyakorisága > 6 %,
3. genetikai **variáns**: gyakorisága 1-6 %

A mutációk **osztályozása**:

- *terjedelem alapján* pontmutációkról (egy bázis vagy bázispár érintett)
  kromoszóma-mutációkról (egész gén, vagy kromoszómaszakasz érintett)

- *minőségi tulajdonságok* alapján
  szerkezeti mutációk: helyettesítő - szubsztituciós,
  deléciós, inszerciós mutációk
  átrendező (génen belül, kromoszómán belül-inverziók,
  kromoszómák között-transzlokációk)

- *eredet szerint:* spontán, genetikai kontroll (un. mutátorok)
  indukált (kémiai ágensek, ionizációs sugárzások, nem ionizációs-uv sugárzás) mutációkról.

Pontmutációk jellegzetességei

A legtöbb betegség-okozó mutáció pontmutáció.

Pontmutációkat:

- *samesense mutációk (szinonim mutációk)*: ezek az un. néma mutációk, általában semmiféle eltérést nem okoznak. Ebbe a csoportba tartoznak a gén polimorfizmusok legnagyobb hányada is

- *nonsense mutációk*: ilyen típusú mutáció során az egyik kodon stop kodonná változik, ami fehérje rövidülését eredményezi.

- *missense mutációk*: az aminosav sorrend megváltozását okozza, az által, hogy az aminosavat kódoló triplet egyik bázisa egy másikra cserélődik, és így a normális aminosav helyett egy másik épül be a fehérjeláncba **(pl. MEN2-t okozó RET protoonkogén mutációk ebbe a csoportba tartoznak)**

Pontmutációk kimutatása

Polimeráz láncreakció (PCR): a vizsgálni kívánt génszakasz felsokszorozása

Kivitelezése:
- DNS mennyisége, minősége (alvadásgátolt vérből)
- Primerek: a kívánt DNS szakaszra specifikus oligonukleotidek
  - Minőségi jellemző: melting hőmérséklet
- Polimeráz enzim (Taq, Pfu…)
- dNTP mix
- puffer, DMSO

Szűrővizsgálati módszerek:

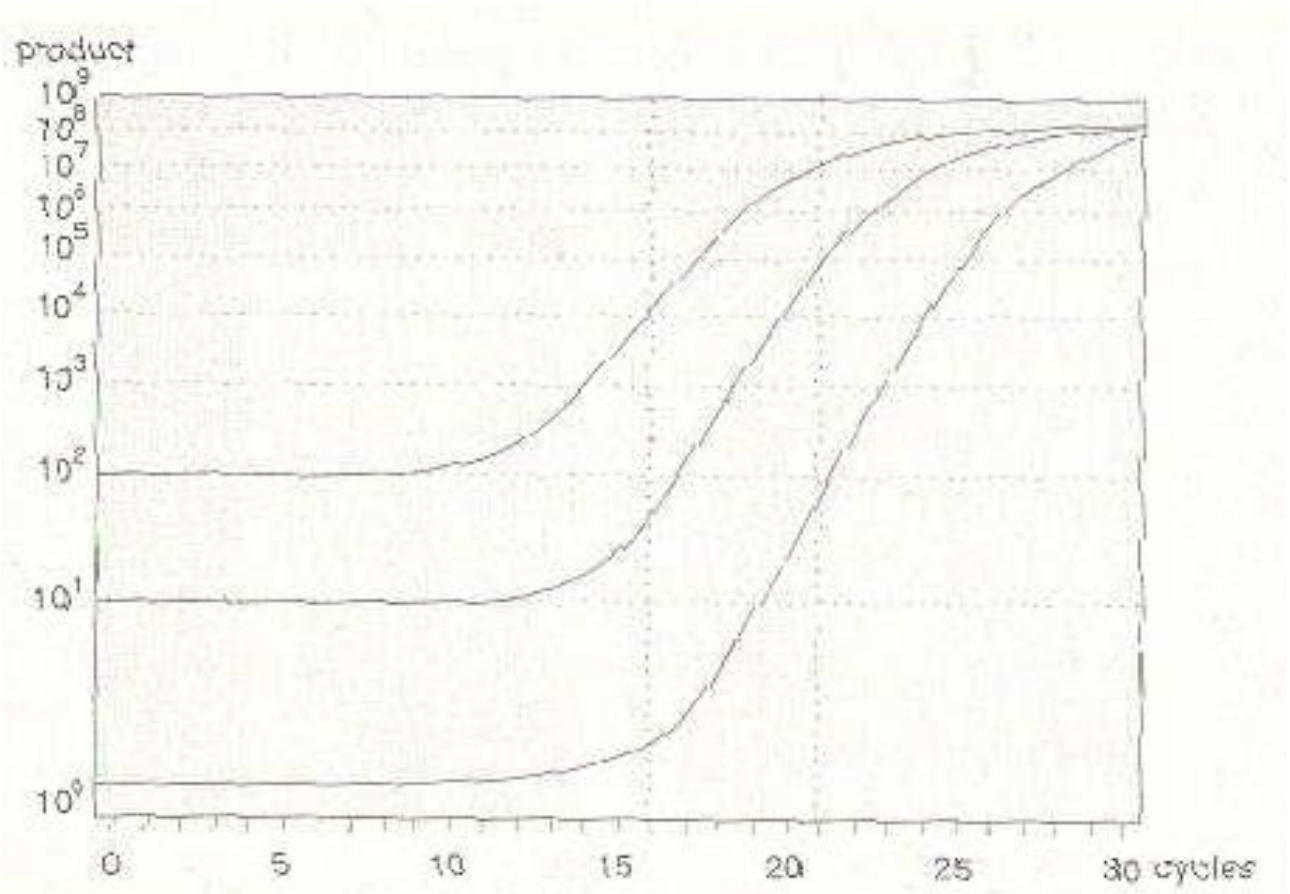
Jellemzője: nagy volumen, kis költség

Módszerek:
- allél specifikus amplifikáció
- restirikciós enzim emésztés
- SSCP
- DGGE
- TTGE

Pontos szekvencia meghatározás

DNS szekvenálás

PCR-termék mennyisége és a ciklusszám közötti összefüggés

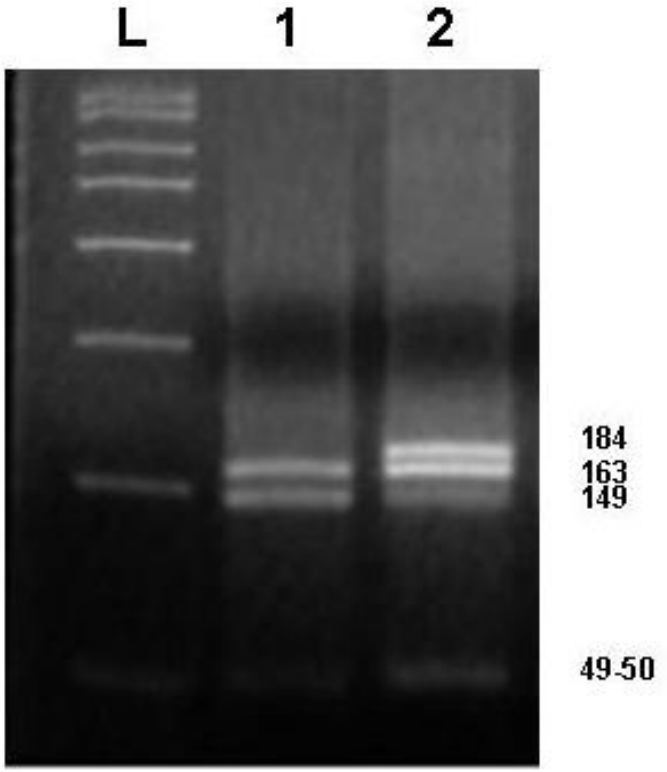


Valós idejű (real-time) detektálás során a mérést a lineáris fázisban kell elvégezni

Alkalmazása: deléciók, inszerciók kimutatása mivel a hagyományos PCR során a heterozigóta deléciók kimutatása nem lehetséges

pl. heterozigóta deléciók igazolása: CYP21A2, vhl, SDHB, SDHD, menin

Restrikciós fragment hosszpolimorfizmus (RFLP)



Az ER22/23 EK polimorfizmus kimutatása PCR amplifikációt követő restrikciós endonukleáz enzimemmel történt emésztés módszerével. Balról jobbra L: DNS létra, 1. minta: homozigóta vad egyén; 2. minta: heterozigóta egyén

Allél specifikus amplifikáció

A glukokortikoid receptor gén 363-as kodon vizsgálata

CCAGTAATGTAACACTGCCCCAAGTGAAAACAGAAAAAGAAGATTTCATCGAACTCTGCACCCC

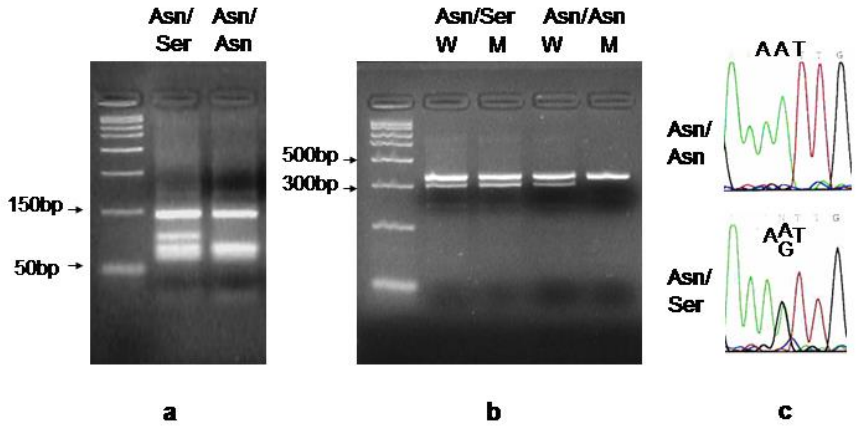
TGGGGTAATTAAGCAAGAGAAACTGGGCACAGTTTACTGTCAGGCAAGCTTTCCTGGAGCAAAT

ATAATTGGTAATAAAATGTCTGCCATTTCTGTTCATGGTGTGAGTACCTCTGGAGGACAGATGTA

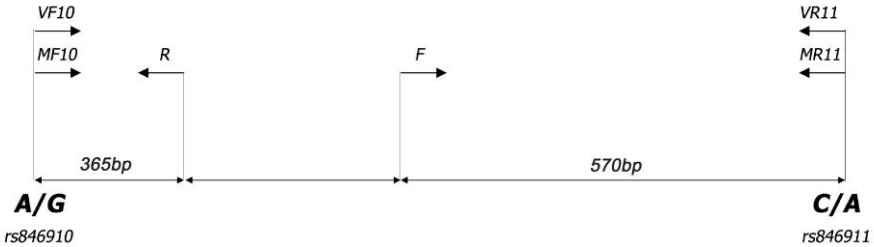
CCACTATGACATGAATACAGCATCCCTTTCTCAACAGCAGGATCAGAAGCCTATTTTTAATGTCA

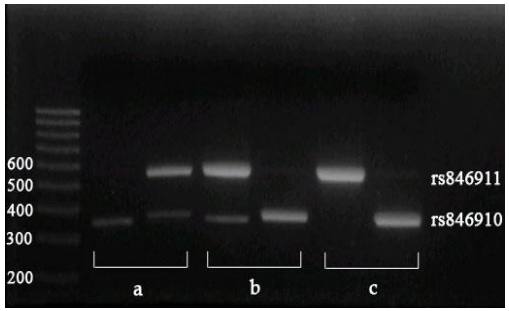
TTCCACCAATTCCCGTTGGTTCCGAAAATTGGAATAGGTGCCAAGGATCTGGAGATGACAACTT

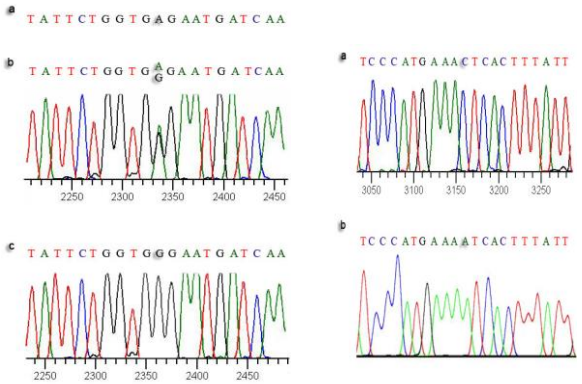
GACTTCTCTGGGGACTCTGAACTTCCCTGGTCGAA



A 11 β-Hydroxiszteroid Dehidrogenáz 1-es típusát kódoló gén rs846910 és rs846911 polymorfizmusok együttes vizsgálata multiplex allél-specifikus PCR-rel







Polimorfizmus vizsgálat allél-specifikus PCR valós időben (RT-PCR)

Roche

Light Cycler



Kapillárisban

Roche próbák

Taqman

Sybergreen

IVD

cobas® 4800 System



96/382-es plate

Többféle jelölés

IVD

ABI

7500PCR



96-os plate

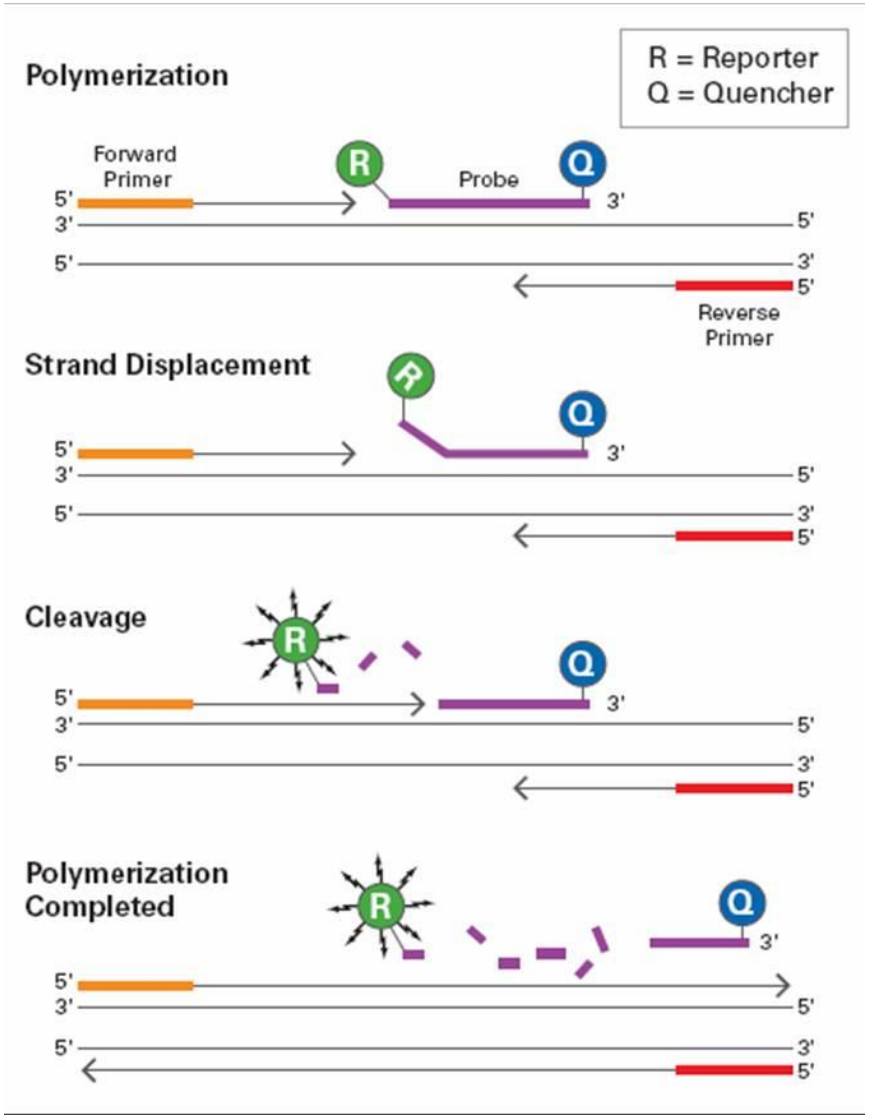
Próbák (6 féle jelölés)

Taqman

Sybergreen

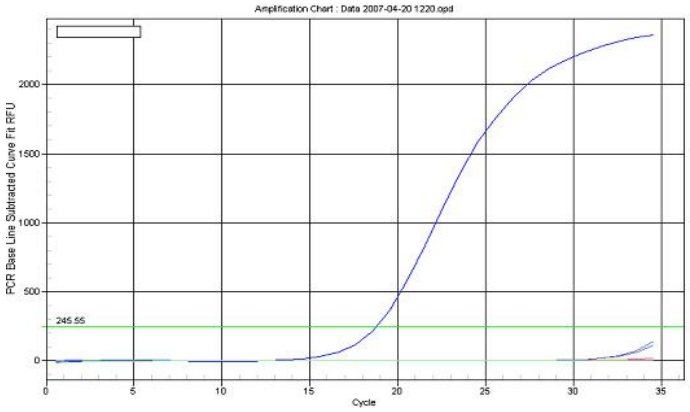
Research Use Only

Taqman kémia és a jelképződés alapja



Általában egy polimofizmus (SNP) esetében a két nukleotid különböző színű próbával van jelölve (FAM, Vic)

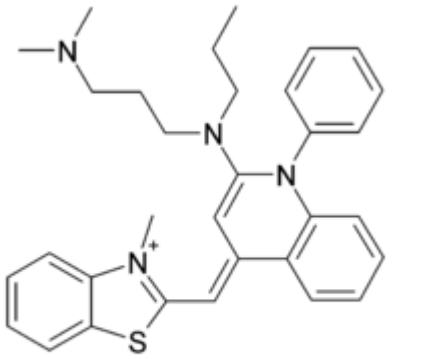
Jel csak onnan detektálható ahol megtörtént a hibridizáció



Sybergreen technológia alapja és a jelképződés alapja

DNS két szála közé interkaládó festék → Etidium bromidot kiváltja ⟷ DE

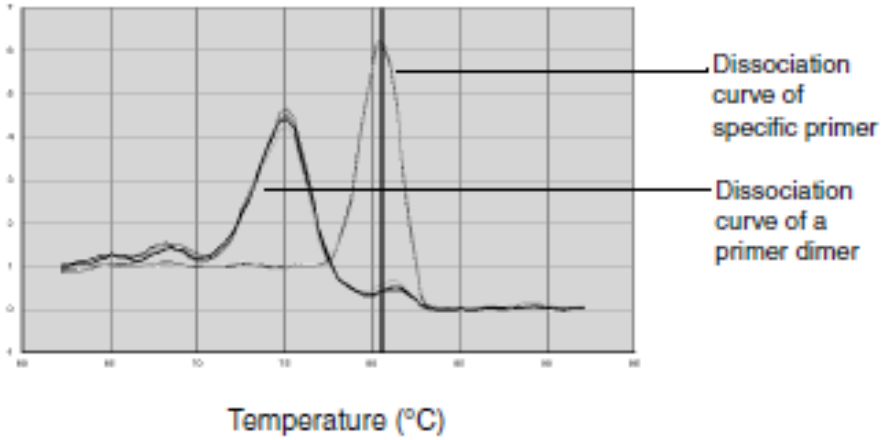
SYBR Green I



IUPAC name [hide]

N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine

PCR esetén az aspecifikus amplifikáció során pl. a primer dimér estén is ad jelet.



Jelenleg elérhető alkalmazások

- IVD minősített
  - Hemosztázis: Leiden, protrombin, MTHFR SNP-ek
  - Mikrobiológia:

    LighCycleren: szepszis panel, vancomycin rezisztencia, MRSA, Herpesz panel,

    Taqman tesztek: HBV, HCV, HIV-1

Nagy átteresztő képességű, automatizált allél specifikus amplifikáció

Technológiai háttér

- Affymetrix
  - GeneChip Human Mapping Array Set
    - 100K, 500K SNP Platforms
    - 1M SNP Platform (early 2007)
- Illumina
  - HumanHap Genotyping BeadChip
    - 250K, 350K, 550K SNP Platforms
    - 650K SNP Platform (150K Yoruba-HapMap) (International HapMap Consortium (2005) A haplotype map of the human genome. Nature 437, 1299–1320, www.hapmap.org)

Teljes genomot lefedő SNP detektáláshoz használatos technológia

Affymetrix 6.0 SNP

- 906.600 SNP
- szükséges DNS 500 ng
- genom lefedettség: > 0,96

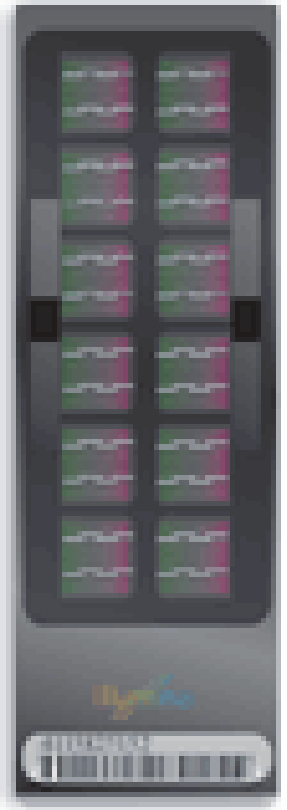


Illumina Human1M-Duo BeadChip (2008 februári Genom adabázis alapján)

-1.1 millió SNP per minta

- szükséges DNS 400 ng
- genom lefedettség: > 0,96
- felbontás 2,4 kb

-21877 nem szinonim, 137 mitokondrium genom SNP



Automatizált mutáció szűrőrendszer

Denaturáló, nagy nyomású folyadékkromatrográfia (DHPLC: denature, highpressure liquid chromatography)

Ismeretlen és nagy méretű gének esetén ideális szűrőmódszer

Homo és heteroduplex-ek eltérő olvadás pontján alapul

Nagy szenzitivitás

Gyors (kb 192 minta /h)

A PCR reakció után más előkészítés nem igényel

Kis méretű fragmensek (ideálisan <200 bp) elemzése

DE

A készülék drága

Pozitív esetekben szekvenálást igényel

A géndefektus megerősítése

Szűrőmódszer, sem a specificitása sem a szenzitivitása nem éri el a 100%-ot

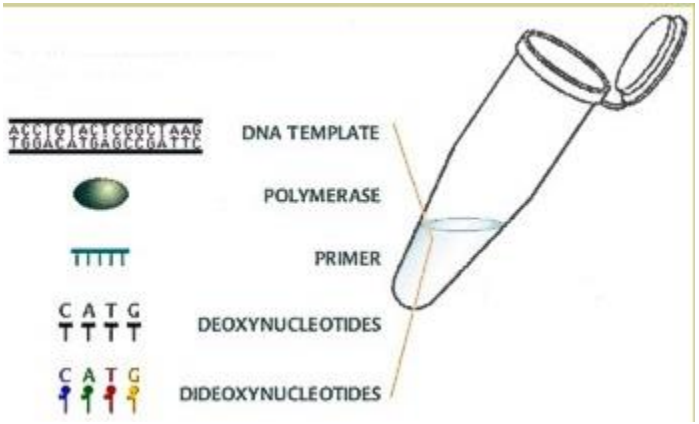
A szűrővizsgálattal kapott eredményt meg kell erősíteni

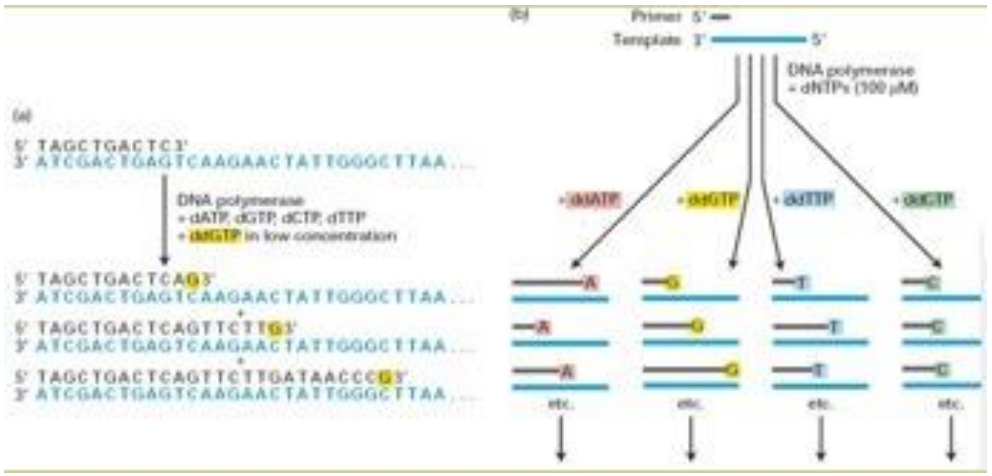
Azokban az esetekben, melyekben a klinikai kép nem korrelál a szűrővizsgálat eredményével további vizsgálatok szükségesek

DNS szekvenálás: mint minden szűrővizsgálat kontrollja,

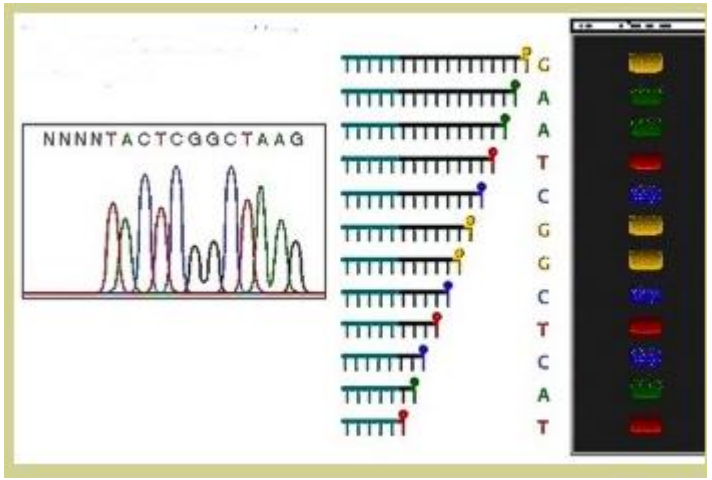
a mutáció azonosítás leghatékonyabb módszere

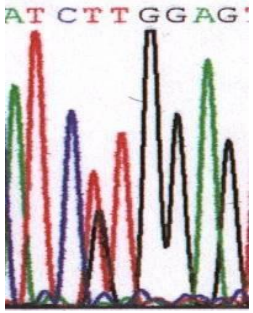
DNS szekvenálás Sanger féle lánctermináció val







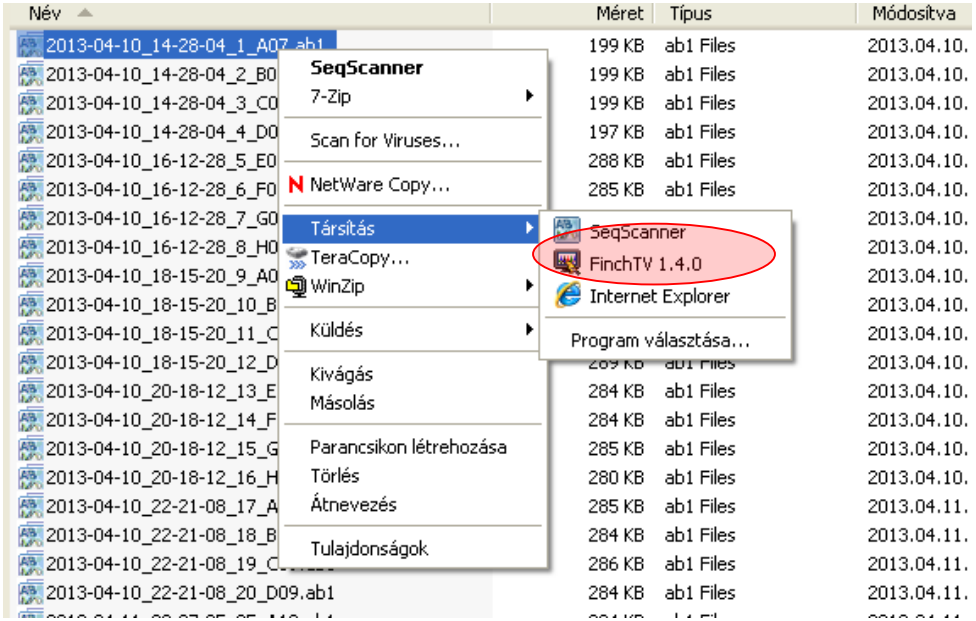


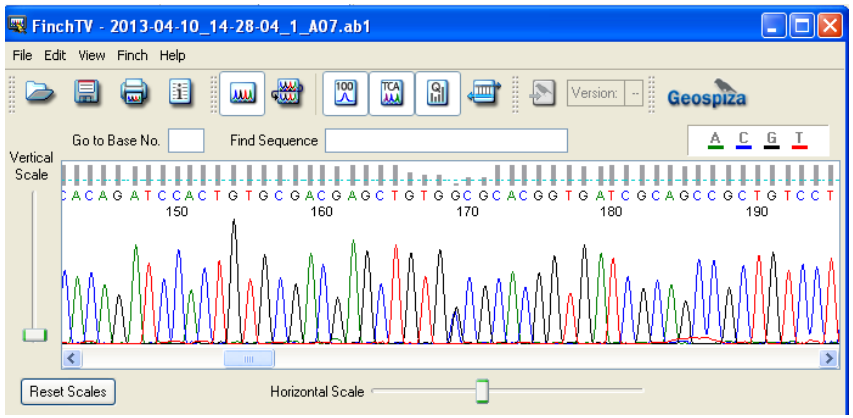


A *RET* protoonkogén 14-es exonjának 804-es kodonjában igazolható CGT-CTT, Val-Leu

Szekvencia értékelése

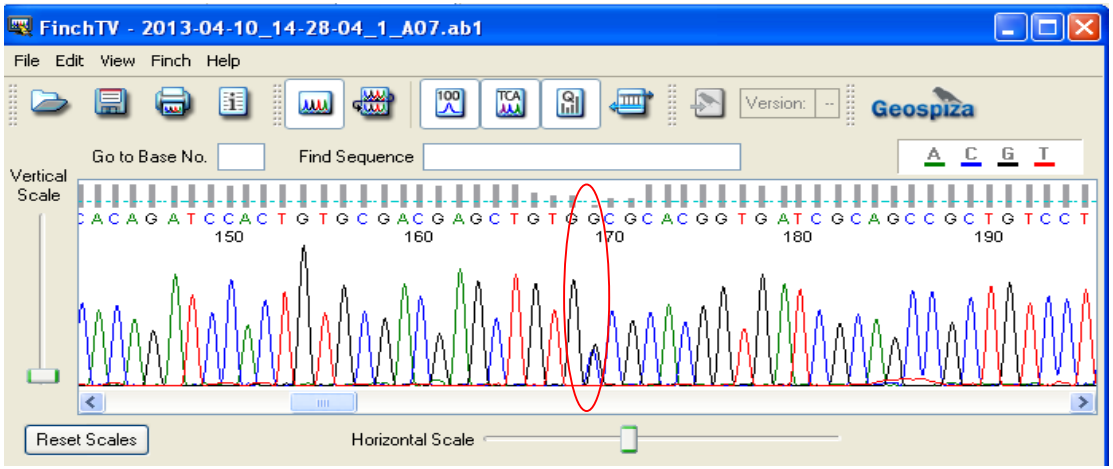
vizualizálás



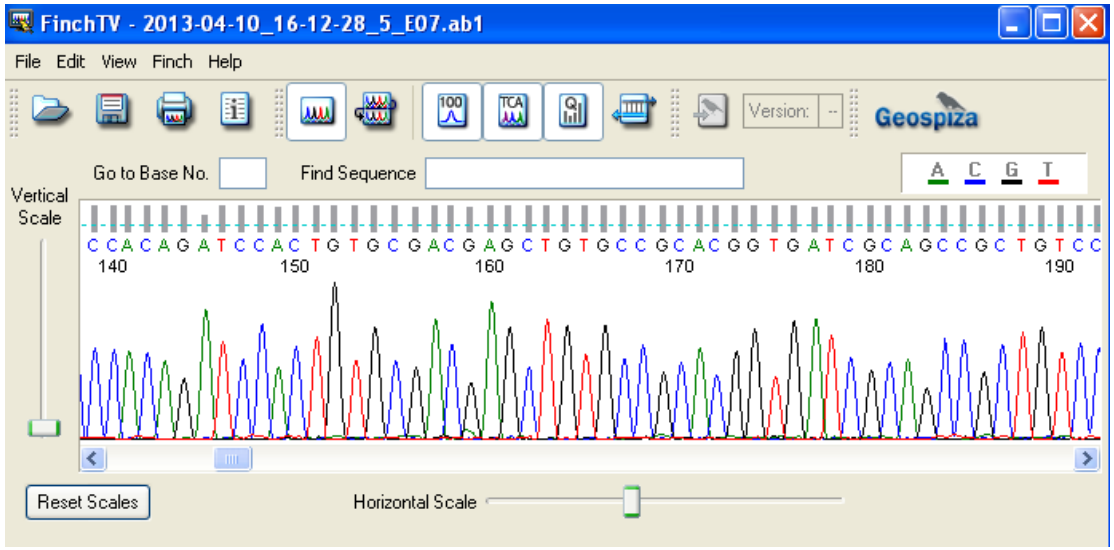


Szekvencia értékelése

Értékelés



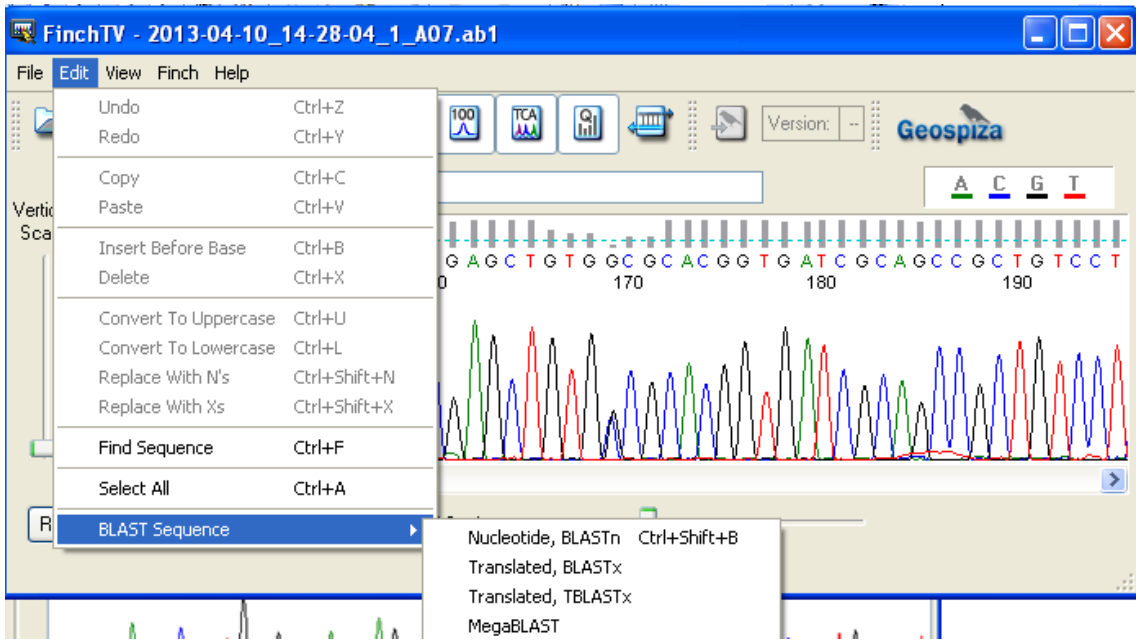
Heterozigóta mutáció

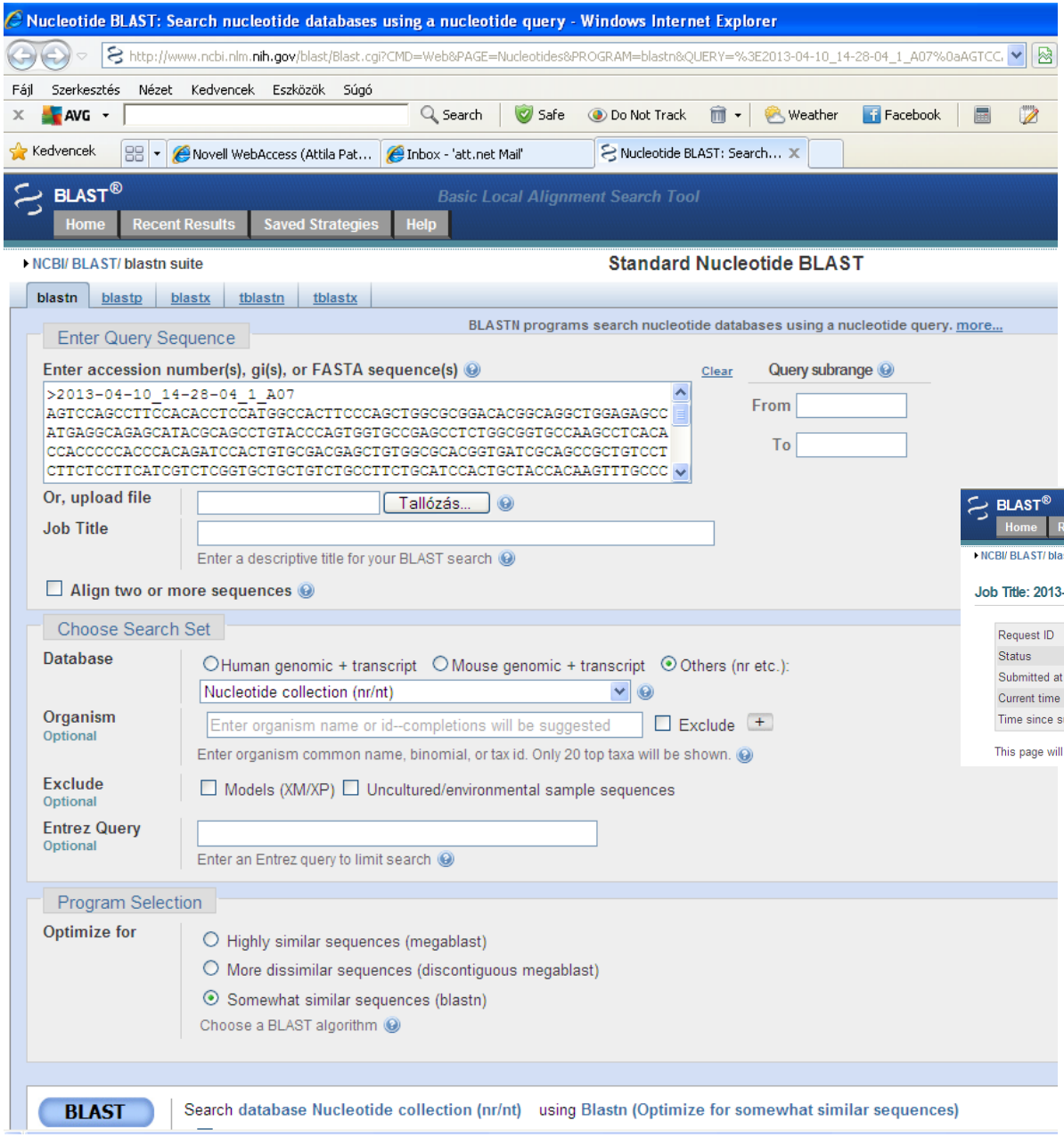


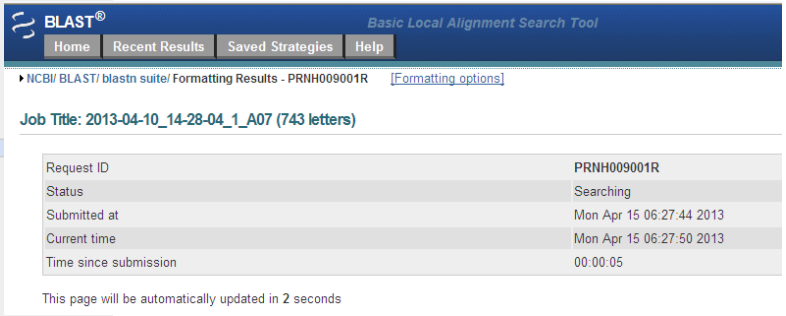
Vad típus

Szekvencia értékelése

Keresés, adatbázisokban: Blast (Basic Local Alignment Search Tool)




Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide query - Windows Internet Explorer
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&QUERY=%3E2013-04-10_14-28-04_1_A07%0aAGTCC
Fájl Szerkesztés Nézet Kedvencek Eszközök Súgó
Search Safe Do Not Track Weather Facebook
Kedvencek
Novell WebAccess (Attila Pat...
Inbox - 'att.net Mail'
Nucleotide BLAST: Search...
BLAST®
Basic Local Alignment Search Tool
Home
Recent Results
Saved Strategies
Help
NCBI/ BLAST/ blastn suite
Standard Nucleotide BLAST
blastn
blastp
blastx
tblastn
tblastx
BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query. more...
Enter Query Sequence
Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)
Clear
Query subrange
From
To
>2013-04-10_14-28-04_1_A07
AGTCCAGCCTTCCACACCTCCATGGCCACTTCCCAGCTGGCGCGGACACGGCAGGCTGGAGAGCC
ATGAGGCAGAGCATACGCAGCCTGTACCCAGTGGTGCCGAGCCTCTGGCGGTGCCAAGCCTCACA
CCACCCCCACCCACAGATCCACTGTGCGACGAGCTGTGGCGCACGGTGATCGCAGCCGCTGTCCT
CTTCTCCTTCATCGTCTCGGTGCTGCTGTCTGCCTTCTGCATCCACTGCTACCACAAGTTTGCCC
Or, upload file
Tallózás...
Job Title
Enter a descriptive title for your BLAST search
Align two or more sequences
Choose Search Set
Database
Human genomic + transcript
Mouse genomic + transcript
Others (nr etc.):
Nucleotide collection (nr/nt)
Organism
Optional
Enter organism name or id--completions will be suggested
Exclude
Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown.
Exclude
Optional
Models (XM/XP)
Uncultured/environmental sample sequences
Entrez Query
Optional
Enter an Entrez query to limit search
Program Selection
Optimize for
Highly similar sequences (megablast)
More dissimilar sequences (discontiguous megablast)
Somewhat similar sequences (blastn)
Choose a BLAST algorithm
BLAST
Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Blastn (Optimize for somewhat similar sequences)


BLAST®
Basic Local Alignment Search Tool
Home
Recent Results
Saved Strategies
Help
NCBI/ BLAST/ blastn suite/ Formatting Results - PRNH009001R
[Formatting options]
Job Title: 2013-04-10_14-28-04_1_A07 (743 letters)
Request ID PRNH009001R
Status Searching
Submitted at Mon Apr 15 06:27:44 2013
Current time Mon Apr 15 06:27:50 2013
Time since submission 00:00:05
This page will be automatically updated in 2 seconds

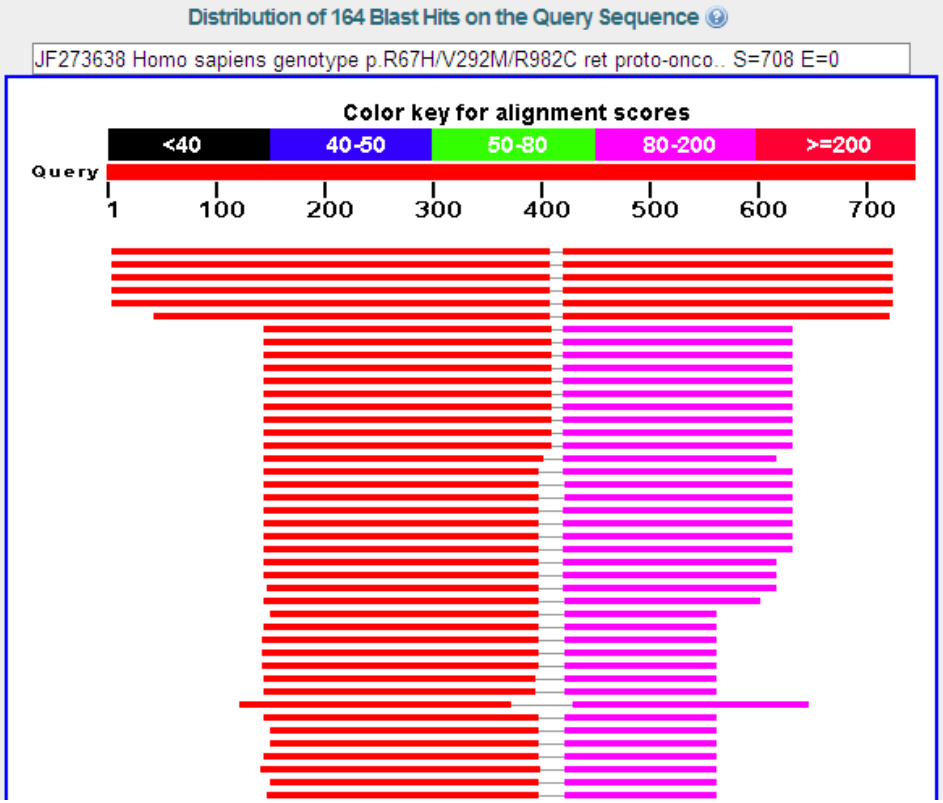
Edit and Resubmit | Save Search Strategies | Formatting options | Download

2013-04-10_14-28-04_1_A07 (743 letters)

Query ID	lcl|15547	**Database Name**	nr
Description	2013-04-10_14-28-04_1_A07	**Description**	Nucleotide collection (nt)
Molecule type	nucleic acid	**Program**	BLASTN 2.2.28+ Citation
Query Length	743		

Other reports: Search Summary [Taxonomy reports] [Distance tree of results]

Graphic Summary



Szekvencia értékelése

Download GenBank Graphics Sort by: E value

Homo sapiens ret proto-oncogene (RET), RefSeqGene on chromosome 10

Sequence ID: ref|NG_007489.1| Length: 60283 Number of Matches: 2

Range 1: 42271 to 42674 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
708 bits(784)	0.0	401/404(99%)	2/404(0%)	Plus/Plus

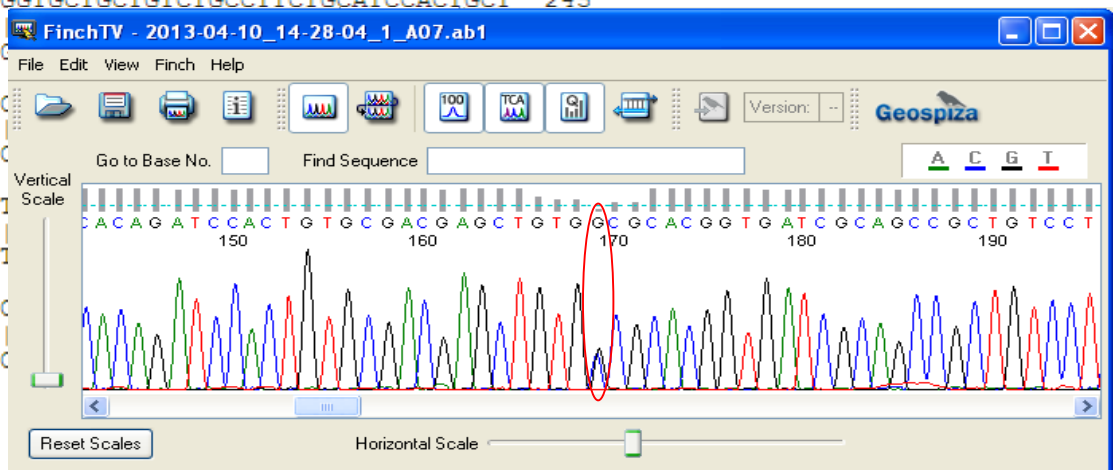
```
Query  7      GCCTTCC-ACACCTCCATGGCCACTTCCCAGCTGGCGCGGACACGGCAGGCTGGAGAGCC  65
              ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  42271  GCCTTCCCACACCTCCATGGCCACTTCCCAGCTGGCGCGGACACGGCAGGCTGGAGAGCC  42330

Query  66     ATGAGGCAGAGCATACGCAGCCTGTACCCAGTGGTGCCGAGCCTCTGGCGGTGCCAAGCC  125
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  42331  ATGAGGCAGAGCATACGCAGCCTGTACCCAGTGGTGCCGAGCCTCTGGCGGTGCCAAGCC  42390

Query  126    TCACACCACCCCCACCCACAGATCCACTGTGCGACGAGCTGTGGCGCACGGTGATCGCAG  185
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  42391  TCACACCACCCCCACCCACAGATCCACTGTGCGACGAGCTGTGCCGCACGGTGATCGCAG  42450

Query  186    CCGCTGTCCTCTTCTCCTTCATCGTCTCGGTGCTGCTGTCTGCCTTCTGCATCCACTGCT  245
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  42451  CCGCTGTCCTCTTCTCCTTCATCGTCTCG
Query  246    ACCACAAGTTTGCCCACAAGCCACCCATC
              ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  42511  ACCACAAGTTTGCCCACAAGCCACCCATC
Query  306    CCCAGGCCTTCCCGGTCAGCTACTCCTCT
              ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  42571  CCCAGGCCTTCCCGGTCAGCTACTCCTCT
Query  366    TGGAGAACCAGGTCTCCGTGGATGCCTTC
              ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  42631  TGGAGAACCAGGTCTCCGTGGATGCCTTC
```

TGC-TGG csere



Genetikai tanácsadás, lelet

- **Ki végezhet?**

Magyarország/Europa

Klinikai genetikus szakvizsgával rendelkező orvos

USA/Ausztrália

- genetikai tanácsadó (genetic counselor, főiskolai végzettség)
- orvosgenetikus

Célja:

- Betegek tájékoztatása, vizsgálatok szervezése

- Genetikai szűrővizsgálatokat az USA-ban is csak orvosi végzettségűek indikálhatnak
  - genetikai betegségben szenvedők
  - genetikai betegség kialakulására hajlamosak
  - géndefektust hordozó családokban a családtervezésben (prenatális diagnosztika)

- Genetikai adat, vizsgálati eredmény kezelése, tájékoztatás, adatszolgáltatás (etikai és jogi kérdések)

Genetikai tanácsadás

Monogénesen öröklődő betegségek esetében

Diagnózis felállítása:

genetikai tesztek alapján, mind a betegekben, mind pedig a tünetmentes családtagok esetében

Differenciáldiagnosztika

Betegek nyomonkövetése

Terápia megválasztása

Családtervezés

Komplex öröklődésű betegségek esetében

-Rizikó becslés, ún. hajlamosító tényezők ismertetése

-Terápia eredményességének becslése (génexpressziós mintázatok alapján a kemoterápia)

-Gyógyszermetabolizmus, pl azathioprin kezelés, a tiopurin-S-metiltranszferáz TPMT*3A homozigótákban életveszélyes mieloszuppresszió

Monogénes betegségek, a patogenetikai ok feltárása

Genetikai tanácsadás folyamata

1. **Családfa elemzés:**

   - öröklődésmenet tisztázása: domináns vagy recesszív, autoszomális vagy nemi kromoszómához kötött öröklődés

2. **A felelős genetikai eltérés vizsgálata hozzáférhető-e?**

3. **Genetikai vizsgálati eredmény birtokában**

   - Kapcsoltsági vizsgálatok:

   - fenotipus szegregálódik-e a genotipussal?
   - az azonosított genetikai eltérés nem egy egyszerű polimorfizmus-e? (funkcionális tesztelés)

   - **Családszűrés szervezése, terápia megválasztása**

Genetikai esetek

Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika
1088 Budapest Szentkirályi u. 46.
Endokrinológiai Genetika
Intézetvezető: Prof. Dr. Rácz Károly
Tel:

V i z s g á l a t k é r ő l a p

Endokrin Genetika

Beteg neve.....
Születési dátum...: 1981.06.15 ÁNTSZ azonosító: B26 014013002
Anyja neve.....
Lakcím.....
Beküldő.....
Vizsgálatkérő.....

Teljesítés azonosító: 10452826

Iránydiagnózis D3500 Mellékvese jóindulatú daganata
Kért.vizsg.: ORO
Rendelő megjegyzése
32 éves, jobb oldali 5 cm-es phaeochromocytoma, családi anamnézis negatív. Egyéb hormonok folyamatban.

2012.11.27

L E L E T

KBA.....: 00000342305

Beteg neve.....: [redacted]
Születési dátum...: 1981.06.15 Teli. AZ: 10452824
Anyja neve.....: [redacted]
Lakcím.....: [redacted]
Vizsgálatkérő.....: [redacted]

Beküldő orvos.....: Adler Ildikó dr.
Kezelő orvos.....: adl01 Adler Ildikó dr.
Vizsgálat időpontja: 2012.11.29 13:54
Mintavételi adatok:

Típ.	Dátum	Idő	Mennyiség	Megj	Anat	Raktár-osztály	kapcsolatok
Hozz	Kont	Mv id					
SE	2012.11.27	12:30	0.01	PIROSKUP		1	00:00

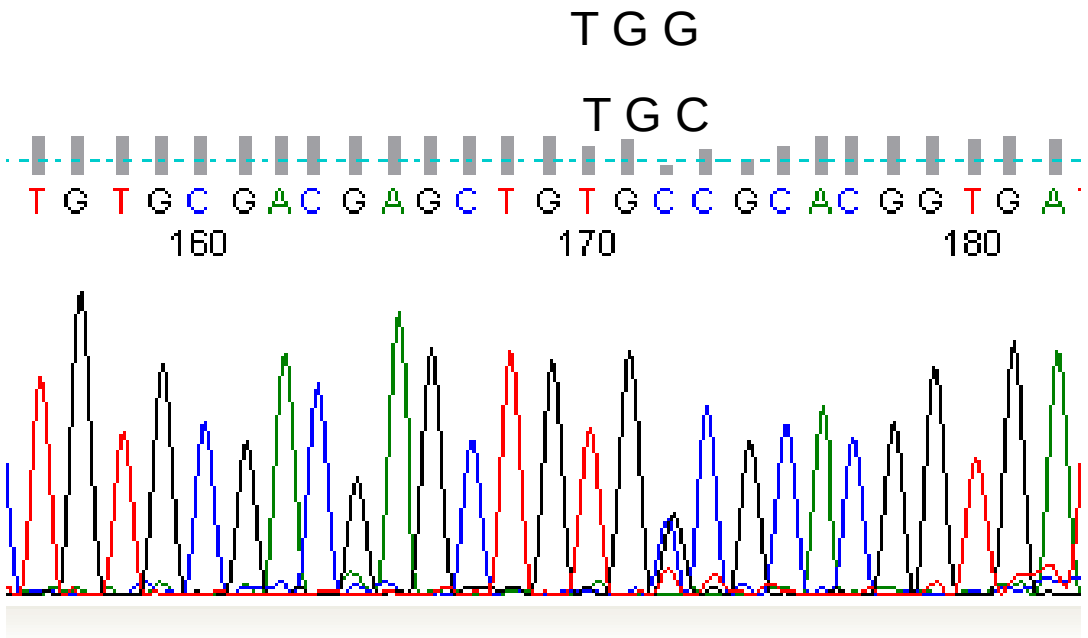
Vizsgálatok

Kód	Megnevezés	Menny.	Pont
23693	Kalcitonin meghatározása	1	1360
Összesen			1360

Eredmény

	Érték	Egység	Abn	Referencia tart.	
calcitonin	29	pg/mL	H	0-19	F

Eredmény, *RET* gén betegség-okozó mutáció



RET exon 11, codon 634

TGC634TGG (Cys-Trp)

RET mutációk típusa prediktív értékű a medulláris pajzsmirigy carcinoma agresszív természetére

- **3-as szint:**
  - MEN 2B beteg vagy 883-as, 918-as, 922-es codon mutáció (preventív thyreoidectomia 6 hónapos korban)
- **2-es szint:**
  - 611-es, 618-as, 620-as vagy 634-es codon mutáció (preventív thyreoidectomia 5 éves korban)
- **1-es szint**
  - 609-es, 768-as, 790-es, 791-es, 804-es és 891-es codon mutáció (preventív thyreoidectomia valószínűleg későbbi életkorban, vagy pozitivvá váló pentagastrin-stimulált szérum calcitonin eredmény esetén)

Rosszindulatú endokrin betegség laboratóriumi diagnosztikája, hormonvizsgálatok és molekuláris biológiai vizsgálatok jelentősége

Medulláris pajzsmirigy carcinoma

Hormon laboratórium: Szérum calcitonin
Szérum CEA

Molekuláris biológiai laboratórium: perifériás vér *Ret* mutáció-analízis

Cytológiai vizsgálat:
Naplószám:18025/20316 Érkezett:121212 Indítás: Válasz:121213

Klinikai adatok

Anamnesisében 1 hete eltávolitott phaeochromocytoma szerepel. Emelkedett Calcitonin szint miatt pajzsmirigy UH vizsgálatot végeztek, mindkét oldali pajzsmirigy lebenyben elmosott határú, echoszegény képletet irtak le. Mindkét oldalról 2-2 UH vezérelt vékonytű biopsia történt.

Makroszkópos- és mikroszkópos leírás

Mindkét oldalról származó aspirátum keneteiben HE festés után szabályos folliculushámsejtekkel vegyülve hyperchromabb

magvú, atypusos sejtes elemek figyelhetõek meg, melyek cytoplasmája széles granularis, eosinophil. A magok egyenetlen magszerkezetûek, nucleolus nem jellemzi õket, de több chromocentrum van jelen.
Immuncytokémiai vizsgálattal mindkét oldali aspiratum kenetein nagy számu calcytonin pozitiv atypusos sejt azonositható./PM

D i a g n ó z i s :

T-SNOMED:Pajzsmirigy 9600
1.)BNO:NEOPLASMA MALIGNUM GLANDULAE THYREOIDEAE
C73.H
M-SNOMED:Carcinoma medullare 8510.3

Diagnózis/vélemény:

A vizsgálat alapján kétoldali medullaris carcinoma jelenléte igazolható.

L E L E T

KBA.....: 00000342305

Beteg neve.....: [redacted]
Születési dátum...: 1981.06.15 Telj. AZ: 10452825
Anyja neve.....: [redacted]
Lakcím.....: [redacted]
Vizsgálatkérő.....: [redacted]

Beküldő orvos.....: Adler Ildikó dr.
Kezelő orvos.....: adl01 Adler Ildikó dr.
Vizsgálat időpontja: 2012.11.27 15:36
Mintavételi adatok:

Típ.	Dátum	Idő	Mennyiség	Megj	Anat	Raktár-osztály	kapcsolatok Hozz	Kont	Mv id
SE	2012.11.27	12:30	0.01	PIROSKUP		1	00:00		

Vizsgálatok

Kód	Megnevezés	Menny.	Pont
26620	Carcino-embrionális antigén (CEA) meghatározá	1	1046
Összesen			1046

Eredmény

	Érték	Egység	Abn	Referencia tart.	
CEA meghat.	6.2	ng/mL	H	0.0-4.3	F

Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika
1088 Budapest Szentkirályi u. 46.
Endokrinológiai Genetika
Intézetvezető: Prof. Dr. Rácz Károly
Tel:

V i z s g á l a t k é r ő l a p

Beteg neve.....:
Születési dátum...: 1976.02.08 ÁNTSZ azonosító: B2EG 014025092
Anyja neve.....
Lakcím.....
Beküldő.....
Vizsgálatkérő.....: B2EG 014025092 Endokrinológiai Genetika
rac08 Rácz Károly Prof.

Teljesítés azonosító: 7042233

Iránydiagnózis E3400 Carcinoid syndroma
Kért.vizsg.: ORO

2010.09.13

.....
Prof.

Phaeochromocytomával járó örökletes tumorszindrómák

Szindróma	Gén	Felfedezésének éve
• Neurofibromatosis 1	NF1	(1990)
• vonHippel-Lindau	VHL	(1993)
• MEN2	Ret	(1994)
• PGL1	SDHD	(2000)
• PGL2	SDHAF2	(2010)
• PGL3	SDHC	(2001)
• PGL4	SDHB	(2000)
Others		
• Pheo, neuroblastoma, lung cc.	KIF1Bbeta	(2008)
• Paraganglioma, erythrocytosis	PHD2	(2008)
• Pheo, paraganglioma	TMEM127	(2010)
• Pheo, paraganglioma	SDHA	(2011)
• Pheo, paraganglioma	MAX	(2011)
• Pheo	FH	(2014)
• Pheo	MDH2	(2015)

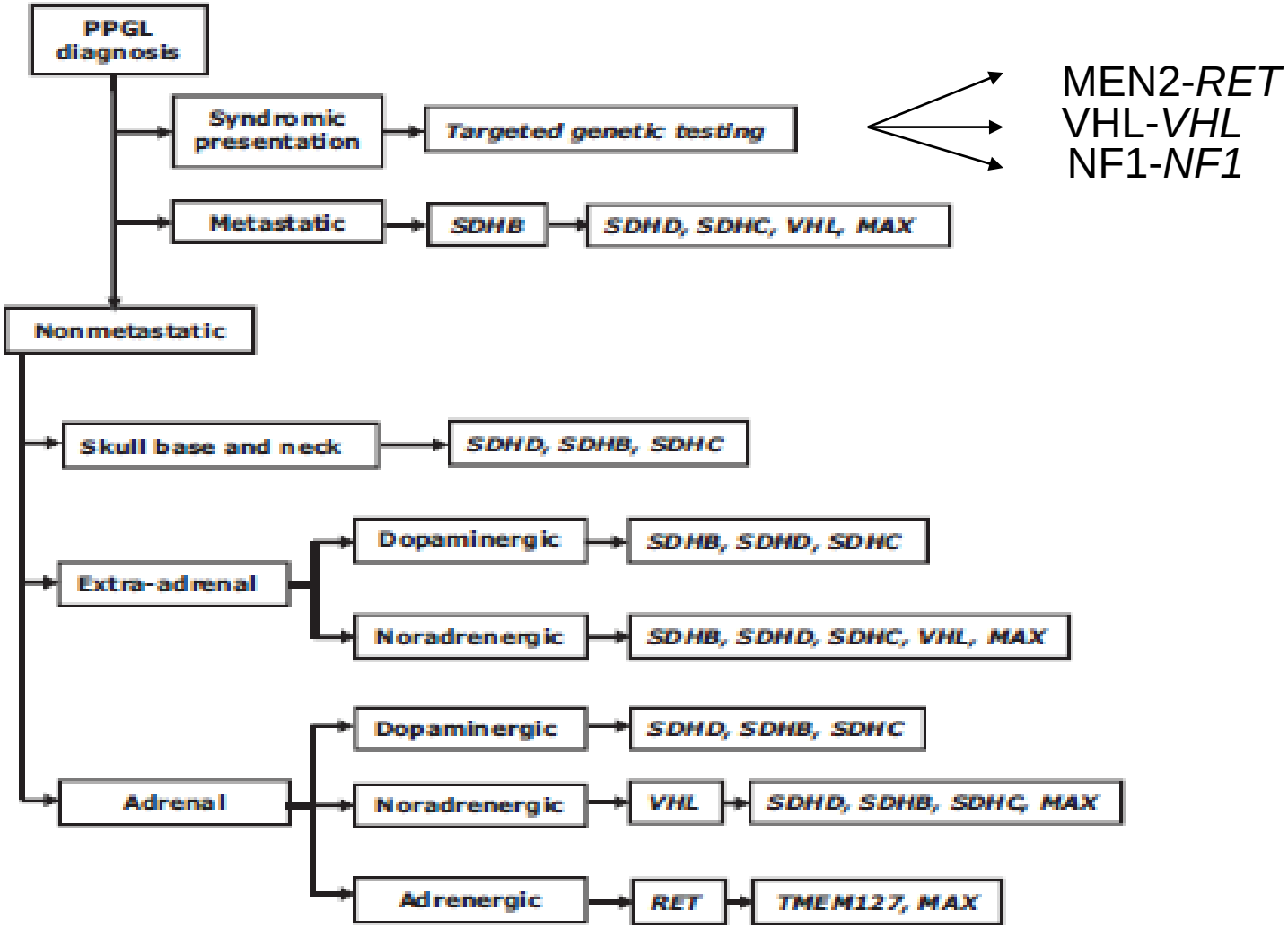
Közös tulajdonság az autoszomális domináns öröklődés

Kihívások az örökletes betegségek molekuláris diagnosztikája során

Melyik gént vizsgáljam?
Milyen sorrendben?

Paradigmaváltás a molekuláris diagnosztikában
- Új generációs szekvenálás alkalmazása

Bizonyított Phaeo/PGL beteg genetikai vizsgálatának algoritmusa



J Clin Endocrinol Metab, June 2014, 99(6):1915–1942

Örökletes endokrin daganatok

Jellegzetes klinikai megjelenés

Klasszikus genetikai kórképek (ismert öröklésmenet, ismert génfunkciók)

Örökletes endokrin tumorszindrómák

1998 **Multiplex Endokrin Neoplasia 2-es típus**

2000 **Multiplex Endokrin Neoplasia 1-es típus**

2000 **von Hippel-Lindau szindróma**

2002 **Örökletes phaeochromocytoma/ paraganglioma szindróma**

2015

Teljes genom vizsgálatok (exom és genom szekvenálás, microarray)

Klasszikus molekuláris biológiai módszerek

PCR, Sanger szekvenálás, mutáció szűrés

Familialis paraganglioma szindrómák

Betegség	Genetikai ok	Fenotípus eltérések
Familialis paraganglioma szindrómák (PGL)		
PGL1	11-es kromoszóma (11q23) mutációk (succinate dehydrogenase subunit D (*SDHD*)	fej és nyak paragangliomák phaeochromocytomák
PGL2	11-es kromoszóma (11q13)	paragangliomák
PGL3	1-es kromoszóma (1q21-23) mutációk dehydrogenase subunit C (*SDHC*)	paragangliomák
PGL4	1-es kromoszóma (1p36) mutációk succinate dehydrogenase subunit B (*SDHB*)	fej és nyak paragangliomák phaeochromocytomák
PGL5	2-es kromoszóma (TMEM127)*	phaeochromocytomák fej és nyak

*: 990 sporadikus pheo/PGL beteg közöl 20 esetben TMEM127 mutáció
Li et al. *JAMA. 2010;304(23):2611-2619*

SDH gének mutáció-analízisének indikációja

Phaeochromocytóma esetén:

Prioritási sorrend

- *vhl* mutációszűrés: szekvenálás negatív, deléció negatív
- RET mutáció szűrés, 10-es és 11-es exonok, negatív
- SDHB gén: hasi PGL esetében is ez az első választás (szekvenálás, deléció)
- SDHD gén vizsgálata (szekvenálás, deléció)
- TMEM127??

Fej/nyak paragangliómák esetében:

Prioritási sorrend

- SDHD
- SDHC
- TMEM127??
- SDHB
- vhl

Genetikai vizsgálatok Pheo/PGL-ban

- “gold standard” módszer
  - PCR amplifikációt követően az érintett gének kódoló részeinek Sanger szekvenálása
  - Nagy deléciók kimutatása multiplex ligációs próba amplifikációval (MLPA)
  - The Endocrine Society guideline alapján a klinikai kép alapján történő diagnosztikai algoritmus használata javasolt, gének priorizálása és a mutáció szűrést a betegellátás keretén belül javasolt elvégezni

J Clin Endocrinol Metab, June 2014, 99(6):1915–1942

Esetismertetés

- Életkor: 33 éves, férfi
- Tünetek: magasvérnyomás, emelkedett szívfrekvencia, izzadás
- Családi anamnézis: pozitív, kardiovaszkuláris eltérésre (apa pacemakert kapott 35 éves korában)
- Laboratórium: kivizsgálás során egy alkalommal emelkedett katekolamin-metabolit ürítés
- Képalkotó: CT és MR negatív (Magyarországon)
    - Pozitív PET scan (Németországban): aorta bifurkáció mellett 4 cm-es neuroendokrin daganat, paraganglioma
- További kivizsgálás: molekuláris laboratóriumi diagnosztika

Lehet-e familiáris tumorszindróma? Milyen géneltérések jönnek szóba:

Phaeochromocytóma/paraganglióma:

MEN2A- *RET* protonkogén vizsgálat

:

Érvek mellette: fiatal életkor, katekolamin szekretáló daganat
ellene: nincs medulláris pajzsmirigy cc, (calcitonin normális), nincs hyperparathyresis

DE

Indokolt vizsgálatok

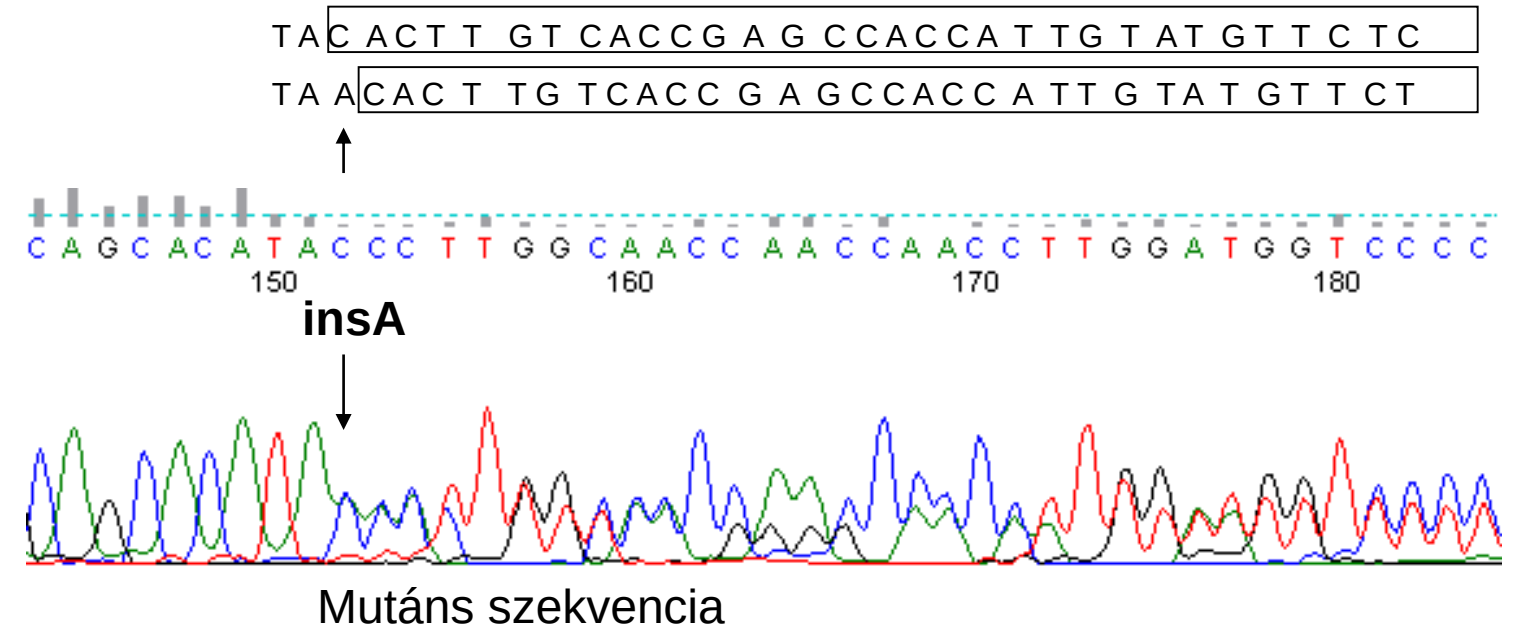
VHL: *vhl* géneltérés
Érvek mellette: fiatal életkor, katekolamin szekretáló daganat
ellene: nincs, mivel a VHL2C típusban csak Phaeo igazolható

Öröklődő phaeochromocytóma/paraganglióma szindróma: ***SDHB, SDHD****:*
Érvek mellette: fiatal életkor, katekolamin szekretáló daganat

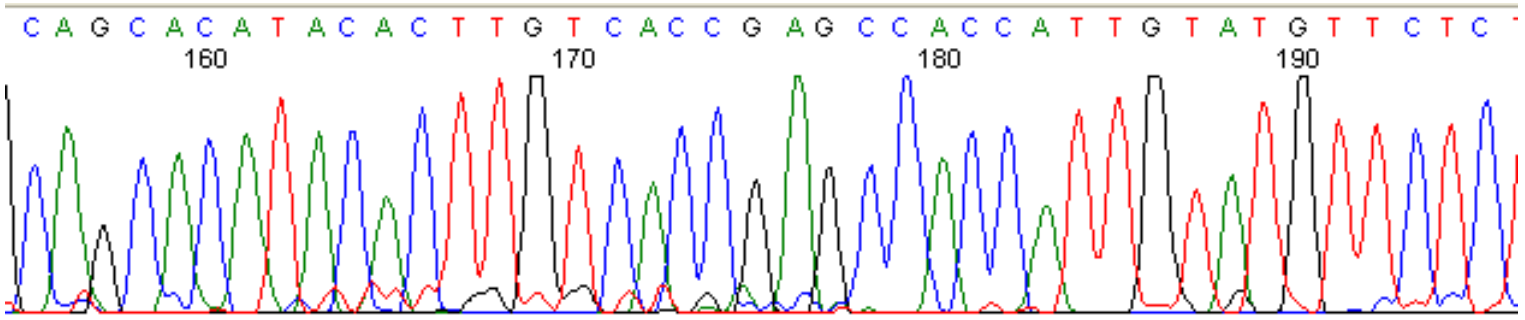
Paraganglióma: extraadrenális phaeochromocytoma, nyaki és intracranialis lokalizációjú is lehet. Vizsgálandó: *SDHB, SDHD* gének intrabdominális és az *SDHC* gén fej-nyaki PGL esetén.

Végső diagnózis: Öröklődő phaeochromocytóma/paraganglióma szindróma-*SDHD* mutáció

Kereteltolást okozó (c.147-148 insA) *SDHD* mutáció



Mutáns szekvencia



Normális szekvencia

Lendvai N, ….és Patócs A.: Orv Hetil. 2009 Apr 5;150(14):645-9.

Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika
1088 Budapest Szentkirályi u. 46.
Endokrinológiai Genetika
Osztályvezetõ: Rácz Károly Prof.
Tel.:

L E L E T

KBA.....: 00001796293
Beteg neve.....
Születési dátu
Anyja neve....
Lakcím.....
Vizsgálatkérõ
Rendelés ideje ...: 2010.09.13 11:05

Vizsgálatok

Kód	Megnevezés	Menny.	Pont
28920	Polimeráz láncreakció (PCR) egy mintában prim	12	21360
2893A	Bidirekcionális DNS szekvenálás, humán mutáci	12	261408
28946	Agarose-gel elektrophoresis	2	1766
29950	DNS kivonása biológiai mintából	1	3925
Összesen			288459

Eredmény:

A beteg vérébõl DNS izolálást követõen az öröklõdõ phaeochromocytóma/paraganglióma szindrómáért felellõ SDHB és SDHD gének exonjait PCR-el történő felsokszorozása után bidirekcionális szekvenálással elemeztük A vizsgálat során **az *SDHB* génben a TGT253TAT (Cys253Tyr) mutációt azonosítottuk.**

Vélemény: Az azonosított eltérés ismert, betegség-okozó *SDHB* génmutáció. A betegben recidiváló paragangliómák irányába szűrővizsgálatok végzése javasoltak. A kórkép autoszomális domináns módon öröklődik, az egyenes ági rokonok genetikai szűrővizsgálata indokolt.

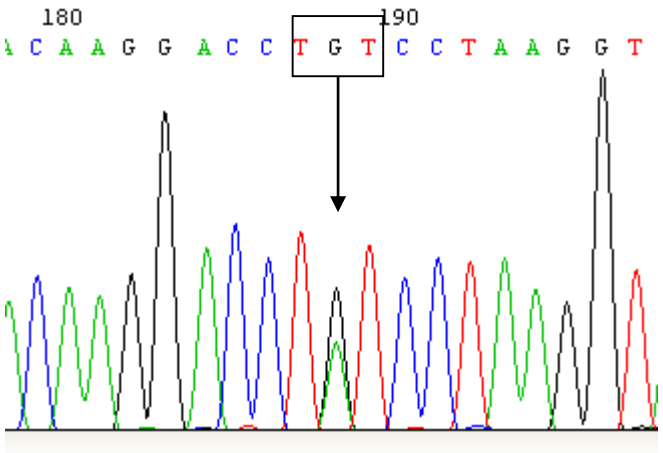
A vizsgálatokat validálta: Dr. Patócs Attila
Tudományos munkatárs
Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika
Endokrinológiai Genetika Laboratórium
Molekuláris genetika diagnosztikai szakorvos
Tel. 2660926/5577
e-mail: patatt@bel2.sote.hu

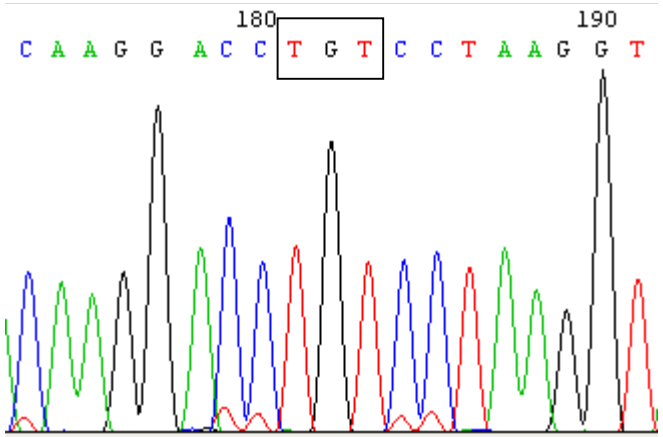
Postázva a beküldő orvosnak.

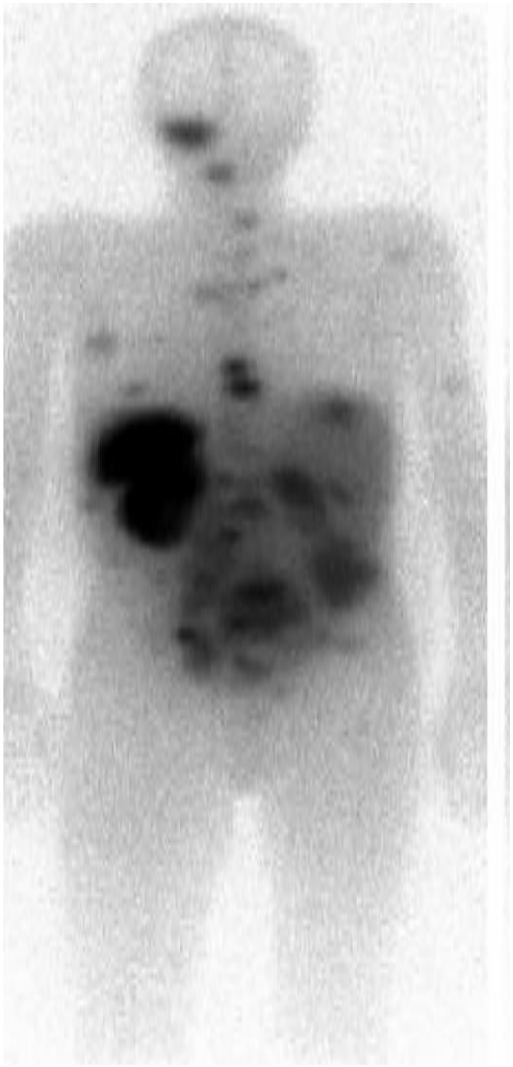
Budapest, 2010. szeptember 23.

Malignus paragangliómát okozó *SDHB* mutáció

TGT253TAT
(Cys253Tyr)







von Hippel-Lindau szindróma

Génhiba:

VHL gén (3p25-26) mutáció

vagy deléció vagy génátrendeződés

Társuló daganatok:

retina angiomák, cerebelláris és spinalis haemangioblastomák, veserák, pancreas-, vese-, epididys- és endolymphaticus cysták és tumorok, polycythaemia

Osztályozás:

1.típus: nincs phaeochromocytoma

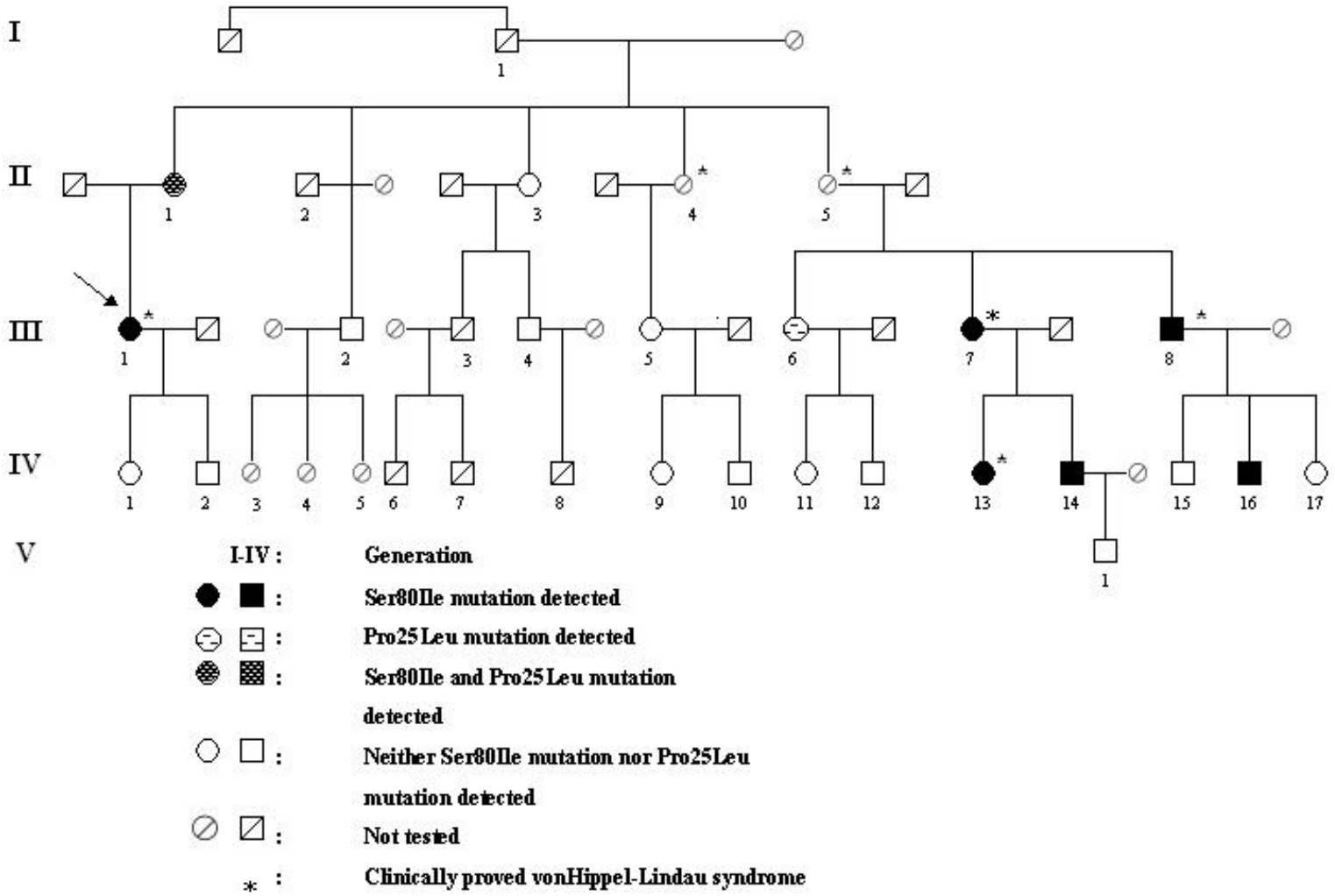
2.típus: phaeochromocytoma kockázat

2A: vese carcinoma kis kockázat

2B: vese carcinoma nagy kockázat

2C: csak phaeochromocytoma

A legnagyobb magyarországi VHL szindrómában szenvedő család



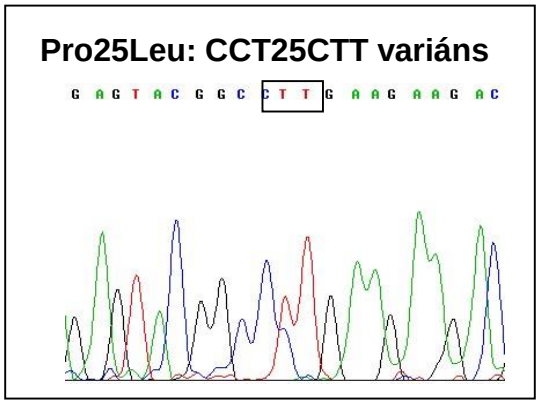
Patocs et al. BMC Medical Genetics 2008, **9**:29 doi:10.1186/1471-2350-9-29

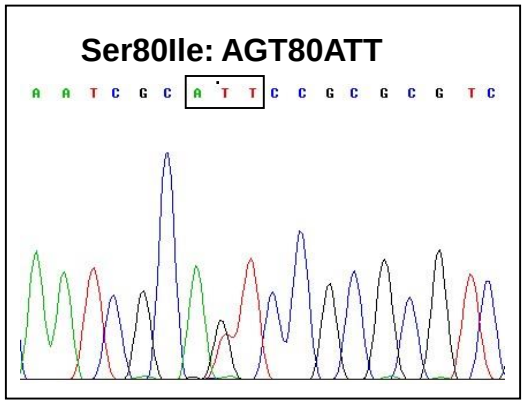
VHL gént érintő, aminosavcserével járó mutáció

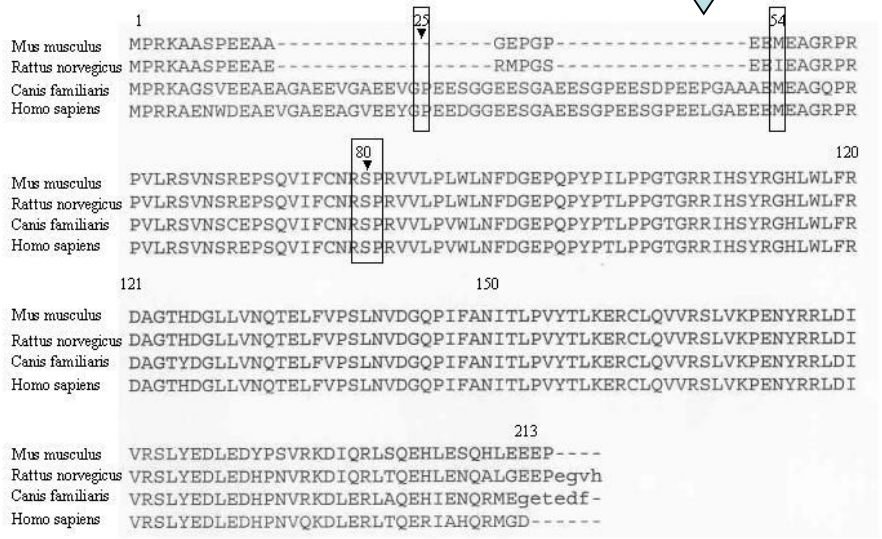
Patogén mutáció vagy ártalmatlan variáns?

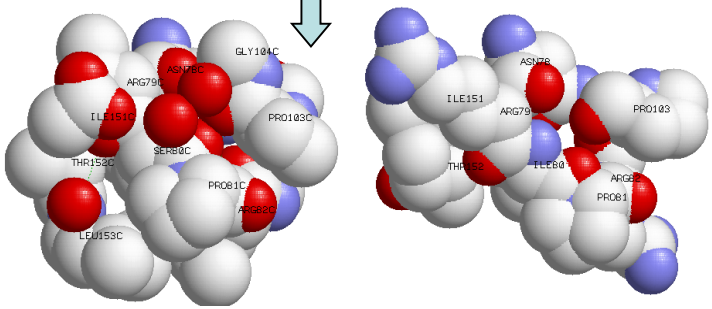
Patogén ha:

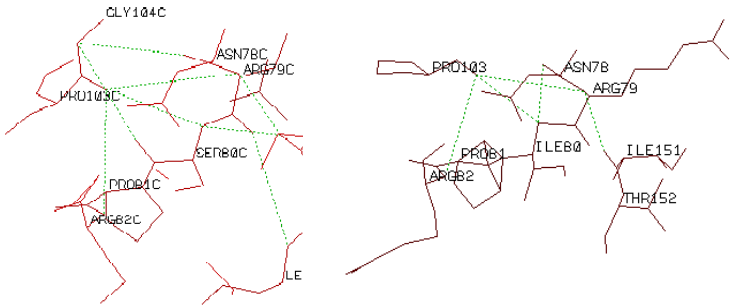
- szegregálódik a betegséggel
- hiányzik az átlagpopulációból
- funkcióvesztést okoz











Patocs et al. BMC Medical Genetics 2008, **9**:29 doi:10.1186/1471-2350-9-29

Von Hippel-Lindau szindróma esetén javasolt szűrőprogram

Vizsgálat	Javasolt életkor
Ophtalmoscopia	újszülöttkortól, évente
Fluoreszcens angiographia	csak indokolt esetben
Fizikális vizsgálat	2 éves kortól, évente
Vizelet/vér catecholamin	2 éves kortól, évente
Hasi ultrahang	11 éves kortól, évente
Hasi CT	20 éves kortól, 1-2 évente
Hasi MRI (MIBG)	csak indokolt esetben
Kisagyi gadoliniumos MRI	11 éves kortól, két évente
Hallásvizsgálat	tinnitus és vertigo esetén

NGS alapú technológiák szerepe a Pheo/PGL szindrómák genetikai diagnosztikájában

Cél: a validált diagnosztikai teszt szükséges

- 15 gén egyidejű vizsgálata

(RET, VHL, SDHA, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, NF1, MAX, TMEM127, FH, MDH2, KIF1B, PHD2, EPAS)

- A Sanger szekvenálás költséges és nagy munkaidő ráfordítással jár (a genetikai központokban a *RET, VHL, SDHB* és *SDHD* gének költsége kb 2700 USD- nálunk kb 400 e FT)

NGS-alapú módszerek

Célzott szekvenálás

Exom szekvenálás

NGS alapú technológiák alkalmazása a Pheo/PGL gének vizsgálata során

- **Amplikon szekvenálás:** GS Junior NGS sequencer (**9 gén**) (454 Life Sciences, a Roche Company, Branford, Connecticut) (Rattenberry et al. JCEM 2013) – pyroszekvenálás alapú technológia

- **Amplikon szekvenálás (14 gén**) Illumina MiSeq platform (Welander et al. 2014)

- **Truseq alapú amplikon szekvenálás** (Illumina MiSeq) (Crona et al. Plos One 2015)

NGS használata a klinikai diagnosztikai alkalmazásokban

Előnyök:

70%-os költség megtakarítás és 66%-os többlet érhető el a Sanger szekvenáláshoz viszonyítva (Rattenberry E, et al. J Clin Endocrinol Metab. 2013; 10:10.)

Hátrányok:

Könyvtárkészítés

Bioinformatika

- a bázisolvasás és illesztéshez használt algortimusok hasonlóak a különböző platformok között (Gargis AS,et al. Nat Biotechnol. 2012; 30(11):1033–6. PMID: 23138292

- a diagnosztikai alkalmazáshoz klinikai validáció szükséges

Current guidelines for the diagnostic use of next generation sequencing state that the **validity of the selected bioinformatic software needs to be ensured by the local investigator**

Truseq Illumina platformon készített célzott reszekvenálás (svéd tanulmány)

Library prep: Truseq custom amplicon enrichment

Sequencing: Illumina MiSEQ

Bioinformatics: 3 different algorithms

1: MiSEQ Reporter, fully automatized and integrated software,
2: CLC Genomics Workbench, graphical interface based software, also commercially available
3: an in-house scripted custom bioinformatic tool

Crona et al. Bioinformatic Challenges in Clinical Diagnostic Application of Targeted Next Generation Sequencing: Experience from Pheochromocytoma PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0133210 July 31, 2015

Célzott reszekvenálási panelek diagnosztikai teljesítménye

Analitikai szenzitivitás

- 98.7% (1 a 77 unique variánsból nem került felismerésre Roche GS Junior (Rattenberry et al)

- 82.9-100% (bioinformatika függvénye)- Illumina Miseq platform

Specificitás

- Roche GS Junior-

  False pozitívitás homopolymer miatt (a 164 unique variánsból 46 volt homopolymer artefakt)
  Két szűrés beiktatásával csökkenthető :
  (1) csak a kódoló régió és ± 5 bp (vizsgálata csak 4 műterméket adott
  (2) ha csak azokat az olvasatokat használjuk, ami 2SD-n belül található az adott variánshoz tartozó értékekhez a fals pozitivitás megszűnt

- Illumina MiSeq

  >99.9 %

Célzott reszekvenálási panelek diagnosztikai teljesítménye

Bioinformatikai algoritmusok

	Mapped reads to HG19 reference, mean % (range)	Mapped reads to targeted regions, mean % (range)	Read coverage, mean (Range)	% X-fold coverage at targeted regions		
				1X, mean (range)	10X, mean (range)	30X, mean (range)
MiSEQ Reporter 2.1.43						
Run01	89.4 (82–92.2)	54 (48.3–64.1)	414 (284–565)	98.1 (97.6–98.4)	97.6 (97.4–98)	95.9 (94.6–96.9)
Run02	86.3 (82.1–88.5)	51.7 (46.6–61.4)	407 (283–571)	98.2 (97.9–98.5)	97.6 (97.3–98.3)	96.2 (94.6–97.3)
CLC Genomics Workbench 5.51						
Run01	86.9 (82.6–92)	56.9 (50.5–67.2)	552 (377–738)	98.4 (98–98.7)	97.9 (97.7–98.4)	97,6 (97,3–97,7)
Run02	84.1 (80–89.1)	55.1 (49.3–64.7)	526 (357–735)	98.5 (98–98.7)	97.8 (97.6–98.7)	97,6 (97,2–98)
In-house custom pipeline						
Run01	89.6 (82–92.2)	58 (51.5–68)	519 (357–699)	98.4 (98–98.7)	98 (97.9–98.3)	97 (96.2–97.6)
Run02	89.4 (82.3–92.4)	56.9 (50.4–66.1)	517 (355–711)	98.5 (98.2–98.7)	98.1 (97.8–98.5)	97.3 (96.3–98)

Results from read mapping. Data presented from three bioinformatics workflows; MiSEQ Reporter 2.1.43 (Smith Waterman algorithm mapper), CLC Genomics Workbench 5.51 (default CLC mapper) and in-house custom pipeline (Burrows Wheeler Alignment tool).

Célzott reszekvenálási panelek diagnosztikai teljesítménye

	True pos, *n*	True neg, *n*	False pos, *n*	False neg, *n*	Sensitivity, %	Specificity, %
MiSEQ Reporter 2.1.43						
Run01	47	119197	99	0	100	>99.99
Run02	47	119195	101	0	100	>99.99
Filtered, merged Runs 01+02	47	119190	94	0	100	>99.99
CLC Genomics Workbench 5.51						
Run01	39	119296	0	8	82.9	100
Run02	40	119296	0	7	85.1	100
Filtered, merged Runs 01+02	36	119296	0	11	76.7	100
In-house Custom pipeline						
Run01	42	119284	7	5	89.4	>99.99
Run02	43	119288	4	4	91.4	>99.99
Filtered, merged Runs 01+02	42	119285	4	7	87.2	>99.99

Sensitivity of targeted next generation sequencing compared to current golden standard (automated Sanger sequencing) covering 5683 basepairs. Results are presented separately for both sequencing runs as well. Filtered and merged results incudes only variants available in both sequencing runs. Pos; positive, neg; negative.

Csak a MiSEQ reporter identifikálta az összes patogén variánst minden mintában

Exom szekvenálás szerepe a Pheo/PGL betegek genetikai vizsgálatában

- **Exom szekvenálással sikeresen fedeztek fel új géneket**
  - MAX (Comino-Méndez I et al. 2011)
  - MDH2 (Cascon et al. 2015)
  - ATRX –somatic (Fishbein et al. 2015)

  It was successfully tested in genetic testing of s**hort-rib thoracic dystrophies (McInerney-Leo AM** et al. 2013)

  NINCS olyan klinikai tanulmány, ami szisztematikusan elemezte volna a WES teljesítőképességét a Pheo/PGL vizsgálatában

Milyen platformon végezzem az WES vagy WGS méréseimet?

Miért az **Illumina és a Complete Genomics** (CG) platform?

- az eddig elérhető human genom szekvenálási adatok közül > 90% ezekkel a technológiákkal került meghatározásra

(**Roach JC, et al**. Analysis of genetic inheritance in a family quartet by whole genome sequencing. **Science**. 2010; 328:636–639.
Snyder M, Du J, Gerstein M. Personal genome sequencing: current approaches and challenges. **Genes Dev**. 2010; 24:423–431.
Rios J, Stein E, Shendure J, Hobbs HH, Cohen JC. Identification by whole-genome resequencing of gene defect responsible for severe hypercholesterolemia. **Hum. Mol. Genet**. 2010; 19:4313–4318.
Lee W, et al. The mutation spectrum revealed by paired genome sequences from a lung cancer patient. **Nature.** 2010; 465:473–477.
The 1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population-scale sequencing. **Nature**. 2010; 467:1061–1073.)

Platform összehasonlítás

Lam,és mtsai: Performance comparison of whole-genome sequencing platforms Nat Biotechnol. 2012 Jan; 30(1): 78–82.

Lefedettség

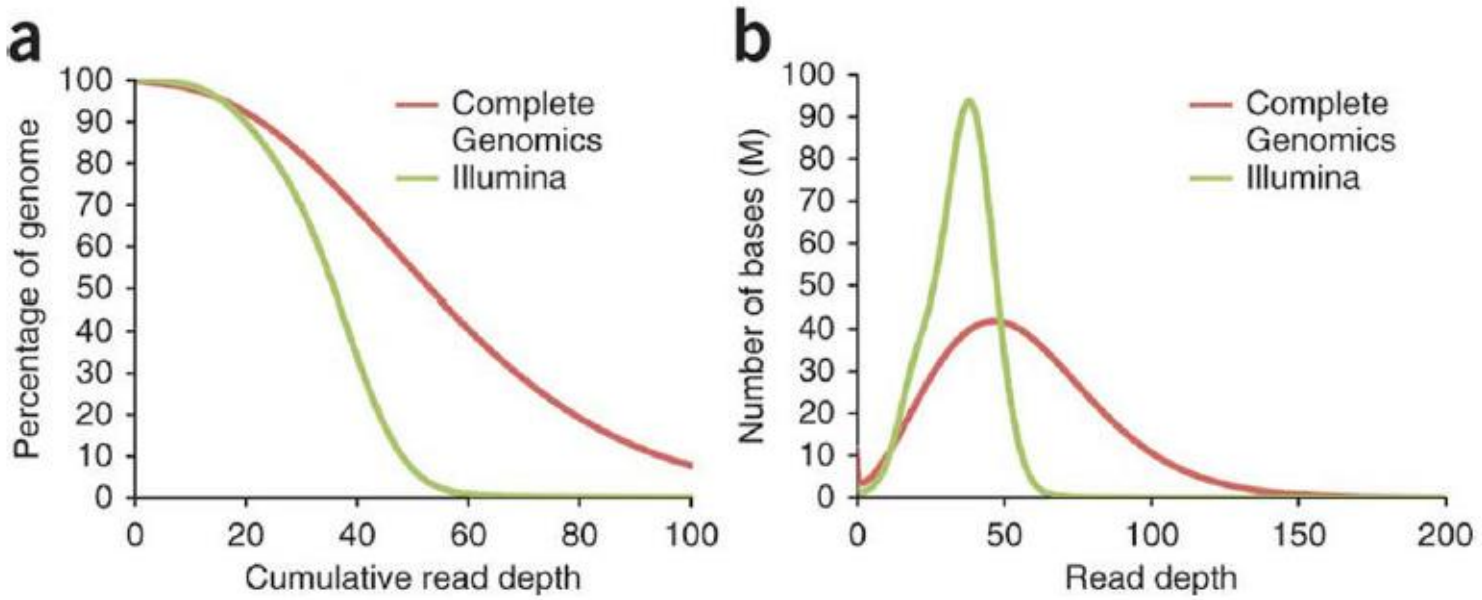


Figure 1. Genome coverage at different read depths
(a) Percentage of genome covered by different read depths in different platforms. (b) Histogram of genome coverage at different read depths.

Platform összehasonlítás

88,1%-ban azonos readek, Sanger szekv 100%-ban validálhatóak

DE platform –specifikus SNV-ek is felismerésre kerültek, Illumina 10%, CG 3 %

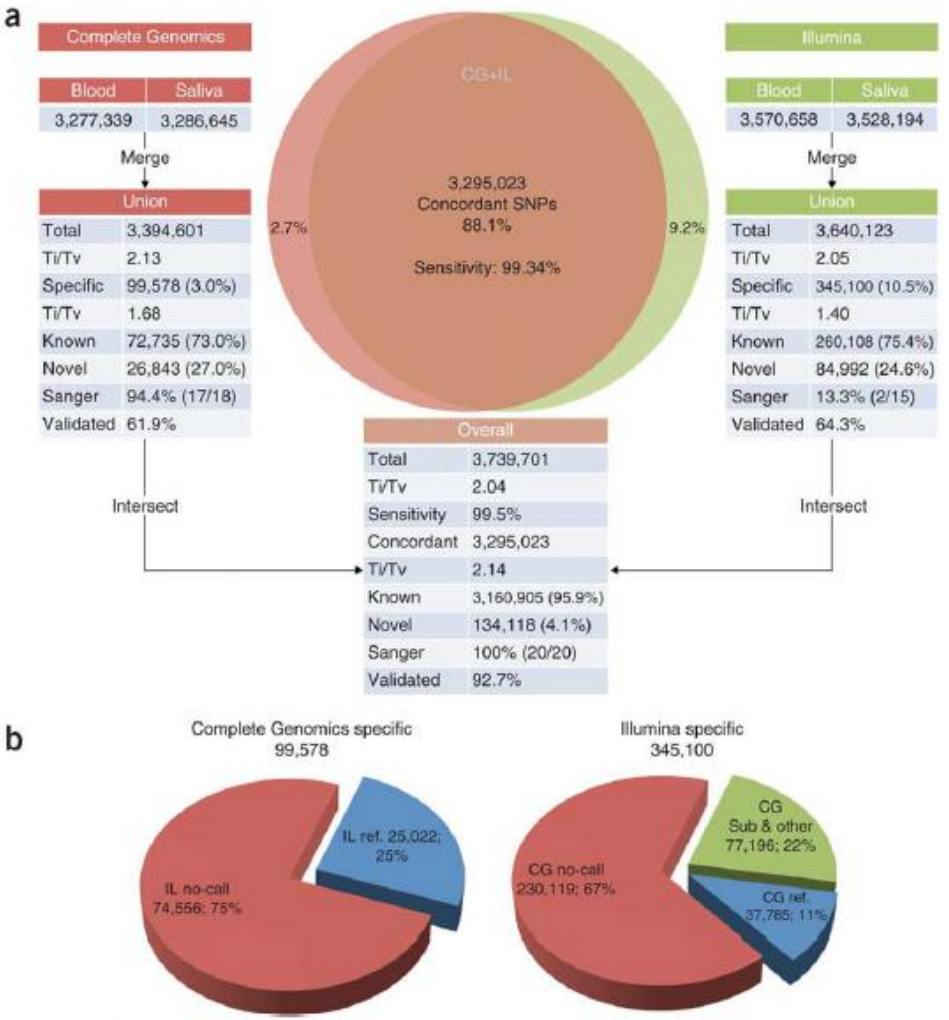


Figure 2. SNV detection and intersection
(a) SNVs detected from the PBMC and saliva samples in each platform were combined. The unions of SNVs in each platform were then intersected. Sensitivity was measured against the Illumina Omni array. Ti/Tv is the transition-to-transversion ratio. The known and novel counts were based on dbSNP. 'Sanger' and 'validated' represent validation by Sanger sequencing and Illumina sequencing (with Agilent target enrichment capture), respectively. (b) Comparing platform-specific SNVs to non-SNV calls in another platform. IL, Illumina; CG, Complete Genomics.

Nat Biotechnol. 2012 Jan; 30(1): 78–82

Platform összehasonlítás

Whole-genome sequencing using CG and Illumina platforms

	CG		Illumina						
Sample	Bases (Gb)	Coverage (×)	Bases (Gb)	Coverage (×)	Reads	Mapped		After duplicate removal	
Blood	233.2	78	151.4	50	1,499,021,500	1,367,988,241	91%	1,233,937,084	82%
Saliva	218.6	73	307.1	102	3,040,306,840	2,614,663,882	86%	2,354,594,740	77%
Total	451.8	151	458.5	153	4,539,328,340	3,982,652,123	88%	3,588,531,824	79%

Agilent SureSelect target enrichment capture with Illumina sequencing

	CG specific		Illumina specific		Concordant	
Total	99,578	—	345,100	—	3,295,023	—
Targeted	3,015	3.0%	33,084	9.6%	24,247	0.7%
Not validated	388	12.9%	7,088	21.4%	3,053	12.6%
Invalidated	1,001	33.2%	9,280	28.0%	1,543	6.4%
Validated	1,626	53.9%	16,716	50.5%	19,651	81.0%
Validation rate	—	61.9%	—	64.3%	—	92.7%

Nat Biotechnol. 2012 Jan; 30(1): 78–82

Platform összehasonlítás: összefoglalás

„Combining the pros of different sequencing systems probably is the most effective and economic way of deciphering mutations in human disease."
Stephan Wolf, a German Cancer Research Center Heidelberg vezetője

"We haven't picked one [technology] because we did find that both of them look quite good**" Michael Clark Stanford Human Genetics laboratory**

Wall et al. 2014 Genome Research 24:1734–1739**: CG versus Illumina**

Átlagos hibaráta: 0.1% - 0.6%,

- CG platformnál magasabb
- ugyancsak magasabb (> 6%) a ritka vagy unique variánsok esetében
- a jó minőségű readek esetében kisebb, de lineáris az öszefüggés
- Illumina esetében a lefedettséggel arányosan nő a hibaszázalék

Nat Biotechnol. 2012 Jan; 30(1): 78–82

Exom szekvenálás versus Sanger szekvenálás hazai SDHx mutációt hordozó betegekben

Patient ID	Result of Sanger sequencing, target for exome seqeuncing	NGS platform used	Exome sequencing		
			Mutation confirmed	Category	Read number (ratio and read number between alleles
1A	SDHB: C196Gly	Illumina	**Yes**	Moderate	51 (0,53: 27/24)
1 B (mother of 1.A)	SDHB: Cys196Gly	Illumina	**Yes**	Moderate	60 (0,55: 27/33)
1C (Father of 1.A)	SDHB wild type	Illumina	**No alteration in SDHx genes**		
2.	SDHB: Arg217Cys	Complete Genomics	**Yes**	Moderate	46 (0,52: 22/24)
3.	SDHB: Cys253Tyr	Complete Genomics	**Yes**	Moderate	40 (0,45: 22/18)
4.	SDHB: Cys243Tyr	Complete Genomics	**Yes**	Moderate	37 (0,37: 24/14)
5.	SDHB: c286+1G/A	Complete Genomics	**Yes**	High	24 (0,45: 13/11)
6.	SDHB: Gly203Stop*	Complete Genomics	**Yes**	STOP	24 (0,41: 14/10)
7.	SDHC: ivs+1G/T	Complete Genomics	**Yes**	High	40 (0,57: 17/23)
8.	SDHD: le49_His50fs/ c.147_148insA	Complete Genomics	**Yes**	High	30 (0,43: 13/17)
9.	SDHD: His50Arg	Complete Genomics	**Yes**	Moderate	25 (0.56: 14/11)

Mindkét platformon végzett szekvenálással sikerült beazonosítani az ismert mutációt

Exom szekvenálás versus Sanger szekvenálás.

Milyen egyéb eltérések kerültek felismerésre?

	Variant ID	Read numbers of mutant / wild type /total alleles	Sanger sequencing confirmed	Functional prediction	Minor allele frequency
EGLN1	ENST00000366641:p.X187X 231557073 insC	9/41/50	**Not confirmed false positive**	Probably deleterious	No data
	ENST00000366641:p.X187X 231557073 insC	8/27/35	**Not confirmed false positive**	Probably deleterious	No data
	Rs12097901 was not detected	**False negative**	rs12097901 (Cys127Ser)	Neutral	0.26
KIF1B	***Rs229788:*** ENST00000377081:p.Tyr1133Cys	71/81/152	Yes	Probably deleterious	0.039-0.06
	rs77172218 ENST00000377081:p.Val1600Met	68/78/146	Yes	Neutral	0.004-0.01
	rs148690591 c.*2T>C 3'UTR NM_015074.3:c.*2T>C, XM_005263433.1:c.*2T>C	105/98/203	Yes	Unknown	0.0012
RET	***rs17158558*** ENST00000355710 p.Arg982Cys	22/21/43	Yes	Probably deleterious	0.022
	rs1799939 ENST00000355710:p.Gly691Ser	In 2 cases	Yes	Neutral	0.1-0.15
NF1	ENST00000358273:p.Asp896Val	In 2 cases	Not tested	Neutral	No data
	rs2525574 ENST00000444181:p.*639Arg	In six cases	Not tested	Probably deleterious	0.37-0.44

Két ritka, és feltehetően patogén variáns került beazonosításra az SDHB mutációt hordozókban

Fenotípus módosítók?

Fenotípus módosító variánsok tisztázása

Nincs adat az előfordulási gyakoriságokról

1. Mennyire ritka eltérések?

Variant	Allele frequency		P value
	Patients with Pheo/PGL	**Healthy Hungarian control individuals**	
KIF1B, rs229788, Tyr1133Cys	5/72 (3,4%) all in heterozygous form	6/94 (3,2%) all in heterozygous form	1
RET, rs17158558 Arg982Cys	3/72 (2%) all in heterozygous form	4/94 (2.1%(all in heterozygous form	1

Előfordulási gyakoriságuk megegyezik a beteg és egészségesek között_ nem patogén eltérések!

Összefoglalás

- A Phaeo/PGL diagnosztizálása egy összetett feladat, amelyben a speciális laboratóriumi vizsgálatoknak óriási szerepe van
- Ezen daganatok jelentős hányada örökletes genetikai tényezőkhöz társul
- Jóindulatú, mellékvesevelő dagantok sebészi eltávolításával teljes gyógyulás érhető el
- DE
- Malignus PGL-k esetén, főleg az SDHB mutációkhoz társult esetekben a mortalitás 50 %-os.

Összefoglalás

NGS alapú vizsgálatok hasznosak lehetnek a Pheo/PGL gének klinikai vizsgálatában

Exom szekvenálás platformtól függetlenül segíthet a betegség-okozó variánsok igazolásában

DE

könyvtárkészítés módja szignifikáns hatású

a > 10 read sikeresen konfirmálható Sanger szekvenálással

Fals pozitív eltérések kerülnek felismerésre, de szűrésekkel ezek száma csökkenthető

Fals negatív eltérések
SÚLYOS probléma. Újabb adatok alapján 15-20 % a patogén eltérések rejtve maradnak exom szekvenálás során: főleg GC gazdag és kópiaszám-változásos régiókban

Új variánsok kerülhetnek felismerésre, amelyek a fenotípus módosításért lehetnek felelősek

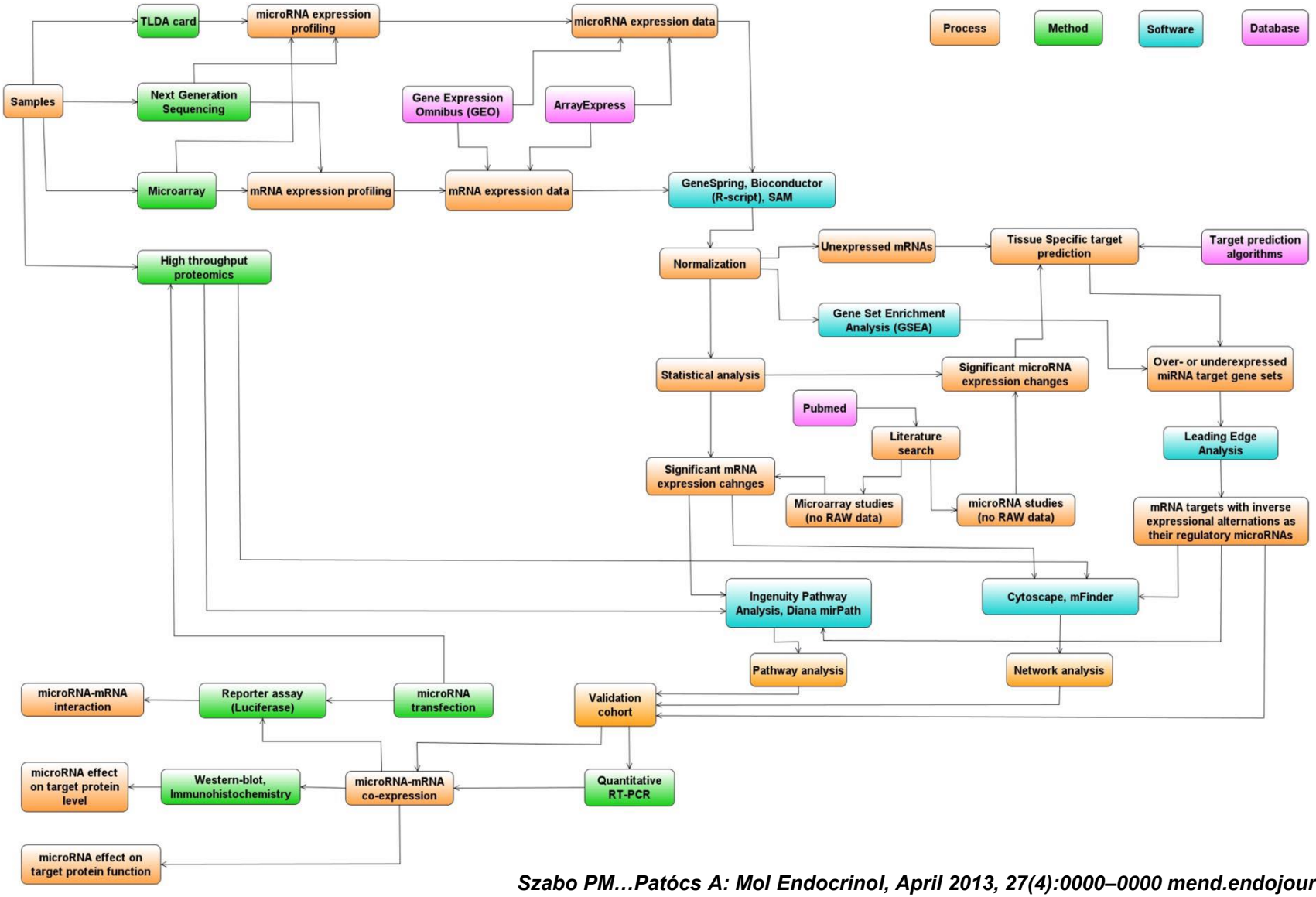
Az exom szevenálási adatok újra értékelésével új betegek kerülhetnek beazonosításra (új gén irányában történő lekérdezések)

Funkcionális genomika

A genetikai vizsgálatok „jövője!??” Nem, ez már a jelen !!!

Nem kapcsolási rajz!!!!!

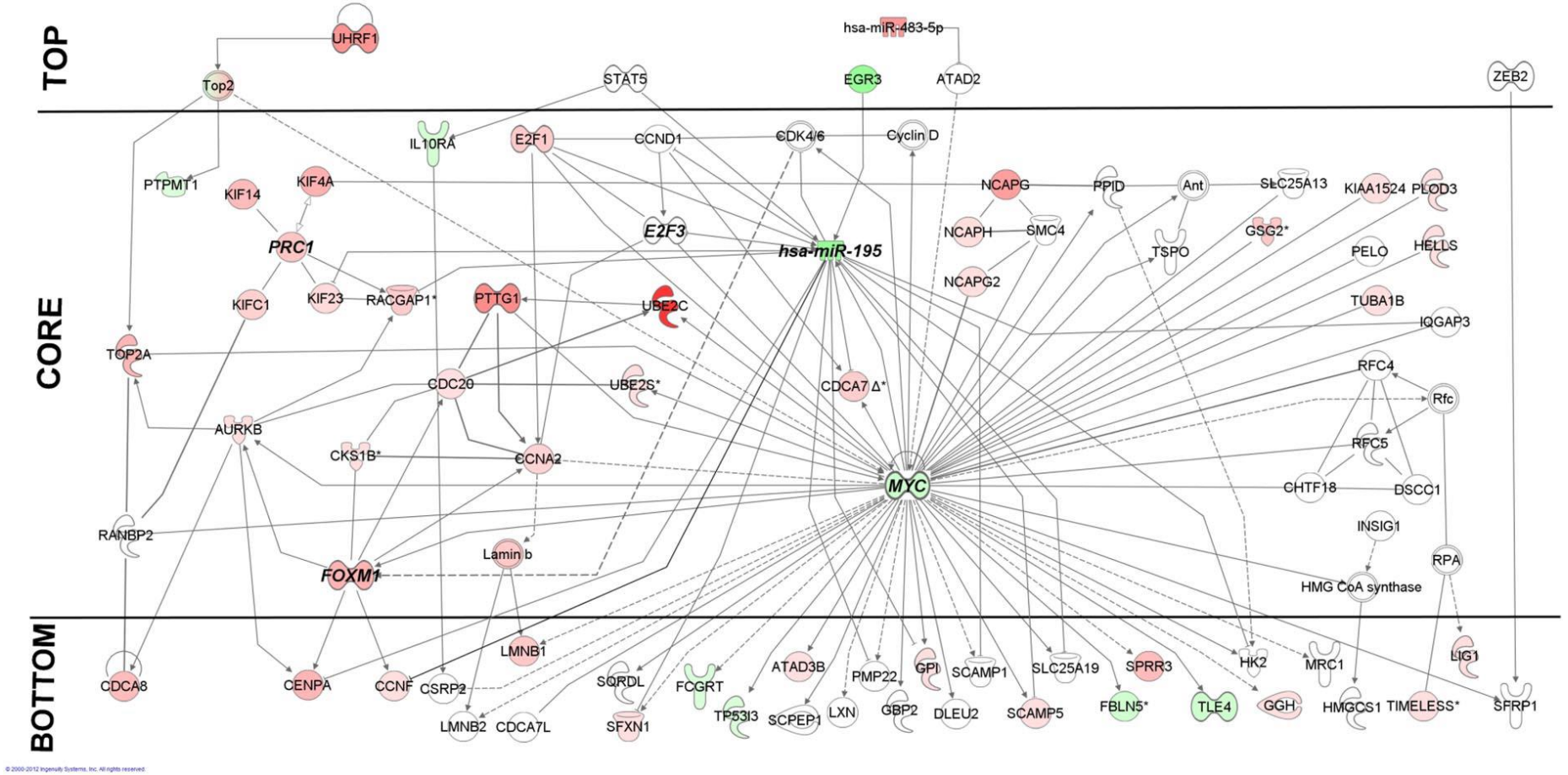
Integratív, rendszerbiológiai megközelítés



Szabo PM…Patócs A: Mol Endocrinol, April 2013, 27(4):0000–0000 mend.endojournals.org

Integratív, rendszerbiológiai megközelítés

Eredmény: network, interakciós hálózat



© 2000-2012 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Szabo PM…Patócs A: Mol Endocrinol, April 2013, 27(4):0000–0000 mend.endojournals.org

Matematikai összefüggés a betegség incidenciája és a heterozigótaság gyakorisága között

A **heterozigóta gyakoriság (H)** és a **betegség incidenciája (i)** közötti összefüggés

$i=H^2/4$. (homozigótaság valószínűsége 25%)

- **Pl1**. : cystás fibrosis esetében:

A heterozigóta gyakoriság 1/25,

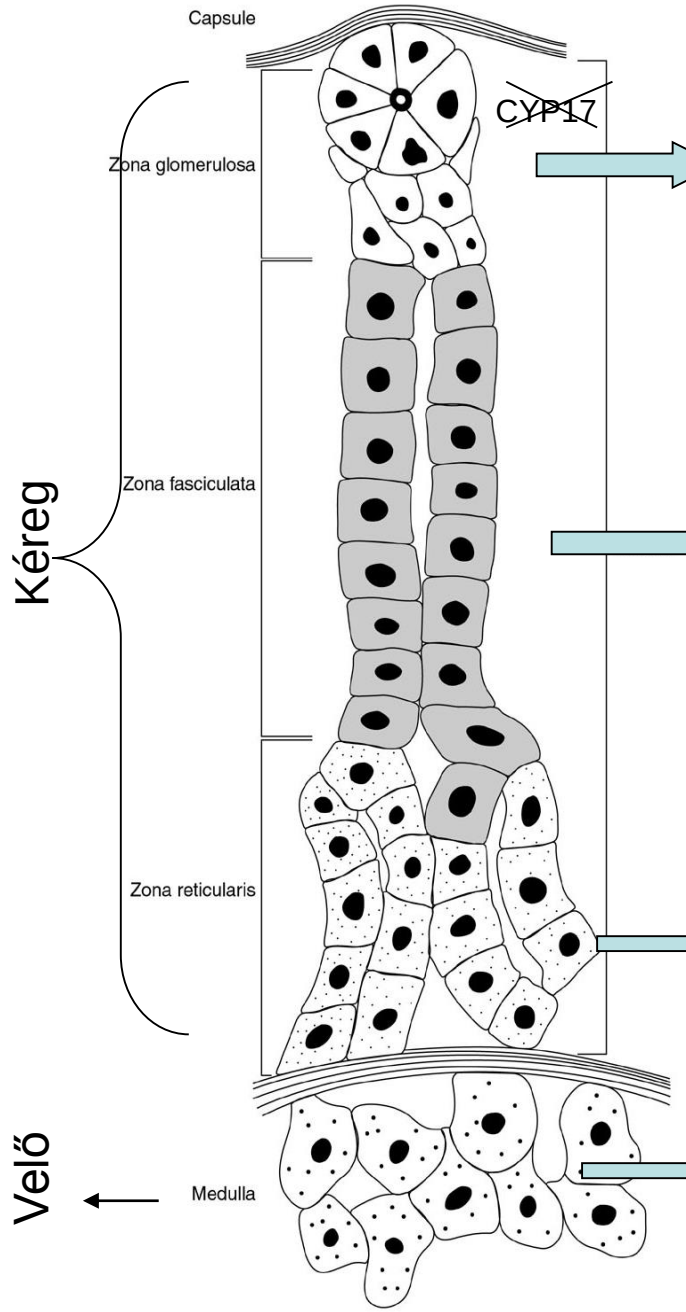
$H^2 = 1/25X1/25=1/625$, de mivel minden negyedik egyén lesz beteg ezért a

az **incidencia** pedig: i=1/625X1/4= **1/2500**.

Az **incidenciát ismerve** fordítva elvégezve a fenti számításokat **kiszámítható** a **heterozigóta gyakoriság**.

- **Pl2**. **CYP21B gén**

a 21-hydroxylase enzimdefektus klasszikus, súlyos formájának incidenciája kb. 1:14000 mutációinak **heterozigóta gyakorisága 1/60**.



A fő szekretált hormonok

Aldoszteron, kortizol nem

Kortizol

Androgének

Catecholaminok, CRH

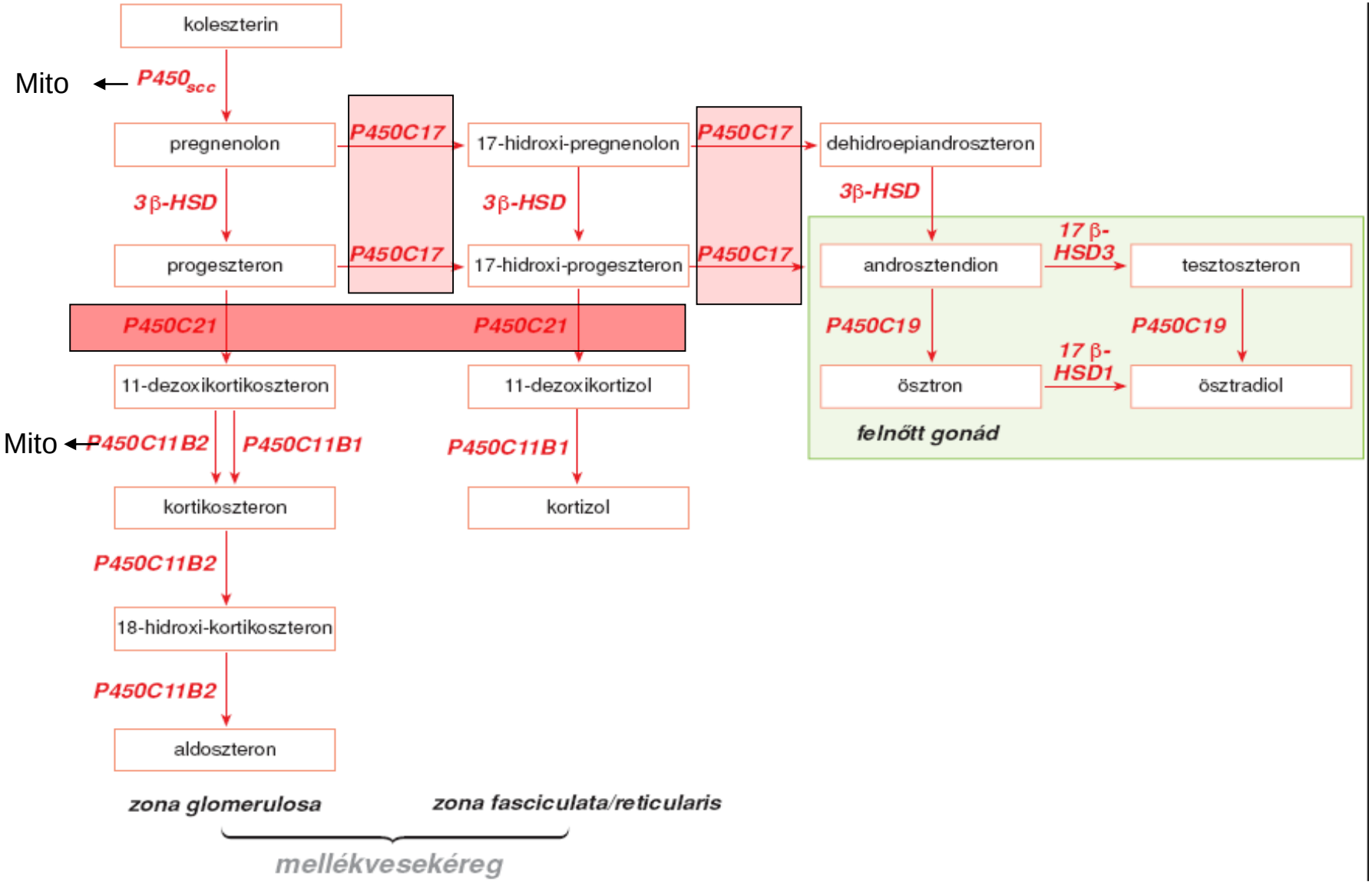
Enzimek

CYP17 nincs, de
CYP11B2 csak itt

nincs CYP11B2,
de CYP11B1 igen

DHEA-DHEAS
átalakulás csak itt

Szteroid bioszintézis, mellékvesekéregben de mind a mitokondrium mind pedig az mikroszoma-endoplazmatikus hálozat elektron-transzportja szükséges



A congenitalis adrenalis hyperplasia hátterében álló géndefektusok

Gén	**CYP21**	**CYP17**	**CYP11B1**	**StAR**	**CYP11B2**
Incidencia	1:14.000	ritka	1:100000	ritka	ritka
Laboratóriumi jellegzetességek					
Kálium	↑	↑	↓	↑	↑
Vérnyomás/Nátrium	↓	↓	↑	↓	↓
Glukokort.	↓	↓	↓	↓	normális
Mineralokort.	↓	↓	↑	↓	↓
Androgének	↑	↓	↑	↓	normális
Ambiguos genitaliák	nőkben	férfiakban nőkben a pubertás hiányzik	nőkben	férfiakban nőkben a pubertás hiányzik	-
Akut mellékvesekéreg elégtelenség	igen	nem	ritka	igen	sóvesztés

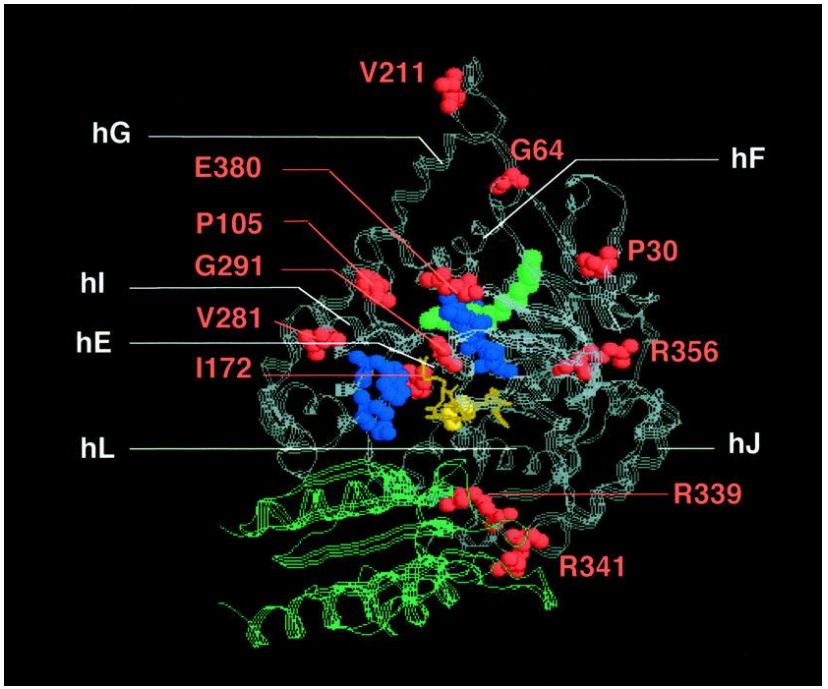
A 21-hydroxylase defektus különböző formái

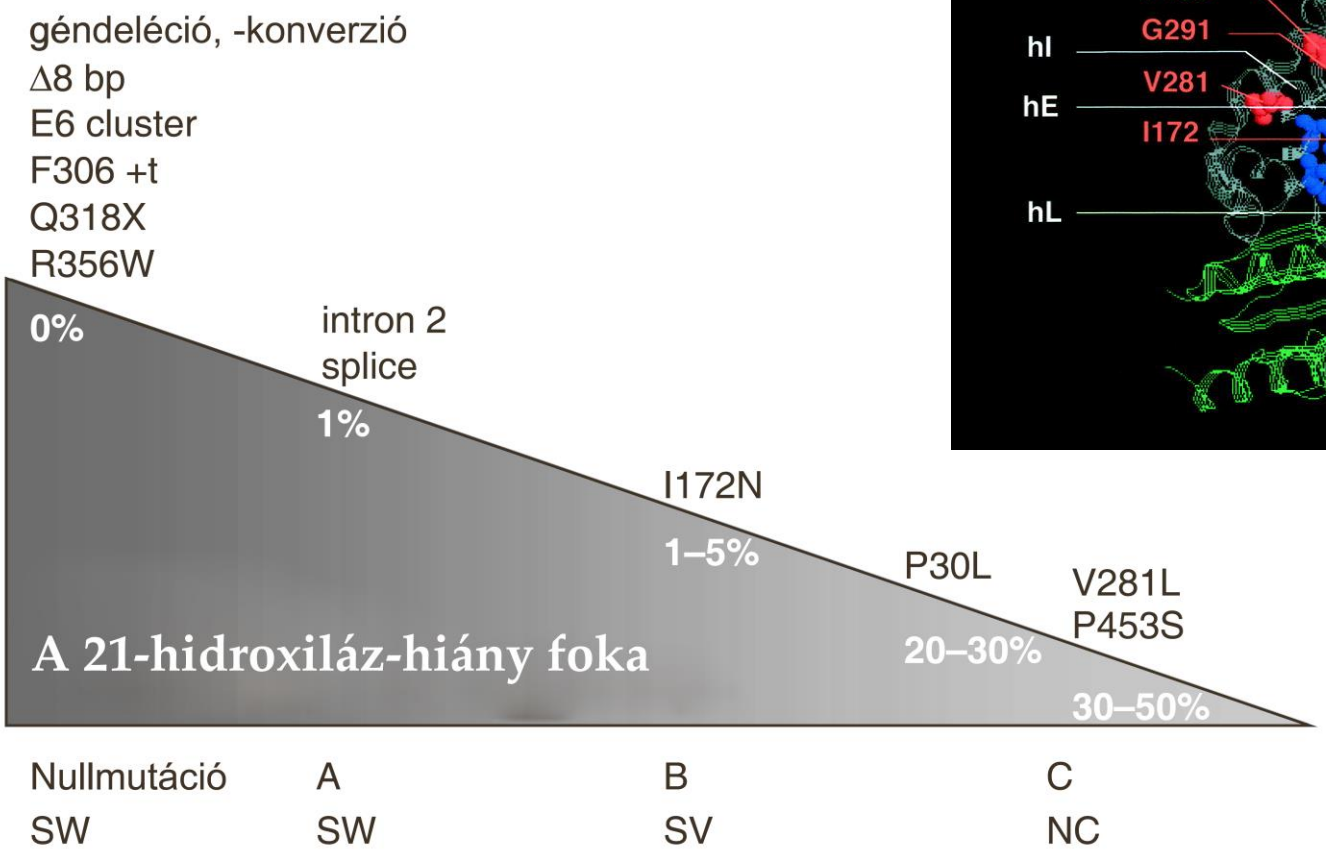
	Klasszikus sóvesztő	**Egyszerű virilizáló**	**Nem-klasszikus**
Életkor	újszülött	újszülött (lány) 2-4 éves (fiú)	gyerek/felnőtt
Genitália	fiú: normális lány: átmeneti	fiú: normális lány: átmeneti	fiú/férfi: normális lány/nő: virilizált
Incidencia	1:14000	1:60000	1:1000
Növekedés	-2-3SD	-1-2SD	normál
Hormonok			
Aldoszteron	csökkent	normál	normális
Kortizol	csökkent	csökkent	normális
17OHP	>1500 ug/l	800-1500 ug/l	150-800 ug/l* de ACTH stimuláció után lehet magas
Tesztoszt.	Emelkedett	emelkedett	változó, emelkedett
21-hydroxylase aktivitás	0%	1%	20-50 %
Tipikus CYP21A2 Mutációk	deléció, E6 cluster R356W, Gln318X	I172N, I2 splice	V281L P30L

Genetika: A *CYP21B* gén fontosabb patogén mutációinak hatása az enzimaktivitásra

Enzimaktivitás mérése:
mutáns klónok expressziója
sejtkultúrában

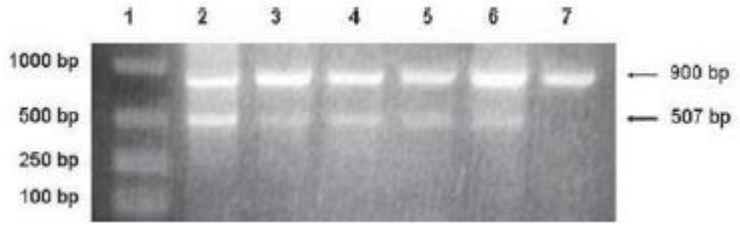
3D fehérje model





Cyp21A2 gén 6 leggyakoribb mutációja

6 bp. deléció



Allélspecifikus PCR – két heterozigóta mutáció



Az allélspecifikus csíkokat jelzi.

17alfa-hydroxylase, 17,20-liáz defektus klinikai jellemzői

-Kortizol és androgének elégtelen szintézise

-Aldoszteron szintézis normális vagy fokozott

Klinikai megjelenés és diagnózis:

-Hipertónia

-Általában a pubertás környékén a nemi jellegek kialakulásának elmaradása miatt:

-XX kariotípusban primér amenorrhea, nemi jellegek hiánya

-XY kariotípusban pseudohermaphroditizmus, női külső nemi jelleg

Laboratóriumi jelek:

Csökkent kortizol és androgének
Emelkedett LH, FSH
Emelkedett DOC

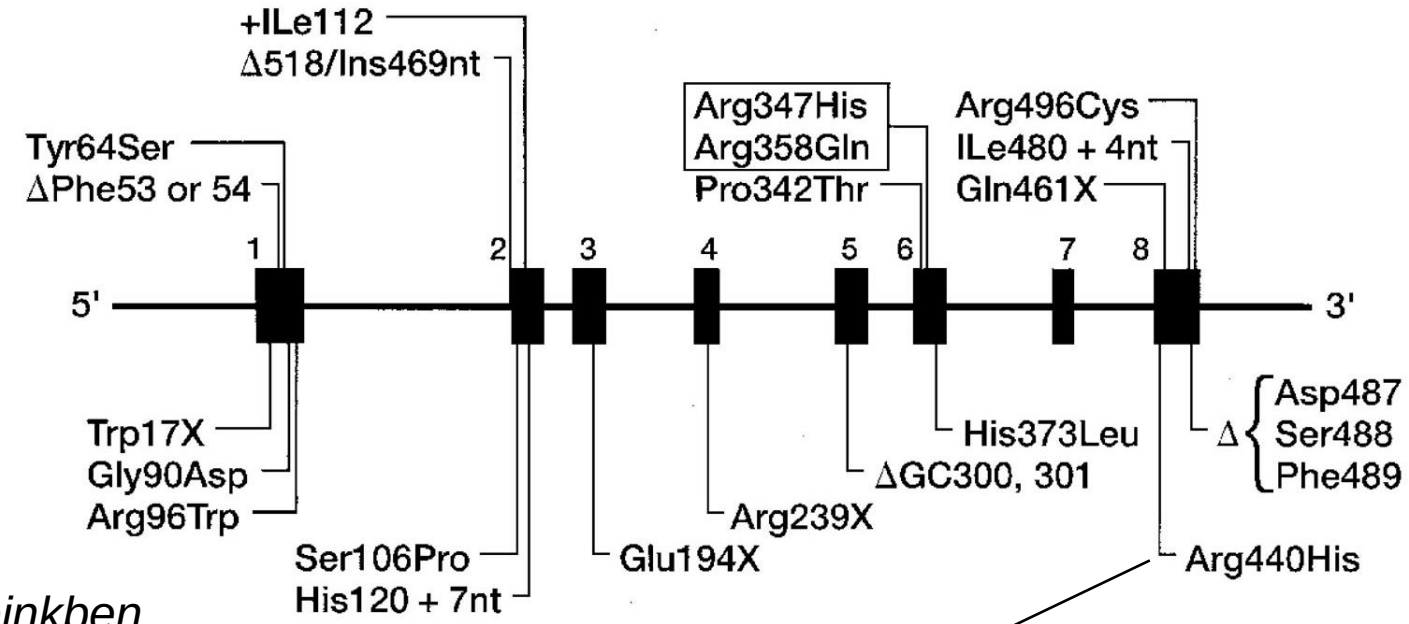
17alfa-hydroxylase,17,20-liáz defektusos betegek klinikai jellemzői

	1-es beteg	2-es beteg
Életkor (év)	37	31
Testsúly (kg)	81	56
Testmagasság (cm)	165	165
Vérnyomás (Hgmm)	220/140-150/90-140/80	160/90-120/70-130/80
Szérum kálium (mmol/l)	3,0-4,3	2,4-3,1-4,7-4,3
Mellékvese CT	Myelolipoma + mellékvese atrófia	Mellékvese hyperplasia
Gonád status	ovárium	Intraabdomi-nális herék
Karyotípus	46XX	46,XY

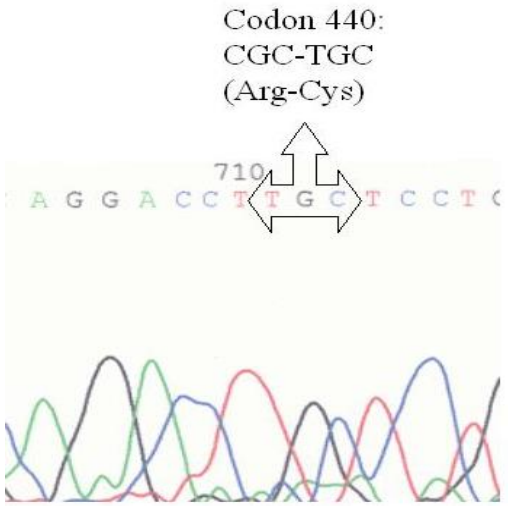
	1-es beteg	2-es beteg	Normál tartomány
ACTH (pg/ml)	**176**	**496**	**20-60**
Aldoszteron (ng/dl)	**4**	**1**	**6-12**
Kortizol (μg/dl)	**1**	**2**	**8-25**
Kortikoszteron (ng/dl)	**23700**	**23873**	**300-600**
Dehydroepiandroszteron (ng/dl)	**12**	**33**	**250-600**
LH mIU/ml	**33**	**67**	**< 10**
FSH mIU/ml	**79**	**113**	**< 10**

CYP17 gén legfontosabb patogén mutációi

Irodalmi adatok



Saját betegeinkben

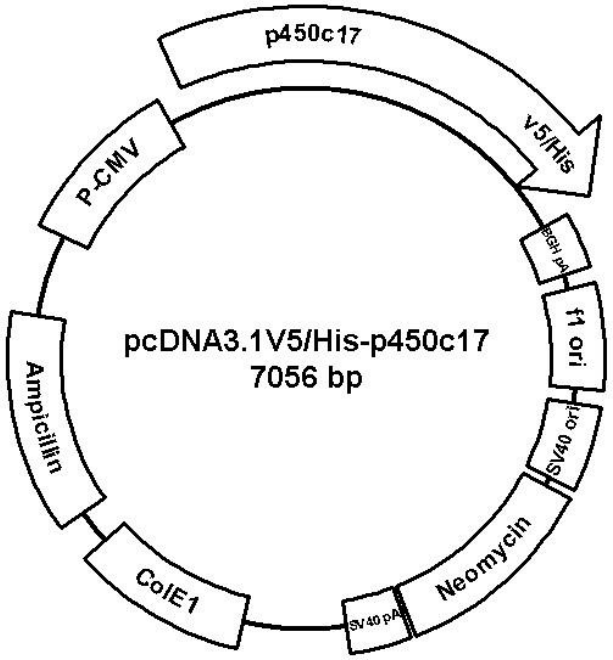


Ok-okozati kapcsolat igazolása, valóban betegség okozó-e a genetikai rendellenesség?

Kérdések:	**Vizsgálatok/válasz:**
Mutáció vagy polimorfizmus?	Mutáció szűrés átlag populációban/ gyakori eltérés-polimorfizmus, ritka-mutáció/szürkezóna-variáns
Összefügg-e a klinikai képpel?	Igen: valószínűsíthető a betegség-okozó hatás Nem: nem ez a genetikai rendellenesség felelős a betegség kialakulásáért
Funkcionális bizonyítás?	Expressziós rendszer készítése és a kiesett funkció bizonyítása

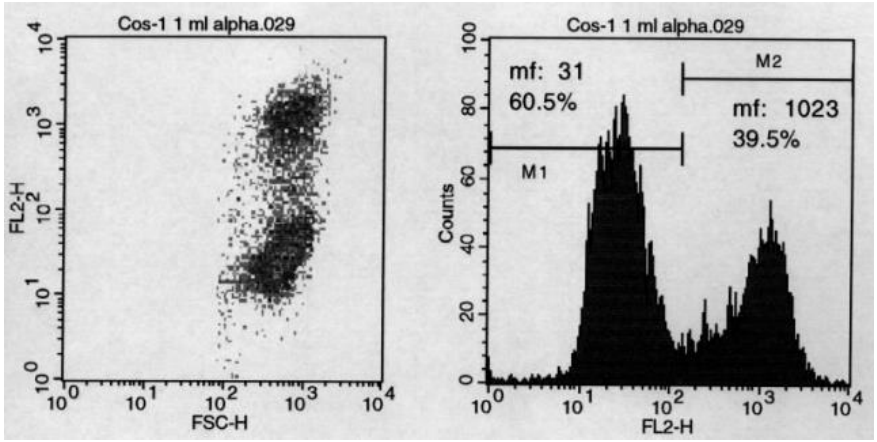
Új CYP17 génmutáció funkcionális bizonyítása

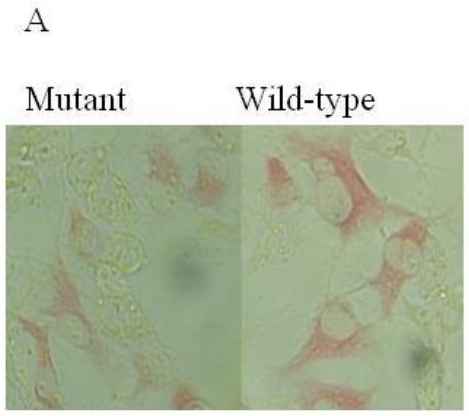
Expressziós vektor készítése

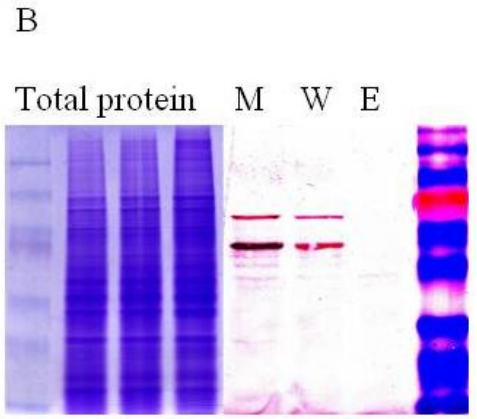


COS sejtbe történő transzfektálás

A mutációt és vad típusú allélt hordozó sejtek kimutatása immunhisztokémiával, western-blottal és flow-citométerrel







A mutációt és a vad típusú allélt hordozó sejtek 17-hidroxiláz és 17,20-liáz enzim aktivitásainak tesztelése

