

Cílené genové testování za použití sekvenování nové generace upřesňuje diagnózu a léčbu u pacientů s onemocněním ledvin

Mansilla MA, Sompallae RR, Nishimura CJ, et al. Targeted broad-based genetic testing by next-generation sequencing informs diagnosis and facilitates management in patients with kidney diseases.

Nephrol Dial Transplant 2019; Nov 18. pii: gzf173. doi: 10.1093/ndt/gzf173. [Epub ahead of print].

Řada renálních chorob má genetické pozadí nebo je jednoznačně způsobena mutacemi jednoho nebo více genů. Klinické projevy, laboratorní nálezy, ale i zobrazovací metody nemusejí jasně stanovit diagnózu, protože manifestace řady chorob s různým genetickým podkladem se vzájemně překrývá.

Šlo o retrospektivní studii u 127 pacientů (77 mužů) s pravděpodobnou dědičnou chorobou ledvin a s nejednoznačným fenotypem. Pacienti ve věku 0–81 let (56 pacientů 0–6 let, 22 pacientů 7–14 let, 26 pacientů 15–30 let, 23 pacientů nad 30 let) byli rozděleni na základě klinické diagnózy do čtyř širokých skupin – ciliopatie/tubulointersticiální choroby, CAKUT (kongenitální anomálie ledvin a močového traktu), tubulární abnormality transportu a glomerulopatie. Z glomerulopatií se nejčastěji jednalo o fokálně segmentální glomerulosklerózu (17 pacientů) a pravděpodobný Alportův syndrom (10 pacientů).

Pacienti byli analyzováni panelem se 177 geny, jejichž mutace se uplatňují v patogenezi renálních chorob. Varianty, které se vyskytují v populaci ve více než 1 %, nebyly analyzovány (polymorfismy). Touto metodou je možno zachytit i zmnožení bází CNV (copy number variant), které jsou příčinou řady chorob. U duplikované části genu *PKD1* (exon 1–32) bylo prováděno klasické Sangerovo sekvenování. Jako jednoznačně patogenní varianty byly označeny mutace, které podle literárních údajů vedly ke změně funkce kódovaného proteinu. Jako pravděpodobně patogenní byly hodnoceny především missense mutace vedoucí ke změně aminokyseliny v proteinu, které

byly hodnoceny šesti predikčními programy. Pokud dosáhly skóre vyššího než 4, byly hodnoceny jako mutace. Všechny analyzované geny měly dobré pokrytí (30 a více) a pokrytí zasahovalo do 25 bází intronů k zachycení i řady stříhových mutací. Ostatní změny byly hodnoceny jako změny nejasného významu.

Diagnóza na podkladě mutační analýzy byla stanovena u 54 pacientů (43 %). Pokud byli pacienti rozděleni dle věku, byla mutace zjištěna u 46 % ve věku 0–14 let, u 46 % ve věku 15–30 let a u 22 % pacientů starších 30 let. Pokud byli pacienti rozděleni dle diagnóz, byla mutace zjištěna u 54 % pacientů se syndromem CAKUT, u 53 % s ciliopatiemi/tubulointersticiální nefritidou (TIN), u 45 % pacientů s poruchou tubulárního transportu a u 33 % pacientů s glomerulopatiemi. Podle typu mutace byly nejčastěji zachyceny missense mutace – v 46 %, ve 23 % inserce nebo delece, v 11 % nonsense mutace a v 6 % stříhové mutace; CNV (copy number variants) byly nalezeny ve 14 % případů. U 41 (76 %) pacientů genetické testování potvrdilo pravděpodobnou klinickou diagnózu, ve 13 případech (24 %) byla po zjištění výsledku mutační analýzy klinická diagnóza změněna. Jedním z klinických dopadů bylo zjištění mutací v genech pro CAKUT u cystických dysplazií ledvin. V jednom případě byla v genu *EYA* zjištěna mutace, která způsobuje branchio-oto-renální syndrom. U pacienta pak byla potvrzena a léčena těžká porucha sluchu. U dalšího pacienta s cystickou dysplazií ledvin byla přítomna mutace v genu *WT1* a následně byl zjištěn Wilmsův tumor, který byl včas odoperován.

KOMENTÁŘ

Doc. MUDr. Jana Reiterová, Ph.D.

Mutační analýza panelu nefrologických genů ukázala, že genetický podklad řady renálních postižení v dětském, ale i dospělém věku je podceňován. Analýza desítek suspektních genů vedla ve 14 % případů k odlišné diagnóze ve srovnání s původní stanovenou klinickou diagnózou. V řadě případů nám nalezení mutací upřesní diagnózu onemocnění, umožní lépe předvídat klinický průběh choroby a umožní prenatální/preimplantační diagnostiku. I u nejčastějších genetických chorob v dospělosti, jako je autozomálně dominantní polycystická choroba ledvin a Alportův syndrom, byl díky panelu NGS (next generation sequencing) odhalen komplexní charakter těchto chorob, kdy mutace v dalších genech mohou výrazně ovlivnit klinický průběh choroby, a ovlivňují tak významně intrafamiliární variabilitu onemocnění.

Z glomerulopatií se zdá nejužitečnější použití panelu genů u fokálně segmentální glomerulosklerózy (FSGS) a Alportova syndromu. U dětských pacientů se jedná většinou o geny spojené s autozomálně recesivními formami těžkého nefrotického syndromu, které nereagují na imunosupresivní léčbu. U těchto genetických forem nefrotického syndromu naštěstí nedochází po transplantaci k recidivě onemocnění ve štěpu. U dospělých s FSGS to bývají častěji mírnější formy stran proteinurie, ale na druhou stranu genetické formy velmi často progredují do selhání ledvin. U dospělých bývají mutace v genech spojených s autozomálně dominantním přenosem FSGS. U FSGS však bývají mutované další geny jako pro syndrom nail-patella nebo choroby spojené nejčastěji s trombocytopatií (choroby MYH). Řada genů není plně penetrantních, a proto se v některých případech může objevit jen renální postižení.

K podobným výsledkům dospěla i španělská studie před dvěma lety,¹ kdy byl analyzován metodou NGS panel 140 genů u cystických onemocnění a glomerulopatií. Kauzální mutace byla nalezena u 78 % pacientů s cystickými onemocněními a u 62 % pacientů s glomerulopatiemi. Také v rámci této studie vedla genetická analýza k překlasifikování choroby u 17 % pacientů.

Co se týče vlastní metody panelu vybraných genů na NGS, má jistě také své limity. Pokud je nově identifikován další vzácný gen zodpovědný za některé onemocnění, není možné ho ihned na panel přidat, ale je nutno vytvořit nový panel. Touto metodou nelze analyzovat duplikovanou část genu PKD1, dále nelze bezpečně zachytit inzerci cytosinu v genu MUC1 zodpovědném za autozomálně dominantní TIN. Dalším problémem bývá interpretace některých mutací na různých alelách genu nebo především v různých genech u autozomálně recesivních onemocnění. Ke stanovení kauzality mutace je nutné dovyšetřit rodiče nebo potomky probanda. Někteří autoři doporučují jako metodu volby u nejasných dědičných chorob rovnou celoxomové, nebo dokonce celogenomové sekvenování,² které je jen o něco nákladnější než panel NGS. Při sekvenování DNA 3 315 pacientů s chronickou renální insuficiencí byly nalezeny patogenní varianty u 9,3 %. Odpadá problém se zahrnutím nejnovějších genů. Při sekvenování všech exomů se nedaří zachytit CNV a mutace v duplikované části genu PKD1. Nejobtížnější ale opět zůstává interpretace patogenicity řady variant, a proto v mnoha případech bude nutné doplnit funkční studie na úrovni proteinů.

Panel NGS nefrologických genů a jeho analýza představují u řady nefrologických onemocnění určitě užitečnou, rychlou a relativně levnou metodu k upřesnění jejich diagnostiky.

LITERATURA

1. Bullich G, Domingo G, Fallego A, et al. A kidney-disease gene panel allows a comprehensive genetic diagnosis of cystic and glomerular inherited kidney diseases. *Kidney Int* 2018;94:363–371.
2. Groopman EE, Marasa M, Cameron-Christie S, et al. Diagnostic utility of exome sequencing for kidney disease. *N Engl J Med* 2019; 380:142–151.