

Az első hazai tapasztalatok összegzése kromoszomális microarray-analízis és teljesexom-szekvenálás módszerekkel a magzati diagnosztikában

Pikó Henriett dr.^{1*} ■ Illés Anett dr.^{1*} ■ Nagy Sándor dr.²
Beke Artúr dr.³ ■ Árvai Kristóf dr.⁴ ■ Elekes Tibor dr.⁵
Horváth Emese dr.⁶ ■ Ferenczy Miklós dr.⁷ ■ Mosonyi Péter dr.⁷
Lukács Valéria dr.⁷ ■ Klujber Valéria dr.⁸ ■ Török Olga dr.⁹
Kiss Zsuzsanna dr.¹⁰ ■ Tardy Erika dr.¹¹ ■ Tidrenczel Zsolt dr.¹¹
Tobiás Bálint dr.¹ ■ Balla Bernadett dr.¹ ■ Lakatos Péter dr.^{1**}
Kósa János dr.^{1**} ■ Takács István dr.^{1**}

¹Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Belgyógyászati és Onkológiai Klinika, Budapest

²Petz Aladár Egyetemi Oktató Kórház, Győr

³Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Budapest

⁴Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

⁵Genviron Prenatal, Székesfehérvár

⁶Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar, Orvosi Genetikai Intézet, Szeged

⁷Budapesti Bajcsy-Zsilinszky Kórház és Rendelőintézet, Budapest

⁸Heim Pál Országos Gyermekgyógyászati Intézet, Budapest

⁹Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Debrecen

¹⁰Vas Vármegyei Markusovszky Egyetemi Oktatókórház, Szombathely

¹¹Észak-pesti Centrumkórház – Honvédkórház, Budapest

Az *Orvosi Hetilap* Szerkesztősége felkérésére készített tanulmányukat a Szerzők
Korányi Sándor (1866–1944) belgyógyászprofesszor,
a 20. század első felének kiemelkedő orvosegyénisége emlékének
ajánlják halálának 80. évfordulóján.

Bevezetés: Az elmúlt évtized egyik jelentős technológiai újdonsága az ún. 'high-throughput' molekuláris genetikai vizsgálati módszerek – mint a kromoszomális microarray-analízis (chromosomal microarray analysis, CMA) és a teljesexom-szekvenálás (whole-exome sequencing, WES) – elterjedése a praenatalis diagnosztikában.

Célkitűzés: Az elmúlt 5 évben munkacsoportunk több mint 252 praenatalis vizsgálatot végzett hazai laboratóriumi háttérrel, amelyek indikációját különböző súlyosságú strukturális magzati ultrahangeltérések képezték. A klasszikus citogenetikai vizsgálatok eredményétől függően végeztük el a nagy felbontású CMA- és WES-analíziseket a praenatalis diagnosztika érdekében.

Módszer: A CMA-vizsgálatokat a „GeneChip System 3000 Instrument” platformmal végeztük az SNP-alapú komparatív hibridizálás módszerével. Az általunk elvégzett újgenerációs szekvenálás során a teljes humán exom szekvenciájának meghatározása IonTorrent és Illumina platformokkal történt.

Eredmények: Összesen 252 magzati CMA-vizsgálatot végeztünk, és 42%-ban mutattunk ki valamilyen hiányt vagy többletet, ebből 22%-ban igazoltunk kóros eltérést. 42 esetben végeztünk WES-t, amelyből 9 esetben (21,4%) azonosítottunk kóros eltérést az öröklésmentet támogató, a magzati fenotípussal feltételezhetően összefüggésben lévő, a ClinVar adatbázis vagy az ACMG-klasszifikáció alapján.

*A szerzők egyenlő mértékben járultak hozzá a kézirat elkészítéséhez.

**A szerzők utolsó szerzőként egyenlő mértékben járultak hozzá a kézirat elkészítéséhez.

Megbeszélés: Tekintettel arra, hogy a magzati fenotípus értékelése közvetett, a praenatalis CMA- és WES-elemzésnek elsősorban a magzati ultrahangvizsgálat során azonosítható strukturális anomáliákkal összefüggő génekre, kromoszomális régiókra kell korlátozódnia. A szülők vizsgálata mind a CMA-, mind a WES-analízisek során kiemelt jelentőséggel bír, főleg azokban az esetekben, amelyeknél a kapott eltérés nem hozható egyértelmű összefüggésbe az ultrahang-eltérésekkel.

Következtetés: Fontos meghatározni azokat a paramétereket, amelyek alapján a magzati mintában talált kópiaszám-eltéréseket és WES-vizsgálattal igazolt variánsokat a leletben közöljük (figyelembe véve a nemzetközi ajánlásokat). Ezek alapján a praenatalis klinikai genetikai tanácsadáskor sokkal használhatóbb információk adhatók.

Orv Hetil. 2024; 165(14): 523–530.

Kulcsszavak: CMA (chromosomal microarray analysis), kromoszomális microarray-analízis, WES (whole-exome sequencing), teljesexom-szekvenálás, praenatalis diagnosztika

Summary of the first Hungarian experiences with prenatal chromosomal microarray analysis and whole-exome sequencing

Introduction: One of the major technological innovations of the last decade has been the proliferation of high-throughput molecular genetic testing methods, such as chromosomal microarray analysis (CMA) and whole-exome sequencing (WES) in prenatal diagnostics.

Objective: Over the past 5 years, our working group has performed more than 252 prenatal examinations, indicated by ultrasound abnormalities of varying severity. Depending on the results of classical cytogenetic studies, we performed high-resolution CMA and WES analyses, with the aim to map the proportion of excess genetic information in the Hungarian population, as described in the literature.

Method: CMA studies were performed using the “GeneChip System 3000 Instrument” platform with SNP-based comparative hybridization. We also performed next-generation sequencing of the whole human exome using Ion-Torrent and Illumina platforms.

Results: A total of 252 fetal CMA examinations were performed and 42% showed some loss or gain, of which 22% showed pathogenic abnormalities. We performed WES in 42 CMA-negative cases, of which 9 (21.4%) were identified as pathogenic abnormalities supporting the inheritance process, with presumed association with fetal phenotype, based on the ClinVar database or ACMG classification.

Discussion: Given the indirect nature of fetal phenotype assessment, prenatal CMA and WES analysis should be limited primarily to genes and chromosomal regions associated with ultrasound-identifiable symptoms. Parental examination is of paramount importance in both CMA and WES analyses, especially in cases where the resulting disorder cannot be clearly associated with ultrasound abnormalities.

Conclusion: It is important to define the parameters by which copy number variations are detected in fetal samples. Recommendations for reporting variants confirmed by WES testing should also be given (taking international recommendations into account). These will provide more useful information for prenatal clinical genetic counselling.

Keywords: CMA (chromosomal microarray analysis), WES (whole-exome sequencing), prenatal diagnostics

Pikó H, Illés A, Nagy S, Beke A, Árvai K, Elekes T, Horváth E, Ferenczy M, Mosonyi P, Lukács V, Klujber V, Török O, Kiss Zs, Tardy E, Tidrenczel Zs, Tobiás B, Balla B, Lakatos P, Kósa J, Takács I. [Summary of the first Hungarian experiences with prenatal chromosomal microarray analysis and whole-exome sequencing]. Orv Hetil. 2024; 165(14): 523–530.

(Beérkezett: 2024. február 6.; elfogadva: 2024. február 8.)

Rövidítések

ACMG = (American College of Medical Genetics and Genomics) Amerikai Orvosi Genetikai és Genomikai Kollégium; ADGRV1 = (adhesion G protein-coupled receptor VI); ANO5 = (anoctamin 5); ATAD3A = (ATPase family AAA domain containing 3A); BP = (breakpoint) töréspont; BSCL2 = (BSCL2 lipid droplet biogenesis associated, seipin); CAPN3 = (calpain 3); CBL = Cbl protoonkogén; CC2D2A = (coiled-coil and C2 domain containing 2A); CMA = (chromosomal microarray analysis) kromoszomális microarray-analízis; CNV = (copy number variation) kópiaszám-eltérés; DNS = de-

zoxiribonukleinsav; EBP = (EBP cholestenol delta-isomerase) EBP kolesztenol delta-izomeráz; GJB2 = (gap junction protein beta 2); Kb = kilobázispár; KIF21A = (kinesin family member 21A); LCR = (low copy repeat) kis kópiaszámú ismétlődés; Mb = megabázispár; NAHR = (non-allelic homologous recombination) nem allélikus homológ rekombináció; NGS = (new-generation sequencing) újgenerációs szekvenálás; NHEJ = (non-homologous end joining) nem homológ végek összekapcsolása; NIPT = (non-invasive prenatal test) nem invazív praenatalis teszt; PTPN11 = (protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11); PUS3 = (pseudouridine synthase 3);

SNP = (single-nucleotid polymorphism) egy nukleotidot érintő polimorfizmus; SOS1 = (SOS ras/rac guanine nucleotide exchange factor 1); TEK = (TEK receptor tyrosine kinase); TNNT3 = (troponin T3, fast skeletal type); TPM3 = (tropomyosin 3); VCF = velocardiocardialis; VMCM = mucocutan vénás malformációk; VUS = (variant of uncertain significance) ismeretlen jelentőségű eltérés; WES = (whole-exome sequencing) teljesexom-szekvenálás

A praenatalis diagnosztika célja a méhen belül fejlődő magzat rendellenességeinek feltérképezése, időben történő diagnosztizálása, a házaspárok számára azon lehetőség biztosítása, hogy a törvényi kereteken belül dönthessenek magzatuk betegsége esetén annak sorsáról. A praenatalis szűrés és diagnosztika jelenlegi két alappillére a nagy felbontású ultrahangtechnika és a célzott biopszia (lepényszövet, magzatvíz, esetleg magzati szövetek) során nyert minta hagyományos citogenetikai vagy molekuláris biológiai elemzése. A terhesség 10–14. hete között elvégezhető a chorionboholy-mintavétel, a 15–20. hete között pedig az amniocentesis. Évtizedek óta a lepényi, illetve a magzatvízmintából elvégzett hagyományos citogenetikai vizsgálat (kariotipizálás) a praenatalis genetikai diagnosztika „arany standard” módszere, amely a magzati kromoszómák számbeli és durva szerkezeti rendellenességeinek kimutatására alkalmas. A módszer által a magzati testi és nemi kromoszómák számbeli (például triszómiák és monoszómiák) és bizonyos szerkezeti rendellenességeik (például törések, transzlokációk, többletek, hiányok) kimutatása lehetséges. A jelenleg alkalmazott, ún. hagyományos kromoszómavizsgálat felbontási határa kb. 10–12 Mb nagyságú. Az ennél kisebb méretű eltérések nem mutathatók ki fénymikroszkóp-alapú klasszikus citogenetikai módszerekkel [1].

A hagyományos citogenetikai vizsgálat nem felismerhető, 1–5 Mb tartományú, több gént is érintő eltérések következményeképpen gyakran sokrétű, súlyos tünetegyüttesek alakulhatnak ki, melyeket microdeletiók/mikroduplicációk körképeknek nevezünk. Ezek a szindrómák általában súlyos kórállapotok, amelyek értelmi fogyatékosággal, idegrendszeri tünetekkel, komplex szervi rendellenességekkel járhatnak. A kromoszómális microarray-analízis (CMA) módot biztosít a kis méretű hiányok/többletek (microdeletiók és mikroduplicációk, illetve kópiaszám-eltérések [CNV-k]) azonosítására [2, 3].

Az újgenerációs szekvenálás (NGS) a 2010-es évektől óriási előrelépést biztosított a néhány nukleotidot érintő eltérések azonosítására és azok megismerésére a különböző betegségekkel összefüggésben a teljesexom-szekvenálás (WES) segítségével. Ez a nagy áteresztőképességű újgenerációs módszer a költségek csökkenésével és a bioinformatikai algoritmusok fejlődésével mára a praenatalis diagnosztika megkerülhetetlen részévé vált [4]. A WES-vizsgálat pozitív hozzáadott értéke a CMA és a kariotipizálás negatív eredménye után 8–10% körüli

[5, 6], de egyes közlemények szerint akár a 80%-ot is elérheti, és erősen korrelál a magzati rendellenességek számával [7, 8].

Célkitűzés

Munkacsoportunk a saját tapasztalatai alapján a nemzetközi előírásoknak megfelelően kialakított egy diagnosztikai algoritmust, amely szerint praenatalis genetikai vizsgálatok indikációjakor i) elsőként hagyományos kariotipizálást indítunk, ennek negatív eredménye esetén, ii) nagyobb felbontóképességű CMA következik, amelynek negativitása esetén iii) WES-vizsgálattal folytatva a diagnosztikai sort, az egyponos nukleotideltérések azonosíthatók. Célunk a fentiek szerint végzett eddigi vizsgálatainkból lesűrhető következtetések elemzése.

Módszer

A CMA-vizsgálatokat GeneChip System 3000 Instrument (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) platformmal végeztük: a hibridizációhoz a GeneChip Hybridization Oven 645 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) hibridizációs kamrát, a mosási lépéshez a GeneChip Fluidics Station 450 (Thermo Fisher Scientific) készüléket, a jelintenzitás mérésére a GeneChip Scanner 3000 7G (Thermo Fisher Scientific) készüléket használtuk.

A vizsgálat egy SNP-alapú komparatív genomialis hibridizációs módszeren alapul. A DNS-mintát NspI enzimmal különböző méretű darabokra emésztjük, majd ezekhez egy adapter molekulát kötünk, amellyel teljesgenom-amplifikálást végzünk. Az amplifikált mintát jelöljük (biotinnal), majd hibridizáljuk az array szilárd fázisán lévő 25 nukleotidból álló oligonukleotid-próbákhoz, amelyekkel a teljes humán genomot lefedjük. Ezután a mosási lépésnél a be nem kötődő DNS-darabokat és egyéb szennyeződések eltávolítjuk a szilárd fázisról, és a biotinnal jelölt és a próbákhoz bekötődött DNS-darabokat sztreptavidin-fikoeritrin komplexszel festjük. Így létrejön egy biotin-sztreptavidin-fikoeritrin komplex, amely gerjeszthető, és az 572 nm-es tartományban emittál. A jelintenzitás mérésekor az emittálójelet a kópia-szám arányának megfelelően detektálja a készülék, és a végső analízissel vizualizálhatjuk az egyes kromoszómákat, amelyekben az esetleges hiányt vagy többletet is megjelöli a rendszer.

Az általunk elvégzett NGS során a teljes humán exom szekvenciáját meghatároztuk 42 praenatalis minta esetében. A szekvenálás IonTorrent (Thermo Fisher Scientific) és Illumina (Illumina, San Diego, MA, USA) platformokon történt. A megfelelő minőségű és mennyiségű genomialis DNS kivonását követően, a könyvtárkészítés első lépéseként felsokszoroztuk a teljes humán exomot, majd több tisztítási és jelölési lépés után, amelyek lehetővé tették a multiplex párhuzamos szekvenálást, a kész könyvtárak koncentrációját ellenőriztük. Ezután a könyv-

tárat ekvimoláris mennyiségben felvittük a szekvenálófélületre (IonChip vagy FlowCell). A szekvenálást követően a keletkezett szekvenciák illesztését a referenciagenomhoz (hg37) és azt követően a variánshívást GATK v4.1.4.1 szoftverrel végeztük, a talált variánsok annotálása és interpretálása során a 'Franklin by Genoox'-ot használtuk.

A genetikai vizsgálat elvégzéséhez a páciensek minden esetben beleegyező nyilatkozatot írtak alá, és az adatok retrospektív feldolgozása anonimizált módon történt.

Eredmények

Összesen 252 praenatalis citogenetikai vizsgálatot végeztünk. A CMA-vizsgálat indikációja az esetek 92,8%-ában valamilyen strukturális magzati ultrahangeltérés volt (1. táblázat). A WES-vizsgálat javallata általában a negatív karyotipus és CMA, illetve a genetikai okot valószínűsítő ultrahangeltérés volt. Az ultrahangeltérések közül a leggyakoribbak a magzati hydrops, a cysticus hygroma, valamint a vastag nyaki redő (40,60%), a craniospinalis és craniofacialis rendellenességek (20,51%), valamint a cardiovascularis rendellenességek (17,95%) voltak (2. táblázat) [9–11].

A vizsgált magzati minták közül 147 (58%) esetben nem mutattunk ki semmilyen eltérést a CMA-módszerrel, az Affymetrics Optima közepes felbontóképességű array alkalmazásával. A többi esetben 105-nél (42%) mutattunk ki eltérést (hiányt vagy többletet) a CMA-vizsgálattal, amelyek közül 22%-ban igazoltunk kóros eltérést, 6 esetben (2%) pedig teljes kromoszómát érintő triszómiát a 21. kromoszómán (5 magzatnál), illetve a 18. kromoszómán (1 magzatnál). A leggyakoribb eltéréseket és azok elhelyezkedését a 3. táblázat tartalmazza.

Három esetben a szülők kiegyensúlyozott transzlokációt hordoztak, amely a magzatnál kiegyensúlyozatlan állapotot idézett elő: i) az apánál a t(9;20)(p24;p12) és a

1. táblázat | CMA- és WES-vizsgálataink indikációi (252 eset)

	Eset (n)	%
Magzati strukturális ultrahangeltérés (lásd 2. táblázat)	234	92,8%
Pozitív NIPT-lelet	2	0,8%
Terhelő anamnézis	4	1,6%
Kariotipizálással igazolt CNV esetén (töréspontok meghatározása)	2	0,8%
Kariotipizálással igazolt marker kromoszóma	2	0,8%
Szülőknél kiegyensúlyozott transzlokáció	3	1,2%
Spontán vetélés (abortumvizsgálata)	3	1,2%
Halvaszülés (24. hét utáni elhalás)	2	0,8%
Összesen	252	100%

CMA = kromoszomális microarray-analízis; CNV = kópiaszám-eltérés; NIPT = nem invazív praenatalis tesztelés; WES = teljesexom-szekvenálás

2. táblázat | CMA- és WES-vizsgálatok strukturális magzati ultrahangeltérés miatt

Szervrendszer	Eset (n)	%
Magzati hydrops, cysticus hygroma, vastag tarkóredő	95	40,60%
Craniospinalis és craniofacialis rendellenességek	48	20,51%
Cardiovascularis rendellenességek	42	17,95%
Egyéb thoracalis rendellenességek	6	2,56%
Hasfali és hasi rendellenességek	7	2,99%
Urogenitalis rendellenességek	8	3,42%
Végtag-anomáliák és csontosodási zavarok	14	5,98%
Egyéb strukturális ultrahangeltérések	14	5,98%
Összesen	234	100%

CMA = kromoszomális microarray-analízis; WES = teljesexom-szekvenálás

magzatnál a 9p24.3p24.1 régióban microdeletio, a 20p13p12.1 régióban 14,755 Mb méretű mikroduplikáció; ii) az anyánál a t(4;5)(p16;p15) és a magzatnál a 4p16.3p16.2 régióban 4,984 Mb méretű microdeletio és az 5p15.33p14.3 régióban 19,389 Mb méretű mikroduplikáció; iii) az anyánál a t(4;8)(p16;p23) és a magzatnál a 4p16.3p15.2 régióban 23,697 Mb méretű mikroduplikáció és a 8p23-3p23.1 régióban 6,474 Mb méretű microdeletio.

Egy esetben igazoltunk „összetett heterozigótaságot”, amelyet a CMA-val az anyai allélon 4,138 Mb méretű (arr[GRCh38]12q12(38620776_42758565)x1) heterozigóta deletióként azonosítottunk, és az apai allélon WES-analízissel az ebben a régióban elhelyezkedő *KIF21A* génben 1 bázist érintő deletio heterozigótahordozóságát mutattuk ki [12]. A két kóros eltérés együttes hatásaként a családban két érintett magzatnál súlyos, már magzati korban kimutatható kóros tüneteket

3. táblázat | A leggyakoribb kópiaszám-eltérések

Kópiaszám -eltérés	Jellemzés	Eset (n)	%
16p11.2	Ismert LCR/SD régió/VUS	23	30,26%
3q24q29:	Ismert LCR/SD régió*	8	10,52%
8p22p24.3:	LOH polimorf régió**	8	10,52%
16p13.11p12.3:	Ismert LCR/SD régió	7	9,21%
Xq21.31q21:	VUS	7	9,21%
15q11.2q13.3:	Ismert BP- (1–3) régió*	6	7,89%
4p16.3p16.2:	Telomer régió	5	6,58%
9p24.3p24.3:	Telomer régió	4	5,27%
22q11.21:	DiGeorge-régió	4	5,27%
20q13.33q14.33	Telomer régió	4	5,27%
Összesen		76	100%

*LCR = alacsony kópiaszámú ismétlődés

**LOH = heterozigótaság elvesztése

BP = töréspont; LCR = alacsony kópiaszámú ismétlődés; SD = szegmentális duplikáció; VUS = ismeretlen jelentőségű eltérés

írtak le (asphyxiás thorax szindróma, orrgyöki oedema, a magzat törzsén is megfigyelhető oedema, borderline cerebraalis ventriculomegalia). 3 esetben elhalt magzati szövetből izolált DNS-mintából végeztük a CMA-t, és 1 esetben triszómiát igazoltunk a 18. kromoszómán, 1 esetben pedig részleges triszómiát a 9. kromoszómán (1. táblázat).

A munkacsoportunk által alkalmazott vizsgálati sorrendben, azokban az esetekben, amelyeknél a klasszikus citogenetika és a CMA-k sem mutattak ki eltérést, további vizsgálatként a WES-analízissel igyekeztünk feltérképezni az ismert kóroki pontmutációt. Az általunk elvégzett NGS során a teljes humán exom szekvenciáját meghatároztuk 42 praenatalis minta esetében. A WES-vizsgálattal 9 esetben (21,4%) azonosítottunk az öröklésmentet támogató, a magzati fenotípussal feltételezhető összefüggésben lévő kóros eltérést a ClinVar adatbázis vagy az ACMG-klasszifikáció alapján.

A pozitív eredmények közül 2 esetben a *PTPN11* génben (c.922A>G p.Asn308Asp és c.923A>C p.Asn308Thr), 1 esetben az *SOS1* génben (c.1644T>A p.Ser548Arg) és 1 esetben az *EBP* génben (c.338+1_338+2del) azonosítottunk kóros *de novo* variánst. További 1 esetben az érintett édesanya ugyanazt az arthrogyposissal társult eltérést hordozta, mint a tünetes magzat (TNNT3:c.188G>A p.Arg63His). 2 esetben az autoszomális recesszív öröklésmentet támogató összetett heterozigóta statust láttunk súlyos ciliopathiával (CC2D2A:c.4552C>T p.Arg1518Trp és c.4675-1G>C) és multiplex arthrogyposissal társuló súlyos fetalis akinesiót. Mindkét esetben a családi szegregációs vizsgálat megerősítette az öröklésmentet. 2 további esetben az azonosított variánsokat (CBL c.1754G>T p.Arg585Leu és TEK c.2744G>A p.Arg915His) olyan génekben írták le, amelyeknél a génekkel összefüggésbe hozott fenotípus megfeleltethető ugyan az ultrahangképnek, de a variáns kóroki szerepét a rendelkezésre álló adatok nem támasztják alá egyértelműen.

A WES-vizsgálatok során 18 esetben azonosítottunk olyan véletlen/másodlagos találatot, amely a ClinVar adatbázis vagy az ACMG-klasszifikáció szerint kóros vagy valószínűleg kóros besorolású (4. táblázat). Ezekben az esetekben a génekkel összefüggésbe hozott fenotípusos jegyek nem feleltek meg egyértelműen az ultrahangképnek, de mindegyik súlyos kórképpel társult.

Megbeszélés

A CMA-vizsgálatok során 99 esetben igazoltunk microdeletiót vagy mikroduplikációt a magzati mintában. Az esetek nagy száma azt is igazolta, hogy a szakirodalomban leírt genomiális szerkezeti formák befolyásolhatják a microdeletiók és mikroduplikációk előfordulási gyakoriságát. Ilyen szerkezeti elemek például az ún. „low copy repeat” (LCR)/szegmentált duplikációs régiók: ezek olyan, 10–300 Kb méretű ismétlődő szekvenciák, amelyek meioticus osztódáskor az ún. nem allélikus homo-

4. táblázat | Feltételezett incidentális találatok a praenatalis WES-vizsgálati csoportban

Gén	Variáns	ClinVar szerinti besorolás	ACMG-klasszifikáció
<i>ATAD3A</i>	c.229C>G p.Leu77Val	P/VUS	LP
<i>ANO5</i>	c.2272C>T p.Arg758Cys	P/LP	LP
<i>CFI</i>	c.772G>A p.Ala258Thr	P/LP	LP
<i>ROBO4</i>	c.190C>T p.Arg64Cys	P	P
<i>PROS1</i>	c.701A>G p.Tyr234Cys	P/LP	LP
<i>ANO5</i>	c.692G>T p.Gly231Val	P/LP	LP
<i>GATA4</i>	c.487C>T p.Pro163Ser	P/VUS	LP
<i>GATA4</i>	c.34G>C p.Gly12Arg	VUS	LP
<i>RPS7</i>	c.298A>T p.Ile100Phe	–	LP
<i>PAH</i>	c.506G>A p.Arg169His	LP	P
<i>F2</i>	c.*97G>A	P/VUS	LP
<i>ADGRV1</i>	c.9623+1G>A	LP	P
<i>F11</i>	c.1693G>A p.Glu565Lys	LP/VUS	LP
<i>BSCL2</i>	c.974dupG p.Ile326fs	P/LP	P
<i>PUS3</i>	c.212A>G p.Tyr71Cys	P/VUS	LP
<i>GJB2</i>	c.35del p.Gly12ValfsTer2	P	P
<i>CAPN3</i>	c.550del p.Thr184ArgfsTer36	P	P
<i>TPM3</i>	c.253G>T p.Glu85Ter	–	LP

ACMG = az Amerikai Orvosi Genetikai és Genomikai Kollégium által megalkotott variánsosztályozási rendszer alapján a Franklin-platform által számított variánsklasszifikáció; ClinVar = a ClinVar adatbázis alapján a jelenlegi tudásunk szerinti legvalószínűbb besorolás; LP = valószínűleg kóros (patogén); P = kóros (patogén); VUS = ismeretlen jelentőségű eltérés; WES = teljesexom-szekvenálás

lóg rekombináció (NAHR) során az utódsejtben microdeletiókat vagy mikroduplikációkat alakíthatnak ki [13]. Így például a szakirodalomban leírtak alapján a 16. kromoszóma p13.1, p12.3, p12.2, p11, q22.2 és q23 régióban olyan LCR-ek találhatók, amelyek változatos méretű és különböző töréspontú átrendezéseket idézhetnek elő a meioticus osztódáskor. Bár ezek az LCR-ek a 16. kromoszóma pericentromer régiójának ún. génszegény környezetében helyezkednek el, az érintett génektől függetlenül bizonyos esetekben mégis kóros fenotípushoz vezethetnek. Az általunk vizsgált magzati mintákban a legnagyobb gyakorisággal mutattuk ki az ebben a régióban található 16p11.2 microdeletiót vagy mikroduplikációt (23%). A szakirodalom alapján ez az eltérés nagy valószínűséggel nem jár tünetekkel (VUS-kategória) [14].

A szegmentális duplikációk (legismertebb formájuk az ún. tandem duplikáció) a genom több mint 6%-át teszik ki. Ezek az ismétlődések szintén okozhatnak a genomban strukturális változásokat, mind a NAHR, mind a nem homológ végek összekapcsolása (NHEJ) révén. Ez utóbbi következményeként, a kettőzött DNS-darabka – extrakromoszomális helyzetbe kerülve, majd visszail-

leszkezdve a genomba – kialakíthat DNS-többletet vagy -hiányt, illetve az inszertálódás során, ha az 1 gént érint, monogén kóros fenotípust is [15].

Vizsgált magzati mintáinkban a negyedik leggyakoribb (4%-os) előfordulással találtunk többletet vagy hiányt a jól ismert, kóros fenotípussal járó 22q11.21 régióban, amelynél szintén a fent említett LCR szegmentált duplikációs régiók jelenléte áll a microdeletiók vagy mikroduplikációk kialakulásának hátterében. A vizsgált minták közül mind deletiót, mind duplikációt igazoltunk: az igazolt mikroduplikáció az LCR22-2 (A) és az LCR22-3b (C) régiókat érintette. A postnatalis esetekben a kóros fenotípust fejlődési és intellektuális elmaradás, fizikális eltérések, mint például hypotonia, közepesen dysmorfhiás arc, valamint microcephalia jellemezte.

Az igazolt deletiós magzati esetek a 22q11.21 deletiós szindrómának (DiGeorge/VCF) feleltek meg. Ezekben a proximális és centrális régiók érintettsége volt kimutatható (LCR22-2 [A] – LCR22-5 [E]) [16, 17]. A 15. kromoszóma 15q11.2-q13.1, ún. kritikus régiója, a BP1–BP3 és a BP2–BP3 bármilyen CNV-je (microdeletio és mikroduplikáció) kockázatot jelenthet a fejlődésmaradással járó kórképekre, illetve az autizmus-spektrum-betegségekre [18, 19]. A vizsgált magzati minták 6%-ában igazoltunk valamilyen eltérést ebben a régióban, amelyek esetleges neuropszichiátriai kórképekkel társulhatnak.

A szülőknél klasszikus citogenetikai módszerrel (G-sávozás) kimutatott kiegyensúlyozott transzlokáció esetén, a magzati ultrahangeltérés mellett, minden esetben invazív mintavétel szükséges, mivel a szülői kiegyensúlyozott transzlokáció könnyen kiegyensúlyozatlanná válhat a magzatban. A vizsgált populációban 3 esetben a szülők kiegyensúlyozott transzlokációt hordoztak, és a magzati mintákban ez mindhárom esetben kiegyensúlyozatlan állapotot idézett elő, amely kóros fenotípussal társult.

Kiemelendők azok az esetek, amelyeknél az ún. „összetett heterozigótaság” az ok a kóros fenotípus kialakításáért. 1 esetben igazoltunk összetett heterozigótaságot CMA- és WES-vizsgálatokkal, amely súlyos kóros magzati ultrahangképpel is járt: az érintett magzati mintában az édesanyától örökölt heterozigóta 4,138 Mb méretű deletiót és az édesapától ebben a régióban található, egy bázist érintő deletiót találtunk, amely mint összetett heterozigóta állapot súlyos fenotípussal társult már magzati korban. Az összetett heterozigótaság hátterében véletlen események állhatnak, ezért is fontos a pontmutációk esetleges meglétének kizárása szekvenálással azokban az esetekben, amelyekben a CMA-vizsgálat heterozigóta-hiányt vagy -többletet igazolt, és autoszomális recesszíven öröklődő gén is érintett.

Azokban az esetekben, amelyeknél sem a klasszikus citogenetika, sem a CMA-vizsgálat nem igazolt kóros eltérést, a következő lépésként WES-vizsgálatot végeztünk [20, 21]. Vizsgálataink során 9 esetben azonosítottunk a magzati fenotípusnak megfeleltethető génben feltételezhetően kóros eltérést, 3 esetben Noonan-

szindrómával és 1 esetben Noonan-szerű szindrómával összefüggésbe hozható génben (*PTPN11*, *SOS1*, *CBL*) aminosavcserével járó variánst. Az elvégzett családi szegregációs vizsgálatok során az utóbbi variánst a szülők is hordozták, így ennek besorolását módosítottuk.

Vázrendszeri rendellenességekkel összefüggésben 3 génben (*TNNT3*, *KIF21A*, *ABP*) találtunk feltételezhetően kóros variánst. Az egyik esetben az autoszomális dominánsan öröklődő fenotípust megerősítette, hogy a tünetes édesanya is hordozta az eltérést, míg a másik, dominánsan öröklődő fenotípus esetében a variáns *de novo* eredete volt valószínűsíthető. A harmadik esetben a gyermek a hordozó szülőktől örökölte összetett heterozigóta formában az azonosított variánsokat. A kardiológiai tünetekkel jellemzett magzat esetében az azonosított variáns kóros szerepe nem nyert megerősítést. Az irodalmi adatok alapján feltételezhető az ok-okozati viszony, a *TEK* génben általunk kimutatott variánst korábban egy VMCM-vel (vénas malformációk, többszörös bőr- és nyálkahártya-rendellenességgel) érintett családban azonosították, ahol az édesanya is érintett volt. Esetünkben a család visszautasította a további vizsgálatot.

1 esetben a magzati ultrahangvizsgálat alapján cilio-pathia gyanújával összetett heterozigóta formában azonosítottunk két, feltételezhetően kóros eltérést a *CC2D2A* génben, ahol a variánsok *transz*-helyzetét a családi szegregációs vizsgálat megerősítette. Az eredmény közlésekor magzati vizsgálat esetében is elsősorban a meglévő fenotípusos jegyek mentén zajlik a kiértékelés. Mivel ezek az információk praenatalisan csak közvetve vagy korlátozottan állnak rendelkezésünkre, és a terhesség során változhatnak, a variánslista további szűkítése célszerű. Erre alkalmas lehet az érintett génekhez társult betegségek öröklésmenete, illetve a betegségek megnyilvánulásának jellemző időpontja vagy a megjelenő fenotípus súlyossága [22, 23].

A bizonytalan jelentőségű variánsok (VUS), a véletlen és másodlagos találatok szintén komoly kihívást jelentenek a laboratóriumok és a klinikusok számára. A véletlen (incidentális) találatok a klinikai indikációtól függetlenül azonosított variánsok. A másodlagos találatok az ACMG szakértői által összeállított és validált génlistán szereplő eltérések, amelyek nem kapcsolódnak az elsődleges fenotípusos megjelenéshez, de az orvosi döntéshozatal folyamatában felhasználható információt hordozhatnak. Az általunk vizsgáltak között 18 esetben azonosítottunk autoszomális domináns kórképpel összefüggésben a ClinVar adatbázis vagy az ACMG-klasszifikáció szerinti kóros vagy valószínűleg kóros eltérést [24, 25]. Az azonosított variánsoknál megvizsgáltuk a fenotípusos jegyeket, az irodalmi adatokat és – ahol volt lehetőségünk – a szülői mintákat is [26]. Az áttekintés során az azonosított variánsokat nagyobb csoportokba tudtuk sorolni. A legtöbb, általunk azonosított variáns patogenitására vonatkozó adat autoszomális recesszív kórkép hátterében került közlésre, illetve néhány esetben az autoszomális domináns szerep még nem kellőképpen volt alátá-

masztva (például *BSCL2*, *PUS3*, *GJB2*, *CAPN3*, *TPM3*, *ADGRVI*, *ANO5*, *ATAD3A* gének). Ezeknél a géneknél a klinikai újraértékelés, a magzati fenotípus ismételt elemzése, a különböző molekuláris technikák összehasonlítása, a családi szegregációs vizsgálat és az irodalmi adatok újbóli áttekintése segítheti a döntést az eredmény közzlésére vonatkozóan [27–29].

Következtetés

A praenatalis vizsgálatokban a klasszikus citogenetikai vizsgálatok mellett egyre inkább teret hódítanak a nagy felbontóképességű eljárások, mint a CMA- és WES-vizsgálati módszerek. A nemzetközi protokollokat alapul véve, saját tapasztalataink alapján, terhelő anamnézis esetén a CMA-vizsgálat hasznosnak és gyorsan kivitelezhetőnek bizonyult a pozitív ultrahangvizsgálat és/vagy NIPT-eredmény megerősítésére. A CMA-módszer alkalmas továbbá klasszikus citogenetikai vizsgálattal igazolt, de sávózási technikával nem vagy nehezen meghatározható eredetű többlet eredetének pontos meghatározására is, és megbízhatóan alkalmazható szám feletti marker kromoszómák eredetének meghatározására és szülőknél kimutatott kiegyensúlyozott transzlokáció esetén a magzatban esetleg kialakuló kiegyensúlyozatlan eltérések felismerésére is.

Vetélesek esetén azokban az esetekben alkalmazhatjuk a CMA-módszert, amelyeknél a klasszikus citogenetikai módszerekkel nem lehet vizsgálni a sejteket, mivel esetleg a sejtek már nekrotizált állapotba kerültek, és nem képesek osztódni. Tapasztalataink alapján az ultrahangvizsgálattal megállapított magzati elhalást követően rövid időn belül kell az abortumból a DNS-izolálást elvégezni, mert az esetleges nekrotikus folyamatok beindulása befolyásolhatja a CMA-vizsgálat eredményességét.

Sok esetben mutattunk ki microdeletiót vagy mikroduplikációt. A nemzetközi ajánlásokat figyelembe véve közöltük ezeket a leletekben: i) a kóros és nagy valószínűséggel kóros eltéréseket minden esetben közöltük, ii) méret alapján mikroduplikáció esetén az 1 Mb méretnél nagyobb eltérést, illetve microdeletio esetén a 0,5 Mb méretnél nagyobb eltérést ismertettük, iii) az ACMG-standard szerint a CNV-re számolt pontérték alapján is meghatározható az adott eltérés patogenitása, iv) adatbázisokat is felhasználtunk (Decipher, ClinVar, ClinGen), hogy az érintett régióban leírt postnatalis esetek, valamint az érintett génekre jellemző tulajdonságok alapján (például dózisszenzitív az érintett gén, vagy nem) fenotípus-előrejelzést adhassunk.

A WES-vizsgálatok indikációja jelenleg még nem olyan széles körű, mint a CMA-vizsgálatoké, de minden olyan esetben, amelynél a genetikai eredet valószínűsíthető, és az előzetes hagyományos kariotipizálás, valamint CMA-vizsgálat negatív eredménnyel zárult, javasolt a WES elvégzése. Ahol a terhesség előrehaladott kora szükségessé teszi, javasolható a CMA- és a WES-vizsgálatok egyidejű indítása. Abban az esetben, ha a családi

kórtörténet vagy a magzati fenotípus nukleotidszintű genetikai hátteret feltételez, a WES megelőzheti a CMA-t [6, 30].

Összességében, a CMA 22%-ban (252 esetből), a WES pedig 21,9%-ban (42 esetből) adott többletinformációt a klasszikus citogenetikához képest. A nemzetközi szakirodalomban megjelent publikációkban erre eltérő százalékokat adnak meg: CMA-ra 6–10%-os és 20%-os értéket [31, 32], míg WES-re a legalacsonyabb 6,2% és a legmagasabb 57,1% [33]. A különbségek a különböző platformok alkalmazásából adódhatnak: CMA esetén a nagyobb felbontóképességű array több eltérést képes kimutatni, valamint a leletben közölt eltérések méretének megválasztásával is eltérő százalékos adatok kaphatók. A G-sávózás, a CMA és a WES összességében kb. 35%-ban tud genetikai érintettséget azonosítani, míg a fennmaradó 65%-ban teratogén hatások állhattak a kóros ultrahangeltérés és a magzati fejlődési rendellenesség hátterében. Ezek alapján munkacsoportunk fontosnak tartotta, hogy – a nemzetközi ajánlásokat figyelembe véve és a nemzeti sajátosságokat hozzátéve – egységes praenatalis diagnosztikai protokollt alakítson ki a CMA- és WES-vizsgálatokra vonatkozólag.

Fontos megemlíteni, hogy sem a CMA, sem az egész genomra kiterjedő szekvenálási módszerek nem képesek minden genetikai rendellenességet kimutatni vagy teljesen kizárni. A ritka rendellenesség fennmaradó kockázata, különösen a többszörös veleszületett rendellenességek esetén, fontos szempont a tanácsadás során.

Megjegyzés: A vizsgálatok a napi rutin részét képezik, amelyhez nem szükséges kutatási engedély. A genetikai vizsgálatokhoz minden esetben beleegyező nyilatkozatot töltöttek ki a betegek, és ezt az adott intézeti egység a törvényben meghatározott időtartamig tárolja.

Anyagi támogatás: A közlemény megírásához a szerzők anyagi támogatásban nem részesültek.

Szerzői munkamegosztás: P. H.: CMA-vizsgálatok kivitelezése és kiértékelése, az eredmények összegzése. I. A.: WES-vizsgálatok kiértékelése és összegzése. K. J., T. B., B. B.: A tudományos eredmények összegzése és értékelése. N. S., B. A., H. E., T. O., T. Zs.: Mintavétel, genetikai tanácsadás, az eredmények összegzése. Á. K.: WES-vizsgálatok kivitelezése, kiértékelése és az eredmények összegzése. E. T., L. V., K. V., K. Zs., T. E.: Genetikai tanácsadás, az eredmények összegzése. F. M., M. P.: Mintavétel, genetikai tanácsadás. L. P.: A tudományos eredmények kiértékelése és összegzése, valamint a nemzeti stratégiák meghatározása. T. I.: A tudományos eredmények kiértékelése és összegzése, valamint a nemzeti stratégiák meghatározása. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekeltségek: A szerzőknek a cikkel kapcsolatosan nincsenek érdekeltségeik.

Köszönetnyilvánítás

A közlemény az Innovációs és Technológiai Minisztérium 2020-4.1.1.-TKP2020-MOLOKRIV pályázatának támogatásával és a Magyar Kutatási Hálózat, HUN-REN-SE, Endokrin Molekuláris Patológiai Kutatócsoportjával történő együttműködés keretében készült.

Irodalom

- [1] Beke A, Papp C, Tóth-Pál E, et al. Cytogenetic exploration of fetal ultrasound anomalies. [Ultrahangvizsgálattal észlelt magzati anomáliák citogenetikai feltárása.] *Orv Hetil.* 2004; 145: 2123–2133. [Hungarian]
- [2] Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010; 86: 749–764.
- [3] Langlois S, Duncan A. Use of a DNA method, QF-PCR, in the prenatal diagnosis of fetal aneuploidies. *J Obstet Gynaecol Can.* 2011; 33: 955–960.
- [4] Pratt M, Garritty C, Thuku M, et al. Application of exome sequencing for prenatal diagnosis: a rapid scoping review. *Genet Med.* 2020; 22: 1925–1934.
- [5] Chandler NJ, Scotchman E, Mellis R, et al. Lessons learnt from prenatal exome sequencing. *Prenat Diagn.* 2022; 42: 831–844.
- [6] Fu F, Li R, Yu Q, et al. Application of exome sequencing for prenatal diagnosis of fetal structural anomalies: clinical experience and lessons learned from a cohort of 1618 fetuses. *Genome Med.* 2022; 14: 123.
- [7] Drury S, Williams H, Trump N, et al. Exome sequencing for prenatal diagnosis of fetuses with sonographic abnormalities *Prenat Diagn.* 2015; 35: 1010–1017.
- [8] Yadava SM, Ashkinadze E. Whole exome sequencing for prenatal diagnosis in cases with fetal anomalies: criteria to improve diagnostic yield. *J Genet Couns.* 2019; 28: 251–255.
- [9] Fiorentino F. Referee commentary Re: Hillman SC, McMullan DJ, Hall G, et al. Use of prenatal chromosomal microarray: prospective cohort study and systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013; 41: 610–620. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013; 41(6): 608.
- [10] Novelli A, Grati FR, Ballarati L, et al. Microarray application in prenatal diagnosis: a position statement from the cytogenetics working group of the Italian Society of Human Genetics (SIGU). *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012; 39: 384–388.
- [11] Gardiner C, Wellesley D, Kilby MD, et al. Recommendations for the use of chromosome microarray in pregnancy. The Royal College of Pathologists, 2015. 1–17. Available from: <https://www.rcpath.org/resourceLibrary/recommendations-for-the-use-of-chromosome-microarray-in-pregnancy.html> [accessed: 5 February, 2024].
- [12] Falb RJ, Müller AJ, Klein W, et al. Bi-allelic loss-of-function variants in *KIF21A* cause severe fetal akinesia with arthrogryposis multiplex. *J Med Genet.* 2023; 60: 48–56.
- [13] Molina O, Blanco J, Anton E, et al. High-resolution fish on DNA fibers for low-copy repeats genome architecture studies. *Genomics* 2012; 100: 380–386.
- [14] WU X, Xu L, Li Y, et al. Submikroskopos aberrations of chromosome 16 in prenatal diagnosis. *Mol Cytogenet.* 2019; 12: 36.
- [15] Schimmel J, van Wezel MD, van Schendel R, et al. Chromosomal breaks at the origin of small tandem DNA duplications. *Bioessays* 2023; 45: e2200168.
- [16] Burnside RD. 22q11.21 Deletion syndromes: a review of proximal, central, and distal deletions and their associated features. *Cytogenet Genome Res.* 2015; 146: 89–99.
- [17] Tidrenczel Zs, P. Tardy E, Ladányi A, et al. Prenatally detected aortic arch anomalies and their consequences after birth. [Prenatalisan felismert magzati aortaív-rendellenességek és megszületés utáni következményeik.] *Orv Hetil.* 2023; 164: 1111–1120. [Hungarian]
- [18] Kalsner L, Chamberlain SJ. Prader-Willi, Angelman, and 15q11-q13 duplication syndromes. *Pediatr Clin North Am.* 2015; 62: 587–606.
- [19] Bokor BA, Török D, Horváth E, et al. Diagnosis of *MECP2* duplication in a child and prenatally. [MECP2-gén-duplikáció gyermekkori és prae-natalis diagnózisa.] *Orv Hetil.* 2024; 165: 30–34. [Hungarian]
- [20] Chandler NJ, Scotchman E, Mellis R, et al. Lessons learnt from prenatal exome sequencing. *Prenat Diagn.* 2022; 42: 831–844.
- [21] Pratt M, Garritty C, Thuku M, et al. Application of exome sequencing for prenatal diagnosis: a rapid scoping review. *Genet Med.* 2022; 22: 1925–1934.
- [22] Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015; 17: 405–424.
- [23] Mellis R, Oprych K, Scotchman E, et al. Diagnostic yield of exome sequencing for prenatal diagnosis of fetal structural anomalies: a systematic review and meta-analysis. *Prenat Diagn.* 2022; 42: 662–685.
- [24] Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015; 17: 405–424.
- [25] Guadagnolo D, Mastromoro G, Di Palma F, et al. Prenatal exome sequencing: background, current practice and future perspectives – a systematic review. *Diagnostics* 2021; 11: 224.
- [26] Tran Mau-Them F, Delanne J, Denommé-Pichon AS, et al. Prenatal diagnosis by trio exome sequencing in fetuses with ultrasound anomalies: a powerful diagnostic tool. *Front Genet.* 2023; 14: 1099995.
- [27] Filges I, Miny P, Holzgreve W, et al. How genomics is changing the practice of prenatal testing. *J Perinat Med.* 2022; 49: 1003–1010.
- [28] Alyousfi D, Baralle D, Collins A. Gene-specific metrics to facilitate identification of disease genes for molecular diagnosis in patient genomes: a systematic review. *Brief Funct Genomics* 2019; 18: 23–29.
- [29] Monaghan KG, Leach NT, Pekarek D, et al. The use of fetal exome sequencing in prenatal diagnosis: a points to consider document of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2020; 22: 675–680.
- [30] Vears D, Amor DJ. A framework for reporting secondary and incidental findings in prenatal sequencing: when and for whom? *Prenat Diagn.* 2022; 42: 697–704.
- [31] Jelin AC, Vora N. Whole exome sequencing: applications in prenatal genetics. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2018; 45: 69–81.
- [32] Mitrakos A, Kosma K, Makrythanasis P, et al. Prenatal chromosomal microarray analysis: does increased resolution equal increased yield? *Genes (Basel)* 2023; 14: 1519.
- [33] Drury S, Williams H, Trump N, et al. Exome sequencing for prenatal diagnosis of fetuses with sonographic abnormalities. *Prenat Diagn.* 2015; 35: 1010–1017.

(Pikó Henriett dr.,
Budapest, Korányi S. u. 2/a, 1083
e-mail: piko.henriett@semmelweis.hu)