

Postępy w badaniach genetycznych i ich zastosowanie w diagnostyce klinicznej noworodków

Kara Goodin, MD,
Margaret Chen, PhD,
Edward Lose, MD,
Fady M. Mikhail, MD, PhD,
Bruce R. Korf, MD, PhD

Cele: Po przeczytaniu tego artykułu czytelnik powinien:

1. Znać zastosowanie nowych metod w diagnostyce cytogenetycznej.
2. Wiedzieć, kiedy należy brać pod uwagę zlecenie rutynowej analizy chromosomowej, fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* lub porównawczej hybrydyzacji genomowej do mikromacierzy.
3. Znać różne metody diagnostyki molekularnej oraz czynniki, które należy uwzględnić przy zlecaniu określonych testów.
4. Opisać rolę piętnowania genomowego w chorobach noworodków oraz możliwości diagnostyczne testów genetycznych w tym zakresie

STRESZCZENIE

Ponieważ zaburzenia genetyczne mogą być odpowiedzialne za patologie u noworodków, ważne jest, aby lekarz neonatolog znał wskazania do wykonywania testów genetycznych oraz podstawowe zagadnienia dotyczące interpretacji ich wyników. Dwie podstawowe techniki cytogenetyki molekularnej to fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* i porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy. Umożliwiają one wykrycie delecji, duplikacji oraz rearanżacji małych fragmentów w obrębie chromosomu. Bezpośrednia analiza mutacji DNA może być skierowana na swoisty wariant genu, o którym wiadomo, że warunkuje określoną chorobę. Czynniki epigenetyczne natomiast mogą wpływać na ekspresję genu nie zmieniając samego genotypu. Przykładem może być piętnowanie genomowe (zróżnicowana ekspresja genu) odpowiedzialne za wiele chorób genetycznych. Większość molekularnych testów genetycznych wykonywanych u noworodków ma na celu ustalenie rozpoznania. Testy te charakteryzują istotne różnice w ich wartości analitycznej oraz wartości użyteczności klinicznej w stosunku do bardziej tradycyjnych badań laboratoryjnych. Dlatego też przy ich zlecaniu należy rozważyć implikacje wynikające z tych różnic.

Wprowadzenie

W latach 50. XX wieku genetyka medyczna stała się odrębną specjalnością lekarską, a w 1959 roku wykonano pierwszy test genetyczny. Była nim analiza liczby i struktury chromosomów. Od tej pory, a szczególnie odkąd poznano sekwencję genomu człowieka, liczba i złożoność testów genetycznych stale rośnie. Neonatolodzy, jako lekarze odpowiedzialni za leczenie znajdujących się na oddziale intensywnej opieki medycznej noworodków z poważnymi wadami rozwojowymi, często muszą uwzględnić genetyczne uwarunkowanie stwierdzanej u nich patologii. Coraz powszechniej dostępne testy genetyczne umożliwiają potwierdzenie podejrzanego rozpoznania klinicznego, ukierunkowując dalszą opiekę nad noworodkiem. Stanowią też podstawę dla poradnictwa genetycznego udzielanego rodzinie. Zatem ważne jest, aby lekarze sprawujący opiekę nad noworodkami znali wskazania do wykonywania takich testów i byli świadomi głównych problemów związanych z ich interpretacją. Niniejszy przegląd dotyczy najnowszych postępów, jakich dokonano w dziedzinie cytogenetycznych i molekularnych testów genetycznych, mających zastosowanie w opiece medycznej nad noworodkami.

Cytogenetyka

Analiza chromosomowa umożliwia wykrywanie zmian w liczbie i strukturze chromosomów. W ciągu ostatnich czterech dziesięcioleci stopniowo osiągała coraz większą rozdzielczość. Rutynowe badanie cytogenetyczne stało się możliwe w latach 50. minionego wieku dzięki opracowaniu metody polegającej na poddaniu szokowi hipotonicznemu dzielących się komórek i rozproszeniu w nich chromosomów. Także dzięki opracowaniu metod hodowli komórkowych. Wprowadzone w latach 60. XX wieku techniki prążkowego barwienia

TABELA 1. Wskazania do wykonania podstawowych testów cytogenetycznych i ich ograniczenia

Metoda	Główne wskazania	Ograniczenia
Uzyskiwanie wysokiej rozdzielczości prążkowej	Podejrzenie zespołu aneuploidii, występowanie zrównoważonej rearanżacji chromosomowej u jednego z rodziców, liczne wady wrodzone	Rozdzielczość 5-10 mpz, wykonanie zabiera wiele dni
Skryning aneuploidii metodą FISH w interfazie	Szybki skryning na obecność aneuploidii chromosomów 13, 18, 21, X i Y	Nie wykrywa strukturalnych rearanżacji chromosomowych
Analiza metodą FISH na obecność mikrodelecji i mikroduplikacji	Podejrzenie zespołu mikrodelecyjnego, takiego jak zespół DiGeorge'a lub Williama	Wymaga szczegółowych wskazań klinicznych w celu skierowania analizy na swoisty region chromosomowy
FISH subtelerowa	Wykrywa delecje subtelerowe u dzieci z licznymi wadami wrodzonymi nieznanego pochodzenia	Nie wykrywa rearanżacji poza regionem subtelerowym
Celowana porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy	Detekcja z wysoką rozdzielczością różnych istotnych klinicznie delecji i duplikacji, wykorzystywana do rozpoznania podejrzanego zespołu lub w poszukiwaniu przyczyny występowania licznych wad wrodzonych	Nie wykrywa wszystkich możliwych zespołów delecji lub duplikacji
Porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy całogenomowej	Liczne niewyjaśnione wady wrodzone	Nie wykrywa zmian na poziomie pojedynczego genu, może wykrywać warianty łagodne, które nie skutkują patologią

chromosomów zwiększyły precyzję tej analizy. Prążkowa nie umożliwia uzyskanie bardziej szczegółowego obrazu chromosomów i dokładniejszą identyfikację delecji, duplikacji oraz dużych rearanżacji. Nie można jednak tą metodą uzyskać dostępu do informacji na poziomie pojedynczego genu. Stosowane obecnie techniki rutynowej analizy cytogenetycznej mają rozdzielczość około 5-10 milionów par zasad. Współczesne postępy metodyczne, szczególnie fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH) oraz porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy (array CGH) zwiększają szybko rozdzielczość analizy chromosomowej. Wskazania do stosowania różnych metod analizy cytogenetycznej wykorzystywanych w diagnostyce klinicznej u noworodków przedstawiono w tabeli 1.

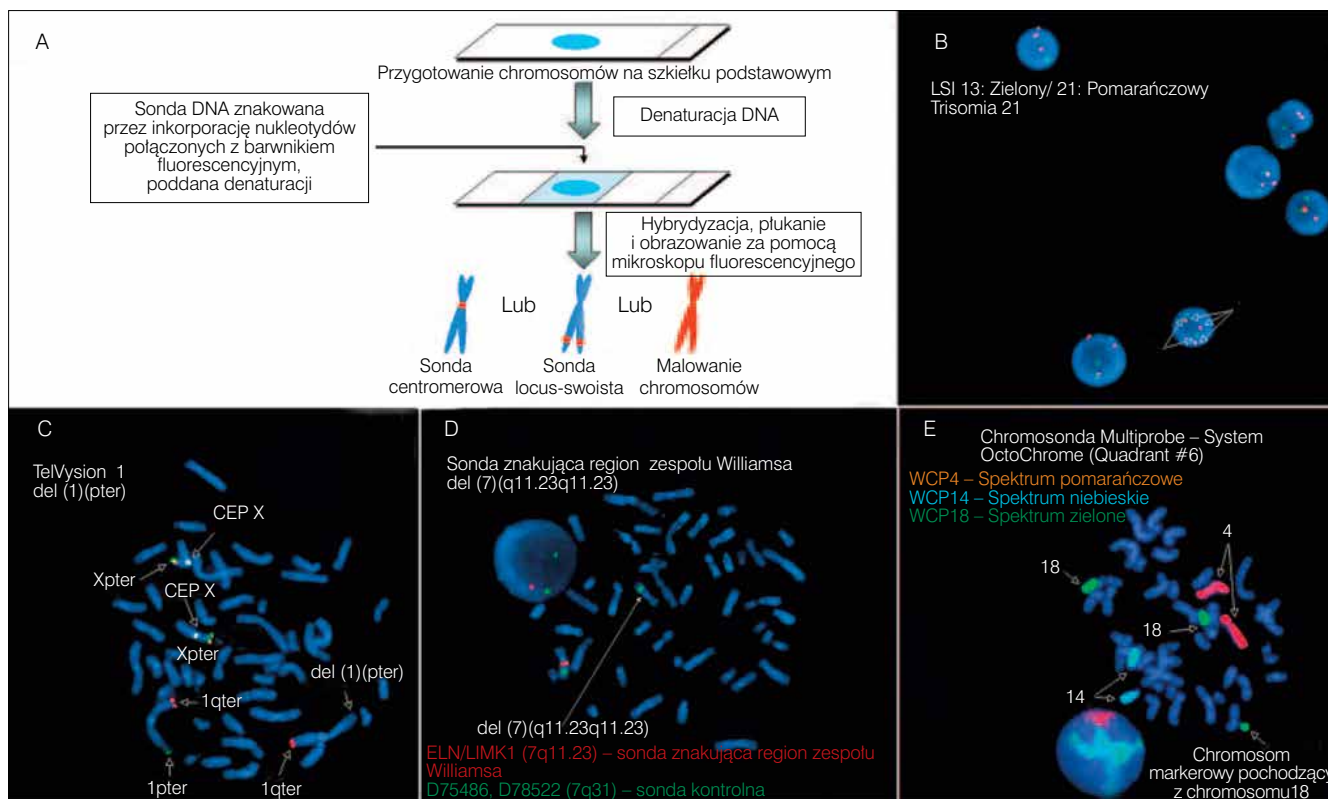
Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*

W latach 90. minionego wieku, wraz z opracowaniem FISH, dokonano znaczącego udoskonalenia testów cytogenetycznych (ryc. 1). FISH polega na hybrydyzacji oczyszczonych fragmentów jednoniciowego DNA znakowanego barwnikiem fluorescencyjnym (sondy) do docelowego, homologicznego jednoniciowego DNA chromosomowego. Umożliwia wykrywanie delecji, duplikacji i rearanżacji niewielkich regionów w chromosomach. Główną zaletą FISH jest jej rozdzielczość, większa od uzyskiwanej w standardowej analizie chromosomowej. Ponadto, wyniki badań tą metodą są dostępne już po 2-3 dniach, a nie dopiero po 2-3 tygodniach. FISH wymaga znajomości regionu, w którym podejrzewa się występowanie zmian, co umożliwia wykorzystanie odpowiedniej

sondy. Rozdzielczość tej metody ograniczona jest koniecznością stosowania względnie dużych sond niezbędnych do uzyskania wystarczająco silnej dla uwidocznienia fluorescencji.

Badanie metodą FISH można wykonać stosując jedną lub wiele swoistych sond do jednoczesnej oceny różnych regionów chromosomowych. Sondy swoiste dla określonych loci (sondy locus-swoiste) można wykorzystać do identyfikacji submikroskopowych delecji lub duplikacji, natomiast sondy centromerowe do określania liczby chromosomów w komórkach interfazowych. Chromosomy mogą też być „malowane koktajlami” swoistych dla nich sond w celu identyfikacji pochodzenia fragmentów chromosomowych ulegających rearanżacji. Analiza subtelerowa polega na ocenie końców chromosomów (subtelerów) za pomocą FISH. W celu identyfikacji delecji, duplikacji lub rearanżacji w regionach subtelerowych stosowany jest zestaw wielu sond swoistych dla sekwencji DNA tych regionów. U noworodków analizę subtelerów wykonuje się rzadko, najczęściej jest ona przeprowadzana u pacjentów z cechami opóźnienia rozwoju psychoruchowego lub znacznego upośledzenia rozwoju fizycznego.

Testy metodą FISH można wykonać zarówno w komórkach znajdujących się w interfazie, jak też w skondensowanych chromosomach metafazowych. Zestawy sond swoistych dla chromosomów 13, 18, 21, X i Y, odpowiedzialnych za zespoły aneuploidii występujące u żywo urodzonych noworodków, mogą być hybrydyzowane do komórek interfazowych, umożliwiając szybką diagnostykę tych zespołów. Choć są one użyteczne w szybkim



RYCINA 1. Analiza metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). A. Podstawowe etapy FISH. B. FISH w interfazie z wykorzystaniem sond znakujących chromosomy 13 i 21. Widoczna trisomia chromosomu 21 (trzy czerwone sygnały). C. FISH w metafazie z wykorzystaniem sond subtelerowych swoistych dla chromosomu 1. Widoczna delecja regionu 1pter oznakowanego sondą zieloną. D. FISH w metafazie z wykorzystaniem sondy swoistej dla zespołu Williama. Widoczna delecja regionu krytycznego tego zespołu oznaczonego sondą czerwoną. E. Sondy znakujące chromosomy 4, 14 i 18. Widoczny zidentyfikowany chromosom markerowy pochodzący z chromosomu 18.

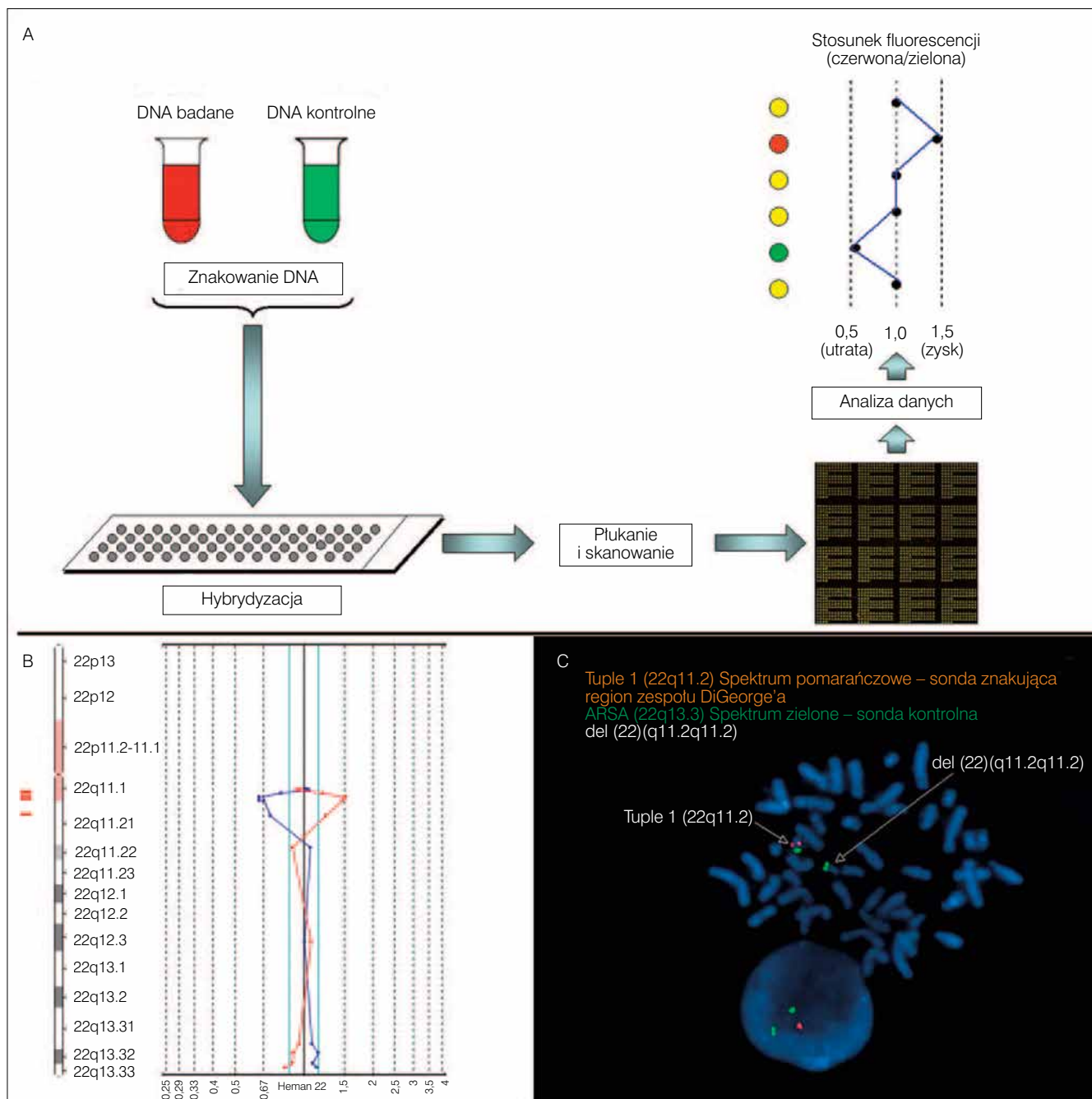
rozpoznanie aneuploidii, nie umożliwiają wykrycia re-aranżacji w obrębie tych lub innych chromosomów. Tak więc, wynik tego rodzaju analizy nie może być uznany za ostateczny w badaniu cytogenetycznym.

Porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy

Opracowanie metody CGH do mikromacierzy dokonało dalszego zwiększenia rozdzielczości analizy cytogenetycznej. CGH do mikromacierzy polega na kompetycyjnej hybrydyzacji dwóch różnych sekwencji genomowego DNA (jednej pochodzącej od pacjenta, drugiej kontrolnej) do tego samego zestawu sond referencyjnych utrwalonych na specjalnym szkiełku (ryc. 2). Takie sekwencje genomowe znakowane są w różnych kolorach barwnikami fluorescencyjnymi (np. czerwonym i zielonym). Delecje i duplikacje są wykrywane przez porównanie stosunku intensywności fluorescencji w kolorze czerwonym do zielonego. Odpowiada on względnej liczbie obecnych kopii danej sekwencji. Jeśli obecna jest taka sama liczba kopii DNA badanego i kontrolnego, to sygnał fluorescencyjny ma barwę żółtą. Jeśli dominują kopie sekwencji badanej (znakowanej na czerwono), obserwuje się kolor czerwony, jeśli zaś dominuje sekwencja kontrolna – zielony. Szkiełka

(mikromacierze) skanowane są w opracowanym do tego celu skanerze laserowym, a uzyskane dane są analizowane za pomocą odpowiednich programów komputerowych.

Główne korzyści płynące ze stosowania CGH do mikromacierzy to lepsza rozdzielczość od tej, jaką można uzyskać za pomocą FISH, oraz możliwość jednoczesnej oceny dużej liczby regionów chromosomowych pod kątem obecności delecji i duplikacji. Obecnie ograniczeniem mikromacierzy jest liczba swoistych sekwencji DNA, które można utrwalić na pojedynczym szkiełku oraz wielkość tych sekwencji, która określa rozdzielczość. Mikromacierze celowane zawierają regiony chromosomowe odpowiedzialne za znane zespoły mikrodelecji i mikroduplikacji oraz za wszystkie regiony subtelerowe. Mikromacierze całogenomowe umożliwiają analizę pod kątem obecności delecji i duplikacji w dowolnym miejscu genomu, bez konieczności wcześniejszego określenia obszaru zainteresowania. Ograniczeniem tej metody jest wykrywanie zmian w liczbie kopii określonych sekwencji DNA, których znaczenie kliniczne nie jest znane. Mogą one mieć charakter patologiczny lub prezentować tzw. warianty łagodne. Prawdopodobnie CGH do mikromacierzy zastąpi stopniowo metody cytogene-



RYCINA 2. Porównawcza hybrydyzacja genomowa do mikromacierzy (array CGH). A. Podstawowe etapy array CGH. B. Wynik array CGH uzyskany dla chromosomu 22 z delecją regionu DiGeorge'a. Niebieska linia prezentuje wynik hybrydyzacji DNA pacjenta i DNA kontrolnego uzyskany z jednej mikromacierzy, a linia czerwona wynik z drugiej mikromacierzy uzyskany po zastosowaniu znakowania odwrotnego. Klony, które uległy delecji w pierwszej hybrydyzacji, prezentują stosunek fluorescencji ~0,6, podczas gdy w drugiej (znakowanie odwrotne) stosunek ten wynosi ~1,5. C. FISH w metafazie z wykorzystaniem sondy znakującej region zespołu DiGeorge'a, analiza przypadku przedstawionego na panelu B. Widoczna delecja regionu znakowanego czerwoną sondą swoistą dla regionu zespołu DiGeorge'a.

tyki klasycznej oraz FISH w detekcji zmian liczby kopii fragmentów DNA. Należy jednak podkreślić, że ta metoda nie umożliwia wykrywania rearanżacji zrównoważonych, takich jak inwersje, zrównoważone translokacje i insercje.

Molekularne testy genetyczne Analiza sprzężeń

Najwyższy stopień rozdzielczości ma bezpośrednia analiza materiału genetycznego przez badanie DNA. Pierwsze próby takiej analizy oparte były na badaniu sprzężenia gene-

TABELA 2. Molekularne testy diagnostyczne powszechnie stosowane w diagnostyce noworodków

Wskazanie	Choroba	Badanie
Hipotonia	<ul style="list-style-type: none"> Dystrofia miotoniczna Rdzeniowy zanik mięśni typu 1 	<ul style="list-style-type: none"> Celowana analiza mutacji: trójnukleotydowe powtórzenia w DMPK Analiza delecji eksonu 7 w genie <i>SMN1</i>
Liczne zaburzenia	<ul style="list-style-type: none"> Zespół CHARGE Zespół Noonan 	<ul style="list-style-type: none"> Sekwencjonowanie genu <i>CHD7</i> Sekwencjonowanie czterech genów szlaku Ras: <i>PTPN11</i>, <i>KRAS</i>, <i>RAF1</i> i <i>SOS1</i>
Wady zewnętrznych narządów płciowych ze współistnieniem lub bez innych wad	<ul style="list-style-type: none"> Dysplazja kampakieliczna Zespół WAGR lub zespół Denysa-Drasha 	<ul style="list-style-type: none"> Sekwencjonowanie genu <i>SOX9</i> Sekwencjonowanie genu <i>WT1</i>
Małe dziecko lub karłowatość	<ul style="list-style-type: none"> Achondroplazja, hipochondroplazja, karłowatość tanatoforyczna Zespół Ellis-van Crevelda Zespół Shwachmana-Diamonda 	<ul style="list-style-type: none"> Celowane sekwencjonowanie <i>FGFR3</i> Sekwencjonowanie <i>EVC</i> i <i>EVC2</i> Sekwencjonowanie <i>SBDS</i>
Wady w obrębie twarzoczaszki	<ul style="list-style-type: none"> Zespół Aperta oraz wiele innych chorób związanych z genem <i>FGFR2</i> Zespół Saethre'a-Chotzena Zespół Waardenburga 	<ul style="list-style-type: none"> Celowana analiza mutacji <i>FGFR2</i> Sekwencjonowanie i analiza delecji/duplikacji eksonu 1 w genie <i>TWIST1</i> Sekwencjonowanie <i>PAX3</i>, <i>MITF</i>, endoteliny 3, receptora B endoteliny i <i>SOX10</i>
Wrodzona choroba serca	<ul style="list-style-type: none"> Zespół Holta-Orama Zwężenie drogi odpływu z lewej komory (wady zastawki aorty lub hipoplazja lewego serca) Noworodkowa postać zespołu Marfana Wada przegrody przedsionkowo-komorowej z heterotaksją 	<ul style="list-style-type: none"> Sekwencjonowanie <i>TBX5</i> Sekwencjonowanie poszukiwawcze <i>GJA1</i>, <i>NOTCH1</i> Sekwencjonowanie genu fibryliny 1 Sekwencjonowanie <i>CRELD1</i>

tycznego, w którym śledzi się dziedziczenie w rodzinie markera genetycznego zlokalizowanego w pobliżu genu warunkującego określoną chorobę. Takie podejście jest użyteczne wtedy, gdy ten gen nie został jeszcze zidentyfikowany, ale znana jest jego lokalizacja. Również wtedy, gdy trudno jest stwierdzić mutacje, prawdopodobnie z powodu dużej różnorodności zmian patologicznych u poszczególnych pacjentów. Rosnąca stale liczba zidentyfikowanych loci odpowiedzialnych za określone choroby ograniczyła liczbę testów opartych na badaniu sprzężeń. Ponadto, metoda ta wymaga badania wielu członków rodziny, zabiera również dużo czasu. Dlatego też te testy nie są powszechnie stosowane w diagnostyce klinicznej u noworodków.

Bezpośrednia analiza mutacji

Zakrojona na szeroką skalę identyfikacja genów umożliwiła rozwój bezpośredniej analizy ich mutacji. W niektórych przypadkach analiza mutacji może dotyczyć specyficznego wariantu genu, o którym wiadomo, że warunkuje określoną chorobę. Tak właśnie jest w przypadku detekcji mutacji w genie beta globiny, odpowiedzialnej za niedokrwistość sierpowatokrwinkową. Mutacje można wykrywać za pomocą różnych metod. Obecnie złotym standardem staje się sekwencjonowanie DNA, choć i ta metoda ma pewne ograniczenia. Stosując ją, można na przykład nie stwierdzić takich mutacji, jak inwersje i translokacje. Sekwencjonowanie nie wykrywa także dużych insercji i delecji. Chociaż umożli-

wia identyfikację zmian par zasad w akceptorowych i donorowych miejscach składania eksonów (splicingu), bezpośrednie udokumentowanie mutacji tych miejsc wymaga analizy cDNA uzyskanego z mRNA (za pomocą procesu określanego mianem odwrotnej transkrypcji).

Badania poświęcone mutacjom różnych genów ujawniły ich dużą różnorodność. Wśród nich znajdują się delecje lub duplikacje całych genów lub też ich części, rearanzacje, takie jak inwersje oraz zmiany na poziomie nukleotydów typu podstawienia zasad lub małych inwersji czy delecji, jak również mutacje w regionach promotorowych. Te ostatnie mają wpływ na kontrolę ekspresji genu. Mutacje mogą także wystąpić w sekwencjach zaangażowanych w proces splicingu, co prowadzi do zaburzeń obróbki (dojrzwiania potranskrypcyjnego) mRNA. W niektórych przypadkach określone mutacje mogą odpowiadać klinicznemu przebiegowi choroby, dostarczając informacji pomocnych w prowadzeniu pacjenta.

Wskazania i ograniczenia

Wskazania do przeprowadzenia molekularnych testów genetycznych obejmują diagnostykę pacjenta z objawami, testy predykcyjne osoby obciążonej ryzykiem dziedziczenia mutacji, testy przed wystąpieniem objawów u osoby obciążonej chorobą ujawniającą się z opóźnieniem oraz badania prenatalne. Większość testów przeprowadzanych u noworodków ma charakter diagnostyczny (tab. 2), choć wyniki

tych testów mogą mieć także określone implikacje dla innych członków rodziny.

Ograniczenia bezpośredniej analizy DNA na obecność mutacji dotyczą konieczności identyfikacji właściwego genu, a geny odpowiedzialne za wiele chorób nie zostały jeszcze poznane. Ponadto, testy genetyczne mają pewne wymagania dotyczące interpretacji wyników, które różnią się od wyników innych testów diagnostycznych. Ocena wyników testu powinna uwzględniać ich wartość analityczną i kliniczną oraz użyteczność kliniczną.

Wartość analityczną określa prawdopodobieństwo, że uzyskane wyniki są poprawne, czyli że specyficzny wariant genetyczny rzeczywiście występuje lub nie. Testy genetyczne cechują się wysokim stopniem wartości analitycznej, jeśli wykluczmy błędy popełnione przez osoby je wykonujące, takie jak np. pomieszanie badanych próbek. Należy jednak zwrócić uwagę na pewien ważny aspekt. W przypadku większości testów medycznych błąd analityczny ostatecznie zostanie ujawniony przy powtórzeniu testu, a testy biochemiczne powtarzane są często ze względu na oczekiwane w czasie zmiany. Testy genetyczne natomiast mogą nigdy nie zostać powtórzone, ponieważ wiadomo, że genotyp się nie zmienia. W związku z tym lekarz powinien zwracać szczególną uwagę na te wyniki testów, które nie odpowiadają oczekiwaniom klinicznym i być przygotowany na powtórzenie testu genetycznego w celu wykazania ewentualnych błędów laboratoryjnych.

Wartość kliniczna jest to stopień, w jakim test prawidłowo ocenia ryzyko choroby bądź zdrowia. Jest ona związana ze znanymi pojęciami dotyczącymi czułości, swoistości oraz dodatniej i ujemnej wartości predykcyjnej. Niektóre ograniczenia testów genetycznych są inne niż te, które dotyczą innych badań diagnostycznych. Falszywie dodatnie wyniki testów dotyczą stwierdzenia wariantów, które nie warunkują choroby. Istnieje wiele łagodnych wariantów genetycznych, a niektóre z nich występują rzadko. Dlatego też należy stosować rygorystyczne kryteria oceny, który z wariantów jest patogenny. Te kryteria to: stwierdzenie wariantu obecnego tylko u osób dotkniętych chorobą, wykazanie, że dany wariant ma istotny wpływ na funkcję produktu genu oraz stwierdzenie, że w danej rodzinie segreguje on wraz z chorobą. Czasami jednak konieczne może być zastosowanie swoistych kryteriów dla określonego genu. W niektórych przypadkach dysponujemy istotnymi dowodami wskazującymi na patogenne znaczenie danego wariantu, w innych natomiast takie znaczenie nie jest oczywiste. Przy podejmowaniu decyzji o postępowaniu z pacjentem lekarze muszą być przygotowani na krytyczną ocenę wyników badań.

Częstą przyczyną wyników fałszywie ujemnych jest to, że testy na obecność mutacji mogą nie wykrywać wszystkich możliwych wariantów danego genu. Wpływ na funkcję genu lub jego produktu może mieć wiele różnych mutacji, a detekcja wszystkich możliwych wariantów może, z praktycznego punktu widzenia, nie być realna. Ponadto, niektóre choroby wywołane są mutacją w jednym

z wielu różnych genów, z których nie wszystkie mogły zostać ujęte w panelu testującym lub też nie wszystkie zostały już odkryte. Zatem lekarz musi pamiętać, że niewykrycie mutacji genu nie musi oznaczać, że danej choroby nie ma.

Użyteczność kliniczną wyraża stopień, w jakim wynik testu ma wpływ na postępowanie medyczne z pacjentem. Możemy dysponować testem wskazującym na ryzyko wystąpienia choroby, ale jednocześnie nie mieć możliwości odpowiedniego, opartego na uzyskanych wynikach testu, postępowania poprawiającego stan pacjenta. W niektórych przypadkach wyniki testu mogą wywołać u pacjenta lęk, stać się przyczyną stygmatyzacji lub dyskryminacji, nie zapewniając mu żadnych korzyści medycznych. Ma to szczególne znaczenie w przypadku testów predyspozycji, które znajdują najlepsze zastosowanie wtedy, gdy ich wyniki skutkują wprowadzeniem obserwacji lub takiego postępowania z pacjentem, które umożliwi poprawę jego stanu. Również wtedy, gdy wyniki testu zapewnią, że takie postępowanie nie jest konieczne ze względu na małe ryzyko choroby. Ponadto, wyniki tych testów mogą mieć implikacje dotyczące członków dalszej rodziny. Niektórzy z nich mogą nie chcieć wiedzieć, że występuje u nich ryzyko rozwoju danej choroby. Wiele laboratoriów wymaga formalnej, świadomej zgody pacjenta na wykonanie testu genetycznego nawet wtedy, gdy jest on oferowany dla celów klinicznych, a nie badawczych. W większości, choć nie we wszystkich stanach Stanów Zjednoczonych, wprowadzono przepisy dotyczące prywatności informacji genetycznych. Niektóre z nich surowo zakazują wykorzystywania wyników testów genetycznych przy podejmowaniu decyzji o zatrudnieniu lub wydaniu polisy ubezpieczeniowej. Istnieją jednak znaczne różnice w tych przepisach między poszczególnymi stanami. Niedawno kongres Stanów Zjednoczonych zatwierdził prawo federalne regulujące te zagadnienia.

Epigenetyczna kontrola ekspresji genów

Czynniki epigenetyczne wpływają na ekspresję genów, nie zmieniając genotypu. Zmiany epigenetyczne polegają na takiej modyfikacji właściwości genu, która wpływa na jego ekspresję, ale nie wprowadza trwałych zmian do informacji genetycznej. Przykładami mechanizmów epigenetycznych, za pośrednictwem których komórki regulują ekspresję genów, są metylacja DNA w miejscach występowania dwunukleotydowych sekwencji CpG w regionach promotorowych genów, jak również dodanie reszt fosforanowych, acetylowych oraz ubikwitynowych do białek histonowych.

Zmiany epigenetyczne leżą u podstaw wielu chorób będących skutkiem zjawiska zwanego piętnowaniem (imprintingiem) genomowym. Polega ono na różnej ekspresji genu w zależności od tego, czy jest on odziedziczony od matki, czy od ojca. Zjawisko to jest również znane jako efekt „parent-of-origin”. Piętnowanie dotyczy mniejszości genów i ma miejsce tuż po zapłodnieniu. Chociaż na ogół piętnowane geny są w różnym stopniu zmetylowane, może też dochodzić do zmian w strukturze chromatyny.

TABELA 3. Choroby genetyczne uwarunkowane zaburzeniami piętnowania genomowego

Choroba genetyczna	Online Mendelian Inheritance in Men	Chromosom	Gen (y)	Piętno*	Białko	Charakterystyczne cechy kliniczne
Zespół Angelmana	105830	15q11-13	<i>UBE3A</i>	Pat	Ligaza E3A ubikwityna-białko	Znacznego stopnia upośledzenie umysłowe, drgawki, ataksja, apraksja
Zespół Pradera-Williego	176270	15q11-13	<i>SNRPN</i> Inne (w tym <i>MKRN3</i> i <i>NDM</i>)	Mat	Maty jądrowy rybonukleinowy polipeptyd N	Hipotonia dziecięca, opóźnienie rozwoju, otyłość dziecięca
Zespół Beckwitha-Wiedemanna	130650	11p15.5	<i>H19</i>	Pat	H19 koduje mRNA nieulegające translacji	Nadmierny wzrost, połowiczny przerost ciała, przerost języka, przepuklina pępowinowa, hipoglikemia noworodkowa, predyspozycja do wystąpienia nowotworów
Zespół Silver-Russella	180860	11p15.5 7p11.2-p13	<i>IGF1</i> <i>CDKN1C</i> <i>H19</i>	Mat Pat	Insulinopodobny czynnik wzrostu II Inhibitor 1C kinazy zależnej od cykliny	Prenatalne i pourodzeniowe opóźnienie wzrostu (z prawidłowym obwodem głowy), trójkątna twarz
Dziedziczna osteodystrofia Albrigta (obejmująca rzekomo niedoczynność [PHP] typu Ia i rzekomo-rzekomą niedoczynność przytarczyc [pPHP])	103580	20q13.3	<i>GRB10</i> (locus-kandydat) <i>GNAS1</i>	Mat Pat	Białko 10 związane z receptorem czynnika wzrostu Podjednostka alfa stymulującego białka G	Okrągła twarz, otyłość, niski wzrost, krótka czwarta i piąta kość śródreżcza w PHP Ia i pPHP Hipokalcemia, hiperfosfatemia, oporność na hormon przytarczyc i upośledzenie umysłowe występują wyłącznie w PHP Ia

* Piętnowany (inaktywowany) allel dziedziczony od jednego z rodziców: Mat — od matki (maternal), Pat — od ojca (paternal)

Piętnowanie genomowe leży u podstaw wielu chorób genetycznych (tab. 3). Cechy fenotypowe związane z małymi delecjami w niektórych chromosomach są najprawdopodobniej częściowo wynikiem braku ekspresji kluczowych, piętnowanych genów znajdujących się w prawidłowym chromosomie homologicznym. Przyпуска się też, że cechy fenotypowe uwarunkowane disomią jednorodzielską niektórych chromosomów są wynikiem braku ekspresji piętnowanych genów. Disomia jednorodzielska polega na dziedziczeniu obu chromosomów homologicznych pary od tego samego rodzica zamiast po jednej kopii od każdego z rodziców. Na przykład zespół Pradera-Williego, charakteryzujący się opóźnieniem rozwoju, hipotonią oraz otyłością występującą w dzieciństwie, może być wynikiem zarówno delecji regionu długiego ramienia chromosomu 15 (15q11-13) odziedziczonego od ojca, jak też jednorodzielskiej disomii matczynej tego chromosomu. W obu przypadkach u chorego dziecka nie dochodzi do ekspresji kluczowych produktów genowych, ponieważ gen(y) dziedziczony(-e) od matki w tym regionie chromosomowym są piętnowane, a zatem nie ulegają ekspresji. Zespół Angelmana jest klinicznie odmienną chorobą charakteryzującą się upośledzeniem umysłowym znacznego stopnia, drgawkami, ataksją i apraksją. Podobnie jak w przypadku zespołu Pradera-Williego, zespół Angelmana jest wynikiem różnej ekspresji określonych genów znajdujących się w chromosomie 15q11-q13. Różnica polega na tym, że zespół Angelmana jest wynikiem delecji w kopii chromosomu 15 dziedziczonej od matki lub jednorodzielskiej disomii ojcowskiej. Ostatnie badania z zastosowaniem sekwencjonowania DNA potwierdziły, że około 10% pacjentów z zespołem Angelmana ma mutacje w ulegającej ekspresji matczynej kopii genu *UBE3A*.

Piętnowanie genomowe leży także u podstaw innych zespołów genetycznych. Na przykład aż do 10% pacjentów z zespołem Silvera-Russella (SRS) ma disomię matczyną chromosomu 7. Zespół ten charakteryzuje się wewnątrzmacicznym i pourodzeniowym opóźnieniem wzrostu oraz trójkątnym kształtem twarzy. Ostatnie badania wskazują, że SRS jest także związany z hipometylacją promotora genu *H19* znajdującego się w chromosomie 11p15. Kolejną chorobą wynikającą z piętnowania genomowego w tym chromosomie jest zespół Beckwitha-Wiedemanna. W przeciwieństwie do chorych z SRS u pacjentów z tym zespołem ma miejsce hipermetylacja promotora genu *H19*. Pacjentów cechuje nadmierny wzrost i predyspozycja do rozwoju nowotworów. Hipermetylacja *H19* może być wynikiem disomii ojcowskiej. Nie wnikając w złożone mechanizmy genetyczne, hipermetylacja prowadzi ostatecznie do utraty piętnowania onkogenu *IGFII* (insulinopodobny czynnik wzrostu II). Wynikiem tego zjawiska jest wzrost ryzyka wystąpienia guza Wilmsa, raka nerki u dzieci oraz wielu innych nowotworów.

Podsumowanie

W ciągu ostatnich 40 lat, tzn. od wprowadzenia testów genetycznych do diagnostyki klinicznej, dokonano ogromnego postępu w zakresie możliwości badawczych i diagnostycznych tych testów. Stosowane obecnie w badaniach diagnostycznych metody obejmują analizę chromosomową, FISH, CGH do mikromacierzy, analizę sprzężeń, bezpośrednią analizę mutacji oraz ocenę modyfikacji epigenetycznych. Testy genetyczne umożliwiają diagnostykę kliniczną, przedkliniczną oraz prenatalną chorób genetycznych. Chociaż neonatolodzy nie muszą znać szczegółów dotyczących wykonywania testów genetycznych, coraz ważniejsze staje się, aby znali możliwości diagnostyczne dostępnych testów, wskazania do ich wykonywania oraz problemy związane z ich interpretacją.

Artykuł ukazał się oryginalnie w NeoReviews, Vol. 9, No. 7, July 2008, p. e289: Advances in Genetic Testing and Applications in Newborn Medicine, wydawanym przez American Academy of Pediatrics (AAP). Polska wersja publikowana przez Medical Tribune Polska. AAP i Medical Tribune Polska nie ponoszą odpowiedzialności za nieścisłości lub błędy w treści artykułu, w tym wynikające z tłumaczenia z angielskiego na polski. Ponadto AAP i Medical Tribune Polska nie popierają stosowania ani nie ręczą (bezpośrednio lub pośrednio) za jakość ani skuteczność jakichkolwiek produktów lub usług zawartych w publikowanych materiałach reklamowych. Reklamodawca nie ma wpływu na treść publikowanego artykułu.

Zalecane piśmiennictwo

- Algar EM, St Heaps L, Darmanian A, et al. Paternally inherited submicroscopic duplication at 11p15.5 implicates insulin-like growth factor II in overgrowth and Wilms' tumorigenesis. *Cancer Res.* 2007;67:2360-2365
- Blik J, Terhal P, van den Bogaard MJ, et al. Hypomethylation of the H19 gene causes not only Silver-Russell syndrome (SRS) but also isolated asymmetry or an SRS-like phenotype. *Am J Hum Genet.* 2006; 78:604-614
- Friedman JM, Dill FJ, Hayden MR, McGillivray BC. Genetics. 2nd ed. Philadelphia, Pa: Williams & Wilkins; 1996 Hitchens MP, Stanier P, Preece MA, Moore GE. Silver-Russell syndrome: a dissection of the genetic aetiology and candidate chromosomal regions. *J Med Genet.* 2001;38:810-819
- Kantor B, Makedonski K, Green-Finberg Y, Shemer R, Razin A. Control elements within the PWS/AS imprinting box and their function in the imprinting process. *Hum Mol Genet.* 2004;13:751-762
- Korf B. Human Genetics and Genomics. 3rd ed. Malden, Mass: Blackwell Publishing; 2007 Nicholls RD, Knepper JL. Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2001;2:153-175
- Ostrer H. Non-Mendelian Genetics in Humans. New York, NY: Oxford University Press; 1998
- Passarge E. *Color Atlas of Genetics*. New York, NY: Thieme Medical Publishers, Inc; 1995
- Schönherr N, Meyer E, Eggermann K, Ranke MB, Wollmann HA, Eggermann T. (Epi)mutations in 11p15 significantly contribute to Silver-Russell syndrome: but are they generally involved in growth retardation? *Eur J Med Genet.* 2006;49:414-418
- Strachen T, Read AP. *Human Molecular Genetics*. 2nd ed. London, United Kingdom: BIOS Scientific Publishers, Inc; 1999
- Weksberg R, Nishikawa J, Caluseriu O, et al. Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of *KCNQ1OT1*. *Hum Mol Genet.* 2001;10:2989-3000

Komentarz

Prof. dr hab. n. med. Ewa Bocian, Zakład Genetyki, Instytut Matki i Dziecka w Warszawie



Rozwój metod biologii i genetyki molekularnej w ciągu ostatnich 25 lat dostarczył wielu dowodów na potwierdzenie faktu, że choroby genetyczne (najczęściej uwarunkowane mutacjami genów lub aberracjami chromosomowymi) mają istotny udział w patologii człowieka. Wystarczy stwierdzić, że liczba znanych chorób monogenowych sięga 12 tys., a zespołów chromosomowych jest praktycznie nieograniczona. Zazwyczaj mają one nie tylko poważne skutki kliniczne, ale także społeczne. Większość z nich ujawnia się tuż po urodzeniu lub we wczesnym dzieciństwie, zatem lekarz neonatolog i pediatra są tymi specjalistami, którzy muszą ustalić rozpoznanie istotne nie tylko dla dalszej opieki nad pacjentem, ale także dla jego rodziny – rodziny ryzyka genetycznego. Choroby warunkowane predyspozycją genetyczną stanowią, jak się ocenia, aż 71% przyczyn hospitalizacji w szpitalach dziecięcych. Opracowane w ostatnich latach nowe techniki analizy genomu, poszerzając znacznie możliwości diagnostyczne testów genetycznych, zapewne sprawią, że ten odsetek będzie jeszcze większy. Wystarczy przytoczyć fakt, że w 1993 roku dostępne były testy genetyczne dla 100 chorób, natomiast obecnie już dla około 1500. Dalsze 274 jest na etapie badań naukowych. To wszystko decyduje o konieczności nie tylko stałego poszerzania wiedzy o genetycznych uwarunkowaniach patologii, ale także śledzenia zmian w zakresie możliwości diagnostycznych testów genetycznych. Uwzględniając powyższe, trzeba docenić zamieszczenie artykułu na ten temat w *Pediatrici po Dyplomie*. Szkoda, że skoncentrowano się w nim na omówieniu tylko dwóch technik, które stosowane są w diagnostyce cytogenetycznej, a mianowicie, wcale nie nowej – fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) oraz rzeczywiście nowoczesnej – porównawczej hybrydyzacji genomowej (CGH).

Mnogość objawów klinicznych chorób genetycznych, a także ogromne zróżnicowanie obrazu klinicznego w obrębie określonego zespołu genetycznego decydują o tym, że niemal każde podejrzenie choroby genetycznej wymaga potwierdzenia odpowiednim testem diagnostycznym. Co więcej, w wielu zespołach chromosomowych obraz kliniczny nie odpowiada określonej, znanej jednostce chorobowej, a nasuwa tylko przypuszczenie, że uwarunkowany jest jakąś aberracją chromosomową. Sytuacja taka ma miejsce wtedy, gdy stwierdzamy u dziecka zespół cech dysmorficznych,

opóźnienie rozwoju somatycznego czy psychoruchowego, często ze współistnieniem wad rozwojowych. Dużej różnorodności objawów klinicznych w chorobach i zespołach genetycznych towarzyszy też zróżnicowanie ich etiologii. Uwarunkowane są one nieprawidłowościami w genomie o bardzo zróżnicowanej wielkości, począwszy od zmian w pojedynczych nukleotydach (mutacji locus-swoistych) przez zmiany dotyczące całych genów (copy number variation, CNV), a kończąc na widocznych mikroskopowo aberracjach chromosomowych. Zatem do identyfikacji defektu genetycznego odpowiedzialnego za chorobę i weryfikację rozpoznania klinicznego konieczne jest zastosowanie różnych, zależnych od rodzaju defektu, testów diagnostycznych. Mimo dużego zakresu dostępnych metod analizy genomu nie ma takiej, która identyfikowałaby wszystkie rodzaje nieprawidłowości. Diagnostyka genetyczna uwzględnia testy DNA (analizę mutacji, sekwencjonowanie, analizę metylacji oraz markerów, np. mikrosatelitów, a także analizę sprzężeń), badania cytogenetyczne (ocenę kariotypu z zastosowaniem metod klasycznych i cytogenetyki molekularnej) oraz testy biochemiczne (badania enzymów, metabolitów i białek). Dlatego też bardzo ważne jest, aby lekarz kierujący na badania diagnostyczne nie tylko miał wiedzę o etiologii choroby, ale także o możliwościach i ograniczeniach poszczególnych metod diagnostycznych.

Diagnostyka cytogenetyczna dotyczy zespołów uwarunkowanych aberracjami chromosomowymi. Ocenia się, że występują one u ok. 0,9% żywo urodzonych noworodków, a niemal połowa z nich ma charakter niezrównoważony i skutkuje poważną patologią. Skutki kliniczne aberracji chromosomowych wynikają z niezrównoważenia genetycznego, którego przyczyną jest zmiana dawki genów w wyniku delecji lub duplikacji określonego regionu chromosomu (genomu) lub też zaburzenia funkcji genu(-ów), jeśli niezrównoważenie dotyczy ich elementów regulatorowych. Metody oceny kariotypu opracowane w latach 70. ubiegłego wieku i polegające na analizie swoistego dla poszczególnych chromosomów obrazu prążkowego stanowią, ciągle jeszcze w większości laboratoriów cytogenetycznych, podstawowe badanie diagnostyczne w przypadku podejrzenia zespołu chromosomowego. W wielu jednak sytuacjach diagnostycznych są uzupełniane lub zastępowane metodami cytogenetyki molekularnej. Znakomi-

tym uzupełnieniem metod klasycznych, a w przypadku zespołów mikrodelecji/mikroduplicacji metodą z wyboru, jest technika FISH. Zastosowanie sond molekularnych swoistych dla określonych loci chromosomowych zawierających geny warunkujące określony zespół umożliwia identyfikację aberracji w tych regionach (tzw. regionach krytycznych). FISH zwiększyła znacznie rozdzielczość analizy chromosomowej, doskonaląc i poszerzając jej możliwości diagnostyczne. Wielkość aberracji identyfikowanych tą metodą ma od ok. 40-250 tysięcy par zasad (kpz), podczas gdy prążkowe metody oceny kariotypu umożliwiają identyfikację aberracji o wielkości >4 milionów par zasad (mpz). To dzięki FISH poznano chromosomowe podstawy, znanych wcześniej ze swojego obrazu klinicznego, zespołów mikrodelecji, takich jak Pradera-Williego, Angelmana, DiGeorge'a, Millera-Dieckera i wielu innych. Zastosowanie FISH do analizy wielkości delacji stwierdzanych w różniących się obrazem klinicznym przypadkach określonego zespołu przyczyniło się do wyjaśnienia przyczyn tego zróżnicowania i określenia wielkości najmniejszego regionu genomu, którego uszkodzenie warunkuje swoisty dla zespołu obraz kliniczny. Możliwe się stało także rozpoznawanie trudnych lub wręcz niemożliwych do identyfikacji metodami klasycznymi aberracji regionów subtelerowych chromosomów odpowiedzialnych za ok. 5% przypadków niepełnosprawności intelektualnej o nieznanym etiologii. Należy jednak stwierdzić, że od kilku już lat, o czym nie wspominają autorzy artykułu, do diagnostyki tych aberracji stosowana jest częściej metoda MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification – multipleksowa amplifikacja sondy zależna od ligacji). W tej metodzie sondy w odpowiednim do rodzaju badania zestawie zawierają dwa fluorescencyjnie znakowane oligonukleotydy hybrydujące do sąsiadujących miejsc w określonej sekwencji badanego DNA. Zhybrydowane sondy są łączone przez ligazę i powielane w reakcji PCR. Powielenie sondy zależy więc od obecności w badanej próbce określonych sekwencji DNA. Produkty powielania są izolowane i oceniane ilościowo. Względna ilość produktów jest proporcjonalna do liczby kopii badanych sekwencji DNA. Dzięki dostępnym komercyjnie zestawom sond subtelerowych, niższej niż FISH cenie badania, a także mniejszej pracochłonności, ta metoda jest już szeroko stosowana nie tylko do diagnostyki aberracji subtelerowych, ale także zespołów mikrodelecji. Ostatnio także do szybkiej diagnostyki aneuploidii. W tym ostatnim przypadku w wielu laboratoriach FISH interfazową zastępuje obecnie metoda QF-PCR (quantitative fluorescence polymerase chain reaction). Podstawą metody jest amplifikacja swoistych regionów

genomowego DNA (markerów mikrosatelitarnych chromosomów 13, 18, 21 oraz X i Y) uzyskanego z płynu owodniowego lub krwi pacjenta metodą ilościowego PCR z wykorzystaniem fluorescencyjnie znakowanych starterów. Podstawowym ograniczeniem wymienionych powyżej metod jest jednak to, że jako metody celowane umożliwiają identyfikację i charakterystykę tylko tych aberracji chromosomowych, które stwierdzono innymi metodami, lub tych, które mają określoną wcześniej lokalizację w genomie. Wynika to z samej istoty tych metod, które wymagają zastosowania swoistych do określonych sekwencji DNA (regionów chromosomowych) sond lub starterów. Liczba możliwych do równoczesnej analizy loci przy zastosowaniu metody FISH lub MLPA nie przekracza 45. Ograniczenie to przestało istnieć po wprowadzeniu opartej na FISH i opracowanej w latach 90. XX w. techniki porównawczej hybrydyzacji genomowej (CGH), której doskonalszą wersją jest CGH do mikromacierzy. Ta metoda analizy genomu dokonuje kolejnego już, po wprowadzeniu do badań FISH, przewrotu w diagnostyce genetycznej. Umożliwiając jednoczesną analizę całego genomu z teoretycznie nieograniczoną rozdzielczością, tworzy nową jakość w badaniach zmierzających do poznania etiologii i patomechanizmów chorób genetycznych. Zapoczątkowany opracowaniem testu subtelerowego z zastosowaniem FISH i rozwinięty wprowadzeniem techniki CGH do mikromacierzy sposób wzbogacania naszej wiedzy w tym zakresie zmienił się z tradycyjnego, określanego jako „pierwszy fenotyp”, w nowoczesny – „pierwszy fenotyp”. Oznacza to, że w przeciwieństwie do klasycznych już zespołów mikrodelecji, których charakterystyczny obraz kliniczny był znany zanim poznano odpowiedzialny za niego defekt chromosomowy, stosując metodę array CGH możemy najpierw stwierdzić zmianę w DNA, a później po dokonaniu analizy wielu przypadków z taką samą zmianą przypisać jej określony fenotyp. Takie podejście badawcze daje ogromne możliwości diagnostyczne.

Metoda array CGH oferuje, jak już wspomniano, nieosiągalną dotychczas rozdzielczość analizy całego genomu (obecnie 1 mpz-1 kpz) oraz możliwość szybkiego przebadania dużych grup pacjentów. Wyniki badań tą metodą otrzymuje się w ciągu 24-48 godzin. Istotną zaletą metody jest także precyzyjne określanie lokalizacji defektu genomowego, co umożliwia analizę zależności fenotyp-fenotyp. Zależnie od potrzeb diagnostycznych czy badawczych mikromacierze mogą być całogenomowe lub celowane na znane zespoły genetyczne (określane jako kliniczne) czy też na określone zainteresowaniami badawczymi chromosomy lub regiony genomu. W diagnostyce klinicznej wykorzystywane są zazwyczaj celo-

wane lub całogenomowe mikromacierze BAC-owe (sondami są w nich klony bakteryjne niosące określone sekwencje DNA ludzkiego), natomiast w pracach badawczych całogenomowe mikromacierze oligonukleotydo-
we. Mikromacierze kliniczne są tak konstruowane, aby możliwa była również identyfikacja delecji/duplikacji o nietypowej dla danego zespołu wielkości, których nie wykrywano dotychczas metodą FISH. Mikromacierze oligonukleotydo-
we mają znacznie większą niż BAC-owe rozdzielczość. Służą do identyfikacji nowych genów patogennych, analizy trudnych do interpretacji klinicznej przypadków czy wreszcie do identyfikacji wariantów polimorficznych. Trzeba też wspomnieć, że jednym z rodzajów mikromacierzy są oligonukleotydo-
we mikromacierze stosowane do wykrywania polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (single nucleotide polymorphism, SNP). Identyfikują one podczas jednego badania dziesiątki tysięcy SNP-ów. Wykrywają nie tylko nierównowagę genomu, ale także disomię jednorodzielską oraz pochodzenie rodzicielskie stwierdzanych nieprawidłowości.

Mikromacierze znajdują coraz szersze zastosowanie w diagnostyce pacjentów z cechami upośledzenia rozwoju psychoruchowego (lub niepełnosprawności intelektualnej), dysmorfii oraz z wrodzonymi wadami rozwojowymi. Z dotychczasowych badań wynika, że udoskonalają diagnostykę, wykazując istotne klinicznie aberracje w ok. 25-30% przypadków z prawidłowym kariotypem określonym metodą klasyczną. Rozwiązują też problemy interpretacji klinicznej w sytuacjach, w których u osób z cechami sugerującymi aberrację chromosomową stwierdzana jest zrównoważona rearanżacja chromosomowa. Wykazują bowiem aż w 40-60% takich przypadków obecność submikroskopowego nierównoważenia genomu. Z naszych doświadczeń wynika, że zastosowanie mikromacierzy umożliwia wyjaśnienie problemu diagnostycznego powstałego w badaniach konwencjonalnych w ok. 20% przypadków. Wyniki naszych badań wskazują także, że u pacjentów, u których cechy kliniczne sugerują nierównoważenie genomu, korzystne byłoby zarówno z medycznego, jak i w wielu przypadkach ekonomicznego punktu widzenia, zastosowanie mikromacierzy klinicznej jako pierwszego testu w procesie diagnostyki cytogenetycznej. Taki algorytm diagnostyczny stosowany jest już w wielu laboratoriach na świecie. Trzeba też wspomnieć o pierwszych badaniach z zastosowaniem mikromacierzy celowanych do prenatalnej diagnostyki aberracji chromosomowych. Wyniki, które mogą być uzyskane tą metodą, niosą jednak ze sobą wiele trudnych dylematów natury etycznej i prawnej, nie wspominając już o problemach związanych z interpretacją dotyczącą obecności

w genomie wariantów polimorficznych. Stanowią one główną przyczynę bardzo ograniczonego jeszcze zastosowania tej metody w badaniach prenatalnych. Warto natomiast uświadomić sobie, że z jednej strony tocząca się od wielu już lat debata, czy można ograniczyć badania prenatalne tylko do szybkiego testu na aneuploidię, zmierza do zaakceptowania takiego stanowiska, z drugiej zaś trwają dyskusje, czy i jakiego rodzaju mikromacierze mogą być stosowane w badaniach prenatalnych. Należy także pamiętać, że ogromnemu potencjałowi badawczemu i diagnostycznemu mikromacierzy towarzyszą nierzadko także istotne trudności (dotyczą one szczególnie całogenomowych mikromacierzy oligonukleotydo-
wych) w interpretacji znaczenia klinicznego identyfikowanych zmian liczby kopii fragmentów DNA. W ocenie, czy stwierdzona zmiana jest patogenna, pomaga często ustalenie jej pochodzenia (badaniem rodziców pacjenta) oraz jej wielkość. Zazwyczaj zmiany pochodzenia rodzicielskiego oraz mniejsze niż 1 mln par zasad uznawane są za łagodne. W interpretacji wyników pomagają także internetowe bazy danych, w których gromadzone są warianty polimorficzne genomu, stwierdzane w badaniach osób uznanych za zdrowe (Genome Variation Database – <http://projects.tcag.org/variation> oraz Human Structural Variation database – www.humanparalogy.gs.washington.edu/structuralvariation/). Przydatne są także inne bazy danych takie jak DECIPHER (Database of Chromosome Imbalance and Phenotype In Humans using Ensemble Resources) czy też UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) dotycząca zawartości genetycznej analizowanych regionów genomu. W interpretacji wyniku badania należy również uwzględnić potencjalną możliwość ujawnienia się, w wyniku delecji jednej kopii genu, mutacji recesywnej znajdującej się w jego drugim allelu.

Istotnym ograniczeniem metody CGH do mikromacierzy jest brak możliwości wykrywania aberracji zrównoważonych, a także i to, że wynik badania tą metodą – określany mianem kariotypu molekularnego – nie określa ani liczby, ani też struktury chromosomów. Tak więc prawidłowy kariotyp molekularny może zawierać zrównoważoną aberrację strukturalną (translokację lub inwersję), której skutkiem klinicznym jest zwiększone, w stosunku do populacyjnego, ryzyko nierównoważenia genomu u potomstwa nosiciela takiej aberracji. Na zakończenie trzeba też dodać, że nieprawidłowe wyniki uzyskane tą metodą powinny być weryfikowane innymi metodami (FISH, PCR, MLPA), a w przypadku wątpliwości interpretacyjnych konieczne jest także badanie rodziców chorego.

Dwa rozdziały artykułu poświęcone są testom na obecność mutacji oraz epigenetycznej kontroli ekspresji

genów. W pierwszym z nich omówiono zagadnienia dotyczące możliwości diagnostycznych i ograniczeń oraz wartości klinicznej tych testów. Drugi natomiast przedstawia w zasadzie mechanizm powstawania skutków klinicznych piętnowania genomowego na klasycznym już przykładzie zespołu Pradera-Williego (PWS) oraz Angelmana (AS). Zabrakło mi w nim chociaż krótkiej informacji o sposobach diagnostyki zaburzeń ekspresji genów, których przyczyną jest disomia jednorodzielska chromosomów zawierających piętnowane geny. Tym bardziej, że artykuł dotyczy testów genetycznych. Disomię jednorodzielską można stwierdzić dzięki analizie sposobu dziedziczenia markerów polimorficznych swoistych dla określonego chromosomu lub jego regionu. Do tych badań niezbędne jest DNA zarówno chorego, jak i jego rodziców. W diagnostyce PWS i AS stosuje się analizę polimorfizmu mikrosatelitów, czyli fragmentów DNA różniących się liczbą motywów krótkiej, powtórzonej sekwencji. Inną, stosowaną zazwyczaj jako pierwsza, poza określeniem kariotypu, metodą diagnostyki tych zespołów jest analiza wzoru metylacji DNA w regionie 15q11-13. Ta metoda weryfikuje rozpoznanie kliniczne, ale nie identyfikuje rodzaju defektu molekularnego (delecji, disomii czy mutacji); stwierdzenie, czy chromosom 15 jest metylowany, czy nie, określa, jakie jest jego rodzicielskie pochodzenie. Do analizy metylacji stosowana jest technika MSP (metylation specific PCR), a od niedawna także MLPA. Ta druga, jak już wspomniano wcześniej, identyfikuje także typowe dla zespołu mikrodelecje. Ze względu na to, że oba zespoły mogą być wynikiem delecji, disomii jednorodzielskiej lub mutacji zmieniającej piętno genomowe, a częstość tych defektów jest bardzo zróżnicowana, opracowane są odpowiednie dla nich algorytmy postępowania diagnostycznego.

Ciężar gatunkowy testów genetycznych niosących określone implikacje dla chorego i jego rodziny sprawia, że w badaniach genetycznych muszą obowiązywać

bardzo wysokie standardy. Skuteczność i wiarygodność tych testów powinny być bliskie 100%, a lekarz klinicysta – odbiorca ich wyników – musi mieć wiedzę umożliwiającą prawidłową interpretację tych wyników. Sprawy te bardzo krótko, chociaż dosyć ogólnie, zostały omówione w niniejszym artykule. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że autorzy artykułu nie pominęli zagadnień dotyczących specyfiki testów genetycznych w zakresie interpretacji ich wyników. Uświadamiają lekarzom zlecającym diagnostyczne testy genetyczne, że wyniki tych testów wymagają określonej wiedzy do, nie zawsze łatwej, ich interpretacji klinicznej. Uwzględnili również fakt, że testy genetyczne służą nie tylko diagnostyce, ale mają także wartość prognostyczną (dotyczącą chorób ujawniających się z opóźnieniem), co niesie ze sobą określone implikacje dla osoby obciążonej chorobą, a także dla członków jej rodziny. Zwrócenia uwagi w tym miejscu wymaga konieczność zapewnienia rodzinie chorego kompetentnej porady genetycznej. Niestety, nie zawsze jest to uwzględniane w coraz liczniejszych, prywatnych laboratoriach genetycznych. Czytelnik tego artykułu powinien także zdawać sobie sprawę, że złożoność i mnogość problemów dotyczących testów genetycznych, interpretacji ich wyników, a szczególnie aspektów etycznych i prawnych związanych z ich wykonywaniem sprawia, że omówione w niniejszym artykule zagadnienia dotyczą zaledwie problemów związanych z badaniami (testami) genetycznymi. Bardzo ważną i poruszoną w artykule sprawą jest konieczność wyrażenia przez pacjenta lub jego prawnego opiekuna świadomej zgody na wykonanie testu genetycznego. Została ona zapisana w obowiązujących w Polsce standardach badań genetycznych. Należy tylko wyrazić ubolewanie, że od ponad dziesięciu już lat czekamy na ratyfikację Konwencji Bioetycznej Rady Europy, która reguluje wiele zagadnień dotyczących etycznych i prawnych uwarunkowań wykonywania testów genetycznych.