

Sekvenciranje nove generacije u dijagnostici monogenских poremećaja

Kristina Crkvenac Gornik¹, Jadranka Škorput¹, Ana Juras¹, Sanda Huljev Frković²

Sekvenciranje nove generacije (NGS, engl. next generation sequencing) ključno je za dijagnostiku monogenских poremećaja, uključujući neurokutane sindrome (fakomatoze) i sindrome vezivnog tkiva poput sindroma Noonan i Marfan. U ovom radu analizirali smo primjenu NGS-a u Kliničkom bolničkom centru Zagreb od 2022. godine. Ukupno je analiziran 131 uzorak pacijenata sa sumnjom na neurokutane sindrome i 94 uzorka sa sumnjom na Noonanov ili Marfanov sindrom i slične poremećaje. Rezultati su pokazali da 25 % pacijenata s kliničkom sumnjom na neurokutani sindrom nosi patogene varijante, pri čemu je najčešće zahvaćen gen NF1. Kod pacijenata sa sindromima Noonan ili Marfan, 23 % imalo je patogene mutacije, najčešće u genima PTPN11 i FBN1. Standardni NGS paneli gena prvenstveno detektiraju točkaste mutacije i manje delecije/duplikacije te kod većih uzročnih posljedica, poput delecija gena NF1, značajnu dijagnostičku ulogu ima i dodatna MLPA analiza za detekciju većih delecija koje NGS ne može otkriti. Primjena NGS-a omogućuje precizniju dijagnozu i diferencijaciju među genetski sličnim sindromima, što poboljšava kliničku praksu i genetsko savjetovanje.

Ključne riječi: SEKVENCIRANJE SLJEDEĆE GENERACIJE; NEUROKUTANI SINDROMI; NOONAN SINDROM; MARFAN SINDROM; NEUROFIBROMATOZE

UVOD

Sekvenciranje nove generacije (NGS, engl. *Next-Generation Sequencing*) rutinska je metoda u dijagnostici genetskih poremećaja kojom se detektiraju promjene gena na nukleotidnoj razini. Analizom podataka dobivenih NGS-om, otkrivene su brojne nukleotidne varijante koje su povezane s određenim fenotipskim abnormalnostima i kliničkim slikama pojedinih bolesti. Ovim radom obuhvaćeni su monogenски poremećaji koji se od 2022. godine mogu dijagnosticirati putem NGS panela u Kliničkom bolničkom centru Zagreb. Prvi uvedeni panel u dijagnostici bio je Panel za neurokutane poremećaje.

Neurokutani sindromi ili fakomatoze predstavljaju skupinu poremećaja koji prvenstveno zahvaćaju živčani sustav i kožu te se prezentiraju varijabilnom kliničkom slikom. Dvije najčešće fakomatoze su neurofibromatoza (NF, engl. *Neurofibromatosis*) i kompleks tuberozne skleroze (TSC, engl. *Tuberous Sclerosis Complex*). Neurofibromatoza tipa 1 (NF1) javlja se s učestalošću od 1:2500 do 1:3000 osoba i karakterizira se značajnom varijabilnošću kliničke slike (1). Gotovo svi oboljeli razvijaju pigmentirane mrlje boje bijele kave (CALMs, *café-au-lait*) na koži te brojne kožne neurofibrome. Klinički kriteriji za dijagnozu NF1 obično se razvijaju do osme godine života, dok se kožni neurofibromi

¹Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Odjel za citogenetiku, KBC Zagreb, Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, Hrvatska

²Klinika za pedijatriju, Zavod za genetiku i metabolizam, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb, 10000 Zagreb, Kišpatićeva 12, Hrvatska

obično ne pojavljuju do kasne adolescencije, što otežava postavljanje dijagnoze u djetinjstvu.

Prisutnost nekoliko *café-au-lait* mrlja u ranoj dobi uobičajena je među djecom, no ako su brojne, mogu upućivati na nasljednu bolest. Već sama prisutnost šest ili više takvih mrlja u ranom djetinjstvu sugerira sumnju na NF1 te predstavlja jedan od glavnih kliničkih dijagnostičkih kriterija. Međutim, višestruke *café-au-lait* mrlje mogu ukazivati i na druge monogenske bolesti, uključujući druge RASopatije. S obzirom na učestalost i potrebu diferencijalne dijagnoze, uveli smo panel za RASopatije, koji obuhvaća gene povezane s ovim poremećajima, kao i gene za sindromske bolesti aorte.

RASopatije su klinički definirana skupina genetskih bolesti uzrokovanih mutacijama u genima koji kodiraju komponente RAS/MAPK signalnog puta. Osim NF1, RASopatije uključuju Noonanov sindrom (NS), Noonanov sindrom s multiplim lentiginima (NSML), Costellov sindrom (CS), Legiusov sindrom (LS), kardio-facio-kutani sindrom (CFC) i kapilarno-malformacijsko-arteriovensko-malformacijski sindrom (CM-AVM). Iako svaka RASopatija ima specifične kliničke manifestacije, zbog zajedničkog mehanizma disfunkcije RAS/MAPK signalnog puta dijele fenotipske značajke, posebno u ranom djetinjstvu. Ove zajedničke kliničke manifestacije uključuju abnormalnosti kože, muskuloskeletnog sustava i očiju; kraniofacijalnu dismorfiju; kardiovaskularne anomalije; neurokognitivne poteškoće; hipotoniju te povećan rizik od razvoja tumora (2). NF1, LS i CM-AVM uzrokovani su mutacijama koje dovode do gubitka funkcije gena NF1, SPRED1 i RASA1, dok su NS, NSML i CFC sindromi genetski heterogeni i povezani s aktivirajućim mutacijama u genima PTPN11, SOS1, RAF1, BRAF, KRAS, NRAS, SHOC2, MAP2K1, MAP2K2, CBL, HRAS i RIT1. Postoje i dodatni geni koji se istražuju u kontekstu RASopatija, poput RASA2, A2ML1, PPP1CB, SOS2, MRAS, RRAS i LZTR1 (3).

Osim spomenutih panela, u laboratoriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb uveden je i NGS panel za nasljedne metaboličke bolesti, koji uključuje dijagnostiku fenilketonurije, nedostatka acil-CoA-dehidrogenaze srednjih i vrlo dugih lanaca, nedostatka karnitinskog nosača, izovaleričke acidurije, glutarne acidurije tipa 1, hiperkolesterolemije i hipermetioninemije.

U ovom radu prikazat ćemo pregled analize ciljanih genskih NGS panela u bolesnika s kliničkom slikom koja ukazuje na fakomatozu, bolesnika sa sindromskim poremećajima vezivnog tkiva, uključujući Marfanov sindrom te bolesnika sa sumnjom na sindrom Noonan čiji su uzorci zaprimljeni na Odjel za citogenetiku KBC-a Zagreb od 2022. godine.

MATERIJALI I METODE

Od uvođenja NGS panela 2022. godine, u Odjelu za citogenetiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb metodom sekvenciranja nove generacije (NGS) analiziran je 131 uzorak periferne krvi pacijenata sa sumnjom na fakomatozu te 94 uzoraka pacijenata sa sumnjom na Noonanov ili Marfanov sindrom i klinički slične poremećaje.

U panel za neurokutane i srodne sindrome uključeni su geni prikazani u Tablici 1, a analizirane su sve kodirajuće (egzonske) i nekodirajuće (intronске) regije navedenih gena.

Tablica 1. Popis gena obuhvaćenih panelom za neurokutane sindrome

Panel gena za neurokutane sindrome	
Neurofibromatoze	NF1
	NF2
Kompleks tuberozne skleroze	TSC1
	TSC2
Legius sindrom	SPRED1
Von Hippel Lindau sindrom	VHL
Piebaldizam	KIT

U panel za Noonanov, Marfanov i srodne sindrome uključeni su geni prikazani u Tablici 2. Sekvenciranjem su obuhvaćene sve kodirajuće regije analiziranih gena, uključujući granice egzona i introna (± 25 pb) (Tablice 1 i 2).

Tablica 2. Popis gena obuhvaćenih panelom za Noonanov/Marfanov i srodne sindrome

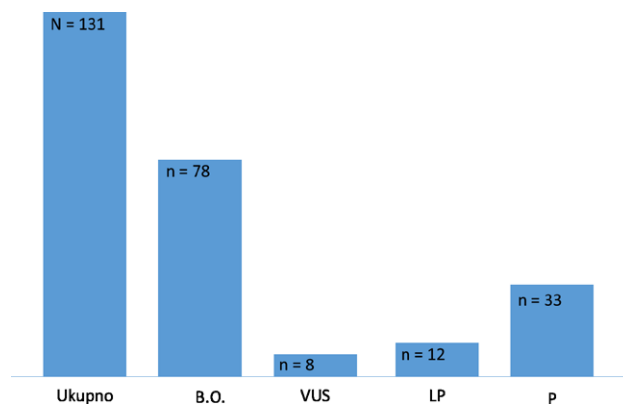
Panel gena za Noonan/Marfan i srodne poremećaje				
A2ML1	HRAS	NRAS	SHOC2	SOS2
BRAF	KRAS	RAF1	SKI	TGFB2
FBN1	MAP2K1	RASA2	SMAD2	TGFB3
FBN2	NF1	RIT1	SMAD3	TGFB1
LZTR1	PTPN11	RRAS	SOS1	TGFB2
CBL				

Izolacija genomske DNA iz periferne krvi provedena je primjenom komercijalnog kompleta QIAGEN FlexiGene DNA kit (QIAGEN, Hilden, Njemačka) (4). Koncentracija izolirane DNA određena je s pomoću Qubit 2.5 fluorimetra (Thermo Fisher Scientific).

Biblioteke za sekvenciranje pripremljene su korištenjem SureSelect XT HS2 kompleta reagensa (Agilent Technologies). Sekvenciranje je provedeno na uređaju DNBSEQ-G99 (MGI Tech Co.), a očitane sekvence DNA poravnate su prema referentnom genomu GRCh38. Dobiveni rezultati analizirani su s pomoću Genome Seq platforme te pretraživanjem baza podataka OMIM, ClinVar, HGMD, Franklin, gnomAD i dbSNP.

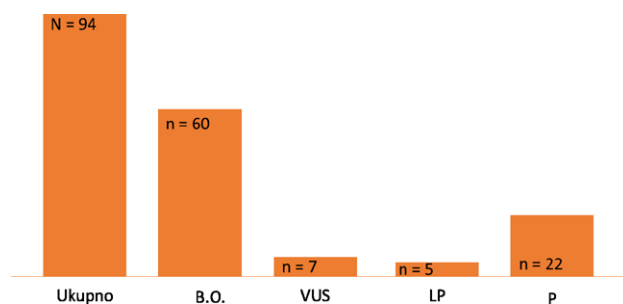
REZULTATI

Analizom podataka dobivenih ciljanim genskim sekvenciranjem, identificirane su varijante koje su kategorizirane prema njihovoj kliničkoj značajnosti u patogene (P, engl. *pathogenic*), vjerojatno patogene (LP, engl. *likely pathogenic*), varijante nepoznatog kliničkog značaja (VUS, engl. *variant of uncertain significance*) te benigne varijante (B, engl. *benign*) (Slika 1). U skupini pacijenata s neurokutanim sindromima (n = 131), kod 78 (60 %) pacijenata prisutne su benigne varijante. Kod 8 uzoraka (6 %) nađene su VUS varijante, dok su vjerojatno patogene varijante identificirane u 12 pacijenata (9 %). Patogene varijante potvrđene su kod 33 pacijenta (25 %) (Slika 1.). Najveći broj uzročnih varijanti identificiran je u genu NF1 (n = 45). Po dvije uzročne varijante otkrivene su u genima SPRED1 i VHL, dok je u genima TSC1 i TSC2 nađena samo jedna uzročna varijanta. Unutar skupine klinički značajnih varijanti gena NF1, 35 je smješteno u egzonskim regijama, dok je 10 smješteno u intronskim regijama. Najčešće detektirane varijante bile su „NF1 c.4600C>T HET” (egzon 35) i „NF1 c.1261-1G>T HET” (intron 11), svaka prisutna u tri neovisna uzorka, dok su ostale varijante bile pojedinačne. Kod ukupno 94 uzoraka pacijenata s kliničkom slikom koja ukazuje na poremećaj vezivnog tkiva ili na sindrom Noonan, kod 60 pacijenata (64 %) nisu nađene varijante povezane s kliničkom slikom. Varijante nepoznatog kliničkog značaja identificirane su kod 7 pacijenata (7 %), vjerojatno patogene kod 5 (5 %) i patogene varijante kod 22 (23 %) pacijenta (Slika 2.). Naj-



Prikazan je ukupan broj (N) analiziranih pacijenata te broj varijanti (n) koje su klasificirane kao P-patološke, LP-vjerojatno patološke, VUS-varijante nepoznatog kliničkog značaja. Stupac B.O. označava broj pacijenata kod kojih su pronađene isključivo benigne varijante.

Slika 1. Grafički prikaz distribucije patogenosti varijanti otkrivenih NGS ciljanim panelima za neurokutane sindrome.



Prikazan je ukupan broj (N) analiziranih pacijenata te broj varijanti (n) koje su klasificirane kao P-patološke, LP-vjerojatno patološke, VUS-varijante nepoznatog kliničkog značaja. Stupac B.O. označava broj pacijenata kod kojih su pronađene isključivo benigne varijante.

Slika 2. Grafički prikaz distribucije patogenosti varijanti otkrivenih NGS ciljanim panelima za poremećaje vezivnog tkiva, poput Noonan i Marfan sindroma.

češće uzročne varijante pronađene su u genu PTPN11 (n = 10), pri čemu je varijanta „PTPN11 c.182A>G HET” identificirana u dva neovisna uzorka, dok su ostale varijante bile pojedinačne. Osim PTPN11, klinički značajne varijante nađene su u genu FBN1 genu (n = 7), pri čemu je varijanta FBN1 „c.7774T>C HET” identificirana u dva uzorka. Ostale pojedinačne patogene varijante detektirane su u genima: RIT1, RAF, BRAF i SHOC2.

RASPRAVA

U ranom djetinjstvu mogu se pojaviti nesigurne kliničke dijagnoze zbog sličnosti simptoma NF1 i drugih RASopatija ili bolesti povezanih s café-au-lait mrljama. Primjerice, istovremena prisutnost

café-au-lait mrlja i pjega u pregibima kože može se vidjeti kod djece s NF1 i LS (5, 6). Stoga, djeca sličnog početnog kliničkog fenotipa mogu nositi mutacije u različitim genima, što ih predisponira različitim kliničkim tijekovima koji zahtijevaju specifične medicinske pristupe. U tom kontekstu, genetsko testiranje može pomoći u potvrdi kliničke sumnje, omogućujući rano i precizno praćenje. Primjerice, genetsko testiranje se preporučuje za potvrdu NF1 kod djece koja ispunjavaju samo pigmentacijske dijagnostičke kriterije (7). Trenutačne strategije genetskog testiranja za ove nasljedne bolesti uključuju multigenске panele ili sekvenciranje cijelog egzoma, što omogućuje rješavanje problema genetske heterogenosti i nejasnih kliničkih prezentacija. S obzirom na visoku moć i isplativost NGS metoda (sekvenciranja nove generacije), sve se više prihvaća genetsko testiranje i kod nesigurnih, ali sugestivnih kliničkih prezentacija, što dovodi do povećanog broja testiranja, osobito kod djece. S druge strane, sve veći broj identificiranih genetskih varijanti donosi izazove u njihovoj interpretaciji i analizi patogenosti. Kako bi se ovaj proces standardizirao, smjernice Američkog koledža za medicinsku genetiku i genomiku (ACMG/AMP) široko su prihvaćene u kliničkoj praksi (8). Međutim, potrebno ih je prilagoditi specifičnostima testiranih genetskih stanja. Kod RASopatija dodatna složenost proizlazi iz postojanja bolesti uzrokovanih i gubitkom i povećanjem funkcije gena. Nedavno je ClinGen RASopathy Expert Panel objavio nove smjernice za poboljšanje povezanosti gena i bolesti te interpretaciju varijanti za NS, NSML, CS, CFC i Noonan-like sindrome. Zanimljivo je da je kod našeg pacijenta koji je upućen na dijagnostiku zbog sumnje na sindrom Noonan nađena VUS varijanta u egzonu 37 gena NF1, što ukazuje na zajedničke genetske mehanizme u patogenezi ovih sindroma i važnost genetičkog testiranja.

Neurofibromatoza tipa 1 (NF1) najčešće je uzrokovana točkastim mutacijama u NF1 genu, koje čine većinu patogenih varijanti povezanih s bolešću. Međutim, u određenom postotku slučajeva uzrok može biti i velika delecija koja zahvaća cijeli NF1 gen ili veće regije kromosoma 17q11.2. Ove velike delecije obično uključuju više od 1,4 Mb DNA i mogu obuhvatiti susjedne gene, što može rezultirati težim fenotipom bolesti.

Budući da standardni NGS paneli gena prvenstveno detektiraju točkaste mutacije i manje delecije/duplikacije, oni nisu prikladni za otkrivanje velikih delecija cijelog gena NF1. Za detekciju ovakvih strukturnih varijanti potrebno je koristiti metode poput MLPA (engl. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) ili CNV (engl. *Copy Number Variation*) analiza.

Kod jednog našeg pacijenta NGS panelom nije otkrivena patogena varijanta u NF1 genu, ali je dodatna analiza s pomoću MLPA setova P081 i P082 pokazala postojanje delecije cijelog NF1 gena, što potvrđuje važnost komplementarnog pristupa u genetskoj dijagnostici NF1.

Ova saznanja su u skladu s literaturnim podacima koji navode da otprilike 5-10 % pacijenata s NF1 imaju veliku deleciju NF1 gena, što zahtijeva specifične dijagnostičke metode poput MLPA ili array-CGH za njihovo detektiranje (9).

Detekcija uzročnih varijanti primjenom naših NGS panela potvrđuje kliničku sumnju i omogućuje primjereno genetsko savjetovanje obitelji bolesnika. U slučaju negativnog nalaza, s obzirom na nemogućnost otkrivanja velikih delecija i/ili duplikacija gena, strukturnih preslagivanja, mozaicizma u niskom postotku te regija u genima koje nisu obuhvaćene panelom, dijagnoza neurokutanog sindroma i sindroma poremećaja vezivnog tkiva nije u potpunosti isključena. U takvim slučajevima indicirana je konzultacija vodećeg liječnika i genetičara s ciljem utvrđivanja potrebe i mogućnosti daljnje genetske obrade.

Kratice:

CALMs	– <i>café-au-lait</i> maculae
CFC	– kardio-faciokutani sindrom
CM-AVM	– kapilarno-malformacijski-arteriovensko-malformacijski kutani sindrom
CNV	– engl. <i>copy number variation</i>
CS	– Costellov sindrom
LS	– Legius sindrom
MLPA	– engl. <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
MS	– Marfanov sindrom
NF	– neurofibromatoza
NGS	– sekvenciranje sljedeće generacije, engl. <i>next generation sequencing</i>
NS	– Noonanov sindrom
NSLM	– Noonanov sindrom s multiplim lentiginima
TSC	– tuberozna skleroza kompleks

LITERATURA

1. Lee Y, Chopra M, Kim S, Parkin D, Barnett-Tapia C. Incidence and prevalence of neurofibromatosis type 1 and 2: a systematic review and meta-analysis. *Orphanet J Rare Dis.* 2023;18(1):292.
2. Bezniakow N, Gos M, Obersztyn G. The RASopathies as an example of RAS/MAPK pathway disturbances – clinical presentation and molecular pathogenesis of selected syndromes. *Dev Period Med.* 2014;18(3):285-96.
3. Grant AR, Cushman BJ, Cavé H, et al. Assessing the gene-disease association of 19 genes with the RASopathies using the ClinGen gene curation framework. *Hum Mutat.* 2018;39(11):1485-93. doi: 10.1002/humu.23624.
4. Escamilla R, Camarena B, Saracco-Alvarez R, Fresán A, Hernández L, Aguilar-García A. Association study between COMT, DRD2, and DRD3 gene variants and antipsychotic treatment response in Mexican patients with schizophrenia. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2018;14:2981-7.
5. Giugliano T, Santoro C, Torella A, et al. Clinical and genetic findings in children with neurofibromatosis type 1, Legius syndrome, and other related neurocutaneous disorders. *Genes (Basel).* 2019;10(8):580. doi: 10.3390/genes10080580.
6. Kavamura MI, Leoni C, Neri G. Dermatological manifestations, management, and care in RASopathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2022;190(4):452-8.
7. Anderson C, Sharon E. Café-au-lait macules and associated genetic syndromes. *J Pediatr Health Care.* 2020;34(1):71-81.
8. Richards S, Aziz N, Bale S, et al.; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30.
9. Kehrer-Sawatzki H, Mautner V, Cooper DN. Emerging genotype-phenotype relationships in patients with large NF1 deletions. *Hum Genet.* 2017;136(4):349-76.

Adresa za dopisivanje:

Doc.dr.sc. **Kristina Crkvenac Gornik**, mag. biol. mol.
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Odjel za citogenetiku
KBC Zagreb
Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb
e-mail: kcrkvena@kbc-zagreb.hr

SUMMARY

Next-generation sequencing in the diagnosis of monogenic disorders

Kristina Crkvenac Gornik, Jadranka Škorput, Ana Juras, Sanda Huljev Frković

Next-generation sequencing (NGS) is essential for diagnosing monogenic disorders, including neurocutaneous syndromes (phakomatoses) and connective tissue syndromes such as Noonan and Marfan syndromes. A retrospective study was conducted from 2022 to 2025 to analyse the application of NGS at the University Hospital Centre Zagreb. A total of 131 patient samples suspected of neurocutaneous syndromes and 94 samples suspected of Noonan or Marfan syndrome were analyzed. The results showed that 25 % of patients clinically suspected of having a neurocutaneous syndrome carried pathogenic variants, with the NF1 gene being the most frequently affected. Among patients with connective tissue syndromes, 23 % had pathogenic mutations, most commonly in the PTPN11 and FBN1 genes. Standard NGS gene panels primarily detect point mutations and small deletions/duplications, while for larger causal alterations, such as NF1 gene deletions, additional MLPA analysis plays a significant diagnostic role in detecting larger deletions that NGS cannot identify. The application of NGS enables more precise diagnosis and differentiation among genetically similar syndromes, improving clinical practice and genetic counseling.

Key words: HIGH-THROUGHPUT NUCLEOTIDE SEQUENCING; NEURO CUTANEOUS SYNDROMES; NOONAN SYNDROME; MARFAN SYNDROME; NEUROFIBROMATOSES;