



Dileme u postavljanju dijagnoze nasljednih metaboličkih bolesti analizom gena i kako si pomoći

Dilemmas in genetic diagnostics of inborn errors of metabolism and how to help yourself

Tamara Žigman^{1,2} , Danijela Petković Ramadža^{1,2}

¹ Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

² Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

Ključne riječi

NASLJEDNI POREMEĆAJI METABOLIZMA; GENETSKO TESTIRANJE; SEKVENCIRANJE NOVE GENERACIJE; VARIJANTE NEJASNOGA ZNAČAJA

Keywords

INBORN ERRORS OF METABOLISM; GENETIC ANALYSIS; NEXT GENERATION SEQUENCING; VARIANTS OF UNCERTAIN SIGNIFICANCE

SAŽETAK. Genske analize omogućuju definiranje molekularne osnove nasljedne metaboličke bolesti, usmjeravaju nas prema optimalnom načinu liječenja i omogućuju genetičko informiranje, a ponekad i prenatalnu dijagnostiku, ako je indicirana. Ulaskom tehnologije sekvenciranja nove generacije u dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti promijenila se paradigma razmišljanja o dijagnostičkom algoritmu za pojedine skupine bolesti. Metode sekvenciranja nove generacije imaju svoje dosege i ograničenja, koje onaj koji se njima koristi treba poznavati. U tumačenju nejasnih nalaza pomažu nam neki korisni informatički izvori o kojima se u tekstu više govori. Neselektivan i neracionalan pristup u korištenju novih tehnologija genske analize nije prihvatljiv i ne može zamijeniti znanje i vrijeme koje je potrebno posvetiti pacijentu s rijetkom bolesti.

SUMMARY. Genetic methods enable the definition of molecular basis of the inborn error of metabolism, guide us towards the optimal treatment methods and enable genetic counselling, and sometimes prenatal diagnosis, if indicated. With the introduction of new generation sequencing technology in the diagnosis of hereditary metabolic diseases, the thinking paradigm about the diagnostic algorithm has also been shifted for some groups of diseases. Next generation sequencing methods have advantages and limitations that those who use them should understand. In the interpretation of unclear findings, some useful IT sources can help us, and are discussed in more details in the text. An indiscriminate and irrational approach in using new genetic technologies is not acceptable and cannot replace the knowledge and time that needs to be devoted to a patient with a rare disease.

Nasljedne metaboličke bolesti heterogena su skupina rijetkih, monogenskih bolesti, a posljedica su manjkavosti jedne od važnih karika određenoga metaboličkog puta. To može biti manjak aktivnosti nekog enzima, receptora, kanalića, transportnog proteina, regulatornog proteina i drugih. Tradicionalno se dijagnoza nasljedne metaboličke bolesti postavlja biokemijskim analizama, a njihov odabir vođen je kliničkom prezentacijom. Klinička sumnja i pažljiv odabir biokemijskih pretraga i dalje su temelj dijagnostike aminoacidopatija, poremećaja ciklusa ureje, organskih acidurija, poremećaja metabolizma masnih kiselina i nekih lizosomskih bolesti nakupljanja. U trenutku pisanja ovog teksta u bazi podataka IEMbase zabilježene su 1904 nasljedne metaboličke bolesti.¹ Neke od njih imaju zajednička i preklapajuća, ponekad vrlo nespecifična klinička i biokemijska obilježja. S obzirom na to da je velik broj nasljednih metaboličkih bolesti lječiv, nužno je brzo i precizno postavljanje točne dijagnoze. Genske analize ne omogućuju samo definiranje molekularne podloge bolesti, već nas usmjeravaju prema pravilnom odabiru načina liječenja i omogućuju genetičko informiranje, a ponekad i prenatalnu dijagnostiku. Ulaskom tehnologije sekvenciranja nove generacije u dija-

gnostiku nasljednih metaboličkih bolesti promijenila se za neke skupine bolesti i paradigma razmišljanja o dijagnostičkom algoritmu. Tako će se primjerice danas kod sumnje na nasljednu mišićnu bolest, prije biopsije mišića, učiniti analiza ciljanog genskog panela. Metode NGS (od engl. *next generation sequencing*) omogućuju uvid u sekvencu željenih dijelova genoma brzo i uz veliku preciznost analize. Bioinformatička analiza dobivenih podataka, nakon koje slijedi ispravna klasifikacija dobivenih varijanti, ključna je za donošenje ispravnih zaključaka.

Danas sveobuhvatni genski paneli sve više zamjenjuju ciljane panele s manjim brojem gena, a u slučaju nespecifičnih i preklapajućih simptoma ili kada nas biokemijske metode ne usmjeravaju u neku od skupina nasljednih metaboličkih bolesti odlučujemo se za analizu cjelokupnog egzoma, iznimno i analizu cjelokupnog genoma. Primjerice, cjelogenomske metode

Adresa za dopisivanje:

Dr. sc. Tamara Žigman, dr. med., <https://orcid.org/0000-0003-1184-8798>,
Klinika za pedijatriju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
Klinički bolnički centar Zagreb, Kišpatičeva 12, 10000 Zagreb,
e-pošta: tzigman1@kbc-zagreb.hr

ključne su u dijagnostici mitohondrijskih bolesti i nasljednih poremećaja glikozilacije. One se kao skupine bolesti mogu prezentirati tipičnim simptomima i biokemijske analize (npr. povišen laktat kod mitohondrijskih bolesti ili patološki nalaz analize sijalotransferina) mogu nas pravilno usmjeriti, ali bez cjelogenomskog pristupa teško ćemo točno definirati dijagnozu odnosno molekularni uzrok. Izuzetak su prepoznatljivi mitohondrijski sindromi u slučaju kojih možemo učiniti ciljano gensko testiranje, npr. sindrom MELAS (od engl. *mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*) koji je u 80% slučajeva uzrokovan mutacijom m.3243G>A gena *MT-TL1*.²

NGS metode danas su i sastavni dio provođenja proširenoga novorođenačkog probira. Primjerice, pozitivan probir na poremećaj razgradnje masnih kiselina srednjih lanaca, odnosno povišen oktanoilkarnitin, može se vidjeti i kod heterozigota za mutacije u genu *ACADM*, iako se radi o zdravoj djeci koja su samo prenositelji navedene bolesti. Ovdje je analiza gena ključna za završetak probira, odnosno razlikovanje pacijenata koji su stvarno pozitivni i imaju navedeni poremećaj od onih koji su lažno pozitivni. Kod nekih skupina nasljednih metaboličkih bolesti simptomi i odstupanja u laboratorijskim pretragama mogu biti prisutni samo povremeno i ako ponavljamo biokemijske analize odstupanja moguće više neće biti, što ne znači da dijete ne boluje od nasljedne metaboličke bolesti. Primjer za to su ponovno poremećaji beta-oksidacije ili blaži oblici glikogenoza. Genska analiza i ovdje nam pruža točan odgovor.³

Dosezi i ograničenja metoda sekvenciranja nove generacije

Iako su NGS metode, prvenstveno zbog velike brzine i točnosti analize, uvelike unaprijedile molekularnu dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i omogućile otkrivanje novih uzročnih gena, i one imaju svoja ograničenja. Genski panel i analiza cjelokupnog egzoma neće detektirati uzročne intronske varijante (izuzetak su mjesta prekranja). Također, ako se radi o deleciji ili duplikaciji većoj od 25 parova baza, velika je vjerojatnost da će takva promjena promaknuti analizi. Za takve promjene potrebno je koristiti ciljanu MLPA metodu (od engl. *multiplex ligation dependant probe amplification*), molekularnu kariotipizaciju ili kvantitativni PCR (od engl. *polymerase chain reaction*). Danas komercijalni genski paneli uz NGS analizu kombiniraju neku od navedenih metoda detekcije velikih genskih preuredbi. Veliki broj varijanti dobivenih NGS analizom pripada u varijante nepoznatoga kliničkog značaja i potrebna je sofisticirana informatička oprema i educirano osoblje kako bi se dobiveni podatci obradili i pravilno tumačili. Posljednjih deset godina troškovi analize značajno su pali tako da danas se-

kvenca cjelokupnoga ljudskog genoma košta manje od 1.000 \$. To je omogućilo šire korištenje NGS metoda u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

Klasifikacija genskih varijanti

Varijante dobivene NGS analizom klasificiraju se u pet kategorija, ovisno o vjerojatnosti da se radi o patogenoj mutaciji:

- Klasa 1* – mutacija nije patogena i nema klinički značaj (vjerojatnost patogenosti je manja od 0,001)
- Klasa 2* – mutacija vjerojatno nije patogena i vjerojatno nema klinički značaj (vjerojatnost patogenosti 0,001– 0,049)
- Klasa 3* – varijanta nejasnog značaja (vjerojatnost patogenosti 0,05 – 0,949)
- Klasa 4* – vjerojatno patogena mutacija (vjerojatnost patogenosti 0,95 – 0,99)
- Klasa 5* – definitivno patogena mutacija (vjerojatnost patogenosti veća je od 0,99).

U nalazima genske analize tipično se navode varijante klase 4 ili 5, a prema dogovoru i varijante nejasnoga kliničkog značaja. Ako se varijante nejasnoga značaja navedu u nalazu i priopće pacijentu, savjetuje se daljnje praćenje pacijenta u kontekstu dobivenog nalaza jer s vremenom može doći do reklasifikacije varijante nejasnoga značaja u vjerojatno benignu ili vjerojatno patogenu varijantu. Ovisno o genu, varijante nejasnoga značaja većinom se reklasificiraju u vjerojatno benigne (80 – 90%), a u manjem postotku (10 – 20%) u vjerojatno patogene varijante.⁴

Ovdje treba napomenuti da je do ere NGS metoda velik broj rijetkih nasljednih bolesti nespecifičnih kliničkih prezentacija ostao nedefiniran. Sve veće korištenje NGS-a omogućilo je molekularno definiranje brojnih poremećaja. S obzirom na to, pojavio se velik broj novih varijanti. Ako se radi o novoj varijanti gena odgovornog za određeni biokemijski poremećaj koji korelira s kliničkom slikom pacijenta, nemamo dvojbu da je takva varijanta, iako nova, uzrok bolesti. Također, ako dobijemo dvije varijante u genu za recesivnu bolest i postoji korelacija genotip-fenotip, velika je vjerojatnost da je navedeni gen, iako se radi npr. o varijantama nejasnoga značaja, također uzrok bolesti. Problem u interpretaciji mogu predstavljati nejasne varijante kod kojih postoji opisana i autosomno recesivna i autosomno dominantna prezentacija. Postoji nekoliko alata koji nam mogu pomoći u interpretaciji takvih nejasnih nalaza.

Korisne baze podataka

Genome Aggregation Consortium (gnomAD) – radi se o vrlo korisnoj populacijskoj bazi podataka koja je rezultat suradnje brojnih istraživača s ciljem prikuplja-

nja i ujednačavanja podataka dobivenih sekvenciranjem egzoma i genoma brojnih svjetskih populacija. Baza sadrži podatke oko 200.000 genoma zdravih i oboljelih pojedinaca koji međusobno nisu u srodstvu. Koristeći bazu, moguće je saznati učestalost pojedine alelne varijante u općoj populaciji te pojedinim etničkim skupinama. Za rijetku varijantu veća je vjerojatnost da je patogena za pacijenta. Ova baza je povezana i s bazom podataka *ClinVar* te za neke varijante nudi interpretaciju patogenosti. Baza je javno dostupna.⁵

ClinVar – javno dostupna baza podataka koja pohranjuje i povezuje varijacije ljudskog genoma s fenotipom, navodeći dokaze za navedenu povezanost. U ovoj bazi može se vidjeti radi li se o patogenoj, benignoj ili varijanti nepoznatog značaja. Baza prihvaća prijavu varijanti od strane certificiranih laboratorija ili grupa kliničkih stručnjaka. Povezana je s bazom *PubMed*, odnosno nudi poveznice na publikacije koje služe kao dokaz za klasifikaciju varijante.⁶

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) – radi se o sveobuhvatnoj zbirci ljudskih gena koja je javno dostupna i obnavlja se na dnevnoj bazi. Opisi u obliku slobodnoga teksta uz pojedine gene sadrže informacije o svim do sada poznatim mendelski nasljednim bolestima i preko 16.000 gena. OMIM se oslanja na povezanost genotipa s fenotipom. Bazu je osnovao još 1960. godine dr. Victor McKusick.⁷

Human Genome Mutation Database (HGMD) – u ovoj bazi podataka nalaze se podatci o varijantama gena koje su povezane s fenotipom. Obuhvaća oko 8.000 gena. Javno je dostupna za registrirane korisnike.⁸

Baze podataka specifične za nasljedne metaboličke bolesti

Inborn Errors of Metabolism Knowledgebase (IEMbase) – javno dostupna baza koja služi kao pomoć kliničaru u dijagnostici nasljednih metaboličkih bolesti. Temeljem unosa fenotipa standardiziranim pojmovima i kombiniranjem biokemijskog poremećaja sa simptomima, baza daje popis poremećaja u mogućoj diferencijalnoj dijagnozi.¹

Metagene – također vrlo korisna baza koja kombiniranjem simptoma bolesti i laboratorijskih nalaza pruža moguću diferencijalnu dijagnozu. Pruža mogućnost rasprave pojedinih kliničkih situacija uz pomoć ekspertnog panela stručnjaka.⁹

In silico programi

In silico algoritmi su korisni bioinformatički alati koji se koriste u tumačenju varijanti krivoga smisla (engl. *missense*). Predviđaju kako varijanta utječe na funkciju proteina uzimajući u obzir fizikalno-kemijske razlike izmijenjenoga aminokiselinskog slijeda, mogući utjecaj na mjesto prekrajanja te koliko je mjesto mu-

tacije evolucijski očuvano. Osobito su korisni kod tumačenja varijanti nepoznatog značaja. Najčešće su korišteni *Mutation Taster* i *Polyphen-2*.^{10,11}

Funkcionalne studije i reverzna fenotipizacija

Funkcionalne studije pružaju definitivan dokaz patogenosti genske varijante. Često se stoga koriste i u reklasifikaciji varijanti nejasnoga značaja. Obično se provode mjerenjem aktivnosti nekog enzima u leukocitima periferne krvi, uzorcima tkiva (npr. biopiat jetre ili mišića) ili staničnim kulturama (uzorku fibroblasta ili mioblasta). Ako se radi o strukturnom proteinu, moguće su i citokemijske ili histokemijske analize. Ako se radi o biokemijskom poremećaju koji je čest i za koji su razvijene i lako dostupne biokemijske analize, funkcionalnu studiju nije teško provesti i ovi su rezultati vrlo značajni u interpretaciji nalaza genske analize. Ipak, u većini slučajeva radi se o rijetkim biokemijskim poremećajima i tada se funkcionalne studije mogu provoditi samo u specijaliziranim laboratorijima i uglavnom na istraživačkoj osnovi. Sve se češće susrećemo i s pojmom reverzne fenotipizacije, koji označava da analiza gena prethodi pronalasku biokemijskog poremećaja koji ga u konačnici retrogradno definira. U ovakvom pristupu može uvelike pomoći metabolomika – traženje i mjerenje metabolita u tjelesnim tekućinama pacijenta s ciljem boljeg definiranja određenog biokemijskog puta. Ovakav pristup otvara mogućnost razvoja novih terapija.¹²

Umjesto zaključka – budućnost u eri genomike

Genske su analize uz pomoć NGS alata ušle široko u svakodnevnu kliničku praksu. U određenim kliničkim situacijama ove analize mogu zamijeniti dugotrajan dijagnostički postupak kojemu su pacijenti s rijetkim bolestima često izloženi. Inicijalnu ushićenost NGS-om i doživljaj da se radi o nečem revolucionarnom zamijenio je oprez. Postajemo svjesni da nam je novo znanje koje je čovječanstvu donio tehnološki napredak zapravo otvorilo „cijeli svemir“ nepoznanica. Pojedini dijagnostički uspjesi identifikacije rijetkih bolesti uz pomoć neselektivnoga cjelogenomskog pristupa ipak ne mogu zamijeniti dobru kliničku praksu, koja još od Hipokrata kreće od anamneze, fizikalnog statusa, odabira dijagnostičkih testova i promišljanja o pacijentu. NGS metode trebamo shvatiti kao dobrodošlu pomoć u dijagnostici, a nikako kao način da skratimo ili preskočimo vrijeme koje je potrebno posvetiti pacijentu ili način da zaobiđemo manjkavosti vlastitog znanja.

Izgleda da ćemo uskoro živjeti u vremenu gdje će u nekoliko sati nakon djetetova rođenja biti dostupne informacije o njegovom genomu. No, pitanje je koliko će još vremena trebati proći kako bi se te informacije

mogle u potpunosti koristiti za dobrobit toga novorođenog djeteta. Čini se da će i generacije poslije nas ovdje nailaziti na probleme i dileme, ako ne druge vrste, a onda na one etičke.

LITERATURA

1. <http://www.iembase.org/>
2. Rahman S, Poulton J, Marchington D, Suomalainen A. Decrease of 3243 A→G mtDNA Mutation from Blood in MELAS Syndrome: A Longitudinal Study. *The American Journal of Human Genetics*. 2001;68:238–40.
3. Saudubray JM, Baumgartner M, García-Cazorla A, Walter J, ur. *Inborn Metabolic Diseases. Diagnosis and Treatment*. 7. izd. Berlin: Springer; 2022.
4. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J i sur. 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;17:405–23.
5. <http://gnomad.broadinstitute.org>
6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
7. <https://www.omim.org/>
8. <https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
9. <https://www.metagene.de/index.html>
10. <https://www.mutationtaster.org/>
11. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
12. Smirnov D, Konstantinovskiy N, Prokisch H. Integrative omics approaches to advance rare disease diagnostics. *J Inherit Metab Dis*. 2023;46(5):824–38.