

**Molekuláris genetikai vizsgálatok az örökletes endokrinológiai tumorszindrómák
klinikai diagnosztikájában**
**Molecular genetic methods in clinical diagnosis of hereditary endocrine tumour
syndromes**

Sarkadi Balázs dr.^{1,2}; Grolmusz Vince Kornél^{1,2}, Butz Henriett^{2,3}, Kövesdi Annamária^{1,2}, Likó István²; Nyirő Gábor^{2,4}, Igaz Péter dr.^{1,4}, Patócs Attila dr.^{1,2,3}

¹Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, II. Belgyógyászati Klinika, Budapest

²Magyar Tudományos Akadémia–Semmelweis Egyetem „Lendület” Örökletes Endokrin Daganatok Kutatócsoport, Budapest

³Laboratóriumi Medicina Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

⁴Magyar Tudományos Akadémia–Semmelweis Egyetem „Molekuláris Medicina Kutatócsoport, Budapest

Levelező szerző:

Dr. Patócs Attila;

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Klinikai Genetika és Endokrinológiai Laboratórium, Laboratóriumi Medicina Intézet,

MTA-SE „Lendület” Örökletes Endokrin Daganatok Kutatócsoport

1088, Budapest, Szentkirályi u. 46.;

patocs.attila@med.semmelweis-univ.hu

+36-20-663-2596

Nyilatkozat: jelen közlemény korábban nem került publikálásra és egyéb folyóiratba sem került beküldésre.

Nyilatkozat: a levelező szerző az Orvosi Hetilap szerzői számára szóló útmutatót elolvasta.

Anyagi támogatás: Jelen közlemény megírása anyagi támogatásban nem részesült.

Szerzői munkamegosztás: S.B., G.V.K., K.A., B.H., L.I., I.P. Ny.G. és P.A. a téma kidolgozása; S.B., G.V.K. és P.A. a kézirat összeállítása. L.I. az új generáció szekvenálásról szóló rész kidolgozása; I.P. klinikai genetikai összefüggések kidolgozása. Valamennyi szerző a kézirat végleges változatát elolvasta és jóváhagyta.

Érdekeltségek: A szerzőknek nincsenek érdekeltségeik.

Köszönetnyilvánítás: A szerzők köszönetüket és hálójukat fejezik Rácz Károly professzor Úrnak, aki megteremtette hazánkban az örökletes endokrinológiai tumorszindrómák molekuláris genetikai vizsgálatának lehetőségét. A szerzők köszönetüket fejezik ki Tóth Miklós, Szücs Nikolett, Kiss Róbert, Sallai Ágnes, Halász Zita, Török Dóra, Somogyi Anikó, Valkusz Zsuzsanna, Csajbók Éva, Tóth Géza, Nagy Endre, Mezösi Emese klinikus kollégáknak a betegek klinikai ellátásáért. A szerzők köszönetüket fejezik ki a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatalnak a Nemzeti Bionika Program keretében nyújtott támogatásért.

Absztrakt

Az örökletes endokrinológiai tumorszindrómák vagy multiplex endokrin neoplaziák (MEN) közös jellegzetességei a különböző endokrin szervek daganatainak társulása egy betegben vagy egy családon belül. A MEN szindrómáknak több altípusát különböztethetjük meg, amelyek közül az 1-es és 2-es típus a leggyakoribb. Öröklődésük az autoszomális domináns jelleget követik, az érintett családokban 50%-os az átörökítés valószínűsége. A MEN szindrómák mellett, a sporadikus megjelenésű endokrin daganatok genetikai hátterében is igazolhatóak a MEN szindrómákért felelős gének eltérései és a később MEN szindrómásnak bizonyuló esetek zöme is sporadikus formaként kerül felismerésre.

A molekuláris genetikai diagnosztika elsődleges szerepe ezekben a szindrómákban a betegségért felelős eltérés kimutatása, majd genetikai tanácsadást követően, az érintett családokban genetikai szűrővizsgálatok végzése. A vizsgálat után a tünetmentes, de a mutációit hordozó egyének folyamatos klinikai nyomonkövetésével a daganatok morbiditásának megelőzése, csökkenése érhető el.

Az utóbbi évek technológiai fejlődésével átalakult az örökletes kórképek molekuláris genetikai diagnosztikája is. Az új-generációs szekvenálásnak (NGS) a klinikai munkában történő elterjedésével az endokrin daganatszindrómákban is bővült a vizsgálandó gének száma.

Jelen összefoglalóban áttekintjük az örökletes endokrin tumorszindrómák genetikai hátterét, és bemutatjuk a jelenleg is alkalmazott molekuláris biológiai vizsgálómódszereket.

Abstract

The common features of hereditary endocrine tumour syndromes or multiple endocrine neoplasias (MEN) are the association of various tumours of different endocrine organs in one patient or within the same family. Different types can be distinguished, of whom the type 1 and type 2 are the most common. The mode of inheritance is autosomal dominant, meaning that there is 50% chance to inherit the pathogenic alteration. The pathogenic variants of genes responsible for MEN syndromes have also been identified in sporadic endocrine tumours and many cases initially referred as sporadic have been later categorized as familiar based on genetic analysis.

The main role of the molecular genetic analysis in these syndromes is to identify the pathogenic variant then, after appropriate genetic counseling to perform the genetic screening of first degree relatives. Following molecular genetic analysis state-of-the-art clinical follow-up of the clinically healthy mutation carriers may decrease or even prevent the morbidity and mortality. Due to the technological developments in the recent years the molecular genetic analysis of hereditary tumour syndromes has also been changed. Using next generation based sequencing methods in routine clinical diagnostics the number of pathogenic genes in endocrine tumours also increased.

This recent review focuses on the genetic background of hereditary endocrine tumour syndromes and the recently used molecular biological methods will also be presented.

Rövidítések

AIP = aryl kölcsönható fehérje, CaSR = calcium érzékelő receptor, CDKN1B = ciklin függő kináz inhibitor 1B, EPAS1 = endotheliális PAS domain fehérje 1, FH = fumarát hidratáz, FHH = familiáris hypocalciuriás hypercalcaemia, FIPA = familiáris izolált hipofízis adenóma, FMTC = familiáris medulláris pajzsmirigy carcinoma, GCM2 = glia sejt hiányzó homológ 2, GOT2 = glutamin-oxaloacetát transzamináz, KIF1B = kinezin család 1B tagja, MAX = MYC-hez kapcsolódó faktor X, MDH2 = malát dehidrogenáz 2, MEN = multiplex endokrin neoplazia, MLPA = multiplex ligációs próba amplifikáció, MTC = medulláris pajzsmirigyrák, NF1 = neurofibromatózis 1-es típusa, NGS = új-generációs szekvenálás, PCR = polimeráz láncreakció, PGL = paraganglioma, Phaeo = Phaeochromocytoma, PHD2 = propil hidroxiláz domain-t tartalmazó fehérje 2, PTH = parathoromon, PTEN = foszfatáz és tenzin homológ, RET = transzfekeció során újraszerveződő fehérje, SDH = szukcinát dehidrogenáz, SDHA = szukcinát dehidrogenáz A alegység, SDHAF2 = szukcinát dehidrogenáz AF2 alegység, SDHB = szukcinát dehidrogenáz B alegység, SDHC = szukcinát dehidrogenáz C alegység, SDHD = szukcinát dehidrogenáz D alegység, TGF β = tumor növekedési faktor béta, TMEM127 = transzmembrán protein 127, VHL = von Hippel Lindau

Bevezetés

A molekuláris genetikai vizsgálómódszerek fejlődése, ezek elérhetősége és a klinikai genetikai diagnosztikában történő térhódítása átalakította az örökletes endokrinológiai szindrómák molekuláris genetikai diagnosztikáját is. Az új-generációs szekvenáláson alapuló vizsgálómódszerek térhódítása a diagnosztikában több olyan új kihívást is jelentett és jelent napjainkban is, amelyek megoldása multidiszciplináris megközelítést tesz szükségessé. A szakorvosok mellett molekuláris biológusok, bioinformatikusok és laboratóriumi szakemberek együttes munkájára van szükség a megfelelő ellátás biztosításához. A vizsgálatok indikációja, a klinikai diagnózis felállítása mellett, a vizsgálatok során keletkezett adatmennyiség feldolgozása és interpretálása is kihívásokkal teli [1]. A humángenetikai társaságok szakmai ajánlásai is kiemelik, hogy minden olyan egyénben, akiben nagyobb mint 10% az esélye az örökletes daganatok kialakulására javasolt genetikai vizsgálat [2]. Ez a hormonrendszert érintő tumorokra is igaz, hiszen a legtöbb, még a sporadikus megjelenést mutató esetek között is magas a csírasejtes génelterések előfordulása [3]. Természetesen a megnövekedett igény és a módszerek elérhetősége is hozzájárult a vizsgálatok elterjedéséhez.

A molekuláris genetikai diagnosztikai munka átalakult; a korábbi egy eltérés-egy gén koncepcióról napjainkra géncsoportok vagy teljes genomot célzó vizsgálatokat végeznek. Természetesen a módszertani fejlődés maga után vonja az egyéb területek fejlődését is. Kezdve a genetikai tanácsadástól és a speciális beteg beleegyező nyilatkozatok kialakításától, az

elvégzett mérések adatainak tárolásán, felhasználásán át a vizsgálati lelet kiadásáig, minden folyamatnak szabályozottnak, ellenőrzöttnek kell lennie [2].

Az örökletes endokrinológiai tumorszindrómák vagy a multiplex endokrin neoplázia (MEN) szindrómák során természetesen a hagyományos és új-generációs szekvenálási módszerek egymást kiegészítve kerülnek alkalmazásra. Jelen tanulmányban a szerzők bemutatják, hogyan történik a különböző metodikák ötvözése, amelyek szükségesek ahhoz, hogy a klinikai igényeknek megfelelő vizsgálati eredmények kerüljenek meghatározásra a hormonrendszert érintő daganatok molekuláris genetikai diagnosztikájában.

MEN szindrómák genetikai vizsgálata hagyományos molekuláris genetikai módszerekkel

MEN1 szindróma

A MEN1 szindróma (Wermer-kór) (OMIM 131100) három fő manifesztációja a primer, általában többszörös mellékpajzsmirigy adenoma, az enteropankreatikus neuroendokrin daganat és a hipofízis adenoma [4]. A MEN1 szindróma klinikai diagnózisa kimondható, ha a 3 fő komponens közül legalább 2 jelen van egy betegben. MEN1 szindrómás családnak tekintjük azt a családot, amelyben legalább egy MEN1 szindrómás családtagon kívül legalább egy elsőfokú vérrokon családtagnak a 3 fő MEN 1 komponens közül legalább 1 előfordul. Fontos megfigyelés, hogy a mutációk egy része *de novo* alakul ki, ezért negatív családi anamnézis nem zárja ki MEN1 szindróma lehetőségét [5]. MEN1 szindróma gyanúja akkor megalapozott, ha bármely fő daganattípus fiatal korban (<35év) vagy multiplex formában fordul elő [5]. Klinikai MEN1 diagnózis esetén 80–90%-ában lehet a molekuláris genetikai vizsgálattal igazolni a csirasejtes betegségokozó *MEN1* génmutációt.

A genetikai vizsgálat legfontosabb eredménye a MEN1 szindrómás családokban a klinikai tüneteket még nem mutató, de betegséget okozó mutációt hordozó családtagok beazonosítása. A negatív genetikai eredmény mentesíti a családtagokat a további felesleges klinikai, laboratóriumi és képalkotó vizsgálatoktól. A betegség-okozó génelterések a *men1* kódoló *MEN1* gén teljes szakaszán kimutathatóak. Nincs mutációs hot spot, és majdnem minden MEN1 szindrómás családnak egyedi mutációja van [4, 5]. A mutációk típusa alapján a fehérje teljes hiányát eredményező Stop kodont vagy kereteltolódást okozó mutációk gyakoriak MEN1-ben. Ezek patogenitása nem kérdőjelezhető meg. Az aminosavcserét eredményező, misszensz mutációk esetében a patogenitás bizonyításához a pontos genotípus-fenotípus összefüggések mellett a mutáció szegregációja az elváltozással és az adott génvariáns előfordulási gyakoriságának ismerete szükségesek ahhoz, hogy a patogenitást egyértelműen bizonyítható legyen.

A molekuláris genetikai vizsgálat alapja a hagyományos Sanger alapú DNS szekvenálás, amellyel a *MEN1* gén teljes kódoló szakaszait polimeráz láncreakcióval (PCR) történő amplifikációja után végeznek el. A Sanger szekvenálás mellett ugyanakkor szükséges a *MEN1* gén vizsgálatát elvégezni olyan módszerrel is, amivel a gén nagyobb szakaszainak heterozigóta delécióit is ki lehet mutatni [6]. Ilyen módszer a multiplex ligációs próba amplifikáció (MLPA). Az összes MEN1 szindrómát okozó betegséget eredményező génvariánsok közül 1-2 % az, amelyek igazolásához szükséges az MLPA módszer.

Laboratóriumunkban a 2000-es évek elejétől érhető el a *MEN1* gén vizsgálata, eddig közel 300 esetben került sor a *MEN1* gén vizsgálatára olyan betegekben, akikben a klinikai megjelenés alapján felmerült MEN1 szindróma lehetősége. Ezek közül 26 index beteg esetében igazoltuk a betegségért felelős *MEN1* mutációt. A mutációkra jellemző, hogy minden család egyedi mutációt hordozott, nem igazolódott alapító mutáció a hazai beteganyagban. A mutációk többsége Stop kodont vagy kereteltolódást eredményező rövid deléció vagy inszerció volt [7]. A genotípus-fenotípus összefüggések során a betegekben mindhárom fő manifesztáció kb. egyenlő arányban fordult elő, így a gasztroenteropankreatikus neuronendokrin daganatok és a hipofízis adenómák sem voltak ritkábbak a primér hiperparatireóvizist okozó mellékpajzsmirigy adenómáknál.

MEN2 szindróma

A multiplex endokrin neoplázia 2-es típusában (MEN2) a leggyakoribb daganat a medulláris pajzsmirigyrák (MTC), ami a mutációt hordozó betegekben a 40 éves életkor eléréséig csaknem minden esetben kialakul. Phaeochromocytoma (Phaeo) a MEN2 esetek kb. felében, míg mellékpajzsmirigy adenóma a betegek 10-20%-ában fordul elő. A klinikai tünetek alapján három altípust különíthető el; MEN2A-ban mindhárom elváltozás megjelenik, a MEN2B-ben a mellékpajzsmirigyek nem érintettek, de az MTC és a Phaeo mellett jellegzetes testalkat, marfanoid habitus, csontrendszeri rendellenességek, nyálkahártya neuromák, cornea idegek megvastagodása és pubertás tarda figyelhető meg. A MTC önállóan megjelenő formáját, az ún. familiáris medulláris pajzsmirigy carcinoma (FMTC) jelenti, ebben az alcsoportban semmilyen más MEN2-re jellemző elváltozás nem mutatható ki [8].

A MEN2 szindróma is autoszomális domináns módon öröklődik, kialakulásáért a *RET* protoonkogén csírasejtes mutációi felelősek. A gén a 10q11.2 lókuszon található, 55 kb nagyságú és 22 exonból áll. A RET fehérje egy receptor tirozin kináz TGF β szupercsaládba tartozó transzmembrán fehérje, az extracellularis rész tartalmazza a cadherin-kötő doméneket, melynek a jel-átvitelben van jelentősége, valamint az ún. ciszteinben gazdag régiót, melynek a receptor dimerizációban van szerepe [8].

A *RET* gént érintő mutációkat két nagy csoportba sorolhatjuk; az első csoportba tartozók a RET inaktiválódását okozzák és a Hirschprung betegség patogenezisében játszanak szerepet, míg a második csoportba tartozók a RET ligand nélküli aktiválódását váltják ki. Utóbbi csoportba sorolt ún. aktiváló mutációk játszanak szerepet a MEN2 tumorok patogenezisében. Ezek a mutációk az extracelluláris ciszteinben gazdag régió mutációi a RET receptor aktivációját okozzák. Szemben a *MEN1* mutációkkal a *RET* génben itt van mutációs hot spot. A 634-es

kodon mutációk a RET ligand nélküli homodimerizációját és következményes tirozinkináz aktiválódását eredményezik [8].

Az összes MEN2 szindrómás beteg 90-95 %-ában mutatható ki *RET* mutáció. Szoros genotípus-fenotípus összefüggések ismertek, amelyek alapján az MTC prevenciójában elsődleges szerepű preventív pajzsmirigyeltávolítás időpontja is mutáció-specifikusan ajánlott [9].

Klinikánkon a *RET* protoonkogén molekuláris genetikai vizsgálatát 1997-ban került bevezetésre [10]. Jelenleg mintegy 100 mutáció hordozó áll gondozás alatt [11, 12].

A *RET* gén vizsgálata hasonlóan a MEN1 szindrómához hagyományos módszerekkel történik, elsősorban a 8-16-os exonok elemzésével, de a klinikai képtől függően a 10-16-os exonok vizsgálata minden klinikailag igazolt MTC esetében indokolt [9]. Az új-generációs szekvenálást használó laboratóriumokban is elérhető a *RET* gén vizsgálata, majdnem minden gyártó onkológiai paneljében jelen van a gén. A csírasejtes mutáció vizsgálata mellett a *RET* gén vizsgálatának indikációját jelentheti a *RET* gén szomatikus mutációjának a beazonosítása sporadikus MTC-ben is. Amennyiben a tumorszövetben kimutatható *RET* mutáció, célzott, specifikusan RET tirozinkinázgátló kezelés is javasolható lehet. Jelenleg a vandetinid-el és a cabozantinid-el kapcsolatos klinikai vizsgálatok folyamatban vannak [9].

A pajzsmirigy nem-medulláris rákjai eseteiben ritkák az örökletes genetikai hibák előfordulása. Follikuláris pajzsmirigyrák részjelensége lehet a Cowden, és a Bannayan–Riley–Ruvalcaba szindrómának. Ezek a kórképek csírasejtes *PTEN* mutációkhoz társulnak. A pajzsmirigyrák mellett egyéb daganatok (emlőrák, trichilemmóma, lipomatózis, endometriumrák) és specifikus fenotípus jegyek (hemihipertrófia, pettyezett glans penis) fordul elő. A diagnózist a *PTEN* gén hagyományos molekuláris biológiai módszerekkel történő vizsgálata jelenti.

Egyéb csírasejtes génmutációk szerepe MEN1-hez hasonló klinikai képet mutató szindrómákban

A mellékpajzsmirigy adenómák genetikai hátterében több új gén szerepére derült fény. Ezek közül az egyik legjelentősebbnek tűnik a *CDKN1B*, amelynek csírasejtes mutációit igazolták olyan *MEN1* negatív betegekben, akikben mellékpajzsmirigy adenóma és hipofízis daganatok alakultak ki. A *CDKN1B* szerepe először patkányban került igazolásra, a mutációt hordozó állatokban a *MEN1*-szerű fenotípus manifesztálódott több szerv érintettségével. A szakirodalom MEN4 szindrómának hívja a *CDKN1B* mutációkhoz társult kórképet. Az utóbbi évek kutatásai kimutatták, hogy sporadikus megjelenésű primér hiperparatireózisban, a vékonybél neuroendokrin daganataiban, limfómák és az emlő daganataiban is azonosítottak *CDKN1B* mutációkat, ami alátámasztja ennek a gének a tumorszupresszor szerepét [13].

Önálló szindróma, az ún. *mellékpajzsmirigy-állkapocstumor szindróma*, ami háttérében a *CDC73* gén mutációi állnak. A szindrómát a MEN1 szindrómától elkülöníti, az a megfigyelés, hogy *CDC73* mutációk esetében a mellékpajzsmirigy daganat rosszindulatú míg MEN1 szindrómában a daganatok jóindulatúak. A mellékpajzsmirigy-állkapocstumor szindróma fiatalabb életkorban jelentkezik és a betegek gyakrabban szorulnak onkológiai kezelésre, mint MEN1 szindrómában [14].

2016-ben azonosították a *GCM2* transzkripciós faktort kódoló gént, amelynek két génvariánsát összefüggésbe hozták a familiáris primér mellékpajzsmirigy adenómák kialakulásával [15]. A tanulmányban a MEN1 és MEN4 negatív eseteket vizsgálták, és az összes eset 18%-ában azonosították a c.1136T>A (p.Leu379Gln) és c.1181A>C (p.Tyr394Ser) variánsokat. Funkcionális vizsgálatokkal bizonyították, hogy ezek a génvariánsok evolúciósan konzervált doménekben helyezkednek el, a mutált aminosavak fokozott transzkripcionális aktivitást eredményeztek a vad típusú fehérjéhez viszonyítva. Mindezek alapján a *GCM2* gén vizsgálata is indokolt mellékpajzsmirigy adenómás betegekben. Ugyanakkor a misszensz variánsok patogenitásának bizonyítása nehéz, több esetben egy korábban kimutatott variánsokról is a későbbi adatok igazolják, hogy viszonylag gyakori eltérések, amelyeknek patogenetikai szerepe csak egyes populációkban vagy csak bizonyos körülmények között manifesztálódik. Egy friss tanulmány is kimutatta, hogy a két *GCM2* génvariáns allélgyakoriságai különbözőek voltak a különböző népcsoportokban felvetve, hogy az igazolt összefüggések csak bizonyos populációkban relevánsak [16].

A primér mellékpajzsmirigy adenómákban a megemelkedett PTH differenciáldiagnosztikai szempontjából fontos tisztázni, hogy az emelkedett PTH koncentráció mögött nem familiáris hypocalciuriás hypercalcaemia (FHH) áll. Ezt legkönnyebben a szérum és vizelet kalcium ürítés mértékének meghatározásával lehet elérni. FHH-ban a vizelet calcium clearance –kreatinin clearance arány kisebb mint 0.01, míg primér hiperparatireózisban ez magasabb mint 0.02. FHH-s betegben a mellékpajzsmirigyek eltávolítása nem indokolt, míg primér hiperparatireózisban vagy MEN1 szindrómában a mellékpajzsmirigyek sebészi eltávolítása a választandó kezelés [17]. Genetikai szempontból az FHH háttérében a calcium érzékelő receptort (CaSR) kódoló gén mutációi felelősek, így a *CaSR* molekuláris genetikai vizsgálata szintén indokolt lehet primér hiperparatireózisban, elsősorban az újszülött korban jelentkező esetekben [18].

Módszertani szempontból így megállapítható, hogy a primér hiperparatireózisban szenvedő betegek esetében indokolt a *MEN1*, *CDKN1B*, *CDC73*, *GCM2* és a *CaSR* gének vizsgálata,

amelyek labortechnikai szempontból már előrevetítik azt, hogy új-generációs szekvenálással vizsgálható specifikus génpanel is bevezetésre kerülhet a klinikai gyakorlatba.

Egy családon belül halmozott előfordulású *hipofízis daganatok* esetében a MEN1 szindróma mellett az ún. *familiáris izolált hipofízis adenóma* (FIPA: familial isolated pituitary adenoma) szindróma is előfordulhat. Ezekben az esetekben indokolt az *AIP* (aryl interacting protein) gén vizsgálata. *AIP* mutációkhoz társulva leggyakrabban növekedési hormont termelő daganatok, de prolaktinómák és ritkán, hormonálisan inaktív hipofízis daganatok is kialakulhatnak. A genetikai vizsgálat során az *AIP* gént PCR-t követő Sanger szekvenálással és MLPA módszerrel elemzik.

Örökletes phaeochromocytóma/paraganglioma szindróma molekuláris genetikai vizsgálata, a hagyományos és új generációs szekvenálási technológiák ötvözése

A phaeochromocytómák (Phaeo) és paragangliómák (PGL) a mellékvesevelő, illetve a szimpatikus és paraszimpatikus dúclánc chromaffin sejtjeiből kiinduló, ritka neuroendokrin daganatok. Autoszomális domináns módon a Pheo/PGL daganatok közel 35-40%-a csírasejtes mutáció következményeként jelentkezik [19]. A már korábban bemutatásra került MEN2A és MEN2B szindrómák részjelensége mellett a von Hippel Lindau (VHL) betegség, a neurofibromatózis 1-es típusa (NF1) és a familiáris paraganglióma szindrómák azok a kórképek, amelyekben Phaeo manifesztálódhat.

A *Von Hippel-Lindau szindróma* egy komplex tumorszindróma, amelyben a Phaeo mellett a retina, a kisagy, a gerincvelő, a vese, míg ritkábban a hasnyálmirigy, a tüdő, a máj, és a mellékvese területén alakulnak ki daganatok. Klinika megjelenését, a Phaeo kialakulásának valószínűsége alapján a VHL-szindrómát két fő altípusra osztják fel. Az 1-es típusban a Phaeo igen alacsony valószínűséggel fordul elő és többi manifesztáció mind kialakulhat, míg a 2-es típus fő komponense a Phaeo. A 2A típusban a világossejtes veserák kockázata alacsony, míg a 2B típusban magas, de létezik egy 2C önálló entitás is, amelyben csak Phaeo jelenik meg [20]. Jelenleg több mint 800 különböző mutáció ismert a *VHL* gén mutációs adatbázis (www.umd.be/vhl) alapján. Bár ismertek genotípus-fenotípus összefüggések, a legtöbb VHL-szindrómás család egyéni fenotípust mutat. A VHL-szindróma 1-es típusában jellemzően a fehérje hidrofób magját érintő misszensz és nonszensz mutációk, illetve deléciók fordulnak elő, melyek súlyosan károsodott, megrövidült fehérjéhez vezetnek, ezáltal teljes funkcióvesztést okoznak. Ezzel szemben a VHL-szindróma 2-es típusában a misszensz típusú mutációk inkább a fehérjekötő helyeket érintik, ezáltal részleges funkciókiesést okoznak. Az alternatív start kodonként szereplő 55. kodon előtti aminosavakat érintő (25, 38, 46, 52. kodonok) mutációk patogenitása

mérlegelendő [21], de Phaeo, és komplett VHL-szindróma kialakulásával is összefüggésbe hozták őket (E46X és E52K).

A *VHL* gén vizsgálata hagyományos molekuláris biológiai módszerekkel történik, PCR reakciót követő Sanger szekvenálással és a *VHL* gén heterozigóta delécióinak kimutatására MLPA módszer is szükséges. A *VHL* gén patogén eltéréseinek 15-20%-a tartozik abba a csoportba, amihez szükséges MLPA vagy valamilyen egyéb, géndózis kimutatására alkalmas módszer [22, 23].

A *VHL* gén szintén szerepel az új-generációs szekvenálási panelekben, de a hemizigócia detektálása jelenleg ezzel a technológiával nem kellően kivitelezhető, főleg a PCR amplifikálást használó könyvtárkészítések során ütközhetünk nehézségekbe [1].

A *neurofibromatosis 1-es típusában* szintén várható Phaeo megjelenése, de az általában egyértelmű klinikai megjelenés, valamint az *NF1* gén mérete korlátozta az *NF1* gén hagyományos módszerekkel történő vizsgálatának elterjedését [1]. Jelenleg, több új-generációs szekvenálási génpanel alkalmazásával elérhető az *NF1* vizsgálata is.

Az örökletes Phaeo/paraganglióma (PGL) szindrómák háttérében álló gének beazonosítása a 2000-es évek elején kezdődött és tulajdonképpen jelenleg is tart (1-es táblázat). Az ezredfordulón a Szentgyörgyi-Krebs ciklus tagját képező szukcinát dehidrogenáz (SDH) egyik alegységét kódoló, *SDHD* gén mutációját azonosították familiáris PGL-s családokban [24]. Még ebben az évben az *SDHB* [25] és az *SDHC* [26] patogenetikai szerepét is igazolták. Mindezen eredmények alapján a familiáris megjelenésű PGL-k 50-70%-ában a sejtmagban kódolt *SDHB*, *SDHC* és *SDHD* gének csírasejtes mutációik állnak.

Az *SDHB*, *SDHC* és *SDHD* géneken kívül az elmúlt 8 évben további 9 gén betegség-okozó mutációit azonosították örökletes paragangliómákban (*SDHA*, *SDHAF2*, *FH*, *KIF1B*, *PHD2*, *MAX*, *TMEM127*, *MDH2* és *GOT2* gén mutációk) [27-35]. A lehetséges betegség-okozó gének nagy száma jelentősen megnövelheti a genetikai vizsgálatok költségét és a munkaidőt, ezért elengedhetetlen az egyes gének vizsgálatának racionális megtervezése. Az Amerikai Endokrin Társaság szakmai ajánlása segít a vizsgálatok racionalizálásában. A fenotípus-orientált algoritmus [36] szerint a MEN2 és a VHL szindróma kizárása után a következő feladat az *SDHB*, *SDHC* és *SDHD* gének vizsgálata, amelyek közül a daganatok lokalizációja alapján dönthetünk a vizsgálatok sorrendjéről. *SDHC* mutációt csak fej-nyak PGL-ban szenvedő betegekben mutattak ki; malignus paragangliómában szenvedő betegben elsőként az *SDHB* gén vizsgálata javasolt [36].

Laboratóriumunkban, a különböző gének felismerésével összhangban, először egy *RET* mutáció talaján kialakult MEN-2 szindrómát ismertettük 1999-ben, [10] majd 2002-ben

bizonyítottuk be, hogy a *RET* 609-es kodon mutáció következtében MEN2A szindróma és Phaeo manifesztálódhat [11].

A hazai *VHL* gén eltérésekhez társuló klinikai manifesztációk ismertetésével kimutattuk, hogy az MLPA vizsgálat a hazai beteganyagban is mintegy 15%-al növelte a genetikai pozitív esetek számát [22], valamint a Ser80Leu génvariáns patogenitását is egy, nagy létszámú család részletes feldolgozásával bizonyítottuk [21].

Az újabban felfedezett gének szisztematikus vizsgálatát elvégezve 82 sporadikusnak vélt Phaeo/PGL betegben 11 esetben igazoltunk patogén eltérést, amelyek közül 4 *SDHB* és 2 *TMEM127* mutáció új mutáció volt. Érdekes eset volt egy *TMEM127* mutációt hordozó ikerpár kórtörténete is, ami szokatlan előfordulás miatt szintén unikális [37].

A 16 Phaeo/PGL gén közül 8 olyan fehérjét kódol, amelyek mitokondriális enzimet vagy enzim alegységként funkcionálnak. A mutációk következtében kialakuló enzimdefektusok miatt felhalmozódó metabolitok megváltoztatják a sejtek anyagcseréjét, ami a sejtek túlélésére is hatással vannak. Ezeket a metabolitokat jelenleg, mint onkometabolitokat tartanak nyilván [38]. Sajnos a rutin laboratóriumi vizsgálatok közül ezek mennyiségi meghatározása jelenleg nem elérhető, nincs olyan eljárás, amivel szűrni lehetne a kóros metabolit profilt vér vagy vizeletmintákból. Daganatszövetből természetesen kimutatható pl. az *SDH* mutációkra jellegzetes kóros szukcinát/fumarát arány, de szűrésre jelenleg ez az eljárás nem használható, ami azt jelenti, hogy továbbra is a genetikai szűrés jelenti a Phaeo/PGL-ák elsődleges szűrési stratégiáját.

Az utóbbi évtizedben megjelent NGS módszerek a Phaeo és PGL-ák tekintetében igazi sikertörténetek, hiszen a legutóbb azonosított 3 Phaeo/PGL gén (*MAX*, *FH* és *MDH2*) felfedezése is ilyen technológiát alkalmazó exom szekvenálással történt [32-35].

A Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikája és az Endokrin Genetika Laboratórium a mindenkori legkorszerűbb diagnosztikus módszereket törekszik beépíteni a kutatás, valamint mindennapi diagnosztikai keretei közé. Munkacsoportunk kidolgozott egy génpanelt, amellyel a *RET*, *VHL*, *NF1*, *MEN1*, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*, *KIF1B*, *MAX*, *TMEM127*, *PHD2*, *FH*, *EPAS1* gének egyidejűleg vizsgálhatóak. A módszer analitikai teljesítőképességének értékelése során vizsgálni kell mind a könyvtárkészítés, mind pedig a bioinformatikai adatfeldolgozás teljesítőképességét is. Mutációt hordozó és mutációt nem hordozó esetek bevonásával a módszer validáláshoz szükséges idő ugyan rövidíthető, de természetesen minden génre meg kell határozni a szenzitivitás és specificitás értékeket, amihez az ellenőrző Sanger szekvenálás szükséges. A Phaeo/PGL-ák vizsgálatában alkalmazott *amplikon szekvenálás*ok feldolgozása kimutatta, hogy az eddig ismertetett egyik módszer sem

biztosította a 100% szenzitivitást és specificitást, amelynek oka elsősorban a bioinformatikai elemzések voltak [1]. Ezek az eredmények indokolják, azokat a szakmai irányelveket, amelyek arra hívják fel a figyelmet, hogy a klinikai döntéshozatalban figyelembe vett NGS alapú mérések eredményeit több bioinformatikai elemzéssel kell ellenőrizni és az eredményeket hagyományos molekuláris biológiai módszerekkel szükséges megerősíteni [39, 40].

A génpanelek szekvenálása mellett az exom szekvenálás terjedése még inkább indokolja, hogy fokozott figyelmet kell fordítani a módszertani kérdésekre, és számos validálási lépésnek kell megelőznie a vizsgálati lelet kiadását. A legtöbb klinikai genetikai vizsgálatot végző laboratórium az exom szekvenálást, mint egy komplex szűrővizsgálatot alkalmazza és saját, validált munkafolyamataikkal egészíti ki ezeket [1, 39].

Összefoglalás

A molekuláris genetikai vizsgálatok alkalmazása a klinikai gyakorlatban átalakulóban van. Ennek oka, hogy az új-generációs szekvenálási módszereken alapuló vizsgálatok kedvező fajlagos költségcsökkenést és, az egyre növekvő információállomány birtokában, gén, vagy akár mutáció-specifikus betegellátást tesz lehetővé. A hormonrendszer daganatainak jelentős része visszavezethető egy-egy örökletes gendefektusra, de ugyanakkor a monogénes szindrómák előfordulási gyakorisága nagyon alacsony, ami nehezíti a betegek felismerését. A gyakoribb előfordulású mellékpajzsmirigyből, mellékvesevelőből, vagy paraganglionokból kiinduló daganatok esetében fokozott jelentőségűek a genetikai tényezők szerepe, ami nemcsak diagnosztikai szempontból, de terápiás következményeket is jelent a betegeknek és családtagjainak. Az új-generációs szekvenáláson alapuló módszereknek a klinikai genetikai gyakorlatba történő beépülésével elérhető ezeknek a daganatoknak a precíz jellemzése, molekuláris kategorizálása. Ezeknek a vizsgálatoknak a klinikai diagnosztikába történő bevezetése előtt szükséges a módszerek technikai validálása és a teljesítőképességük felmérése. A metodikából eredően a genetikai vizsgálatokat megelőző genetikai tanácsadás folyamata, a beteg beleegyező nyilatkozatok átdolgozása szintén szükségesek ahhoz, hogy a vizsgálatok megfeleljenek a jelenleg hatályos etikai, jogi és adatvédelmi szabályoknak. Az orvos-szakmai társaságok valamint az európai és helyi adatvédelmi ajánlások iránymutatások megismerése és ezeknek a napi gyakorlatba történő bevezetése a közeljövő feladata lesz.

Irodalomjegyzék

1. Patócs A, Likó I, Butz H, et al. Novel methods and their applicability in the evaluation of the genetic background of endocrine system tumours. [Új módszertani lehetőségek és ezek alkalmazása a hormonális rendszer daganatainak genetikai kivizsgálásában.] *Orv Hetil.* 2015; 156: 2063-2069. [Hungarian]
2. Robson ME, Bradbury AR, Arun B, et al. American Society of Clinical Oncology Policy Statement Update: Genetic and Genomic Testing for Cancer Susceptibility. *J. Clin Oncol.* 2015; 33: 3660-3667.
3. Toledo RA, Dahia PL. Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary pheochromocytoma and paraganglioma syndromes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2015; 22: 169-179.
4. Agarwal SK, Kester MB, Debelenko LV, et al. Germline mutations of the MEN1 gene in familial multiple endocrine neoplasia type 1 and related states. *Hum Mol Genet.* 1997; 6: 1169-1175.
5. Choi H, Kim S, Moon JH, et al. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 with Multiple Leiomyomas Linked to a Novel Mutation in the MEN1 Gene. *Yonsei Med J.* 2008; 49: 655-661.
6. Thakker RV, Newey PJ, Walls GV, et al. Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *J Clin End Met.* 2012; 97: 2990-3011.
7. Balogh K, Hunyady L, Patocs A, et al. MEN1 gene mutations in Hungarian patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Clin Endocrinol.* 2007; 67: 727-734.
8. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature.* 1993; 363: 458-460.
9. Wells SA, Asa SL, Dralle H, et al. Revised American Thyroid Association Guidelines for the Management of Medullary Thyroid Carcinoma : The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid.* 2015; 25: 567-610.
10. Igaz P, Rácz K, Tóth M, et al. Ret-protooncogene mutation, verified by molecular genetic methods, in a Hungarian MEN Type 2a family. [Molekuláris genetikai módszerekkel igazolt ret-protoonkogén mutáció magyar MEN2A család esetében.] *Orv Hetil.* 1999; 140: 355-357. [Hungarian]
11. Igaz P, Patocs A, Racz K, et al. Occurrence of pheochromocytoma in a MEN2A family with codon 609 mutation of the RET proto-oncogene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87: 2994.
12. Patocs A, Klein I, Szilvasi A, et al. Genotype-phenotype correlations in Hungarian patients with hereditary medullary thyroid cancer. *Wien Klin Wochenschr.* 2006; 118: 417-421.
13. Molatore S, Pellegata NS. The MENX syndrome and p27: relationships with multiple endocrine neoplasia. *Prog Brain Res.* 2010; 182: 295-320.
14. van der Tuin K, Tops CMJ, Adank MA, et al. CDC73-Related Disorders: Clinical Manifestations and Case Detection in Primary Hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017; 102: 4534-4540.
15. Guan B, Welch JM, Sapp JC, et al. GCM2-Activating Mutations in Familial Isolated Hyperparathyroidism. *Am J Hum Genet.* 2016; 99: 1034-1044.
16. Guan B, Welch JM, Vemulapalli M, et al. Ethnicity of Patients With Germline GCM2-Activating Variants and Primary Hyperparathyroidism. *J Endocr Soc.* 2017; 1: 488-499.

17. Papadakis M, Meurer N, Margariti T, et al. A novel mutation of the calcium-sensing receptor gene in a German subject with familial hypocalciuric hypercalcemia and primary hyperparathyroidism. *Hormones (Athens)*. 2016; 15: 557-559.
18. Toke J, Patocs A, Balogh K, et al. Parathyroid hormone-dependent hypercalcemia. *Wien Klin Wochenschr*. 2009; 121: 236-245.
19. Neumann HP, Bausch B, McWhinney SR, et al. Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *N Engl J Med*. 2002; 346: 1459-1466.
20. Latif F, Tory K, Gnarr J, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science*. 1993; 260: 1317-1320.
21. Patocs A, Gergics P, Balogh K, et al. Ser80Ile mutation and a concurrent Pro25Leu variant of the VHL gene in an extended Hungarian von Hippel-Lindau family. *BMC Med Genet*. 2008; 9: 29.
22. Gergics P, Patocs A, Toth M, et al. Germline VHL gene mutations in Hungarian families with von Hippel-Lindau disease and patients with apparently sporadic unilateral pheochromocytomas. *Eur J Endocrinol*. 2009; 161: 495-502.
23. Gergics P, Toke J, Szilagyi A, et al. Methods for the analysis of large gene deletions and their application in some hereditary diseases. [A nagy géndeletiök kimutatásának módszerei és alkalmazásuk egyes örökletes betegségekben.] *Orv Hetil*. 2009; 150: 2258-2264. [Hungarian]
24. Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, et al. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science*. 2000; 287: 848-851.
25. Astuti D, Latif F, Dallol A, et al. Gene Mutations in the Succinate Dehydrogenase Subunit SDHB Cause Susceptibility to Familial Pheochromocytoma and to Familial Paraganglioma. *Am J Hum Genet*. 2001; 69: 49-54.
26. Niemann S, Muller U. Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nat Genet*. 2000; 26: 268-270.
27. Yeh IT, Lenci RE, Qin Y, et al. A germline mutation of the KIF1B beta gene on 1p36 in a family with neural and nonneural tumors. *Hum Genet*. 2008; 124: 279-285.
28. Ladroue C, Carcenac R, Leporrier M, et al. PHD2 Mutation and Congenital Erythrocytosis with Paraganglioma. *N Engl J Med*, 2008; 359: 2685-2692.
29. Hao HX, Khalimonchuk O, Schraders M, et al. SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. *Science*. 2009; 325: 1139-1142.
30. Qin Y, Yao L, King EE, et al. Germline mutations in TMEM127 confer susceptibility to pheochromocytoma. *Nat Genet*. 2010; 42: 229-233.
31. Burnichon N, Briere JJ, Libe R, et al. SDHA is a tumor suppressor gene causing paraganglioma. *Hum Mol Genet*. 2010; 19: 3011-3020.
32. Clark GR, Sciacovelli M, Gaude E, et al. Germline FH mutations presenting with pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99: E2046-2050.
33. Remacha L, Comino-Mendez I, Richter S, et al. Targeted Exome Sequencing of Krebs Cycle Genes Reveals Candidate Cancer-Predisposing Mutations in Pheochromocytomas and Paragangliomas. *Clin Cancer Res*. 2017; 23: 6315-6324.
34. Comino-Mendez I, Gracia-Aznarez FJ, Schiavi F, et al. Exome sequencing identifies MAX mutations as a cause of hereditary pheochromocytoma. *Nat Genet*. 2011; 43: 663-667.
35. Cascon A, Comino-Mendez I, Curras-Freixes M, et al. Whole-exome sequencing identifies MDH2 as a new familial paraganglioma gene. *J Natl Cancer Inst*. 2015; 107
36. Lenders JW, Duh QY, Eisenhofer G, et al. Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Met*. 2014; 99: 1915-1942.

37. Patocs A, Lendvai NK, Butz H, et al. Novel SDHB and TMEM127 Mutations in Patients with Pheochromocytoma/Paraganglioma Syndrome. *Pathol Oncol Res.* 2016; 22: 673-679.
38. Lendvai N, Pawlosky R., Bullova P, et al. Succinate-to-fumarate ratio as a new metabolic marker to detect the presence of SDHB/D-related paraganglioma: initial experimental and ex vivo findings. *Endocrinology.* 2014; 155: 27-32.
39. van El CG, Cornel MC, Borry P, et al. Whole-genome sequencing in health care: recommendations of the European Society of Human Genetics. *Eur J Hum Genet.* 2013; 21: 580-584.
40. DePristo MA, Banks E, Poplin RE, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet.* 2011; 43: 491-498.

1-es Táblázat: Phaeochromocytoma és paragangliómák háttérében azonosított géneltérések, az örökletes szindrómák, és a gének felfedezésénél időpontja

Gén	Szindróma	Leírásának ideje
<i>NF1</i>	Neurofibromatózis 1-es típusa	1990
<i>VHL</i>	von Hippel-Lindau	1993
<i>RET</i>	MEN-2	1993
<i>SDHD</i>	PGL1	2000
<i>SDHB</i>	PGL4	2000
<i>SDHC</i>	PGL3	2000
<i>KIF1β</i>	Phaeo, neuroblastoma, tüdő cc.	2008
<i>PHD2</i>	PGL, erythrocytosis	2008
<i>SDHAF2</i>	PGL2	2009
<i>TMEM127</i>	Phaeo/PGL	2010
<i>SDHA</i>	Phaeo/PGL	2010
<i>MAX*</i>	Phaeo/PGL	2011
<i>FH*</i>	Phaeo	2014
<i>MDH2*</i>	Phaeo	2015
<i>GOT2</i>	Phaeo	2017