

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**KLINIKAI LABORATÓRIUMI GENETIKAI ÉS MOLEKULÁRIS
BIOLÓGIAI VIZSGÁLATOK SÚLYOS MONOGÉNES BETEGSÉGEKBEN
ÉS MULTIFAKTORIÁLIS KÓRKÉPEKBEN**



DR. BALOGH ISTVÁN

**DEBRECENI EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
LABORATÓRIUMI MEDICINA INTÉZET
KLINIKAI GENETIKAI TANSZÉK**

Debrecen, 2020

ELŐSZÓ

2007-ben, nagyapám halálakor Orosz István akadémikus így búcsúztatta őt a Magyar Hírlap május 21-ei számában:

"Balogh Istvánnal Debrecen múltjának egy darabját teszik sírba

Május 4-én, életének 95. évében elhunyt Balogh István levéltáros, muzeológus, a történelemtudományok doktora, címzetes egyetemi tanár. Debrecen szülötte és a város múltjának legjobb ismerője volt. Nagyon mélyről, a debreceni erdős puszták egyik tanyasi iskolájából jutott el a református kollégiumba, majd szerzett az akkor Tisza Istvánról elnevezett egyetemen történelem–földrajz szakos tanári diplomát és 1935-ben egyetemi doktori címet. Történeti témából doktorált, de a Déri Múzeum munkatársaként rövidesen néprajzi dolgozatokkal jelentkezett. Az egyetemen, magántanárként viszont szociológiai előadásokat tartott s az 1950-es években művészettörténeti tanulmányokat is publikált. A második világháború borzalmi vették rá arra, hogy politikai szerepet vállaljon az új, akkor demokratikusnak elképzelt Magyarország megteremtésében. Rokonszenvezett a népi írókkal – Veres Péterrel, Erdei Ferencsel közeli kapcsolatban volt –, így a Nemzeti Parasztpártban vállalt feladatokat. Előbb Szatmár, majd Hajdú megye és Debrecen főispánja lett, de a "fordulat éve" rádöbbenette, hogy Magyarországon nem az általa elképzelt rend formálódik. Lemondott a főispánságról, visszatért a Déri Múzeumba, és rövidesen igazgatója lett. 1957-ben, nem függetlenül a megtorlásoktól, elbocsátották. Nyíregyháza fogadta be, előbb a Jósza András Múzeumban volt muzeológus, majd 1963 után igazgató a Szabolcs-Szatmár Megyei Levéltárban. Tudományos életműve rendkívül szerteágazó. Aligha kétséges azonban, hogy az alföldi népelet legjobb ismerői közé tartozott. Tudatában volt annak, hogy a modern társadalomnéprajz nem boldogulhat a történeti források nélkül, a társadalomtörténet, benne a parasztság története nem vizsgálható szociológiai eszközök s a mentalitás elemzése nélkül. Így születettek meg könyvei, tanulmányai a debreceni cívisek világáról, a hajdúk társadalmáról, a "debreceniségről" mint a "legmagyarabb" város jellemzőiről, a két világháború közötti paraszti művelődésről, az alföldi tanyás gazdálkodásról, a dualizmus korának paraszti életformájáról és termelési technikájáról, a határhasználat sajátosságairól, a 16–19. századi alföldi népelet számos kérdéséről a gabona betakarításának módjától az állattartásig, a megyei közigazgatás változásától Debrecen műemlékeinek a bemutatásáig. A szakmai sikerek mellett a rendszerváltozás ifjúsága eszményeihez is közelebb hozta, elnyerte a

legjelentősebb kitüntetések. Az Akadémiától Eötvös-koszorút, városától díszpolgárságot, az egyetemtől a díszdoktori címet kapott. Ha szakmai sokoldalúsága, munkabírása titkát keressük, nem tekinthetünk el az első generációs értelmiségiek mohó tudásvágyától. Belülről ismerte az alföldi parasztvilágot, különösen a debreceni cívisek, a parasztpolgárok gondolkodását. Éppen ezért ő volt a legszigorúbb kritikusa is ennek az életformának. Nem hamis nosztalgiával tekintett rá, hanem az értő és elemző tudós biztonságával. Nem félt megállapítani, hogy a valaha mintaképnek tekintett debreceni polgári lét sokféle erényéből a 20. századra idejétmúlt kuriozitás vált. Debrecen másik szerelmese, Szabó Magda világosan látta, hogy Balogh István nem egyszerűen a város tudósa, hanem "minden, hazánknak használó jónak hűséges pásztora, nemzeti örökségünk katona bátorságával védelmezője". A ritkán elérzékenyülő, szikár kálvinista Balogh István mesterének, Ecsedi Istvánnak temetéséről azt írta, hogy "Debrecen múltjának egy darabját" tették vele sírba. Mi, akik abban a szerencsében részesültünk, hogy munkatársai lehettünk s barátságával is kitüntetett, róla sem mondhatunk mást."

A nekrológban írt, nagyapám rendkívül széles érdeklődési körét taglaló részek számomra csak most, e disszertációra készülve nyertek értelmet. Visszatekintve a több, mint 20 éves tudományos tevékenységemre, a méltatlan utód magára ismer a történelmi időket megélt szilárd hitű és hihetetlen munkabírású elődben. Esetemben a szerteágazó munkáim kötőanyaga, örök szenvedélyem, a genetika, mely minden tudományos tevékenységem alapja, legyen az monogénes vagy multifaktoriális betegségek vizsgálata, molekuláris genetikai módszerfejlesztés vagy RNS, fehérje szintű vizsgálatok.

Munkám, mely pályám kezdete óta molekuláris genetikai diagnosztika, minden esetben klinikai problémák megoldására irányul. E tevékenységem összegzése a jelen disszertáció.

TARTALOMJEGYZÉK

ELŐSZÓ	3
TARTALOMJEGYZÉK	5
RÖVIDÍTÉSEK	11
1. BEVEZETÉS	15
1.1. Egyedi monogénes betegségek vizsgálata	16
1.1.1. A véralvadás V-ös faktorának öröklött hiánya	16
1.1.1.1. A FV deficiencia klinikai laboratóriumi genetikája	18
1.1.2. A C típusú Niemann-Pick betegség: klinikum, pathomechanizmus	19
1.1.2.1. Az NPC laboratóriumi diagnosztikája - biomarkerek	21
1.1.2.2. Az NPC klinikai laboratóriumi genetikája	22
1.1.3. A Duchenne/Becker izomsorvadás	24
1.1.3.1. A Duchenne/Becker izomsorvadás klinikai laboratóriumi genetikája	25
1.1.4. A glükóz metabolizmus monogénes zavarai	27
1.1.4.1. Neonatális diabetes mellitus	27
1.1.4.1.1. A neonatális diabetes klinikai laboratóriumi genetikája	28
1.1.4.2. Fiatal felnőttkori diabetes (maturity-onset diabetes of the young, MODY)	29
1.1.4.2.1. A MODY klinikai laboratóriumi genetikája	31
1.1.4.3. A hypoglycaemiás hyperinsulinismus	32
1.1.4.3.1. A HH klinikai laboratóriumi genetikája	34
1.2. Genetikai diagnosztikai módszertani fejlesztések	34
1.2.1. Az anyai sejt kontamináció hatása a molekuláris genetikai diagnosztikai tesztekre invazív mintavételt követő prenatalis diagnosztika során	34
1.2.2. Piroszekvenálási alapú új generációs DNS szekvenálási rendszer analitikai paramétereinek vizsgálata	37
1.3. Monogénes kohorszok vizsgálata	38
1.3.1. A cystás fibrosis (CF)	38
1.3.1.1. Mutáció specifikus kezelés CF-ben	41
1.3.2. A Smith-Lemli-Opitz szindróma	42
1.3.2.1. Bevezetés és patofiziológiai háttér	42
1.3.2.2. Epidemiológia	43
1.3.2.3. Fenotípusos jellemzők	44

1.3.2.4. Biokémiai diagnosztika	45
1.3.2.5. A betegség molekuláris genetikája – mutációs spektrum	46
1.3.2.6. Prenatális diagnosztika, genetikai tanácsadás	46
1.3.2.7. Kezelés	47
1.3.2.8. Gyógyszer interakciók	48
1.3.3. Az autoszomális recesszív policisztás vesebetegség	48
1.3.3.1. Csillók - ciliopathiák	48
1.3.3.2. ADPKD	49
1.3.3.3. ARPKD	50
1.3.3.4. A klinikai laboratóriumi genetika szerepe az policisztás vesebetegségek diagnosztikájában	52
1.3.3.5. Differenciál diagnosztika: fenokópiák	54
1.3.3.6. Vizsgálataink ARPKD-ben	55
1.3.4. A Marfan szindróma	55
1.3.4.1. A Marfan szindróma és betegségbesorolása	55
1.3.4.2. Pathomechanizmus	57
1.3.4.3. A Ghent nozológia	58
1.3.4.4. A Marfan szindróma genetikája	59
1.3.4.5. Genetikai tesztelés	60
1.3.4.6. Terápia, menedzsment	60
1.3.4.7. Vizsgálataink Marfan szindrómában	61
1.4. Multifaktoriális betegségek vizsgálata	62
1.4.1. Multifaktoriális betegségek vizsgálata - a Gas6 és receptorai	62
1.4.1.1. A Gas6 betegségekkel való kapcsolata	63
1.4.1.2. A Gas6 és a véralvadás	63
1.4.2. Multifaktoriális betegségek vizsgálata - időskori macula degeneráció (age-related macular degeneration, AMD)	64
1.4.3. Multifaktoriális betegségek vizsgálata - az infertilitás, mint multifaktoriális kórkép genetikai meghatározottsága	67
1.4.3.1. Az infertilitás monogénes formái	67
1.4.3.2. Y kromoszóma mikrodeléciók és infertilitás	68
1.4.3.3. A mikroRNS-ek kapcsolata a férfi infertilitással	70
2. CÉLKITŰZÉSEK	71

3. BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	72
3.1. Betegek	72
3.1.1. Faktor V deficiencia	72
3.1.2. Niemann-Pick C	72
3.1.3. Duchenne/Becker muscularis dystrophia	73
3.1.4. Neonatalis diabetes mellitus	74
3.1.5. <i>HNF4A</i> -MODY	74
3.1.6. Hypoglycaemias hyperinsulinismus	75
3.1.7. Cystás fibrosis	76
3.1.8. Smith-Lemli-Opitz szindróma	76
3.1.9. ARPKD betegek	80
3.1.10. ARPKD obligát heterozigóták	80
3.1.11. Marfan szindróma	81
3.1.12. Betegek és referencia populáció a Gas6 ELISA tesztelésére	81
3.1.13. Időskori macula degeneráció	81
3.1.14. Infertilitás hátterének vizsgálata	82
3.2. DNS szintű módszerek	83
3.2.1. Mutáció analízis FV deficiencia esetén	83
3.2.2. Mutáció analízis NPC esetén	84
3.2.3. Mutáció analízis Duchenne/Becker muscularis dystrophia esetén	84
3.2.3.1. Deléció/duplikáció analízis	84
3.2.3.2. A <i>DMD</i> gén 4-es exon Sanger DNS szekvenálása	84
3.2.3.3. A <i>DMD</i> gén teljes kódoló régiójának vizsgálata	84
3.2.4. Mutáció analízis monogénis glükóz metabolikus zavarok esetén	85
3.2.4.1. NDM, <i>KCNJ11</i> analízis	85
3.2.4.2. <i>HNF4A</i> -MODY	85
3.2.4.3. Hypoglycaemias hyperinsulinismus	85
3.2.5. Anyai sejt kontamináció szimulációs kísérletek	85
3.2.5.1. Sanger szekvenálás MCC érzékenységeinek meghatározása	85
3.2.5.2. MLPA MCC érzékenységeinek meghatározása	86
3.2.5.3. Az új generációs DNS szekvenálás MCC érzékenységeinek meghatározása	87
3.2.6. Piroszekvenálás analitikai teljesítőképességeinek vizsgálata	87
3.2.6.1. Plazmid rendszer	87

3.2.6.2. <i>CFTR</i> gén analízis	88
3.2.7. CF monogénes kohorsz	89
3.2.8. <i>DHCR7</i> gén szekvenálás	89
3.2.9. <i>PKHD1</i> mutációk analízise ARPKD-ben	90
3.2.9.1. Más génekben történő CNV és kis skálájú mutációk vizsgálata	90
3.2.9.2. ARPKD: Klinikai exom szekvenálás	91
3.2.10. A kódoló <i>FBNI</i> régiók és az exon-intron határok vizsgálata Marfan szindrómában	91
3.2.10.1. Illumina platformon történő NGS szekvenálás	91
3.2.11. AMD	92
3.2.12. Infertilitás - Y kromoszóma mikrodeléción analízis	93
3.2.12.1. Részleges AZFc deléción vizsgálata	94
3.2.12.2. A <i>DAZ</i> és <i>CDY1</i> gének kópiaszám és kópiatípus, valamint az Y kromoszóma haplotípus meghatározása	94
3.3. Vizsgálatok RNS szinten	95
3.3.1. <i>DHCR7</i> mRNS vizsgálat	95
3.3.2. <i>FBNI</i> mRNS analízis	95
3.3.3. miRNS vizsgálatok infertilitásban	95
3.4. Vizsgálatok fehérjeszinten	96
3.4.1. FV aktivitás és antigén tesztek	96
3.4.2. FV immunprecipitáció, SDS-poliakrilamid (SDS-PAGE) gélelektroforézis és immunblotting	96
3.4.3. Izom hisztológia, dystrophin immunhisztokémia	97
3.4.4. Gas6 analitikai módszerek	97
3.4.4.1. Antitestek	97
3.4.4.2. Humán plazma és rekombináns Gas6 izolálása és tisztítása	98
3.4.4.3. Tömegspektrometria	98
3.4.4.4. Gas6 ELISA teszt kifejlesztése	98
3.4.4.5. Thrombocyta izolálás és aktiválás	99
3.4.4.6. Immunprecipitáció, immunblotting	99
3.4.4.7. A <i>Gas6</i> c.834+7G>A polimorfizmus esetleges hatásának vizsgálata a Gas6 szintre	100
3.5. Egyéb biomarkerek vizsgálata	100

3.5.1. Klinikai kémiai analízisek SLO szindrómában	100
3.5.2. Kis molekulák hatása a koleszterin bioszintézisre	100
3.6. Statisztikai analízisek	101
3.7. <i>In silico</i> analízisek	102
3.7.1. Dystrophin in silico vizsgálata	102
3.7.2. Predikciós algoritmusok használata új mutáció esetén	102
3.8. Engedélyek, finanszírozás	102
3.9. Melléklet: primerszekvenciák	104
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	111
4.1. FV deficiencia	111
4.2. <i>HNF4A</i> -MODY első hazai esete	114
4.3. <i>De novo</i> <i>ABCC8</i> mutáció kimutatása hypoglycaemias hyperinsulinismusban	115
4.4. Terhesség alatti mutáció-specifikus kezelés <i>KCNJ11</i> mutáció által okozott diabetesben	117
4.5. Új misszensz mutáció detektálása dystrophinopathiában	118
4.5.1. Genetikai analízis	118
4.5.2. Izom hisztológia, dystrophin immunhisztokémia	118
4.5.3. A p.Asn76Ile mutáció hatásának <i>in silico</i> vizsgálata	119
4.6. Kezelést megalapozó genetikai tesztelés - Niemann-Pick C	122
4.6.1. Genetikai analízis	122
4.6.2. Terápia	122
4.7. Az anyai sejt kontamináció hatása a molekuláris genetikai diagnosztikai tesztekre invazív mintavételt követő prenatális diagnosztika során	123
4.7.1. A Sanger DNS szekvenálás MCC érzékenysége	123
4.7.2. Az MLPA módszer MCC érzékenysége	124
4.7.3. A piroszekvenálás alapú új DNS szekvenálás MCC érzékenysége	126
4.8. Piroszekvenáláson alapuló új generációs DNS szekvenálás analitikai paramétereinek vizsgálata	128
4.9. <i>CFTR</i> mutációk Kelet-magyarországi CF betegekben	132
4.9.1. Kiterjesztett betegcsoport <i>CFTR</i> mutáció analízise, kapcsolat a mutáció specifikus kezeléssel	133
4.10. SLO kutatómunka	137
4.10.1 SLO kohorsz vizsgálat	137

4.10.2. Biomarkerek használata az SLO szindróma klinikai súlyosságának megítélésében	140
4.10.3. Kis molekulák hatása a 7-DHC szintre	142
4.10.4. A <i>DHCR7</i> patogén mutációt hordozó heterozigóták érzékenyek az aripirazole és trazodone kezelésre	142
4.11. Monogénes kohorsz vizsgálatok: Fenokópiák ARPKD-ben	144
4.12. Monogénes kohorsz vizsgálatok: Marfan szindróma	150
4.13. Gas6 vizsgálatok	156
4.14. Komplement faktor H Y402H, <i>LOC387715</i> , <i>HTRA1</i> és <i>ApoE</i> vizsgálata időskori macula degenerációban	163
4.15. A Gas6 c.834+7G>A polimorfizmus szerepe az AMD kialakulásában	167
4.16. mikroRNS vizsgálatok férfi infertilitásban	175
4.17. Y kromoszóma mikrodeléciók Kelet-magyarországi infertilis férfiakban	179
5. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK	184
6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	186
7. REFERENCIÁK	187
8. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK	216
9. AZ ÉRTEKEZÉSBEN NEM TÁRGYALT NEMZETKÖZI ÉS HAZAI KÖZLEMÉNYEK	219
10. FELSŐOKTATÁSI TANKÖNYV RÉSZEK	227
11. KÖNYVFEJEZET, SZAKTANULMÁNY	227
12. CSOPORTOS (MULTICENTRIKUS) KÖZLEMÉNYBEN KOLLABORÁCIÓS KÖZREMŰKÖDŐ	227
13. TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK	228

RÖVIDÍTÉSEK

7-DHC	-	7-dehidro koleszterin
8-DHC	-	8-dehidro koleszterin
ABC	-	avidin biotin complex
ABCC8	-	ATP binding cassette subfamily c member 8 gén
ABD	-	actin binding domain
ACD	-	acid citrate dextrose
ACMG	-	American College of Medical Genetics and Genomics
ADA	-	Americal Diabetes Association
ADPKD	-	autoszomális domináns policisztás vese betegség
AMD	-	age-related macular degeneration
AMI	-	acute myocardial infarction
APC	-	aktivált protein C
APTI	-	aktivált parciális tromboplasztin idő
<i>ApoE</i>	-	apolipoprotein E gén
AR	-	androgén receptor
AREDS	-	age-related eye disease study
ARPKD	-	autoszomális recesszív policisztás vese betegség
ATP	-	adenozin trifoszfát
AZF	-	azoospermic factor
BMD	-	Becker muscular dystrophy
BMI	-	body mass index
cAMP	-	ciklikus adenzin-monofoszfát
CBAVD	-	congenital bilateral absence of vas deferens
CE-IVD	-	Conformité Européenne - in vitro diagnostics
cDNS	-	komplementer DNS
<i>CDY1, 2</i>	-	chromodomain Y-linked 1, 2 gének
CF	-	cystás fibrosis
CFH, <i>CFH</i>	-	complement factor H protein, gén
CHH	-	congenitális hypogonadotrop hypogonadismus
<i>CFI</i>	-	complement factor I
CFTR, <i>CFTR</i>	-	cystic fibrosis transmembrane regulator protein, gén
CK	-	kreatin kináz
CNV	-	copy number variation
CV	-	coefficient of variation
CVS	-	chorionic villus sampling, chorion biopszia
<i>DAZ, DAZL</i>	-	deleted in azoospermia, deleted in azoospermia-like gének
DEND	-	developmental delay epilepsy neonatal diabetes syndrome
<i>Dhcr7</i>	-	egér DHCR7 gén
DHCR7, <i>DHCR7</i>	-	7-dehydrocholesterol reductase protein, gén
<i>DMD</i>	-	Duchenne muscular dystrophy gén
DMSO	-	dimetilszulfid
DNS	-	deoxiribonukleinsav
dNTP	-	dezinukleotid trifoszfát
<i>DZIP1L</i>	-	DAZ interacting protein 1-like gén
EDTA	-	etilén-diamin-tetraecetsav
EFLM	-	European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
EH	-	esélyhányados

ELISA	-	enzyme linked immunosorbent assay
ELS	-	ectopia lentis szindróma
<i>F13A</i>	-	véralvadási XIII-as faktor génje
FDA	-	Food and Drug Administration
<i>FBN1</i>	-	fibrillin 1 gén
FFP	-	friss fagyasztott plazma
FV, <i>F5</i>	-	véralvadási V-ös faktor protein, gén
FX	-	véralvadási X-es faktor protein
<i>Gas6</i> , <i>Gas6</i>	-	growth arrest specific 6 fehérje, gén
<i>GCK</i>	-	glükokináz gén
GC-MS	-	gas chromatography - mass spectrometry
gDNS	-	genomiális DNS
GFR	-	glomeruláris filtrációs ráta
GLUT	-	glucose transporter
gnomAD	-	genome aggregation database
HC	-	heavy chain
HCTD	-	hereditary connective tissue disorders
HEK293	-	human embryonic kidney 293 sejtvonat
hg19 NCBI37	-	hg19-es referencia genom
HGMD	-	human gene mutation database
HH	-	hypoglycaemiás hyperinsulinismus
<i>HNF1A</i>	-	hepatocyte nuclear factor 1 A gén
<i>HNF1B</i>	-	hepatocyte nuclear factor 1 B gén
<i>HNF4A</i>	-	hepatocyte nuclear factor 4 A gén
HMG-CoA	-	hidroxi-metilglutaril koenzim A
HP	-	homopolimer
HRP	-	torma
HTAD	-	heritable thoracic aortic disease
<i>HTRA1</i>	-	high temperature requirement serine protease gén
<i>INS</i>	-	inzulin gén
INR	-	international normalized ratio
IRT	-	immunreaktív tripszinogén
ISPAD	-	International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes
IVF	-	in vitro fertilizáció
K_{ATP}	-	ATP függő kálium csatorna
<i>KCNJ11</i>	-	potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 11
$K_{ir6.2}$	-	potassium inwardly rectifier
KO	-	knock out
LAP	-	latency associated peptide
LC	-	light chain
LDL	-	low density lipoprotein
LLC	-	large latent complex
LOVD	-	Leiden open variation database
LTBP	-	latent TGF-beta binding protein
MAC	-	membrane attack complex
MCC	-	maternal cell contamination
MFS	-	Marfan szindróma
MLPA	-	multiplex ligation-dependent probe amplification
MMP	-	mátrix metalloproteáz
MODY	-	maturity onset diabetes of the young

mRNS	-	messenger RNS
<i>MID1</i>	-	midline 1 ring finger gén
miRNS	-	mikro RNS
MS	-	mass spectrometer
mTOR	-	mechanistic target of rapamycin
MVT	-	mély vénás thrombosis
N-ABD	-	N-terminal actin binding domain
NDM	-	neonatalis diabetes mellitus
NGS	-	next generation sequencing
NMD	-	nonsense-mediated mRNA decay
<i>NPHP1</i>	-	nephrocystin 1 gén
NPC	-	Niemann Pick Type C disease
<i>NPC1</i>	-	Niemann Pick Type C1 gén
<i>NPC2</i>	-	Niemann Pick Type C2 gén
OMIM	-	online Mendelian inheritance in men
OPD	-	o-phenylenediamine dihydrochloride
OR	-	odds ratio
PAGE	-	polyacrylamide gel electrophoresis
PAP	-	pancreas asszociált protein
PBS	-	phosphate buffered saline
PCR	-	polymerase chain reaction
PDB	-	protein data bank
PET	-	pozitron emissziós tomográfia
<i>PKD1,2</i>	-	polycystic kidney disease 1, 2 gének
<i>PKHD1</i>	-	polycystic kidney and hepatic disease 1 gén
PNDM	-	permanens neonatális diabetes mellitus
PS	-	foszfatidilszerin
PTAD	-	4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione
PVDF	-	polyvinylidene fluoride
QMPSF	-	quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments
RFLP	-	restriction fragment length polymorphism
rhGas6	-	rekombináns humán Gas6
RNS	-	ribonukleinsav
RPE	-	retina pigment epitélium
RT	-	reverz transzkriptáz
RTK	-	receptor tirozin kináz
SCOS	-	Sertoli cell only syndrome
SDS	-	sodium dodecyl sulphate
SHBG	-	sex hormone binding globulin
SIFT	-	sorting intolerant from tolerant
SLC	-	small latent complex
SLE	-	systemic lupus erythematosus
SLO	-	Smith-Lemli-Opitz
SnoRNA 202	-	small nucleolar RNA 202
SNP	-	single nucleotide polymorphism
<i>SRY</i>	-	sex-determining region gén
STR	-	short tandem repeat
SU	-	sulfonylurea
SUR1	-	sulfonylurea receptor 1
TAM	-	Tyro3, Axl, Mer receptorok

TBS	-	tris buffered saline
TGF- β	-	transforming growth factor beta
TI	-	trombin idő
<i>TMEM67</i>	-	transmembrane protein 67 gén
TNDM	-	transiens neonatális diabetes mellitus
<i>TSC2</i>	-	tuberous sclerosis 2 gén
VEGF	-	vascular endothelial growth factor
VSGP	-	vertical supranuclear gaze palsy
VUS	-	variant of unknown (clinical) significance
<i>WDR19</i>	-	WD repeat-containing protein 19 gén
WHO	-	World Health Organization

1. BEVEZETÉS

A klinikai laboratóriumi genetika területébe tartozik a klinikai, klinikai genetikai ellátást végző specialisták által betegek (családok) részére nyújtott orvosi genetikai szolgáltatásokhoz kapcsolódó genetikai laboratóriumi szolgáltatások minden eleme. A klinikai laboratóriumi genetika egy olyan komplex laboratóriumi szakirány, ami széles - gyakran saját fejlesztésű - metodológiai repertoárral vizsgálja az öröklött monogénes betegségeket valamint a multifaktoriális kórképek genetikai meghatározottságát. A szakma feladata minden esetben a klinikailag releváns ismeret megszerzése és annak megfelelő interpretációja a klinikum irányába. A tesztelésnek számos következménye lehet a gyakori és ritka öröklött/genetikai betegségekkel rendelkező egyének, családok vagy populációk esetében: a klinikai laboratóriumi genetikai információ jelenthet prognózist, diagnózist, differenciál diagnózist, új vagy ismert genotípus-fenotípus összefüggéseket állíthat fel és eredménye alapja lehet genotípus alapú kezelésnek és prenatális diagnosztikának is.

A klinikai laboratóriumi genetika folyamatosan változó tesztrendszeret használ, a genetikai metodológia fejlődése nagyon gyorsan bevonul a diagnosztika területére. A DNS alapú tesztrendszer, melyek a humán genom különböző felbontásban való jellemzésére szolgálnak, kiegészülnek RNS, sőt metabolit illetve fehérje alapú tesztrendszerekkel - mindig a tudományos/klinikai problémának megfelelően. Az új tesztrendszerek klinikai diagnosztikában történő optimalizálása, validálása és alkalmazása a szakma feladata, beleértve a reprodukciós döntéshozatallal és családvizsgálatokkal kapcsolatos kérdéseket, különös tekintettel az ilyenkor alkalmazandó tesztek megfelelő módszertanát és azok korlátait.

A disszertációban ismertetett tudományos munkámban vizsgálom monogénes betegségeket, azok egyedi eseteit és kohorszokat is. Munkánk során a diagnosztikai analízishez szükséges genetikai módszertani fejlesztéseket is végeztünk és vizsgáltunk multifaktoriális kórképeket, minden esetben szem előtt tartva azt, hogy a tevékenységünk alapvetően a betegellátást, a betegségek okainak jobb megértését és magas színvonalú diagnosztikai eszköztár kialakítását szolgálja. A disszertációban vizsgált egyedi monogénes betegségek érintik a glükóz metabolizmust (neonatális diabetes mellitus, fiatal felnőttkori diabetes, hyperinsulinismus), a koleszterin metabolizmust (C-típusú Niemann Pick betegség), a véralvadást (faktor V hiány) és a vázizomrendszert (Duchenne/Becker muscularis dystrophia). Négy súlyos monogénes betegség esetén (cystás fibrosis, Marfan szindróma, autoszomális recesszív polycystás vesebetegség és Smith-Lemli-Opitz szindróma) magyar betegcsoportokban vizsgáltuk meg az adott betegség genetikai hátterét,

mely több esetben új kutatási utak indításának lehetőségét teremtette meg, akár a mutáció-specifikus kezelés megalapozását, akár a pathomechanizmus jobb megértését illetően. A multifaktoriális kórképek vizsgálata során az artériás és vénás thrombosis kialakulásában szerepet játszó Gas6 esetében először igazoltuk, hogy a fehérje a plazmában - ellentétben a thrombocyttal - jelen van és kimutattuk kapcsolatát időskori macula degenerációval, valamint vizsgáltuk a férfi infertilitás genetikai hátterét.

1.1. Egyedi monogénes betegségek vizsgálata

A klinikai laboratóriumi genetika egyik legfontosabb feladata a monogénes betegségek diagnosztikája. Ehhez széles módszertani repertoárt vonultat fel és számos olyan helyzet adódik, ahol a módszertan által nyújtott lehetőségek vagy éppen azok limitációi vagy a betegség sajátosságainak felismerése önmagában tudományos értékkel bír. A disszertációban hat olyan esetet mutatok be, melyek a direkt diagnosztikán túli tanulságokkal szolgálnak.

1.1.1. A véralvadás V-ös faktorának öröklött hiánya

Az V-ös véralvadási faktor (FV) egy olyan nélkülözhetetlen véralvadási faktor, amelynek aktív formája a (FVa) a protrombin-trombin átalakulásban vesz részt. A FV a májban szintetizálódik és a keringésben A1-A2-B-A3-C1-C2 domén struktúrájú egyszálú fehérjeként kering. A FV-öt a trombin vagy az aktív X-es faktor (FXa) aktiválja (1). Ebben az aktiválódási folyamatban a B domén szabaddá válik és kialakul a nehéz (ez A1-A2 domén szerkezetű, 105 kDa) és könnyű láncból összeálló (ami A3-C1-C2, 71/74 kDa) fehérje, melyeket kalcium ion tart össze. A FVa a FXa kofaktora a protrombin trombin átalakulás során, amely átalakítást 4 nagyságrenddel gyorsítja meg (2). A FVa inaktivációját az aktivált protein C (APC) végzi proteolitikus emésztéssel 3 arginin mellett (Arg³⁰⁶, Arg⁵⁰⁶ és Arg⁶⁷⁹) (3, 4). Tracy és munkatársai 1982-ben kimutatták (5), hogy a FV kb. 80%-a a keringésben foglal helyet, míg 20 %-a a thrombocyták α granulumaiban, ahova receptor-mediálta endocitózissal kerül (6, 7). A thrombocyta FV a thrombocyta aktivációja során az α granulumokból ürül (5). A thrombocyta FV részlegesen aktivált formában tárolódik (8). A thrombocyta FV akkor, ha a deficiencia miatt a keringésben detektálhatatlanul kevés mennyiségű szabad FV van, hozzájárul a betegek túléléséhez (9).

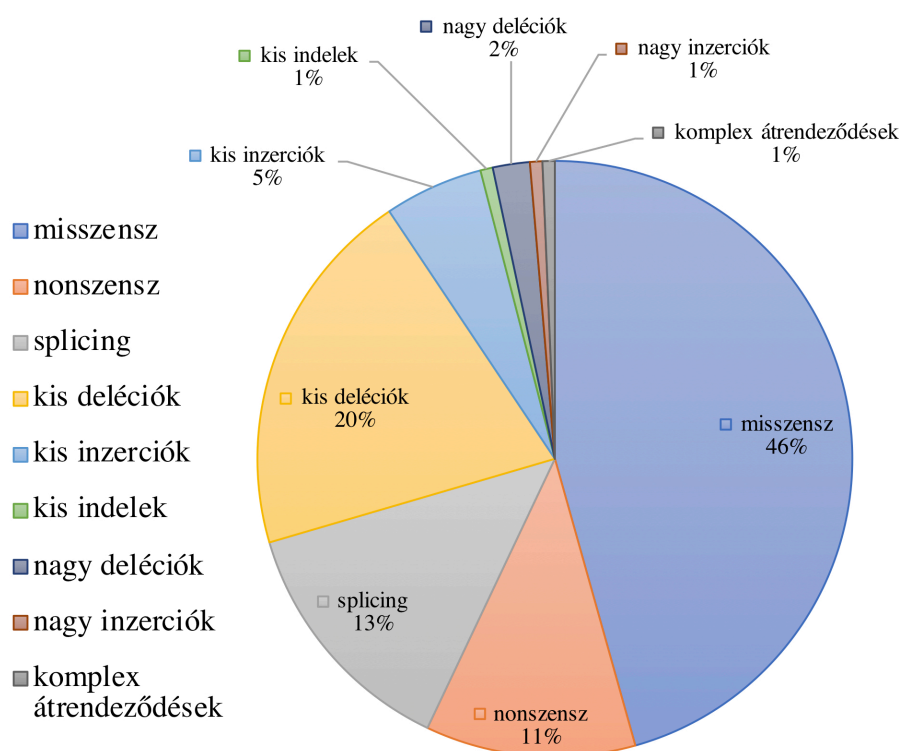
A FV hiányhoz vezető mechanizmusok a következők lehetnek:

- (1) A leggyakoribb - de még mindig extrémén ritka - a FV hiány a homozigóta vagy összetett heterozigóta *F5* génmutációk miatt alakul ki (Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM 227400)). A FV öröklött hiányát, azaz a parahaemophiliát mint autoszomális recesszív betegséget Paul Owren írta le Norvégiában 1940-ben (10). Ez általában olyan típusú hiánybetegség amikor mind az aktivitás, mind az antigén szintek csökkennek. Az oki variánsok lehetnek nonszensz mutációk, misszensz mutációk, inzerciók, deléciók, splice helyet érintők.
- (2) A második típusú genetikai hiányban a FV mellett a FVIII szint is csökkent (11), ebben az esetben az *LMAN1* illetve *MCFD2* génekben bekövetkező mutáció okozza a közös hiányt, ugyanis kódolt fehérjék rendkívül fontosak a FV és FVIII szekréciójában (12).
- (3) A harmadik típusú hiánybetegség esetében szerzett hiány van, ez lehet májbetegség vagy DIC (disszeminált intravascularis koaguláció, disseminated intravascular coagulation), de a leginkább előforduló típus az inhibítor antitest típus FV-tel szemben.

A veleszületett FV hiány előfordulása $1:10^6$ (13, 14). A klinikai kép a súlyos homozigóta vagy összetett heterozigóta FV hiányban az enyhe tünetektől (pl. időnkénti nyálkahártya vérzés) egészen az életveszélyes vérzésekkig terjedhet (15-17). Súlyos esetekben már születéskor vagy kora gyermekkorban előfordulnak vérzések. A leggyakoribb klinikai tünetek a nyálkahártya vérzés, az epistaxis, a menorrhagia, ezt követik a sebészeti beavatkozást követő vérzések. Központi idegrendszeri vérzés, köldökzsinór vérzés, visszatérő vetélések ritkán vannak jelen a FV hiányban (18, 19). A reziduális plazma FV szint és a betegség súlyossága közt nincs egyértelmű összefüggés. A teljes hiány az élettel nem kompatibilis, ez a knock out (KO) egér kísérletekből egyértelműen látszik: a teljes KO totális embrionális vagy perinatális letalitást jelent (20). Úgy tűnik azonban, hogy az élet fenntartásához szükséges minimális FV mennyiség bőven 1% alatti (21-23). A faktor V hiány kivizsgálásának első lépése a rutin alvadási tesztek elvégzése, mind az aktivált parciális tromboplastin idő (APTI) mind a protrombin idő (PI) megnyúlása megfigyelhető. Ezt követik a specifikusabb alvadási tesztek, mint pl. a FV aktivitás és antigén mérések. A thrombocytákban levő 20% FV α granulum fehérjeként 4,600-14,000 molekulát jelent trombocitánként (24-26). Jelenleg nincsen egyértelmű ajánlás a FV hiány kezelésére vonatkozóan (27). A kezelés friss fagyasztott plazmával (FFP-vel) történik. A FV szintet 20% fölött kell tartani. A kezelés transzfúzió-asszociált mellékhatásokkal is járhat (akut tüdő károsodás, inhibítor kialakulása). A thrombocyta transzfúzió ígéretes, hiszen magas prokoaguláns aktivitása van és a thrombocyta sérülés helyére vándorolnak.

1.1.1.1. A FV deficiencia klinikai laboratóriumi genetikája

A *F5* gén az 1-es kromoszóma hosszú karján foglal helyet, 80 kb hosszúságú és 25 exont tartalmaz. A mRNS 7kb hosszúságú, a cDNS szekvencia 6675 nukleotid hosszúságú, míg a szintetizált V faktor 2240 aminosavból áll és 2196 aminosav hosszúságú fehérjeként cirkulál a keringésben 20 nM koncentrációban (12, 28). Jelenleg 149 patogén FV hiányt okozó mutáció ismert (1. ábra. HGMD 2020.1).



1. ábra. Az öröklött FV hiány genetikai okai (HGMD 2020.1).

Az ultraritka FV hiány olyan területeken fordul elő gyakrabban, ahol a rokonházasság elfogadott (27). A ritka vérzékenységek - így a FV hiány - molekuláris diagnosztikája a kóroki mutáció feltárását jelenti, amely az aktuálisan érintett gén vizsgálatán keresztül történhet meg, kivéve a kombinált hiányokat (FV/FVIII kombinált hiány vagy a K vitamin függő faktorok kombinált hiánya). A prenatális diagnózis majdnem minden esetben felajánlásra kerül akár amniocentézis akár chorion biopszia mintavételt követően és természetesen ebben az esetben az ismert családi mutáció jelenléte kritikus (29). A FV hiány esetében a prenatális diagnosztika elsődleges fontosságú (30). A prenatális diagnosztikán túl a preimplantációs genetikai diagnosztika is indokolt lehet ismert családi mutációk esetén, miáltal az IVF ciklusban csak az egészséges embriók kerülnek beültetésre (29, 31, 32).

1.1.2. A C típusú Niemann-Pick betegség: klinikum, pathomechanizmus

A C típusú Niemann-Pick betegség (NPC, OMIM 257220; OMIM 607625), egy lizoszomális tárolási betegség amelyet az *NPC1* vagy *NPC2* génekben bekövetkező mutációk okoznak (33-35). Rendkívül széles tünetpektrummal bír, a számos aspecifikus tünet miatt nagyon nehéz diagnosztizálni. Születéstől kezdve lehetnek tünetek, de akár késői felnőttkori krónikus neurodegeneratív betegség formájában is manifesztálódhat. A betegség autoszomális recesszív öröklődésmentet mutat. A génmutációk abnormális késői endoszomális -lizoszomális koleszterin transzport defektust okoznak, aminek az eredménye az lesz, hogy többféle lipid molekula akkumulálódik a lizoszómákban. A két gén a két hasonló nevű fehérjét, az NPC1 és NPC2 fehérjéket kódolja (36, 37). Az NPC2 132 aminosavból felépülő kicsi szolubilis fehérje (37, 38). Az NPC1 és az NPC2 fehérjék együtt dolgoznak, fő szerepük, hogy az LDL eredetű nem észterifikált koleszterint a késői endoszómából, lizoszomális kompartmentből intracellulárisan mozgassák (39, 40). Az *NPC* gének nagy evolúciós konzerváltsága (41, 42) és konstitutív expressziójuk a legtöbb emlős szövetben arra utal, hogy egyfajta háztartási funkciót látnak el. Az NPC1 fehérje nagy, 1278 aminosavból felépülő 13 transzmembrán domént tartalmazó fehérje, amelynek számos jól definiált specializált régiója van. A jelenleg érvényes modell szerint a koleszterin a szolubilis NPC2 irányából adódik át a membrán kötött NPC1-nek. A betegség pathogenezisének megértéséhez hozzátartozik az, hogy nem csak a koleszterin, hanem egyéb lipidek is akkumulálódnak a sejtekben az NPC betegség esetén, sphingolipidek, beleértve a sphingomyelint és a sphingosint, a gangliosidok, pl. GM2 és GM3, valamint a glycolipid glucosylceramid és laktozilceramid (43). A betegek nagy részében koleszterin és sphingomyelin akkumulálódik elsősorban a perifériás szövetekben, míg a glycosphingolipid az elsősorban az agyban (43, 44).

Az életkilátások nagy mértékben a betegség tüneteinek jelentkezésétől függenek és néhány naptól több évtizedig terjedhetnek.

A betegség nem mutat etnikai meghatározottságot, pánetnikusnak minősíthető, becsült incidenciája 1:100.000 élveszületés (45). A betegséget több mint 95%-ban az *NPC1* génben bekövetkező mutációk míg a maradék majdnem 5%-ot az *NPC2* génben bekövetkező mutációk okozzák. Egy nemrégiben megjelent publikáció jól példázza a mutációk patogenitás megítélésének a bonyolultságát, hiszen bizonyos exom és genom szekvenálási adatokból a korábban lényegesen ritkábbnak vélt betegség esetében 1:19.000-1:36.000-es incidenciát határoz meg a betegségre, némiképpen megkérdőjelezve a ritkább előfordulást (46).

Neonatális illetve gyermekkori formákban szisztémás betegségként jelentkezhet neurológiai tünetekkel, de a jelenlegi klasszifikációs ajánlás a neurológiai manifesztációknak megfelelően osztja be, miszerint az 1. csoportba (korai infantilis forma) a viscerális neurodegeneratív forma tartozik, 2 évnél fiatalabb életkorban jelentkező tünetekkel, a 2. csoportba a neurodegeneratív forma (késői infantilis) 2-6 év között jelentkező tünetekkel, illetve gyermekkori még a juvenilis, 6-15 év között jelentkező tünetekkel. A pszichiátriai neurodegeneratív forma felnőtt korban jelentkezik >15 éves életkori tünetekkel (45). A korai betegcsoportokban elsősorban májbetegségként mutatkozik meg a betegség, hosszabb ideig fennálló cholestasis, sárgaság, hepatosplenomegalia fémjelzi és előfordulhat akut májelégtelenség is. Ez a sárgaság 3-4 hónapos korra spontán oldódik, de az organomegalia különböző mértékben fennmaradhat. A neurológiai tünetek mindig később jelentkeznek, akár néhány hónapos kortól indulva, akár a gyermekkor későbbi szakaszában, de körülbelül az esetek 8-9%-ában nagyon gyorsan akut májkárosodás vagy többszervi elégtelenség alakul ki melyek halálhoz vezetnek 6 hónapon belül (45). Korai infantilis esetekben a hypotonia és a motoros képességek fejlődésének elmaradása a fő tünetek. Itt már megjelenhet a vertikális tekintésbénulás (VSGP, vertical supranuclear gaze palsy), azonban ebben az életkorban ennek a felismerése még rendkívül nehéz. A késői infantilis formában, 2-6 év közötti életkorban jelentkező betegség esetén ügyetlenség, járási zavarok figyelhetők meg és a finom motoros képességek érintettek. Késik a beszédfejlődés, a neonatális cholestasis és visceromegalia szintén előfordulhat. Tipikusan jelen van már a VSGP, de nagyon gyakran nem kerül felismerésre. Ebben a betegcsoportban az epilepszia meglehetősen gyakori.

A juvenilis forma a második leggyakoribb. Elsősorban kognitív érintettséget jelent, az iskolai teljesítmény elmarad, tanulási nehézségek, beszéd nehézségek, koordinációs problémák, ügyetlenség (gyakran elesik a gyermek), progresszív ataxia, dystonia és VSGP van jelen.

A felnőttkori, 15 évnél idősebb NPC betegek körülbelül az összes beteg harmadát adják (47). Itt minden esetben van kognitív deficiencia és a pszichiátriai tünetek együtt fordulhatnak elő a neurológiai manifesztációkkal. A korrekt diagnózis általában rendkívül késői, de nagy mértékben gyorsítható, ha a VSGP felismerésre kerül (48). A betegség akár a 70 éves életkorban is manifesztálódhat (49).

A képalkotó eljárásoknak fontos szerepe van az NPC menedzsmentjében. A betegségben a leggyakrabban előforduló kimutatható elváltozás a cerebellum volumen csökkenése, a hippocampus volumen és a subcortikális szürkeállomány volumen csökkenése és vannak elváltozások nagyon gyakran a fehérállományban is. Természetesen ezek a neuroradiológiai jellemzők elsősorban (fiatal) felnőttkori betegekben kerültek publikálásra és előfordul az is, hogy

a betegség korai szakaszában eltérések nem látszanak. A betegség lefolyása során ezek a jellemzők összefüggést mutatnak az ataxiával és ocularis-motor funkciókkal (50). A fehérállományi változások gyakran széleskörűek és akár a corpus callosum atrophijaként is kimutathatóak (51). Bizonyos betegekben az agyi atrophia elsősorban a frontális és temporális régiókat érinti (52). Ezek az eltérések sokkal inkább a betegség kurzusának biomarkereként foghatók fel, mint önmagában megálló diagnosztikai tesztként.

Az NPC kezelésére vonatkozóan léteznek ajánlások. A betegség szisztémás jellege miatt az érvényes ajánlás 1A szintű a kezelési csoport multidiszciplinaritását illetően. Tagja kell(ene) hogy legyen háziorvos, anyagcsere specialista, neurológus, pszichiáter, neuroophthalmológus, aneszteziológus, neuropszichológus, beszéd- és nyelvtérápiához értő szakember, rehabilitációs szakember, ortopéd sebész, gasztroenterológus, dietetikus, szociális munkás, genetikai tanácsadó, klinikai genetikus.

Az NPC esetében olyan gyógyszerek fejlesztésére van szükség, amelyek átjutnak a vér-agy gáton, hiszen az NPC neurológiai tüneteit csak ott lehet kezelni. Az egyik terápiás fejlesztés pontosan azt célozza meg, hogy nem csak a koleszterin, hanem egyéb lipidek is akkumulálódnak a betegek sejtjeiben, így a miglustat - amely eredetileg Gaucher kórban használt gyógyszer - reverzibilisen gátolja a glucosylceramid szintáz enzimet (53) és át tud jutni a vér-agy gáton így potenciálisan NPC kezelésére is használható. A klinikai vizsgálatok azt mutatták, hogy a terápiára adott válasz a neurológiai tünetek javulását/stabilizálását jelenti, a viscerális patológiára viszont kis hatással van (54-58). Minden beteg esetében, ahol az NPC diagnózisa felállításra került, érdemes megfontolni a miglustat terápia megkezdését, hiszen a neurológiai tünetek a betegség természetes lefolyásának analízise alapján egyértelműen progressziót mutatnak (59). Mivel a miglustat késlelteti a neurológiai tünetek progresszióját, alkalmazását NPC betegségben számos országban befogadták, beleértve az Európai Uniót is (60).

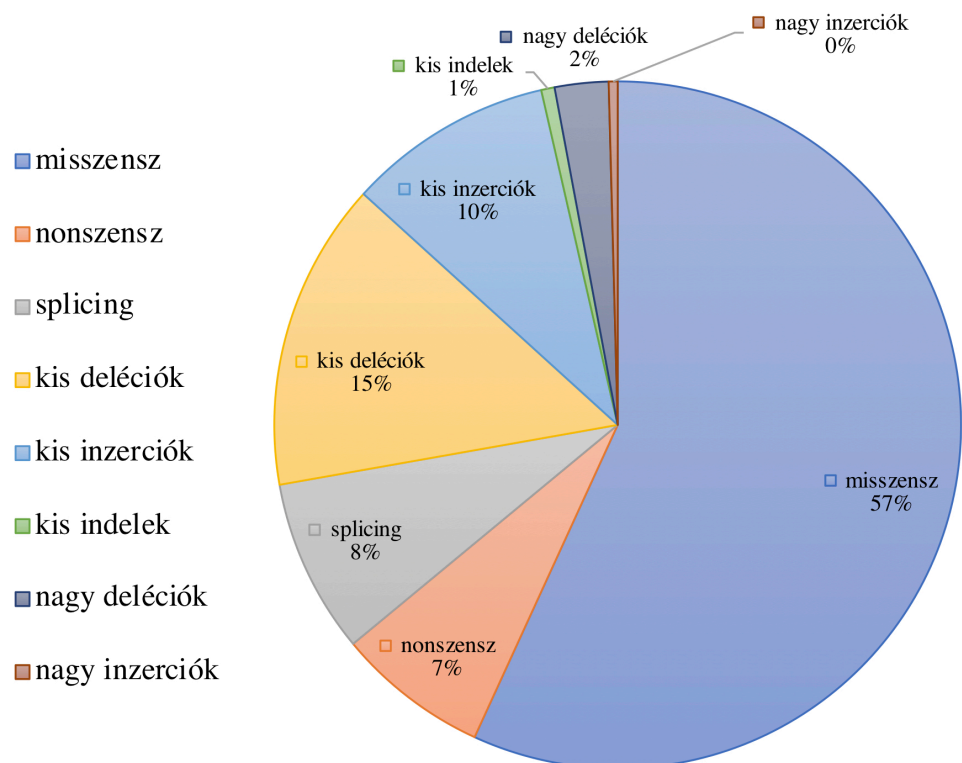
1.1.2.1. Az NPC laboratóriumi diagnosztikája - biomarkerek

Tradicionálisan a tenyésztett fibroblasztokon alkalmazott koleszterint festő filipin festés volt az elsődleges diagnosztikai teszt, azonban nehézkessége és időigénye miatt - habár meglehetősen magas szenzitivitással és specificitással mutatja ki az NPC betegséget - már nem elsővonalbeli teszt, bár sokáig ez volt az arany standard (44, 61, 62). Új, korábban nem leírt eltérés detektálása esetén ma is hasznos a filipin teszt annak igazolására, hogy a patogenitás valóban jelen van.

Az élet első két évében történő differenciál diagnosztikai kórképek közé tartozik a Wolman betegség, a Niemann-Pick A/B, a 3-as típusú Gaucher kór, a cerebrotendinous xanthomatosis is. Több klinikai pontrendszer került kifejlesztésre (63-65). A diverz tünetegyüttes és a betegség tüneteinek változatos jelentkezési ideje nagy jelentőségűvé teszik a korai felismerést, amely segítségére különböző biomarkerek fejlesztése történt az elmúlt évtizedben. A diagnosztikában és a szűrésben használt biomarkerek az oxiszterolok, a lyso-SM-509 és a lyso-sphingomyelin. A biomarkerek önmagukban nem elegendőek a betegség diagnosztizálására, azt genetikai vizsgálatnak is követnie kell. Az oxiszterolok (cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol (C-triol) és a 7-ketocholesterol (7-KC)) jól ismert biomarkerei az NPC-nek. Emelkedett szintjük más anyagcsere betegségekben is megfigyelhető, mint pl. savas sphingomyelináz deficienciában vagy Smith-Lemli-Opitz szindrómában és kisebb mértékben cerebrotendinous xanthomatosisban is, illetve fals pozitív értékeket kaphatunk akkor is, ha nem megfelelő volt a minta tárolás, szállítás illetve a derivatizációs kinyerés (45). A lyso-sphingolipidek csoportja, amely szintén tömegspektrometriával kerül meghatározásra (lyso-sphingomyelint és lyso-sphingomyelin 509 (lyso-SM 509)) nagy reményeket adó szűrőteszt (66).

1.1.2.2. Az NPC klinikai laboratóriumi genetikája

A betegség genetikai tesztelése 1A szintű (legmagasabb) ajánlás (45). Minden olyan egyén esetén ahol az NPC diagnózis klinikailag felmerül, a genetikai teszt elvégzése - ami *NPC1* és *NPC2* gének vizsgálatát jelenti - mindenképpen szükséges, valamint a klinikai genetikai tanácsadás is alapvető. A genetikai tesztek nem csak a betegség diagnosztizálásában fontosak, hanem a család nem érintett tagjainál a hordozó állapot meghatározásában is, valamint a prenatális dignosztikában is. Nincs olyan genetikai tesztünk ami 100%-ban ki tudná mutatni a kóroki mutációkat, hiszen a mély introni cserék vagy a nagy deléciók/duplikációk kimutatása nem minden esetben történik meg (61). A *transz* öröklődésmentet igazolni kell, tehát a szülői minták vizsgálata egy beteg esetében elsődleges fontosságú. Jelenleg több, mint 700 *NPC1* variánst ismerünk amelyek között 475 patogén variánsnak minősíthető (45) (2. ábra, HGMD 2020.1).



2. ábra. Patogén *NPC1* mutációk (HGMD 2020.1).

Nagyon kevés visszatérő mutáció van (például ilyen az *NPC1* p.Ile1061Thr és a p.Pro1007Ala). A detektált eltérések patogenitásának igazolására standard módszerek javasoltak, ez a disszertációban máshol kifejtésre kerül. A genotípus-fenotípus korreláció meghatározása nem egyszerű. A nagyon súlyos következményekkel járó genetikai eltérések, amelyek a nagy inzerciók, deléciók, a nonszensz mutációk, vagy az olvasási keret eltolódást okozó eltérések általában korai formákat okoznak. Az egyik gyakori mutáció a p.Ile1061Thr (67, 68) nagy számú betegben került kimutatásra homozigóta formában is, ez leggyakrabban a juvenilis formával mutat összefüggést, ritkábban a késői infantilis neurológiai fenotípussal. Amennyiben heterozigóta és transz fordul elő egy másik patogén mutációval, gyakran a felnőtt korban manifesztálódó betegség formát fogja okozni (69). A másik, gyakoribb eltérés a p.Pro1007Ala mutáció juvenilis és felnőtt korban jelentkezik gyakrabban (63, 70). Az *NPC2* génben lényegesen kevesebb mutációt írtak le, eddig 23 patogén eltérést sikerült kimutatni (HGMD 2020.1), ezek általában súlyos fenotípussal járnak, leggyakrabban olvasási keret eltolódást okozó vagy nonszensz mutációk (45).

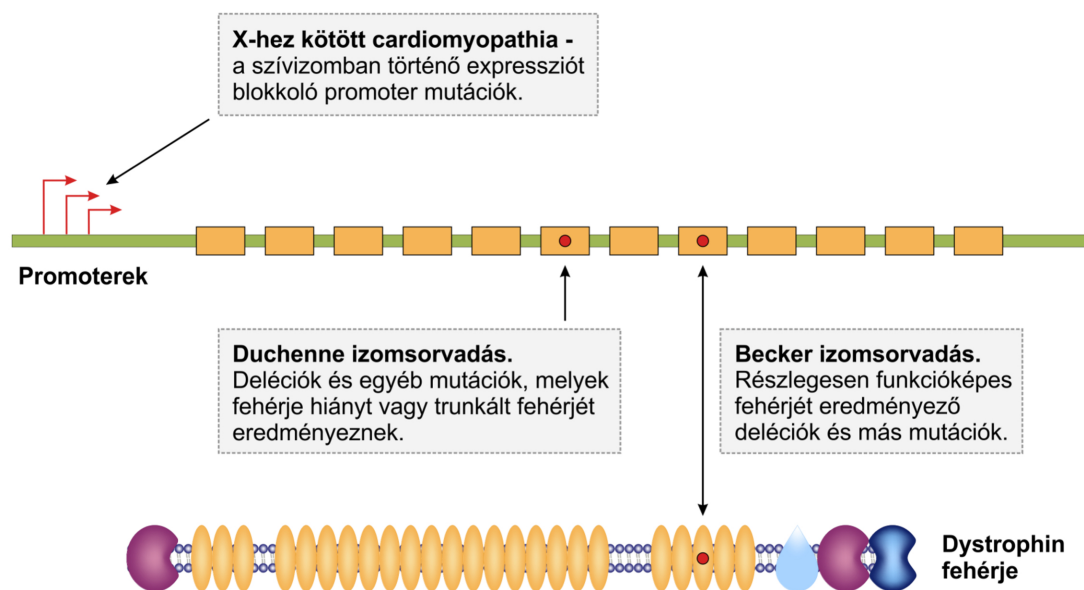
1.1.3. A Duchenne/Becker izomsorvadás

A Duchenne izomsorvadás (OMIM 310200) a leggyakoribb izomsorvadás típus, öröklődésmenete X kromoszómához kötött, incidenciája 1:5.000 fiú születésre nézve (USA: 15,9:100.000 fiú születés, Egyesült Királyság: 19,5:100.000) (71-73). A betegségben tipikus a proximális izomgyengeség, amely korai gyermekkorban mutatja először a tüneteit (71, 74). A legtöbb érintett beteg esetében a tünetek 3-5 éves életkor között jelentkeznek (74), ezek a nagymozgások késlekedése, rendellenes járás, a földről való felállás nehezítettsége és a gyakori elesés. Ritkább tünetek lehetnek az általános fejlődésbeli elmaradás illetve a beszédkészség relatív fejletlensége. A szérum kreatin kináz (CK) emelkedett (74). A betegek nagy része 11-12 éves korra tolószékbe kényszerül, a kardiális manifesztációk dilatatív cardiomyopathia és különböző arrythmiák lehetnek. A cardiomyopathia 10 éves életkor után klinikailag egyértelműen látható, 14 éves korra a betegek harmadát érinti és mindenkit 18 éves életkorra (74). Általánosan megfigyelhető a krónikus tüdőelégtelenség, amely restriktív tüdőbetegség következménye. A betegek átlagos IQ-ja 85, egy SD-vel az átlag populáció alatt van (74). Az ortopédiai szövődmények nagyon gyakoriak, a scoliosis majdnem minden esetben kifejlődik, a spinális deformitások érintik a légzési kapacitást (75). Az átlag életkor a diagnózis idején az Egyesült Államokban 5 év (76). A nagyon hosszú diagnosztikai késedelem rövidítése fontos lenne a reprodukzív döntéshozatal támogatása miatt. A Duchenne izomsorvadás gyanúja akkor kell, hogy felmerüljön ha (1) valamilyen nem megmagyarázható okból a máj transzaminázok/CK szint emelkedik, (2) amennyiben családi halmozódás van és az abnormális izomműködés gyanúja fennáll és (3) ha nincs családi halmozódás, de a fiú gyermek 16-18 hónapos korában nem jár, Gower's jelek vannak (nehezített földről felállás, először hasra fordul, majd térdre, combra támaszkodva kel fel), vagy pedig 5 évnél fiatalabb életkorban lábujjhegyen járás figyelhető meg.

A Becker izomsorvadás (OMIM 300376) allélikus betegség, azonban lényegesen jóindulatúbb, mint a Duchenne, sokkal későbbi kezdettel és jobb életkilátásokkal. A két forma közt a különbség molekuláris szinten is magyarázható, mégpedig a dystrophin fehérje reziduális funkciójával (lásd lentebb, illetve 3. ábra). A Becker izomsorvadás prevalenciája kb. 7,3:100.000 (77). A 3B típusú dilatatív cardiomyopathia (OMIM 302045) szintén a *DMD* génhez kötött.

A Duchenne izomsorvadás elsővonalbeli kezelése a glükocorticoid terápia, ami meghosszabbítja az ambuláns állapotot, javítja a légzésfunkciót és a felső végtagi erőt és késlelteti a scoliosis operációt (78). A Duchenne izomsorvadásban sokféle fejlett terápiás próbálkozás történt, lehet génterápia (79), lehetséges a korai stop kodont átugró kis molekula (80, 81). Vannak antiszensz

oligonukleotid terápiás próbálkozások, ahol exon skippinggel állítják helyre a nyitott olvasási keretet (a betegek 13%-a olyan mutációban szenved, amely az 51-es exon skippingjével helyreállítható). Minden esetben nagyobb vizsgálatokra van szükség (82, 83). 2014-ben az atalurent az EU engedélyezte (a betegek 11%-nak segíthet), míg 2016-ban az FDA engedélyezte az eteplirsent (a betegek 13%-ának segíthet, (84)). Ezek az első gyógyszerek, amelyek mutáció specifikus terápiás beavatkozásokat jelentenek a Duchenne izomsorvadás esetén.



3. ábra. A dystrophin betegségei. Forrás: Balogh et al. Molekuláris diagnosztika, https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Molekularis_diagnosztika_hu_book/adatok.html.

1.1.3.1. A Duchenne/Becker izomsorvadás klinikai laboratóriumi genetikája

A betegség a *dystrophin* (*DMD*) gén mutációk következményeképpen alakul ki. A *DMD* a humán genom legnagyobb génje, a dystrophin fehérjét kódolja. Funkciója a sarcolemma mechanikai megerősítése. A *DMD* gén 79 exont tartalmaz, a mutációk 1/3-a *de novo*. Az izomrost degenerációban a sarcolemma instabilitás és az abnormális kalcium homeosztázis is szerepet játszik (85). A dystrophin gén, amely az X kromoszóma rövid karján foglal helyet (86) 2,5 Mb hosszúságú, legalább 10-szer nagyobb, mint egy átlagos humán gén. 79 exont, 7 promotert tartalmaz, az intronok összességében a dystrophin gén több, mint 99,5%-át jelentik (87). Általános szabály az, hogy amennyiben a deléció/duplikáció olvasási keret eltolódást eredményez, akkor Duchenne, amennyiben nem, akkor Becker izomsorvadás lesz a következmény. A Duchenne esetében trunkált, instabil vagy nem működő fehérje lesz, ha egyáltalán expresszálódik, akkor is gyorsan degradálódik, míg Becker esetében rövidebb a fehérje ami expresszálódik, viszont

funkcióját részlegesen megtartja. Ez az "olvasási keret szabály" az esetek 90%-ban igaz ez, de 10%-ban nem érvényesül (88). A kis mutációk nem lokalizálhatók egy területre, bárhol előfordulhatnak a génen belül olyan kis, olvasási keret eltolódást okozó mutációk, nonszensz mutáció, splice helyet érintő mutációk, amelyek Duchenne izomsorvadást okozhatnak. A leírt misszensz mutációk fele az aktin kötő doménben van (89).

A dystrophin myopathiákat három szinten lehet vizsgálni:

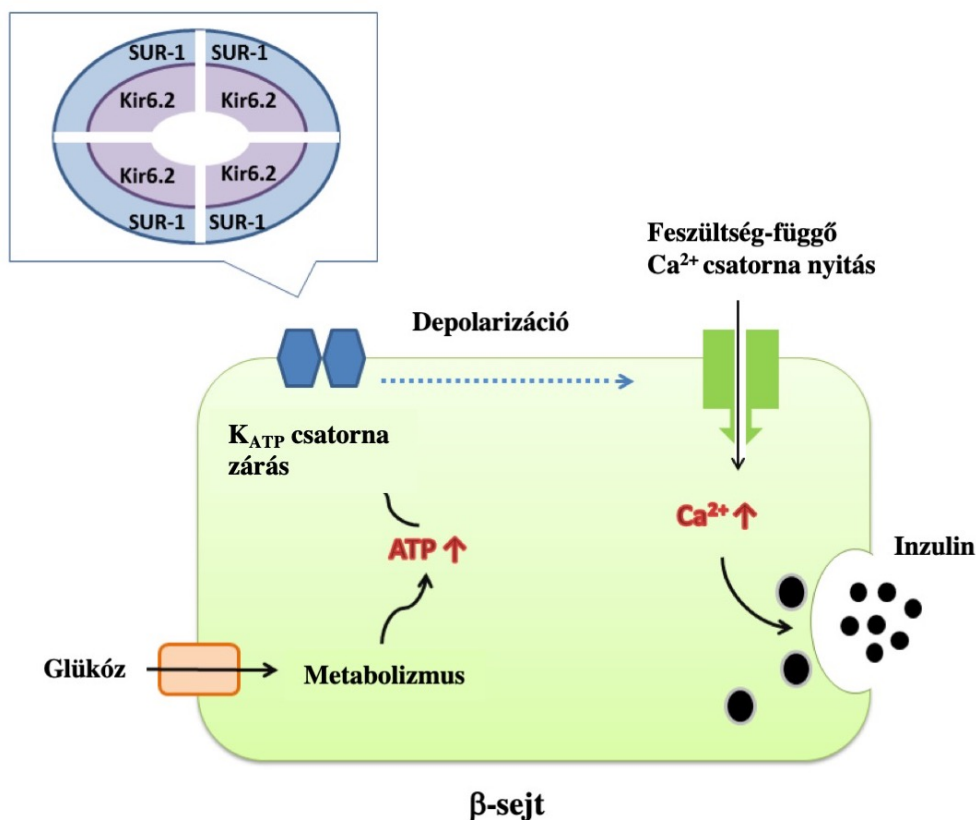
- (1) a szérum CK szint markánsan, a referencia tartomány akár 10-20 szorosára is emelkedhet (74), ha ez nem emelkedett, a Duchenne izomsorvadás nagy valószínűséggel kizárható (90),
- (2) izom biopszia (immunhisztokémia és/vagy Western blotting (91)), amely a legújabb ajánlások szerint már nem ajánlott akkor, ha a genetikai tesztelés egyértelműen igazolja a betegséget,
- (3) a genetikai tesztelés, amely a diagnosztika fővonala. Első lépése az MLPA analízis, hiszen a betegek 2/3-a deléció/duplikáció által okozott betegségben szenved, míg azok negativitása esetén DNS szekvenálással lehet vizsgálni a kis genetikai eltéréseket a génben. A gén mérete miatt az új generációs szekvenálási technika nagymértékben javította az analitikai szenzitivitást, hiszen a diagnosztikai célú DNS analízis esetében az új generációs szekvenálás kiváltja az MLPA tesztet, ugyanis a hemizigóta deléciók egyértelműen kimutathatók az új generációs szekvenálási stratégiákkal azáltal, hogy deléció esetén szekvenálási termék lefedettség az érintett régióban nem detektálható. Előnye még ennek a módszernek, hogy egy kísérletből nem csak a kópiaszámbeli változásokra hanem a kis skálájú mutációkra is teljes képet kaphatunk, tehát megfontolandó a *DMD* gén esetében az új generációs szekvenálási gén vagy génpanelbe építése. Így kialakítható egy egyszerűsített diagnosztikus megközelítés - nem pedig az MLPA és második vonalbeli szekvenálás - amivel jelentősen rövidíthető a leletátfordulási idő. Az is nyilvánvaló, hogy ha az új generációs szekvenálási teszt alkalmas a heterozigóta deléció/duplikáció kimutatására, akkor a hordozó tesztelés is realitássá válhat egy tesztből.

A genetikai tanácsadás nagy jelentőséggel bír, hiszen a mutáció *de novo* vagy öröklött voltát meg kell állapítani, mert az ismétlődési kockázat megítélésében ez rendkívül fontos. Amennyiben az édesanya hordozó, a reprodukzív döntéshozatalt prenatális genetikai tesztelés vagy preimplantációs genetikai diagnosztika is segítheti. Ugyan időről-időre felmerül, de a Duchenne izomsorvadás nem része az ajánlott Recommended Uniform Screening Panelnek (92), azaz újszülöttkori szűrése nem indokolt.

1.1.4. A glükóz metabolizmus monogénes zavarai

1.1.4.1. Neonatális diabetes mellitus

A neonatális diabetes mellitus egy súlyos monogénes betegség, amely definíció szerint az élet első 6 hónapjában keletkezik. A hyperglycaemia általában inzulin kezelést igényel. Két fő formája van, a permanens neonatális diabetes mellitus (PNDM) és a tranziens neonatális diabetes mellitus (TNDM). Az utóbbi esetében a diabetes néhány hónapon belül elmúlik, de később az élet során visszatérhet. A neonatális diabetes mellitus incidenciája körülbelül 1:100.000-1:400.000 élve születés (93, 94). Az esetek fele PNDM, a másik fele TNDM. A neonatális diabetes mellitus esetek kb. felét az ATP függő kálium csatorna (K_{ATP}) gének, a SUR1-et kódoló *ABCC8*-ban és a Kir6.2-t kódoló *KCNJ11*-ben bekövetkező mutációk okozzák (95). Ennek megértéséhez ismerni kell a glükóz által indukált inzulin szekréció mechanizmusát. Az inzulin véráramba kerüléséért a pancreas β sejtjei felelősek. A szignalizációs út első lépése a glükóz GLUT transzporterén keresztüli β sejtbe jutása. A pancreas β sejtjének glükóz szenzora a *GCK* gén által kódolt glükokináz (GCK). A metabolizálódott glükóz megemelkedett intracelluláris ATP koncentrációhoz vezet, amely ATP koncentráció emelkedés zárja a K_{ATP} csatornát. E csatorna két alegységből épül fel, heterooktamer formájában a négy Kir6.2 pólus formáló belső alegységet kívülről négy SUR1 alegység veszi körbe. E heterooktamer felelős a kálium transzportért a β sejt membránban. A csatorna zárása membrán depolarizációhoz vezet, amelynek következménye a kalcium koncentráció intracelluláris megemelkedése. Ez a kalcium koncentráció emelkedés vezet az inzulint tartalmazó granulumok exocitózisához (4. ábra).



4. ábra. Az inzulin szekréció mechanizmusa a β -sejtben (Molnár et al (96) alapján).

A PNDM leggyakoribb okai a *KCNJ11* génben bekövetkező aktiváló mutációk (97), melyek az esetek 30%-áért felelősek (OMIM 606176). Érdekes, hogy a *KCNJ11* mutációk mennyire markánsan különböző következményekkel járhatnak: a fenotípusos spektrum a TNDM-től elindulva a PNDM-on keresztül, a fejlődési elmaradással, epilepsziával és neonatalis diabetes-szel járó DEND szindrómáig (developmental delay-epilepsy-neonatal diabetes syndrome, ez 20%-a az eseteknek) terjed (95, 98, 99). Szintén funkcionyerő mutációk vezetnek T/PNDM-hoz az *ABCC8* génben (OMIM 606176) (100, 101). E mutációk ebben a két génben felelősek a PNDM esetek összességében több, mint 40%-áért (102, 103).

1.1.4.1.1. A neonatális diabetes klinikai laboratóriumi genetikája

Ellentétben a másik gyakori monogénis diabetes formával, a MODY-val (maturity-onset diabetes of the young) a neonatális diabetes esetén a genetikai tesztelés klinikai ellátásba történő bevonulása rendkívül gyorsan és gördülékenyen ment, hiszen ezekben az esetekben a magas dózisú sulfonylurea (SU) gyógyszeres kezelés rendkívül jó glükóz kontrollt tesz lehetővé (104). A kezelés fiziológiai alapja az a tény, hogy a SUR1 valójában a SU receptor, és a SU hatása az intracelluláris

ATP koncentrációtól független csatorna zárásban nyilvánul meg. A K_{ATP} csatorna génekben bekövetkező mutációknak hatása lehet a terhességendozás menetére is, mint ezt a disszertációban be is mutatom.

Az ADA (American Diabetes Association) és az ISPAD (International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes) ajánlása alapján minden olyan gyermeknek, aki esetében a diabetes az élet első 6 hónapjában jelentkezik, azonnal genetikai tesztelésen ajánlott átesnie ("A" szintű bizonyíték) (105, 106). E gyors genetikai analízis lehetősége immáron adott, mint azt a disszertáció összefoglalásában külön jelezni fogom.

1.1.4.2. Fiatal felnőttkori diabetes (maturity-onset diabetes of the young, MODY)

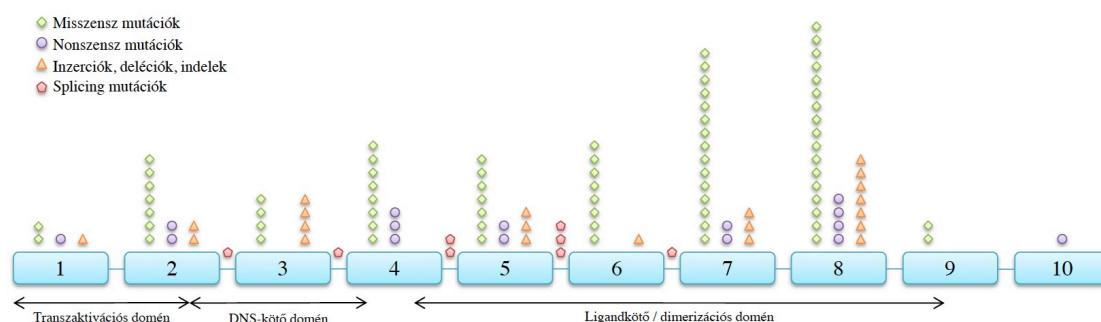
A MODY monogén diabetes típus eredeti kritérium rendszerét, mely nagyrésztben ma is igaz, Fajans és Tattersall állította fel (107, 108). A diabetes kialakulásának időpontja fiatal felnőttkorban van, általában 25 éves kor előtt. Az öröklődés autoszomális domináns, a betegség korai fázisában nincs inzulin deficiencia. A MODY betegek kb. 80%-a félrediagnosztizálásra kerül, akár 1-es, akár 2-es típusú diabetesnek (109) és a korrekt diagnózisig - ami általában a molekuláris diagnózist is magában foglalja - való eljutási idő akár 10 év is lehet (110). A genetikai diagnózis a MODY altípustól függően a betegek nagy részénél az alkalmazott kezelés megváltoztatását (adott esetben befejezését) eredményezi (111). A MODY-nak számos altípusa van: *HNF4A*-MODY, *GCK*-MODY, *HNF1A*-MODY, *PDX1*-MODY, *HNF1B*-MODY, *NEUROD1*-MODY, *KLF11*-MODY, *CEL*-MODY, *PAX4*-MODY, *INS*-MODY, *BLK*-MODY, *ABCC8*-MODY, *KCNJ11*-MODY, *APPL1*-MODY, *RFX6*-MODY. Ezen a helyen a részletes klasszifikációtól eltekintek, de a MODY altípusok kifejtése az általunk írt könyvfejezetben megtalálható (112).

Mivel a MODY esetek nagy része félrediagnosztizálásra kerül(t), az utóbbi időben számos nagy populációt érintő MODY genetikai vizsgálat történt. Egy 354 főből álló gesztációs diabetesben szenvedő betegcsoport 6%-a esetében MODY génmutációt igazolódott (113). Egy több mint 4000 2-es típusú diabeteses beteget vizsgáló nagy tanulmányban 40 beteget találtak, akik bizonyosan MODY patogén mutációval rendelkeztek (114). Egy brit tanulmányban, ahol az analízis tartalmazta a DAD/IA2 autoantitest vizsgálatokat és más paramétereket is a genetikai analízist megelőzően, a gyermekkori diabeteses populáció 2,5%-a monogén diabetesben szenvedett (115). Egy amerikai tanulmányban az autoantitest negatív fiatal diabeteses populáció 8%-a MODY-nak bizonyult (116). A norvég regiszteren történt analízis eredménye azt mutatta, hogy a monogén diabetes prevalenciája a norvég gyerekek között 3,1/100.000 (117) és ugyanennek a

populációnak a vizsgálata azt is kimutatta, hogy az autoantitest negatív gyermekek 4,1%-a a patogén vagy valószínűleg patogén MODY gén eltéréssel rendelkezett (118). Egy retrospektív olasz tanulmány, amely majdnem 4000 gyermekkori diabetes esetet vizsgált, a MODY prevalenciát 5,5%-nak találta (119).

Annak klinikai eldöntésére, hogy ki kerüljön genetikai analízisre, MODY kalkulátort fejlesztettek ki (120), mely a három fő MODY génre fókuszál (*HNF1A*, *HNF4A*, *GCK*). A többféle etnikai csoport vizsgálata során bebizonyosodott, hogy az európai eredetű populációban a leghatékonyabb. Akkor lehet használni ezt a kalkulátort, hogy a beteg diagnóziskori életkora kevesebb, mint 35 év.

Részletesebben - mivel a disszertációban szerepel egy ilyen tárgyú közlemény - a *HNF4A*-MODY-t fejtem ki (OMIM 125850). A HNF4 α egy szteroid hormon receptor fehérje, mely a májban, a hasnyálmirigyben, a vesében és a vékonybélben expresszálódik (121). A génnek két promotere van, a hasnyálmirigy a kettes promotert használja (122). A *HNF4A*-MODY esetén a mutációk funkcióvesztéssel járnak, a betegség kialakulásának mechanizmusa a haploinsufficiencia (123, 124). A génben mutációs forró pont nincs (5. ábra). A *HNF4A*-MODY és a *HNF1A*-MODY klinikai megjelenését tekintve nagyon hasonló. Van néhány apróbb különbség, például a macrosomia előfordul a *HNF4A* mutációt hordozók között, illetve a neonatális periódusban megfigyelhető egy átmeneti hypoglycaemia (125). A HNF4 α különböző lipid anyagcserében jelentős fehérjék expresszióját is befolyásolja (121). A *HNF4A* a MODY esetek kb. 5%-áért felelős.



5. ábra. Kis skálájú mutációk a *HNF4A* génben.
HGMD, 2020.1 adatok. Referencia szekvencia: NM_175914.4.

1.1.4.2.1. A MODY klinikai laboratóriumi genetikája

Kevés olyan mutációs forrópont van a MODY génekben, amelynél az analízist érdemes elkezdni, azaz a MODY gének teljes kódoló régiójának analízise a legeredményesebb, kiváltva a korábbi szekvenciális vizsgálatot (*HNFI1A-HNF4A-GCK* sorrend) (126). Abban az esetben, ha a beteg urogenitális malformációkkal rendelkezik és vesekárosodása van, a *HNFI1B* az elsőként választandó genetikai teszt. Napjainkban azonban az új generációs szekvenálás (NGS, next generation sequencing) a rutin diagnosztikába történő beállításával drámaian megváltozott a monogén diabetes genetikai tesztelése, a génpaneleket (118, 127-129) széles körben használják a molekuláris analízisre. A Sanger szekvenálás még szükséges a detektált variánsok konfirmálása céljából. Fontos, hogy az analitikai teljesítő képességét ezeknek az egyedileg gyártott génpaneleknél meg kell vizsgálni, mert nagyon gyakran az NGS módszerek nem érik el bizonyos mutáció típusok esetében az elvárt analitikai szenzitivitást (pl. a *HNFI1B* nagy deléciója esetében). Szintén lehetséges megközelítés a teljes exom szekvenálás (126, 130-134). A MODY esetében a prediktív, illetve a preszimptomatikus klinikai genetikai tesztelés rendkívüli fontossággal bír, egyre több esetben több olyan biztosító és egészségügyi döntéshozatali szerv dönt úgy, hogy az exom és genom szekvenálás végső soron valójában egy költséghatékony megoldás az egészségügyben történő döntéselőkészítéshez és különösen a genetikai meghatározottságú betegségek incidenciájának csökkentésére. Erre a MODY nagyon jó példa, hiszen általában nem egy korai megjelenésű betegség, tehát olyan preventív intézkedések tehetők, amelyek a szövődmények kialakulását késleltetik vagy akár meg is szüntetik. A klinikai gyanú esetén az ADA "A" szintű bizonyítékkal a MODY genetikai tesztelését javasolja (105). Ugyan az ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) preszimptomatikus panelben, mely azokat a géneket tartalmazza, amelyek esetében teljes exom szekvenálás esetén mindenképpen el kell végezni az informatikai analízist patogén mutáció keresése céljából, nem szerepelnek a MODY gének, de belefoglalásuk megfontolandó lenne véleményem szerint, hiszen a preszimptomatikus diagnózis egyértelműen egészség nyereséggel jár. A kaszkád vizsgálatok szintén nagy klinikai jelentőséggel bírnak, hiszen csökkentik a stresszt és a szükségtelen vizsgálatok számát is a nem érintett családtagok esetén. Ismert, hogy a MODY genetikai tesztelés azon egyének esetében, ahol magas a preteszt prevalencia, a tesztelés költséghatékony és megnöveli az életminőséget (127) különösképpen akkor, hogy ha félrediaosztizált 1-es típusú diabetesesként van a beteg számon tartva. Egy tanulmány keretében, ahol 47 újonnan diagnosztizált MODY beteget vontak be, 94%-uk volt inzulin terápián a diagnózis előtt, amely kezelés a betegek zömében a diagnózist követően

elhagyható volt (116). Összefoglalva, az új generációs szekvenálási stratégiák sokkal magasabb mutációs detektálási rátát tesznek lehetővé. A rutin klinikai laboratóriumi genetikai diagnosztikába történő beillesztésük során mégis jelenetkeznek új nehézségek, hiszen a mutációk nagy része egyedi és nincs még funkcionális tesztelés rá. Tény, hogy a molekuláris genetikai diagnosztikai ráta napjainkra a klinikailag gyanús MODY betegek esetében elérheti a 40%-ot (127). Ez a korábbi években ritkán érte el a 25%-ot, azaz a növekedés egyértelműen az NGS génpanel analitikai teljesítményének köszönhető. Összességében ez a technológiai fejlődés lehetővé teszi nagyon sok klinkai helyzetben a precíziós medicinát. A várandósság kimenetele nagy mértékben függhet a magzati genotípustól, amint kimutatták GCK MODY esetében (135), így a magzati DNS analízis - különös tekintettel a noninvazív metódusokra, mint a keringő sejtmentes DNS (136) - személyre szabott kezelési stratégiát eredményezhet.

1.1.4.3. A hypoglycaemiás hyperinsulinismus

A hypoglycaemiás hyperinsulinismus (HH) egy klinikailag, genetikailag és morfológiailag heterogén betegségsz csoport. A háttérben minden esetben nem megfelelően szabályozott inzulin szekréció áll. A legsúlyosabb neonatális formája esetén, a gyors diagnózis kritikus a megfelelő terápiás beavatkozás megválasztása céljából. A HH genetikai formái az inzulin szekréciót szabályozó gének mutációi következtében alakulnak ki. Az életet veszélyeztető neurológiai tünetek magukban foglalják a görcsöket, az eszméletvesztést, letargiát, kómát és akár a halált is, amely az agy elégtelen glükóz ellátásának a következménye, A megfelelő terápia megválasztása illetve a beteg ellátása e különböző neurológiai tünetek és a neurológiai fejlődési rendellenességek megelőzése szempontjából fontos (137). A HH leggyakrabban a neonatális periódusban manifesztálódik. Az intrauterin hyperinsulinaemia miatt a neonatálisan jelentkező hyperinsulinismusban szenvedő újszülöttek makroszómok lehetnek, de a makroszómia hiánya a hiperinzulinizmus jelenlétét nem zárja ki.

A betegség menedzsmentjében nagy előrelépést jelentettek a különböző képalkotó technikák, amely ebben az esetben a 18 fluoro-DOPA PET-CT-t jelenti, hiszen a fokális forma egészen pontosan kizárólag ezen technika segítségével mutatható ki és ezáltal alapvetően változtatja meg a korábbi terápiát (138, 139).

A HH-nak hisztológiailag három formája különíthető el, a diffúz, a fokális és az atípusos forma (140, 141). A diffúz forma az összes pancreas β sejtet érinti, míg a fokális formánál egy kisebb régió érintett. Nemrégiben atípusos hisztológiai formákat is leírtak (142), mely esetben bizonyos

szigetsejtek mutatnak hiperpláziás jeleket, de hisztológiailag normálnak tűnő szigetsejtek is vannak (143). A fokális formában az abnormális régiók általában 2-10 mm méretűek (144). A fokális HH általában sporadikus és egy apai oldalról öröklött K_{ATP} csatorna gén mutációval jár együtt. Akkor következik be a betegség, ha heterozigótaság vesztes fordul elő a 11p kromoszomális régiójában az anyai allélen (145). A fokális léziók definiálására az egyedüli megoldás a 18 fluoro-DOPA PET-CT (146). A képalkotó eljárás szenzitivitása 88-94%, míg a pontossága 100% is lehet (147). Az összes HH eset 60%-a azonban nem a fokális, hanem a diffúz formához köthető, ez esetben az összes hasnyálmirigy β sejt érintett a betegség által. Ekkor általában egy homozigóta recesszív mutáció vagy összetett heterozigóta mutáció kombináció áll a háttérben, mely valamelyik K_{ATP} csatorna gént érinti (140). Ezek a betegek általában gyógyszeres terápiára nem reagálnak, így esetükben a majdnem teljes (95-98%-os) pancreas eltávolítás az egyedüli megoldás (148).

A terápia célja a plazma glükóz szint 3,5 mmol/L fölötti tartása, a gyors terápieakezdés minden formájú hiperinzulinizmus esetében kritikus fontosságú. Ez a kezelés lehet gyógyszeres, sebészeti vagy ezek kombinációja. A hosszútávú menedzsment egyik legfontosabb szereplője a diazoxid, ami a K_{ATP} csatornát nyitó gyógyszer. Sok esetben a megfelelő mutáció jelenlétében jó hatással van a csatornára (137, 149-151). Nagyon nehéz előrelátni azt, hogy a diazoxid fog-e hatni a betegnél, általában az olyan formákban hatékony, ahol a K_{ATP} csatorna funkciója érintetlen, de sok esetben a recesszív és néha a domináns K_{ATP} csatorna mutáció nem reagál a diazoxidra, hiszen a diazoxid hatásmechanizmusa a SUR1 alegységhez való kötődés, azaz egy funkcionálisan érintetlen K_{ATP} csatornát igényel ahhoz, hogy tudjon hatni. A diazoxidra nem reagáló esetek esetén a gyors genetikai analízis ami az *ABCC8* és *KCNJ11* géneket foglalja magában, együtt a 18 fluoro-DOPA PET-CT vizsgálattal fontos azért, hogy megtaláljuk azokat a betegeket, akik a fokális HH formában szenvednek. A diazoxid legsúlyosabb mellékhatása a folyadékviisszatartás. Sajnos a diazoxid által indukált pulmonalis hypertensio is egy életet veszélyeztető mellékhatás, amely esetenként a terápia visszavonását eredményezi (152-154). Másik terápiás lehetőség az octreotid, ami egy 8 aminosavból álló szintetikus hosszan ható somatostatin analóg. Az inzulin szekrécióját a somatostatin receptor 2-es és 5-ös típusához való kötődéssel gátolja (155). A terápiás lehetőségekbe beletartozik még a hosszú hatású somatostatin analógok és egyéb hasonló szintetikus peptidek használata.

1.1.4.3.1. A HH klinikai laboratóriumi genetikája

A HH monogénis nem szindrómás forma 12 gén hibájára vezethető vissza, ezek az *ABCC8*, *KCNJ11*, *GLUD1*, *GCK*, *HADH*, *SLC16A1*, *UCP2*, *HNF4A*, *HNF1A*, *HK1*, *PGM1*, *PMM2* gének. A génhibák az inzulin nem megfelelően szabályozott exocitózist eredményeznek (156-161). Sok esetben a genetikai háttér feltárása még mindig sikertelen. Leggyakrabban (162, 163) az ATP-függő kálium csatornát alkotó fehérjék génjeiben bekövetkező mutációk okoznak súlyos neonatális HH-t (OMIM 601820, OMIM 256450), ezek a mutációk minden esetben funkcióvesztő mutációk recesszív inaktíváló formában általában diffúz hyperinsulinismust okoznak, amely gyógyszeres kezelésre nem reagál (156, 164-166). Ezek a mutációk a csatornát alkotó fehérjék membránba jutását akadályozzák meg, vagy aktivitásukat csökkentik le drasztikus módon (144). A dominánsan öröklődő mutációk a veleszületett HH némiképp enyhébb formáját okozzák (167, 168). Olyan kombinációt is leírtak már, hogy egyszerre az *ABCC8* és a *KCNJ11* génekben bekövetkezett mutáció vezetett hyperinsulinismus kialakulásához (169).

1.2. Genetikai diagnosztikai módszertani fejlesztések

A klinikai laboratóriumi genetikának ritkán adatik meg, hogy előregyártott, optimalizált, CE-IVD eszközökkel dolgozzon a diagnosztikai eljárás során. Ennek következménye a számos módszertani fejlesztés, optimalizáció, melyek nagy része a specifikus diagnosztikai esetek/kohorszok fejezetekben kerül bemutatásra. Itt azt a két esetet mutatom be, amely általános jelentőséggel bír, hiszen minden, a területen végzett diagnosztikai eljárás során van szerepe. Az egyik módszertani fejlesztés az anyai kontamináció vizsgálata prenatális mintavételt követően, a másik pedig a piroszekvenálás analitikai teljesítőképességének analízise, különös tekintettel a homopolimer szakaszok vizsgálatára.

1.2.1. Az anyai sejt kontamináció hatása a molekuláris genetikai diagnosztikai tesztekre invazív mintavételt követő prenatális diagnosztika során

A non-invazív technikák döbbenetes térnyerése ellenére a prenatális diagnosztika fő terepe jelenleg még mindig az invazív prenatális diagnosztika. Annak ellenére így van, hogy a sejtmentes szabadon keringő DNS analízis felhasználási területe egyre bővül (170), elsősorban az anyai vérben kimutatható magzati DNS esetében a triszómiák vizsgálatára, de kezdenek ezek a tesztek

monogénes eltérésekre is választ adni. Mindenesetre az anyai sejt kontamináció az invazív beavatkozással nyerhető, a chorion biopszia (chorionic villus sampling, CVS) és a magzatvíz mintákban kimutatható és mind a két esetben súlyos preanalitikai kockázati tényezőt jelent (171). A prenatális diagnosztika során végzett genetikai tesztelés minősége nagymértékben függ az anyai kontaminációtól, hiszen a nem egyértelmű eredmények legnagyobb része vagy anyai sejt kontaminációból (maternal cell contamination, MCC), vagy a nem megfelelően kezelt DNS minták degradációjából adódik (172). Az anyai sejt kontamináció a rossz diagnózis vagy nem informatív eredmények 0,1-3,8%-áért felelős (173). Az anyai sejt kontamináció rossz diagnózishoz vezethet tragikus terhességi következményekkel, valamint nem konkluzív eredményre, utóbbi miatt szükség lehet egy megismételt invazív beavatkozásra.

Amniocentézis során a mintába kerülő anyai vér okozza az amnion folyadékban az anyai sejt kontaminációt, habár önmagában a vér jelenléte nem jelent anyai sejt kontaminációt, mert az lehet magzati eredetű is (174). Tenyésztés során megtörténik a magzati sejtek pozitív szelekciója, azaz azok növekszenek és elvesznek az anyai kontamináló sejtek a sejtenyésztés alatt (175).

A chorion biopszia a külső cytotrophoblast és a belső mesoderm rétegek mintavételét jelenti. A mesodermális réteg egy későbbi magzati sejtvonalból származik, míg a cytotrophoblast egy sokkal korábbi vonalból, ebből következően kevésbé reprezentálja a magzati szöveteket (174). Az e sejtekből izolált DNS mind a cytotrophoblast, mind a mesenchymális eredetű sejteket tartalmazza (176). A direkt chorionboholy mintavétel csak a cytotrophoblast vonalat vizsgálja, míg a sejtenyésztés elsősorban a mesodermális sejtvonalat, így az ebből megállapított kariotípus sokkal inkább a magzatnak megfelelő (174). Az amnion folyadékhoz képest a CVS magasabb anyai sejtkontaminációs kockázattal bír, mert az anyai deciduát a magzati sejtekről eltávolítani teljes mértékben lényegesen nehezebb (177), a tenyésztett mintaanyag méginkább ki van téve kontaminációs veszélynek. Az anyai sejtkontamináció mértéke csökkenthető az anyai decidua chorion sejtekről történő pontos eltávolításával a sejtenyésztés megkezdése előtt (178).

Az anyai sejt kontaminációt először 1976-ban mutatták ki, mint a genetikai diagnózist alapvetően zavaró tényezőt (179). Régóta ismert az is, hogy ha az amnion folyadék első néhány milliliterét kiöntik, az anyai kontamináció 2,5-szer alacsonyabb lesz (180). Az anyai sejt kontamináció igen nagy szórást mutathat: 0,1 és 21,4% közötti arányok ismertek (181). Jelenleg az alacsony szintű mozaicizmus analíziséhez hasonlóan az anyai sejtkontamináció vizsgálatára is ugyanaz a módszer használatos, mégpedig a rövid ismétlődő DNS szakaszok amplifikációja (short tandem repeat, STR-PCR), mely módszer használata mind direkt mintában, mind pedig tenyésztett sejtvonalakon javasolt (181, 182). Az anyai sejtkontamináció 0,2% és 2,8% között szór tenyésztett sejtvonalak

esetén (175, 183) és 0,1% - 21,4% között nem tenyésztett direkt mintákban (173, 183). Minden laboratóriumnak meg kell határozni az érzékenységi szintet, ameddig képes kimutatni a releváns anyai kontaminációs szennyezettséget.

Egy kínai tanulmány adatai szerint, ahol 387 invazív prenatalis teszt eredményét dolgozták fel, összesen öt (1,3%) minta esetében mutattak ki anyai sejt kontaminációt, ahol kettő amnion folyadékból, három pedig chorion biopsziából származó minta volt (177). Ugyanez a publikáció felhívja a figyelmet arra, hogy az anyai sejt jelenléte az amnion folyadékban egyáltalán nem feltétlenül vezet diagnosztikus hibához, mert az több tényező függvénye: mi az adott genetikai betegség, mi az öröklődésmenet, mi az apai és az anyai mutáció. Összességében az anyai kontamináció miatti eredménytelenséget óvatosan kell kezelni, hiszen minden ilyen esetben az alapvető cél a tiszta egyértelmű genetikai diagnózison túl az invazív beavatkozás ismétlődésének elkerülése. Nagy jelentősége van a prenatalis mintavételt végző tapasztalatának is: 1384 eset vizsgálatakor azt találták, hogy azon orvosok esetében, akik évente kevesebb, mint 50 amniocentézist végeznek a magzat vesztés aránya 14 napon belül 1:57, míg azok esetében akik több mint 50-et végeznek, ott majdnem egy nagyságrenddel alacsonyabb, 1:415 (184). 30 napon belül ugyanez az adat az 50 beavatkozásnál kevesebbet végző orvosok esetében 1:38, míg az 50 beavatkozásnál többet végző orvosok esetén 1:312. Az elfogadott ajánlás alapján, minden egyes prenatalis diagnosztika esetében a molekuláris diagnosztikai teszt elvégzésekor függetlenül attól, hogy milyen öröklődésmenet és milyen betegségről van szó, ajánlott anyai sejt kontaminációs vizsgálatot végezni (182). Az ajánlás szerint a legalacsonyabb érzékenységi szint az 5%, azaz ekkora mértékű anyai sejt kontaminációt ki kell tudni mutatni. Az ajánlás azt is megfogalmazza, hogy az adott genetikai laboratóriumnak tisztában kell lenni a rutin módon alkalmazott diagnosztikai tesztek anyai sejt kontaminációra vonatkozó szenzitivitásával, mely szükséges a teszt eredményének korrekt interpretációjához, azonban ennek a kialakítása nagyon nehéz. A szignifikáns anyai sejt kontamináció az eredmény interpretációját egyértelműen befolyásolja és nagy mértékben függ az alkalmazott módszertől, bár nem feltétlenül jelenti a teszt elvetését, sokkal inkább csak a megfelelő interpretációját: egy korai vizsgálat (185) multiplex PCR esetén (Duchenne izomsorvadás vizsgálatára) azt találta, hogy 5%-os anyai sejt kontamináció még tolerálható volt a megfelelő kísérleti körülmények betartásával. Egy másik analízis azt mutatta, hogy magasabb mint 20%-os anyai sejt kontamináció volt az, ami valóban zavaró tényező volt (microarray analízis) (186). E tanulmány szerint az anyai sejt kontamináció akár a magzati minták 7,1%-ban is jelen lehet, ennek megfelelően nagyon fontos a rutin módon használt diagnosztikai eljárás szenzitivitásának meghatározása (186).

Fentiekből az alábbi következtetéseket vontam le:

- (1) az anyai kontamináció, annak minden, interpretatív és klinikai döntéshozatali következményével egy komoly diagnosztikai probléma,
- (2) az ország egyik legnagyobb klinikai laboratóriumi genetikai diagnosztikai laboratóriumának, mely évente több tucat prenatalis diagnosztikát végez monogénes betegségek területén, foglalkoznia kell az általa használt módszerek esetén a szignifikáns MCC módszerenkénti meghatározásával,
- (3) számos modern módszer esetén (MLPA, új generációs DNS szekvenálás) a nemzetközi adatok is rendkívül hiányosak. Mindezek miatt döntöttem úgy, hogy egy szisztematikus kísérletsorozat keretében megvizsgáljuk a Sanger szekvenálás, az MLPA teszt és egy új generációs DNS szekvenálási módszer, a piroszekvenálás MCC érzékenységét.

1.2.2. Piroszekvenálási alapú új generációs DNS szekvenálási rendszer analitikai paramétereinek vizsgálata

A homopolimer (HP) egy olyan szekvencia mintázat, amely azonos nukleotid bázisokból áll. A majdnem minden exonban előforduló HP szekvenciák a rekombinációban illetve a transzkripció szabályozásában játszanak szerepet (187, 188). Legnagyobb részük (97%) 4-6 nukleotid hosszú. A HP szekvenciák rendkívül mutagének és a hossz változással járó mutációk forró pontjának tekinthetők (189-191). A napjaink klinikai laboratóriumi genetikai diagnosztikájában használt új generációs szekvenálási technológiák esetében néhány nem képes a homopolimereket megfelelően szekvenálni a szekvenálás alapelve miatt. A piroszekvenálás (192) és az ion félvezető szekvenálás (193) esetében a jel - ami emittált fény vagy hidrogén ionok - erőssége attól függ, hogy hány azonos nukleotid bázis épül be a DNS szába egy adott dNTP ciklus során. Azonban az induló linearitás a HP mintázatokban egyre inkább ellaposodik, ebből következően számos, mind túl sok, mind túl kevés nukleotid olvasásban megvalósuló hiba következhet be (194-196). Ami ezt különösen problémássá teszi, hogy a HP szekvenciák az inzerció és delécio mutációk forró pontjaiként szerepelnek, ezért ezeknek a kémiaiaknak a klinikai laboratóriumi genetikai diagnosztikai felhasználása a HP szekvenciák tekintetében rendkívül kérdéses (197). Számos bioinformatikai javító eszközt fejlesztettek ki, amelyek segíthetnek a HP szekvenciák megítélésében (198-203) viszont az adott új generációs DNS szekvenálási rendszer analitikai képességeinek meghatározása a rutin diagnosztikába történő beillesztés előtt elengedhetetlen (204). Érdekes módon nagyon kevés experimentális adat áll rendelkezésünkre arra nézve, hogy

mennyi az a pontos HP nukleotid szám, ahol a piroszekvenálás pontatlanná válik, ezért két tesztrendszer alakítottunk ki az általunk használt piroszekvenáláson alapuló új generációs szekvenálási rendszer analitikai képességének a vizsgálatára:

- (1) plazmid vektorokban különböző homopolimereket hoztunk létre és ezeket szekvenáltuk új generációs szekvenálással,
- (2) a *CFTR* gént vizsgáltuk egy saját fejlesztésű piroszekvenálási tesztrendszerrel ismert szekvenciájú betegmintákon.

A *CFTR* gén esetében a 27 exonból 17 tartalmaz 24 homopolimer szekvenciát. Ami különösen fontossá tette ezt, hogy a 14-es exonban a 7 adenint tartalmazó HP régió a c2046_2052, kifejezett mutációs forró pontként működik hiszen ez a poli-A szekvencia az alábbi patogén mutációkat is tartalmazhatja az irodalmi adatok szerint: c.2051_2052delAAinsG (2183delAAinsG) amely 5 adenint eredményez, míg a c.2052delA (2184delA) 6 adenint eredményez homopolimert, míg a hazánkban meglehetősen gyakori c.2052_2053 insA (2184insA) egy 8 adenin hosszúságú HP szekvenciát eredményez.

1.3. Monogénes kohorszok vizsgálata

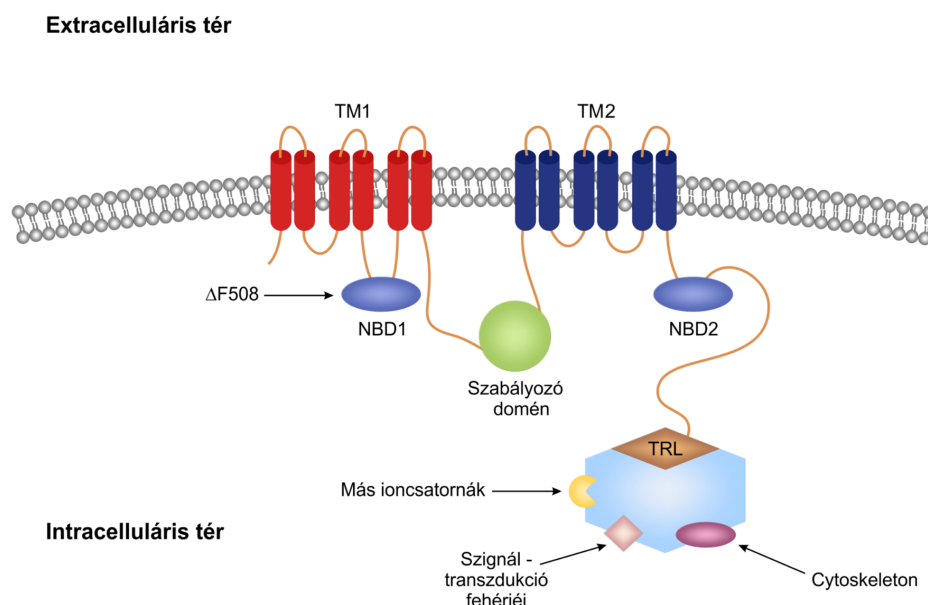
A monogénes kohorszok genetikai vizsgálatának jelentősége szerteágazó. A mutációk ismerete lehetőséget nyújt pontos, költséghatékony diagnosztikai protokollok kialakítására, segítheti a reprodukív döntéshozatalt. A családoknak megnyugvást hozhat, rövidíti a diagnosztikus odüsszeiát. Adatokat szolgáltat a populáció történetére, a genotípus-fenotípus kapcsolatra vonatkozóan, segítheti az újszülöttkori szűrés genetikai oldalának kidolgozását. Munkánk során négy monogénes kohorsz analízisét végeztük el.

1.3.1. A cystás fibrosis (CF)

A cystás fibrosis (CF, OMIM 219700) a monogénes betegségek archetípusának nevezhető. Az egyik legjobban vizsgált és a kaukázusi népcsoport egyik leggyakoribb súlyos monogénes betegsége. Öröklődésmenete autoszomális recesszív. Habár a betegek várható élettartama az utóbbi évtizedekben jelentősen megnőtt, és napjainkra eléri a 40 évet is, a betegség igen nagy terhet ró az érintett családokra. Számos országban a CF nem genetikai módszertannal való, általában immunreaktív tripszinogén (IRT) alapú szűrése bekerült az újszülöttkori szűrőprogramokba, habár a szűrés ellentmondásos, hiszen a CF a legutóbbi időig az összes

Wilson és Jungner kritériumnak (205) nem felelt meg, elsősorban azért, mert nincsen olyan kezelési módja, amely érdemben befolyásolná a fenotípus kialakulását és progresszióját. A betegség által érintett fehérje a CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) egy, elsősorban a légutakban és a verejték mirigyekben expresszálandó klorid ion csatorna. A betegség diagnosztikáját megnehezíti az a tény, hogy a fehérjét kódoló *CFTR* génben több, mint 2000 mutáció okozhat CF-et és az egyes mutációk előfordulása igen változó a különböző vizsgált populációkban. A CF mutációk hazai prevalencia adatai igen hiányosak voltak az ezirányú munkánk megkezdése előtt.

Európában több mint 30.000 beteg, míg világszerte több mint 80.000 beteg szenved CF-ben (206). Ma már több felnőtt beteg van mint gyermek, de a halálozáskori medián életkor még mindig csak 28 év (206). Az egészségügyi rendszer fejlődésével azonban ez nagyon nagy mértékben kitolódhat, a legutóbbi 15 évben született betegek az Egyesült Királyságban már hosszabb, mint 50 éves születéskor várható élettartamra számíthatnak (207). Hiába vezették be több országban a CF újszülöttkori szűrését, a várakozással szemben az nemhogy csökkentette az incidenciát, hanem általában növelte, hiszen a korai felismerés jobb életminőséget és hosszabb élettartamot jelent. A CFTR fehérje egy epitheliális klorid és bikarbonát transzmembrán ion csatorna (6. ábra) (208, 209).



6. ábra. A CFTR fehérje. Forrás: Balogh et al. Molekuláris diagnosztika, https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Molekularis_diagnosztika_hu_book/adatok.html.

A klinikai manifesztáció legnagyobb részben a progresszív tüdőbetegség miatt alakul ki, ahol a légutakat a hiperviszkózus nyák elzárja, így baktériumok telepednek meg a kialakult biofilmen és gyulladás alakul ki. A legutóbbi időkig tüneti kezelési mód volt csak lehetséges, ami elsősorban a viszkózus nyák oldását jelentette, illetve az antibiotikum kezelés, amely az infekciók megelőzésére és kezelésére szolgál, valamint a krónikus gyulladás leküzdésére szolgáló gyulladás elleni gyógyszerek. A már említett archetípus abban is leírható, hogy minden olyan genetikai, molekuláris és a pathogenezist feltáró folyamat illetve kutatási módszertan, ami a CF-nél eredeztethető, az bevonul(t) más ritka monogén betegségek kutatásába is. A több mint 1400 *CFTR* mutáció legnagyobb része, 40%-a misszensz, 15-16% olvasási kereteltolódással járó mutáció, 11% splicingot megzavaró mutáció és 14% nonszensz mutáció. Elég számottevő (8%) a nagy genetikai eltérések aránya is, míg a mutációk kevesebb, mint 1% érinti a promotert (6,74) (HGMD Professional 2020.1). A leggyakoribb mutáció a p.Phe508del, amely a betegek 70-80%-ban kimutatható földrajzi lokalizációtól függően. Észak-Európában nagyon magas a frekvenciája, megfigyelhető egy Észak-déli csökkenő grádiens (210). A CF fő oka a cAMP-szabályozta klorid és bikarbonát szekréció sérülése az epitheliális sejteken, de a konkrét molekuláris ok nagymértékben különböző lehet. Éppen ezért a mutáció-specifikus terápiák kifejlesztése során nagy jelentősége van ezeknek a különböző pathomechanizmus utaknak. A funkcionális defektus tulajdonságainak megfelelően 7 mutációs osztályt különböztetünk meg CF esetében (206, 211, 212). Az I. osztályú mutációk esetében fehérje nem keletkezik, melynek leggyakoribb oka a nonszensz mutáció, aminek a következménye a korai stop kodon miatti mRNS degradáció (nonsense-mediated mRNA decay, NMD) vagy a trunkált fehérje lebomlása. A II. osztályú mutációk (ide is tartozik a p.Phe508del) a CFTR fehérje intracelluláris mozgását, illetve érését befolyásolják és a végeredménye az lesz, hogy a fehérje csomagolódása, foldingja sérül, a rosszul kialakult fehérje az endoplazmás retikulumban marad és utána korai degradációval elemésződik és ezért nem jut ki a sejtmembránba (213). A III. osztályú mutációk esetében a CFTR csatorna nyitási funkció érintett, míg a IV-es osztályú mutációk esetében a kloridion vezetés csökkent. Az V. osztályú mutációk esetében a CFTR fehérje szerkezete normál, viszont a mennyisége csökkent, mert olyan splicingot megzavaró mutációk következtében alakul ki, amelyek mind kóros, mind normál mRNS képződését eredményezik, de csak a normál mRNS képződéssel kialakult fehérje jut ki a membránba. A VI. osztályú mutációk a citoplazma membránban levő CFTR fehérjének életidejét csökkentik, ezek destabilizáló mutációk vagy azért, mert az endocitózis gyorsul fel, vagy a fehérje membránba történő újra kijutása sérül. A VII. osztályú mutációk esetében a farmakológiai kezelésnek elvi lehetősége sincsen, hiszen oly mértékben sérül a genetikai állomány, hogy

semmilyen formában nem alakulhat ki működőképes fehérje. Ilyen eltérések a nagy CNV-k, mint például az eredményeink alapján (lásd lentebb) hazánkban is jelentős frekvenciával előforduló nagy szláv eredetű delécia, a CFTRdele2,3(21kb) (214). Azaz, ezek mutációspecifikus terápiával nem megközelíthető eltérések.

Még a CF esetében, mely az egyik legnagyobb erőforásokkal kutatott monogén betegség is alig több, mint 300 mutációt sikerült funkcionálisan tesztelni az ismert 2000 variánsból (www.cftr2.org). A nagy számú beteget érintő mutációk száma meglehetősen kevés, viszont a mutációk harmada öt vagy kevesebb CF betegben került eddig kimutatásra. Épp ezért azok karakterizálása rendkívül lassú.

1.3.1.1. Mutáció specifikus kezelés CF-ben

A mutáció specifikus terápiák kb. 10 évvel ezelőtt kaptak lendületet. Alapjuk olyan kis molekulású CF modulátor molekulák, amelyek feladata az, hogy valamilyen módon javítsák a mutáns CFTR fehérje funkcióját (215). Különböző típusokat fejlesztettek, illetve vannak fejlesztés alatt:

1. A potenciátorok, amely esetében a kis molekula hatása az, hogy a csatorna nyitási valószínűségét növeli meg.
2. A korrektorok, amelyeknek a funkciója az, hogy az átíródó CFTR fehérjének a plazma membránba való kijutását segítsék elő egyfajta chaperon molekulaként.
3. A stabilizátorok, melyeknek meghosszabbítják a mutáns CFTR fehérje plazma membránban eltöltött idejét.
4. Az amplifikálók, amelyeknek az a funkciója, hogy megnöveljék a mutáns CFTR fehérje mennyiségét ahhoz, hogy utána más kis molekulák tudjanak rajta hatni és a nonszensz mutációk kezelésére szolgáló átolvasó gyógyszerek, amelyek a korai terminációs kodont tartalmazó mRNS-nél ezt a korai stop kodont átugorva (pontosabban egy random aminosavat beépítve) haladjon tovább a fehérje szintézis a normál stop kodonig, tehát egyfajta transzlációs átolvasást indukáljon a riboszómának, hogy teljes hosszúságú fehérje keletkezessen. Ez az utóbbi nagyon nehéz, hiszen a nonszensz mutációk nem csak trunkált fehérjét, de NMD-t is okozhatnak (216). A modulátorok két osztálya kapott már szabályozási hatóságtól engedélyt:

(1) a potenciátorok, amely esetében a nyitási és a vezetési hibát okozó *CFTR* mutációkat lehet kezelni, valamint olyan variánsoknál, ahol van reziduális funkció és az bizonyítottan javul a potenciátor kezelés hatására,

(2) a korrektorok, amelyeknek az érést elősegítő funkciójuk a potenciátorokkal együtt értelmezhető, azaz együtt fogják a p.Phe508del homozigóta betegeknél vagy a p.Phe508del/más mutáció összetett heterozigóta betegek esetében javítani a klinikai képet. A potenciátorokat, amplifikálókat, korrektorokat tesztelő klinikai vizsgálatok napjainkban folyamatosan folynak és kombinációs terápiák is vannak.

A betegség súlyossági fokától függően, újszülött vagy csecsemő, kisded korban jelentkezhet. A legsúlyosabb formában meconium ileus alakul ki, de általában a betegség kicsit később jelentkezik, fél-, egy éves életkorban, visszatérő tüdőgyulladás illetve felsőlégtúti gyulladások formájában. A CFTR-t expresszáló szövetekben, a tüdőben, a pancreasban cisztás kötőszövetes elfajulás alakul ki, és a működési zavart elsősorban a viszkózus nyák okozta obstrukció fogja jelenteni. Az újszülöttkori szűrés több szinten valósulhat meg, kettő vagy három szintű lehet, de az első lépés az majdnem mindig IRT, ezt követi a pancreas asszociált protein (PAP) meghatározása és utána következnek a DNS alapú tesztek (217, 218).

1.3.2. A Smith-Lemli-Opitz szindróma

1.3.2.1. Bevezetés és patofiziológiai háttér

A Smith-Lemli-Opitz (SLO, OMIM 270400) szindróma egy monogénes, autoszomális recesszív módon öröklődő, mentális retardációval járó malformációs szindróma, melyet 1964-ben írt le Smith, Lemli és Opitz (219).

A betegség diagnózisa évtizedeken át kizárólag a klinikai tüneteken alapult. A kilencvenes évek elején SLO szindrómás betegekben alacsony koleszterin és emelkedett 7-dehidrokoleszterin (7-DHC) értékeket észleltek (220, 221). Kiderült, hogy a biokémiai eltérések hátterében a koleszterin bioszintézis utolsó lépését katalizáló enzim, a 7-dehidrokoleszterin-reduktáz (DHCR7) defektusa áll (222). Az enzimblokk eredményeképpen alacsony koleszterin szint, magas 7-DHC és izomer formája, 8-dehidrokoleszterin (8-DHC) koncentráció mérhető a vérben és a szövetekben. Az SLO szindróma biokémiai hátterének felfedezése megdöntötte az addig fennálló dogmát, miszerint metabolikus betegség nem vezet veleszületett malformációs szindróma kialakulásához.

A DHCR7 enzimet kódoló gén klónozása lehetővé tette a molekuláris genetikai diagnosztikát (223-226). A *DHCR7* gén (11q12-13) kódoló régiója 9 exonba rendeződik és egy 54,5 kDa molekulatömegű, 475 aminosavból álló fehérjét kódol (227). Jelenleg 169 SLO szindrómát okozó mutáció ismert (HGMD, 2020.1). A koleszterin számos fontos biológiai funkcióval rendelkezik.

A sejtmembrán ún. lipid „tutajainak” (raft) alkotóeleme, részt vesz a myelinhüvely kialakításában, előanyaga a szteroid hormonoknak, epesavaknak és neuroaktív szteroidoknak. A koleszterin embrionális fejlődésben és morfogenezisben játszott szerepe hozzájárul az SLO kialakulásához (227). A test koleszterin tartalmának 25%-át az agyban (myelin) található koleszterin képezi, melynek szabályozása független a perifériás koleszterin regulációtól (228). Az SLO szindróma patofiziológiai háttere összetett és csak részben tisztázott. A kórképre jellemző, több szervrendszert érintő, szerteágazó tünetekért - más veleszületett anyagcsere betegségekhez hasonlóan - feltehetően az enzimblokk előtt felszaporodó közti termék, a 7-DHC és izomerje a 8-DHC, valamint a csökkent mennyiségű végtermék, a koleszterin együttesen felelősek (229). A 7-DHC a koleszterintől csupán egy, a szterol gyűrű 7.-8. szénatomja között lévő kettős kötésben különbözik, mégis a sejtmembránba való beépülése megváltoztatja a lipid raftok protein összetételét, a sejtmembrán struktúráját és funkcióját (230, 231). Az emelkedett koncentrációban lévő 7-DHC és annak metabolitjai ugyanakkor toxikus hatásúak: a 7-DHC csökkenti az intracelluláris koleszterin transzportot (232) és a hidroximetilglutaril koenzim A (HMG-CoA) reduktáz fokozott degradációjához vezet (233). A 7-DHC az egyik legkönnyebben oxidálható lipid molekula. A lipid peroxidáció során számos oxiszterol keletkezik belőle, melyek feltételezhetően kóroki szerepet játszanak a szindrómában megfigyelhető központi idegrendszeri tünetek kialakulásában (234-236).

1.3.2.2. Epidemiológia

A betegség leggyakoribb Észak- és Közép-Európában, míg extrém ritka Ázsiában és Afrikában. Becsült incidenciája különböző populációkban változó, 1:10.000-1:70.000 (237). A leggyakoribb oki mutáció (c.964-1G>C) hordozó gyakorisága kb. 1%-ra tehető, mely eltérés a kórképet okozó allélek mintegy 30%-áért felelős. Ezen adatok igen magas hordozó gyakoriságra utalnak (1:30) (238). Az új generációs DNS szekvenálási technika az utóbbi időben új adalékokkal szolgált a (patogén) mutációk prevalenciáját illetően. Egy amerikai adatelemzés, mely 17836 kromoszóma analízisen alapul, a heterozigóta formában hordozott patogén *DHCR7* mutációk arányát összesen 1,01%-ra teszi, ami a betegség incidenciáját 1/39125 terhességben állapítja meg (239). A magas hordozó frekvenciát az alapító hatással és a heterozigóták szelekciós előnyével magyarázzák. Utóbbiban szerepet játszhatott a D vitamin fokozott keletkezése a bőrben lévő előanyagából, a 7-DHC-ből, amely nemcsak az angolkór kialakulásával, hanem az autoimmun betegségek kialakulásával és bizonyos kórokozókkal szemben is védettséget jelent. Számos tanulmány szerint

a hordozó gyakoriság alapján becsült incidencia magasabb, mint a tényleges. Ez a különbség leginkább a súlyosan érintett magzatok prenatális/perinatális elhalálózásából, illetve a betegség aluldiagnosztizáltságából és a hordozók csökkent fertilitásából adódhat (240, 241). Az érintett családokban a magzati halálozás és a spontán vetélés gyakorisága kétszerese az átlag populációénak (242).

1.3.2.3. Fenotípusos jellemzők

Az SLO szindróma rendkívül széles klinikai spektrummal rendelkezik. A fenotípusos jegyek, az egészen enyhe tünetektől (viselkedési zavar, enyhe mentális retardáció) a prenatális/perinatális elhalálozáshoz vezető több szervrendszert érintő rendellenességek jelenlétéig, rendkívül változatosak lehetnek. A klinikai tünetek valamennyi szervrendszert érinthetik (1. táblázat).

Az Smith-Lemli-Opitz szindróma jellegzetes klinikai tünetei	
Craniofaciális eltérések microcephalia keskeny homlok felfelé néző ornyílások széles orrgyök kicsi alsó állkapocs ptosis epicanthus redő alacsonyan ülő, hátrafelé rotált fülek	Orális manifesztáció magasan ívelt, keskeny kemény szájpad szájpadhasadék bifid uvula zsúfolt fogazat széles alveoláris szegélyek
Központi idegrendszeri érintettség agykamra tágulat hiányzó vagy hypoplasziás corpus callosum cerebellaris hypoplasia hypoplasziás frontális lebeny holoprosencephalia mentális retardáció	Vázrendszeri eltérések postaxiális polydactylia tenyéren harántbarázda 2. és 3. lábujj kötőszövetes összenövése
Cardiovascularis rendellenességek atrioventricularis septumdefektus ductus arteriosus persistens	Urogenitális eltérések renális hypo-/aplasia fiúgyermek esetén nem egyértelmű/női genitáliák hypospadiasis cryptorchismus
Légzőszervi érintettség abnormális tüdőleányezettség tüdő hypoplasia laryngeális és tracheális porcok eltérései alvási apnoe	Gastrointestinális rendszer pylorus stenosis intestinális dysmotilitás aganglionosis a vastagbélben constipáció nyelési/táplálási nehézségek gasztrooesophageális reflux dys- vagy aplasiás epehólyag cholestasis
Viselkedés gyakori autisztikus jegyek hiperreaktivitás önbántalmazó magatartás	Bőr eltérő mértékű fotoszenzitivitás ekcéma

1. táblázat. Az SLO klinikai tünetei.

A leggyakoribb rendellenesség, mely majdnem minden betegben jelen van, a 2-3. lábujjak részleges összenövése. Fiúgyermekben a genitálék eltérései igen gyakoriak, megjelenhetnek micropenis, különböző fokú hypospadiasis, bizonytalan vagy női külső genitálék formájában. Jellegzetes az SLO-s arcdysmorphia (microcephalia, ptosis, micrognathia, előretekintő orrnyílások, széles orrgyök, dysplastikus fülkagyló). A arcdysmorphia mértéke jó korrelációt mutat a biokémiai és egyéb fizikális eltérésekkel (229). A betegség súlyosságának megállapítása pontozási rendszer alapján történik, melyet Bialer és munkatársai fejlesztettek ki 1987-ben (243), majd Kelley és Hennekam 2000-ben módosították (244). A különböző szervrendszerek érintettsége alapján a betegség három súlyossági fokozata különíthető el: enyhe (<20 pont), típusos/klasszikus (20-50 pont) és súlyos (>50 pont) (244).

Az SLO szindrómás betegeket többnyire fejlődésbeli elmaradás jellemzi. A mentális retardáció változó mértékű lehet, egyes esetekben közel normál intelligencia hányadost figyeltek meg igazolt *DHCR7* gén mutációk és emelkedett 7-DHC jelenléte mellett (237). Gyakori a szenzoros hiperreaktivitás, a különböző vizuális, auditoros ingerekre adott felfokozott válaszreakció. A betegek többségére jellemző különböző mértékű agresszivitás és önbántalmazás. Az SLO szindróma gyakran autisztikus magatartás zavarral társul (245). Jellemző a súlyos alvászavar, ami az alvási igény igen kifejezett csökkenésében, ami esetenként csupán 2-3 óra éjszakai alvást jelent (246). A betegek több mint felében gastrostomán keresztüli táplálás szükséges. Súlyos fenotípus esetén újszülött korban elektrolit eltérések és hipoglikémia jelentkezhetnek a mellékvesekéreg elégtelen működése miatt. Az önálló mozgásra képtelen gyermekekben gyakorivá válnak az ízületi kontraktúrák. Mind csecsemő-, mind korai gyermekkorban gyakoriak a különböző infekciók (otitis media, felső légúti infekciók, pneumonia). A fényérzékenység, néha igen súlyos megjelenésű ekcéma sem ritka (237, 244).

1.3.2.4. Biokémiai diagnosztika

A klinikai tünetek alapján felmerülő SLO szindróma esetén elsőként biokémiai tesztek elvégzésére kerül sor. A koleszterin szint általában alacsony, de lehet normál is, fontos korspecifikus referencia tartomány használata. A szindrómára nagymértékben specifikus az emelkedett szérum 7-DHC koncentráció (229), kimutatása lehetséges UV spektrofotometriás (247) vagy gázkromatográfiás-tömegspektrometriás (GC-MS) módszerrel (248).

1.3.2.5. A betegség molekuláris genetikája – mutációs spektrum

A Smith-Lemli-Opitz szindróma kialakulásáért a DHCR7 enzimet kódoló gén mutációi felelősek (223-226), emelkedett 7-DHC koncentráció esetén a betegséget okozó mutációk kimutatása DNS szekvenálással történik. A kódoló szakaszok (exonok) és az exon-intron határok bázissorrendjének meghatározásával a betegek mintegy 95%-ában detektálható kóroki mutáció (229). A mutációk a génben bárhol előfordulhatnak, némelyek csak egy/néhány betegben mutathatók ki, míg más eltérések bizonyos populációkban gyakran megfigyelhetők az alapító hatásnak köszönhetően. Öt mutáció (p.Thr93Met, p.Trp151*, p.Arg404Cys, p.Val326Leu, c.964-1G>C) tehető felelőssé a betegséget okozó allélok közel 60%-ért, melyek közül a c.964-1G>C splicing-ot befolyásoló mutáció önmagában átlagosan 30%-ban fordul elő (229). Más monogénes betegségekhez hasonlóan itt is megfigyelhető, hogy az egyes populációkban különböző a mutációs spektrum és az egyes mutációk gyakorisága földrajzi elhelyezkedéstől függően eltérő (249).

SLO szindróma esetén a genotípus-fenotípus összefüggés gyenge korrelációt mutat, kivétel, hogy a legsúlyosabb klinikai kép (akár magzati vagy perinatális halálozás) két null allélt eredményező mutáció esetén fordul elő, mely genotípus az enzimaktivitást közel nullára csökkenti (227). A gyakori összetett heterozigótaság és az azonos genetikai háttérű betegek alacsony száma nehezíti a genotípus-fenotípus összefüggések vizsgálatát. A szakirodalomból ismert, hogy azonos genotípussal rendelkező betegek esetén a klinikai kép az enyhétől az egészen súlyosig terjedhet. Ez a megfigyelés azt valószínűsíti, hogy számos még nem ismert illetve részben ismert módosító gén hatás, epigenetikai és környezeti faktor tehető felelőssé a nagyfokú fenotípusbeli variabilitásért (229).

1.3.2.6. Prenatális diagnosztika, genetikai tanácsadás

Az SLO szindróma gyanúja felvetődhet prenatálisan, amennyiben az anyai vérben alacsony a konjugátatlan ösztriol, β -HCG, alfa-fötóprotein szint a 15-20. terhességi héten (250) és az eredmény ultrahang vizsgálat során talált különböző eltérésekkel társul (intrauterin retardáció, agy-, szív-, vese- vagy végtagfejlődési rendellenességek, bizonytalan/női genitália XY kariotípusú magzatban). Enyhe esetekben azonban mind a konjugátatlan ösztriol szint, mind az ultrahang vizsgálat eredménye normális lehet (237).

Rizikóbecslés esetén ajánlott 2%-os hordozó frekvenciát figyelembe venni (229). Amennyiben a családra jellemző mutáció ismert, ismételt terhesség alkalmával prenatális genetikai diagnosztika szükséges a betegség ismétlődésének megelőzéséhez.

1.3.2.7. Kezelés

Az SLO szindrómás betegek kevesebb koleszterint szintetizálnak és az enzimblokk miatt jelentősen emelkedik a vérben és a szövetekben a 7-DHC szintje (251). Az elsődleges terápiás próbálkozás a koleszterin szint növelését célozza. A koleszterin pótlás a legtöbb beteg esetén emeli a koleszterin koncentrációt a vérben és a HMG-CoA reduktáz enzim gátlásán keresztül csökkenti a 7-DHC és 8-DHC szintet. A koleszterin azonban a vér-agy gáton nem jut át, így az agyban nem tudja a koleszterindeficitet, valamint a már kialakult központi idegrendszeri eltéréseket korrigálni (252). Az egyetlen kettős-vak, placebo-kontrollált koleszterin pótlás hatását vizsgáló tanulmány nem igazolt viselkedésbeli javulást a kezelés 2,5 hónapos periódusa után (253). Egy 6 éven át tartó longitudinális vizsgálat nem tudott fejlődésbeli javulást kimutatni 14 SLO szindrómás gyermekben koleszterinpótlás mellett (254). A másik kezelési mód a HMG-CoA reduktáz gátló sztatínok alkalmazása, melyek átjutnak a vér-agy gáton és paradox módon a reziduális DHCR7 aktivitás növekedését okozva egyes SLO szindrómás betegekben a koleszterin szint emelkedéséhez, illetve a 7-DHC és 8-DHC koncentrációjának csökkenéséhez vezetnek. Egyéb tanulmányok ezt a hatást nem tudták megerősíteni. Ismeretes a sztatínok szisztémás antioxidáns hatása is. Jelenleg kutatási célú vizsgálatokon kívül a sztatínok rutinszerű alkalmazása SLO szindrómában nem ajánlott (áttekintve (252)).

A 7-DHC-ből lipidperoxidációs folyamatok során számos oxiszterol keletkezik (234, 235), mely terápiás szempontból az antioxidánsok potenciálisan előnyös hatását feltételezi (236). SLO szindrómás betegek fibroblasztjaiban és *DHCR7*-KO egerekben a vizsgált antioxidánsok közül az E vitamin önmagában hatékonynak bizonyult, gátolta a 7-DHC-ből az oxiszterok képződését és ezen keresztül helyreállította a lipidbioszintézist érintő génexpressziós változásokat. Az Egyesült Államokban 2007-ben kezdődött és jelenleg is folyamatban lévő vizsgálatban (smithlempiopitz.org, current studies, Dr. Ellen Roy Elias, The Children's Hospital Colorado, Denver, Colorado) SLO szindrómás betegeknek speciális vitaminkészítményt (AquADEKs, Yasoo Health Inc.) adnak a koleszterinpótlás mellett, mely könnyen felszívódó formában tartalmaz zsírolékony vitaminokat, a betegeknél jól ismert táplálási nehézségek és emésztőrendszeri problémák miatt. A készítményt az Európai Unió számos országában forgalmazzák.

Munkacsoportunk 2014. május 1-én kezdeményezett klinikai tanulmányt a fenti vizsgálat és az említett közlések (234, 236, 255) alapján. A bevont betegek koleszterin pótlás mellett kizárólag E vitamin cseppeket kapnak. Minden olyan próbálkozás, ami a toxikus 7-DHC szintet csökkenti, potenciális kezelési lehetőségként vizsgálandó. Nemzetközi kollaborációban végzett vizsgálataink során amerikai partnerünk több olyan kis molekulát azonosított, melynek hatása van a koleszterin bioszintézisre.

1.3.2.8. Gyógyszer interakciók

Az SLO-s betegek egészséges (obligát) hordozó szülei, illetve vérszerinti rokonai esetében lényegében teljes mértékben hiányoznak a biomarker vizsgálatok. Annyi ismert, hogy a hordozók kicsivel emelkedett 7-DHC szinttel rendelkeznek (256). Kollaborációs partnerünk korábbi munkáiból tudjuk, hogy az emelkedett 7-DHC szint heterozigóta egerekben is kimutatható és a legmagasabb szinteket pedig az idegrendszerben találták (257), valamint az is bizonyítást nyert, hogy bizonyos pszichiátriai betegek, akik aripiprazole vagy trazodone gyógyszert szednek, nagy mértékben megemelkedett 7-DHC-val rendelkeznek (258). Egy korábbi klinikai vizsgálat azt igazolta, hogy az aripiprazole vagy trazodone gyógyszert szedők esetében a 7-DHC plazma szintjük alapján akár az SLO félrediagnosztizálás veszélye is fennáll (259). Az adatok arra utalnak, hogy a DHCR7 inhibítor expozíciónak (pl. aripiprazole és trazodone) fontos hatása lehet a magzati egészségre és a magzati fejlődésre, különös tekintettel arra, hogy az aripiprazole egy rendkívül széles körben használt antipszichotikum az USA-ban, és terhesség alatt is adják ezt a gyógyszert. Az a tény, hogy a populációban sem a heterozigóták sem az aripiprazole-t szedők aránya nem extrém alacsony, arra utal, hogy azok esetében, akik a Venn-diagram közös metszetében vannak, a 7-DHC szint már toxikus tartományba is emelkedhet.

1.3.3. Az autoszomális recesszív policisztás vesebetegség

1.3.3.1. Csillók - ciliopathiák

A csillók mikrotubulus alapú struktúrák, amelyek különböző sejtek felszínét borítják, lehetnek mozgékonyak illetve nem mozgékonyak. A nem mozgékony elsődleges csillók sejt antennaként funkcionálnak, sejt szignalizációt koordinálnak, meghatározzák a sejt polaritását és különböző más érzékelési és funkcionális szerepük is van (260). A vesén belül a tubuláris sejtek tartalmaznak

elsődleges csillókat, amelyek a nephron ürege felé néznek. Szerkezetét tekintve az elsődleges csilló bazális testből, tranzíciós átmeneti zónából és az axonémából áll, ezek a képletek az evolúció során nagy mértékben konzerválódtak. A ciliopathiák az elsődleges csillót alkotó néhány 100 fehérje génjeinek mutációjaként alakulnak ki, ezek közül azok, amelyek a vesét érintik, a renális ciliopathiák (261). Ezek közé a vese ciliopathiák közé tartozik többek között az ADPKD (autosomal dominant polycystic kidney disease) és az ARPKD (autosomal recessive polycystic kidney disease), valamint a nephronophthisis is.

A ciliáris aplasia széles fenotípus spektrummal járhat együtt. Bizonyos esetekben ezek végzetesek, máskor túléléssel is járhatnak (262). Abban az esetben, ha az érett csilló teljes vagy részleges elvesztése történik, nagyon súlyos több szervrendszert érintő betegségek fejlődnek ki és bizonyos esetekben, amikor a csilló morfológiailag normál, leggyakrabban a késői jelentkezésű ADPKD és retinitis pigmentosa jelez ciliopathiát (262).

1.3.3.2. ADPKD

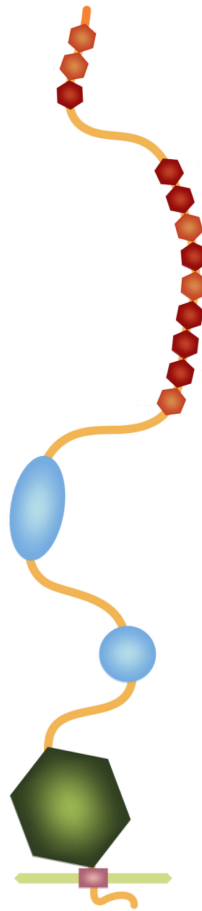
A policisztás vesebetegségek leggyakoribbja az ADPKD, ami általában egy felnőttkorban jelentkező több szervi érintettséggel rendelkező betegség. A folyamatosan növekvő vese ciszták *in utero* elkezdenek kialakulni, és a vese bármelyik részében jelen lehetnek, de általában a nephron disztális régiójában és a gyűjtő csatornában alakulnak ki (263). Az ADPKD betegek 2-5%-ában a ciszták gyermekkorban vagy akár prenatálisan is jelentkezhetnek (264). Az ADPKD előfordulása 1:400 és 1:1000 élve születés közé tehető (263, 265, 266). Ezen előfordulási adatok alapján az ADPKD több mint 10 millió embert érint a világon, minden etnikai csoportba tartozók érintettek lehetnek (263). Az ADPKD esetén majdnem minden beteg tünetmentes marad a 3. vagy 4. életévtizedéig (262). Az ADPKD esetében a betegek több, mint 90%-ban a *PKD1* és *PKD2* gének mutációja okozza a betegséget (260), melyek mellett vannak egyéb más újonnan identifikált gének is. Érdekes, hogy az ADPKD esetében a *PKD1* (OMIM 601313) és a *PKD2* (OMIM 173910) recesszív módon is öröklődhet, homozigóta vagy összetett heterozigóta formában és ilyenkor ezek a betegek sokkal inkább ARPKD fenotípusnak megfelelő klinikai képet mutatnak (264). Az ADPKD esetében a *PKD1* felelős a betegek 85%-áért és 15%-áért a *PKD2* (262). Domináns esetben elképzelhető az, hogy az öröklött mutáció mellett akkor alakul ki a ciszta, ha szomatikus mutáció következik be a másik allélen, ez a two-hit teória (267). Sok esetben van családi halmozódás, de ez nem mindig mutatható ki, hasonlóan a recesszív módokhoz, ha hypomorf

inkomplett penetranciával rendelkező allélekről van szó (268). Az ADPKD esetek 15-20%-ában *de novo* mutáció okozza a betegséget (264).

1.3.3.3. ARPKD

Az ARPKD (OMIM 236200) sokkal ritkább, de sokkal súlyosabb betegség, mint a domináns forma. Az ARPKD tipikusan perinatálisan vagy gyermekkorban manifesztálódik, gyakran végzetes következményekkel. A betegség érintheti a májat is, máj fibrosist okoz és nagy mértékben megnagyobbodott vesékkal jár. Általában a gyűjtő csatornáknak alakulnak ki a ciszták. Az ARPKD esetében a hipertensio a születés utáni első hónapokban jelentkezik az összes betegnek akár 80%-át is érintve (262). Az ARPKD kombinált máj és vese transzplantációt igényelhet gyermekkorban (264).

A betegséget okozó génmutáció a *PKHD1* génben (OMIM 606702) van, amely gén a fibrocisztin /polyductin nevű fehérjét kódolja és ez a protein az elsődleges csillóban és a bazális testben fordul elő. A fibrocisztin részt vesz a sejt-sejt adhézióban és proliferáció szabályozásban is, illetve lehetséges az, hogy egy membrán kötött receptorként is funkcionál (264, 269). A *PKHD1* gén rendkívül nagy méretű, ennek megfelelően az átíródó mRNS is nagyon nagy. Sok különböző transzkript ismert (269), melyek közül a legnagyobb egy 4074 aminosavas fehérjét kódol, ami egy transzmembrán doménnel, valamint egy rendkívül hosszú extracelluláris N- terminális doménnel és egy nagyon rövid C-terminális citoplazmatikus doménnel rendelkezik (263) (7. ábra).



7. ábra. A fibroystin/polyductin fehérje. Az ismert domén szerkezeti homológok színes alakzatokkal jelölve (TIG, TIG-szerű domének piros hatszöggel, TMEM2 homológ kék oválissal, DKFZ homológ zöld hatszöggel). Citoplazmamembrán: világos zöld. Forrás: Balogh et al. Molekuláris diagnosztika, https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Molekularis_diagnosztika_hu_book/adatok.html

C-terminusán található a csilló membrán targetáló motívum (270). A fibrocisztin proteolitikusan hasítható, így a citoplazmatikus farok a sejtmagba transzlokálódik és különböző, a ciszták kialakulását segítő (271) cél gének expresszióját befolyásolja (263).

Az ARPKD incidenciája az amerikai adatok szerint 1:26.500 élve születésre, ami 1:70 es hordozó frekvenciát jelent (272), előfordulhat azonban, mint oly sok más recesszív megbetegedés esetén, hogy izolált populáció esetén sokkal magasabb prevalencia alakulhat ki. Erre példa Finnország, ahol 1:8000 incidenciáról számoltak be (273). Az ARPKD pontos incidenciájának megbecslése nehéz, hiszen a különböző kohorszok esetében különbözőek a beteg beválasztási kritériumok és nagyon sokszor előfordul az, hogy a perinatálisan elvesztett definitív diagnózis nélküli újszülöttek esetében nem történik mutáció analízis (264). Ez utóbbi említése azért fontos, mert a saját adatainkban is vannak indirekt diagnózisra vonatkozó eredmények (lásd a megfelelő fejezetben lentebb).

A mortalitás legfontosabb oka újszülött korban a tüdő állapota, az ARPKD 30-40%-os mortalitása a tüdő hypoplasiára vezethető vissza (274, 275). Akkor azonban, ha a gyermek a perinatális periódust túléli, a betegség hosszútávú prognózisa lényegesen jobb, az 1 éves túlélés 85%-os, míg a 10 éves túlélés 82%-os (274-277). Az ARPKD esetében is egy genetikailag korábban homogénnek gondolt betegségről van szó, amely a *PKHD1* génben történő recesszív mutációk következtében alakul ki, de vannak már egyéb más olyan újonnan identifikált gének, mint pl. a *DZIP1L*, amely okozhatja a betegséget (260). A *PKHD1* gén által okozott ARPKD esetében genotípus-fenotípus korrelációt rendkívül nehéz felállítani. Ez nem csak amiatt van, mert egyszerre több mutáció is lehet ugyanazon a génen, sőt ugyanazon az allélen is, amely okozhatja a fehérje funkció csökkenését vagy teljes funkcióvesztését, de nagyon sok összetett heterozigóta genotípus is megfigyelhető. Ezekben az esetekben a két különböző mutáns allél hatása nehezen vizsgálható, de általában a hypomorf allél determinálja a fenotípust, hiszen a funkcióvesztő allél jelenléte egyértelműen súlyos következményekkel jár. Azokban az esetekben, ha két trunkáló mutáció van jelen, akkor a betegség igen súlyos, általában halálos (263). Az aminosav cserékkel járó mutációk esetében előfordulhat a trunkáló mutációknak megfelelő súlyosságú fenotípus és előfordulhat enyhébb fenotípus is (264). Nagy fenotípusbeli különbség lehet családon belül ugyanazon mutációs kombináció esetén is, ami arra utal, hogy más genetikai vagy környezeti tényezők is részt vehetnek a fenotípus meghatározásában (277). A *PKHD1* annak példája, hogy nem az adott mutációra, hanem az adott mutáció típusra próbálunk meg felállítani genotípus-fenotípus korrelációt (278).

1.3.3.4. A klinikai laboratóriumi genetika szerepe az policisztás vesebetegségek diagnosztikájában

Az interdiszciplináris kollaboráció a gyermekgyógyászok, nefrológusok, klinikai genetikusok és klinikai laboratóriumi genetikusok között elengedhetetlen. Mint minden ritka betegség esetén, a genetikai tesztelés rendkívül fontos a diagnosztikus odüsszeia rövidítésében, a szükségtelen egyéb diagnosztikai tesztelések, pl. biopsziák elkerülésében. A definitív diagnózis felállítása lélektanilag nagyon fontos a családoknak, a diagnózisnak lehet szerepe a várható extrarenális tünetek meghatározásában, a komplikációk előrejelzésében. A predikcióban is, a betegség lefolyásának a becslésében és az ismétlődési kockázat meghatározásában is elsődleges fontosságú a klinikai laboratóriumi genetika szerepe (264).

A legújabb adatok szerint a teljes exom szekvenálás módszertanának széleskörű elterjedése segíti a nagymértékben átfedő fenotípussal rendelkező ciliopathiák diagnózisát. Úgy tűnik, hogy rövid időn belül a teljes exom szekvenálás lesz ezen betegségeknek az elsődleges diagnosztikai eszköze (260, 279). A genetikai tesztelést a korai jelentkezésű policisztás vesebetegségek esetében minden családnak fel kell ajánlani (276). A preszimptomatikus diagnózis ebben az esetben a kockázatnak kitett családtagok esetében indokolt mind képalkotó eljárásokkal, mind pedig genetikai teszteléssel.

Az ADPKD genetikai diagnosztikája nem könnyű, hiszen a *PKDI* gént is érintő régióban egy intrakromoszómális duplikáció történt az emberi evolúció során amely 6 pszeudogént eredményezett, több mint 99%-os szekvencia homológiával a *PKDI*-el (263). Ebből következően a teljes exom szekvenálás nem minden esetben megfelelő a *PKDI* analízis során (263). Azonban, ha a teszt fejlesztése ennek figyelembevételével történik, akkor az új generációs DNS szekvenálási technikák kiválóan használhatóak az ADPKD diagnosztikára, legyen az hibridizációs könyvtár készítéssel kialakított technológiák vagy fejlett informatikai eszközök, vagy akár teljes genom szekvenálás (280-282).

Az ARPKD fenotípusosan rendkívül variábilis, jelei már *in utero* láthatók. Születéskor és gyermekkorban is általános a mindkét oldalon megnagyobbodott echogén vesék jelenléte. Az ARPKD-ben a legsúlyosabb esetekben megfigyelhető a Potter szekvencia. Az ARPKD diagnózisa során fontos a szindrómás ciliopathiák kizárása. A betegség diagnosztikájában a molekuláris genetikai tesztelés az arany standard a fenokópiák miatt (283). Hagyományosan a *PKHDI* gén tesztelése Sanger szekvenálással történt (284), de ennek szerepét ma már átveszi az új generációs szekvenálás. Napjainkban a panel tesztelés vagy az exom szekvenálás a legfontosabb (281). Fontos megemlíteni azt, hogy CNV analízisre is fel kell készíteni a genetikai tesztet (263). A mutációk, amelyek a rendkívül nagy, 67 exont tartalmazó (470 kb) (269) génben bárhol lehetnek, a fibrocisztin/polyductin teljes hosszát érinthetik, ez arra utal, hogy a leghosszabb, 4074 aminosavat kódoló transzkript is szükséges a megfelelő fibrocisztin funkció ellátásához (264). A genetikai tesztelés a családok 95%-ban legalább egy mutációt talál (264), de előfordulhat, hogy csendes exoni mutációk vagy olyan nem vizsgált introni szekvencia variánsok is okozhatnak funkcióvesztést akár a splicing sérülése során, amelyek splice elősegítő (enhancer) vagy csendesítő (silencer) helyeket jelentenek. Ezekben az esetekben mRNS vizsgálatok lennének az ideálisak annak eldöntésére, hogy az adott eltérés patogén vagy nem (285), illetve mutációk lehetnek olyan szabályozó elemekben is amelyeket nagyon nehéz kimutatni és különösen nehéz bizonyítani a patogenitást, valamint a *PKHDI* génben előfordulhatnak nagy genomikai átrendeződések is.

Bizonyos mutációk gyakrabban előfordulnak minden populációban mint mások, pl. a p.Thr36Met misszensz mutáció, amely az európai betegpopuláció 10-15%-ban kimutatható (278, 286). Természetesen a *PKHD1* mutáció hordozó szülők esetében, akiknél a családban volt már beteg gyermek, a prenatális diagnosztika nagyon fontos. Ez csak klinikai laboratóriumi genetikai teszteléssel valósítható meg és elsősorban akkor, ha az érintett gyermek genetikai státusza tisztázott (263). A prenatális diagnosztikai lehetőségek kibővülése várható még a non-invazív prenatális tesztelés fejlődésével (287).

1.3.3.5. Differenciál diagnosztika: fenokópiák

A nephronophthisis is a ciliopathia csoportba tartozik, több mint 20 kóroki gént identifikáltak már. Ezek az evolúció során nagy konzervativizmust mutató nefrocisztinek (262). A betegség infantilis, juvenilis és adolescens formában jelentkezhet, az infantilis 1 éves korig, a juvenilis 13 éves korig, míg az adolescens 19 éves korig manifesztálódik. A juvenilis forma a leggyakoribb (262), mely esetében az *NPHP1* a kóroki tényező, ez a betegség az összes nephronophthisis 20-40%-áért felelős (262). A genetikai tesztelés elsődleges fontosságú a nephronophthisis esetén is, bizonyos közlések az új generációs DNS szekvenálást a gold standard, sőt, a teljes exom szekvenálást jobbnak ítélik, mint a gén paneleket (288, 289). A differenciál diagnózis során a nephronophthisis esetében a korai jelentkezésű ADPKD illetve az ARPKD veendő elsősorban figyelembe. Ezekben az esetekben a vese ultrahang vagy egyéb képalkotó eljárások segíthetnek, de mindenképpen a genetikai vizsgálat az, ami definitív diagnózist jelent (288). Bergmann 2015-ben vázolta a fenokópiák lehetőségét. A PKD fenokópiák a *HNF1B*, illetve bizonyos nephronophthisis típusok is lehetnek (283). Természetesen ez fordítva is igaz, azaz hogy más génekben bekövetkező mutáció, legyen az *HNF1B* vagy az ADPKD-t okozó és más ciliopátiákat okozó gén mutációk az ARPKD-hez hasonló fenotípusos tüneteket eredményezhetnek (264). A MODY-t okozó *HNF1B*-hoz kapcsolható betegség is vese cisztákkal jelentkezik (290), igen gyakran megelőzve a diabetest. Az öröklődésmenet autoszomális domináns rendkívül nagy variabilitású penetranciával és expresszivitással és gyakori a *de novo* mutációk kialakulása (264) (112). Az esetek fele nagy deletációt hordoz, ami megint felhívja a figyelmet arra, hogy a genetikai tesztelésnél a teszt megfelelő analitikai képességére oda kell figyelni. Hasonlóan az ARPKD-hoz is, a HNF1 β érintettség, de a nephronophthisis esetén is lehetséges Potter szekvencia vagy ARPKD-szerűen megnagyobbodott vese (264). A különböző formák közti különbségtétel kritikus a genetikai tanácsadás a reprodukív tervezés szempontjából és a betegség kilátásai szempontjából is.

1.3.3.6. Vizsgálataink ARPKD-ben

Vizsgálataink, melyeket az ARPKD területén végeztünk, tíz éves múltat tekintenek vissza és életre hívójuk egy szülész-nőgyógyászati klinikai genetikusi kezdeményezés volt. Dr. Török Olga motivációja az volt, hogy végre lehessen érdemleges választ adni az érintett gyermeküket már elvesztő családoknak az ismétlődési kockázatról, a prenatális diagnosztika bevezetésével. A munka ez esetben igencsak sziszifuszi volt, a gén hatalmas mérete, a hazai molekuláris genetikai diagnosztikai lehetőségek teljes hiánya, a nagy klinikai igény miatt. Az ebből az igen széleskörű kollaborációs munkából született publikáció megmutatja a genetikai tesztelés évtizedes evolúcióját, a Sanger szekvenálástól az új generációs szekvenálásig, beleértve a gén paneleket és az exom szekvenálást is és adalékkal szolgál az ARPKD fenokópiáit illetően is (291).

1.3.4. A Marfan szindróma

1.3.4.1. A Marfan szindróma és betegségbesorolása

Az mellkasi aorta öröklött betegségeivel (heritable thoracic aortic disease, HTAD) több mint 30 gén hozható kapcsolatba (292). Az aorta disszekcióban szenvedő betegeknek 5%-a Marfan szindrómás (293). A Marfan szindróma (OMIM 154700) az *FBN1* génben (OMIM 134797) bekövetkező mutációk miatt alakul ki, az érintett fehérje a fibrillin-1, az extracelluláris mátrix fontos alkotó eleme, mely strukturális integritást ad a kötőszövetnek és hozzájárul az elasztikus tulajdonságainak kialakításához is (294). A Marfan szindróma kardiovaszkuláris szövődményei az aortagyök aneurysma disszekció és a mitrális billentyű prolapszusa. A Marfan szindróma genetikai diagnosztikája nagy hatással van a betegség menedzsmentjére, mert a diagnózis megelőző sebészeti beavatkozáshoz vezet abban az esetben, ha az aortagyök átmérője eléri az 5 cm-t, vagy ha az aortagyök növekedése évente nagyobb, mint 5 mm (294). A Marfan szindrómás betegek 40-54%-ban kimutatható a mitrális billentyű prolapszusa (295), mely súlyos esetben szükségessé teheti a sebészeti beavatkozást. A nagyon gyakran már gyermekkorban kimutatható és fontos diagnosztikai kritériumként szereplő mitrális és tricuspidális billentyű prolapszus hosszú távú klinikai követést igényel (296), évente echocardiogram ajánlott. A Marfan szindróma az életminőséget nagymértékben rontja, beleértve a munkaképességet (fáradtságérzet), befolyásolja a reprodukzív döntéshozatalt és az élettel való elégedettséget (krónikus fájdalom) (297). A fő mortalitási ok a kardiovaszkuláris komplikáció (298), a Marfan szindrómás betegek 80%-ánál

alakul ki aorta komplikáció (299). Szintén megfigyelhető a hosszú csontok túlzott lineáris növekedése és az ízületek lazasága (300). A Marfan szindrómás betegek magasabbak az átlag populációnál. Megfigyelhető az arachnodactilia és a scoliosis (300). Az ectopia lentis a Marfan szindrómás betegek felében fordul elő (301). A fő tüdőartéria tágulata a Marfan szindrómás gyermekek 10%-ban mutatható ki és általában súlyos kardiovaszkuláris szövődeményekkel együtt fordul elő (302). Pneumothorax a betegek 5-10%-ban fordul elő (303). A legsúlyosabban érintett betegeket már születéskor diagnosztizálják, ők a neonatális Marfan szindrómások. Az infantilis forma felismerése az első életévben történik. A korai felismerés javíthatja a menedzsmentet és a genetikai tanácsadás során tájékoztathatók a szülők az esetleges kimenetelekről. A súlyos állapotú újszülöttek esetén a mortalitás az első életévben elérheti a 15%-ot (304). A neonatális Marfan szindróma súlyos mitrális és/vagy tricuspídális billentyű elégtelenséggel és pulmonális emphysemával jár (305).

A HTAD csoportba tartozik a már különálló szindróma néven illetett Loeys-Dietz szindróma, amelyet először a *TGFβR1* és *TGFβR2* génekben bekövetkező mutációk miatt kialakuló betegségként írtak le (306), majd három másik, a TGFβ útvonalban résztvevő génről derült ki, hogy mutációjuk Loeys-Dietz szindrómát okoz: *TGFB2*, *TGFB3* és *SMAD3* (307). A Loeys-Dietz esetében hypertelorismus, craniosynostosis más szív- és érrendszeri rendellenességek is előfordulhatnak, és ami nagyon fontos különbség, hogy nem csak az aortagyök vagy a felszálló aortában lehet aneurysma, hanem az aorta oldalágakban és a cerebrális erekben is. Gyakoribb az allergia is, illetve a gyulladásos bélbetegség is gyakrabban előfordul a Loeys-Dietz szindrómában (307) viszont nincs ectopia lentis (308). Az átfedő tünetek a scoliosis, a mellkas deformitás, a pectus excavatum és carinatum, a spontán légmell és a dura ectasia. A másik ilyen betegségecsoport az Ehlers-Danlos szindróma, ami szintén kötőszöveti betegség, mind klinikailag, mind genetikailag heterogén csoport, 1:5,000 és 1:25,000 közé tehető prevalenciájú (309). Az Ehlers-Danlos szindrómás betegek 1/4-e aorta aneurysmával rendelkezik (310). A HTAD csoport betegségei esetében az elmúlt időszakban a sebészeti technikákban tapasztalható rendkívüli fejlődés nagy születéskor várható élettartam növekedésben mutatkozik meg: az eddigi 30 éves születéskor várható élettartam több, mint 70 éves korra nőtt (305). Míg a HTAD a betegség következménye felől került meghatározásra, a gének szempontjából számos átfedés van az öröklött kötőszöveti betegségek (hereditary connective tissue disorders (HCTD)) csoporttal, melybe több, mint 200 betegség tartozik (308). Ezek a gének érinthetnek strukturális fehérjéket, enzimeket, illetve a TGFβ útvonalnak a tagjait. A fő betegségek amelyek ide tartoznak a Marfan szindróma, az Ehlers-Danlos szindróma és a Loeys-Dietz szindróma, ezek példák arra amelyeknek egymással

komoly klinikai átfedésük van, legyen kardiovaszkuláris, csontot érintő, craniofaciális, szemészeti vagy bőr tünetekről szó (308).

1.3.4.2. Pathomechanizmus

A mutációk kettős hatásúak. Ha a fibrillin-1 nem funkcionál, annak nemcsak szerkezeti következménye van, de a TGF- β szignalizációs útvonal túlzott aktivitása is, és mindkettő hozzájárul az egyébként meglehetősen bonyolult pathogenezishez (305, 311). A struktúrális szerepén kívül tehát a fibrillin szerepet játszik a β transzformáló növekedési faktor (transforming growth factor β , TGF β) szignalizációs útvonalban. A TGF β család tagjai pre-pro-peptid prekuzorként szintetizálódnak, az ún. latency associated peptide (LAP) és az érett TGF β -t tartalmazva, de együttesen inaktív formában, a small latent complex-et (SLC) formálva. Ehhez a komplexhez kapcsolódik a latent TGF- β binding protein (LTBP) és a kialakuló large latent complex (LLC) fog kötődni az extracelluláris mátrixhoz az LTBP-n keresztül. Az inaktív TGF- β így a mikrofibrillumokhoz közel lokalizálódik és kapcsolatba kerül a fibrillinnel és ez az interakció érinti az aktivációs állapotát (312). A diszfunkcionális fibrillin megnöveli a TGF β hozzáférhetőségét (azaz proteolitikus aktiválhatóságát) és annak koncentrációja megnő az extracelluláris mátrixban. Ez a megnövekedett TGF β szignalizáció fontos része a pathomechanizmusnak (299). A TGF β szupercsalád ligandjai a TGF β 2 receptorhoz (TGFBR2) kötődnek. Ez a TGF β 1 receptor foszforilációhoz vezet, amelynek a receptor-szabályozott R-SMAD-ok foszforilációja lesz a következménye. A foszforilált R-SMAD coSMAD-okhoz való kötődése által kialakult komplex transzlokálódik a magba és transzkripciós faktorként szabályozza bizonyos gének átíródását (312). Végül ezek a történések vezetnek a megnövekedett mátrix metalloproteináz expresszióhoz és olyan citokinek megnövekedett expressziójához, amelyek szabályozzák az aortába történő makrofág infiltrációt (313). Az aorta ruptúrával kapcsolatban álló mátrix metalloproteinázok az MMP2 és MMP9 (314). A komplex pathomechanizmushoz hozzá tartozik az is, hogy a TGF β reaktív oxigén specieknek akkumulációját eredményezi, amelyek szintén hozzájárulnak a rost degradációhoz (315). Összességében ezek a mechanizmusok vezetnek az aorta ruptúrához.

1.3.4.3. A Ghent nozológia

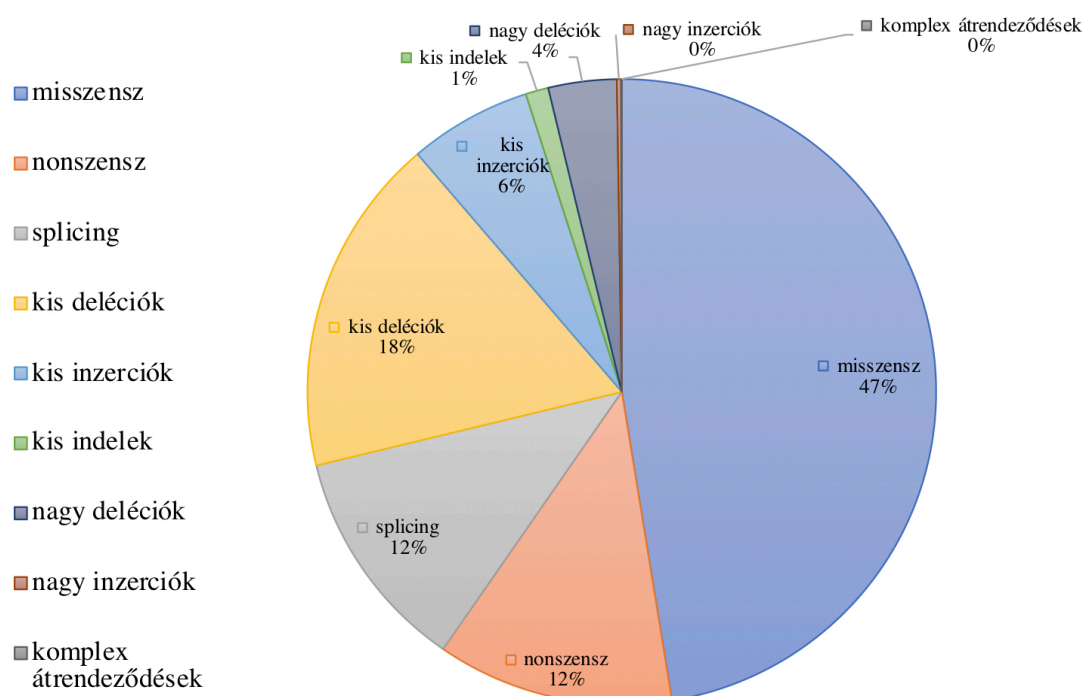
A 2010-ben publikált átdolgozott Ghent kritérium rendszer nagyon nagy mértékben hangsúlyozza a genetikai tesztelés fontosságát a szemészeti és kardiovaszkuláris tünetek mellett (296). A Ghent nozológiát vizsgálataink során mi is használtuk (8. ábra). A családi halmozódás hiányában az aorta gyök tágulat és az ectopia lentis önmagában felállítja a Marfan szindróma diagnózisát, míg ha csak egy ilyen manifesztációja van, akkor a FBN1 mutáció jelenléte vagy a $7 \geq$ szisztémás pont érték az, ami szükséges ahhoz, hogy a diagnózis felálljon. Pozitív családi anamnézis esetén ectopia lentis, a $7 \geq$ szisztémás pont érték vagy a kitágult aorta elegendő a Marfan szindróma diagnózisának felállításához (296).

CSALÁDI ANAMNÉZIS		
Marfan szindrómás első fokú rokon ☐ igen ☐ nem ☐ nem ismert		
Ectopia lentis ☐ igen ☐ nem		
Z-pontszám kiszámításához szükséges adatok		
Aortagyök (cm):	Testmagasság:	Testsúly:
Szisztémás tünetek pontozása		
Tünet	Érték	Pozitivitás
Hüvelykujj- ÉS csuklótünet	3	
Hüvelykujj- VAGY csuklótünet	1	
Pectus carinatum	2	
Pectus excavatum vagy mellkas aszimmetria	1	
Lábdeformitás (sarok valgus állása)	2	
Pes planus	1	
Pneumothorax	2	
Dura ectasia	2	
Protrusio acetabuli	2	
Csökkent felső szegmens/alsó szegmens ÉS emelkedett karfeszítésvolság/magasság arány súlyos scoliosis NÉLKÜL	1	
Scoliosis vagy thoracolumbalis kyphosis	1	
Csökkent könyök extensio	1	
Arckarakter (3/5 pozitív)		
Dolichocephalia	1	
Malaris hypoplasia		
Enophthalmus		
Retrognathia		
Lefelé ívelő szemrész		
Striák a bőrön	1	
Myopia > 3 dioptria	1	
Mitralis billentyű prolapsusa	1	
Összpontszám (maximum 20 pont, ≥ 7 pont=szisztémás érintettség)		

8. ábra. A Ghent-nozológia kérdőív.

1.3.4.4. A Marfan szindróma genetikája

A Marfan szindróma prevalenciája 1:5000 és 1:10.000 közé tehető. A Marfan szindrómás betegek 75%-ában mutatható ki családi halmozódás (érintett szülő), 25% pedig *de novo* mutáció eredményeképpen alakul ki (311). Pozitív pedigre esetén is tűnhet negatívnak a családi anamnézis, mert nem ismerték fel a betegséget, vagy mert korán meghalt az a szülő, aki a betegség által érintett volt (316). Autoszomális domináns öröklődésmentet mutat, nagyon nagyon ritkán előfordulhat homozigóta vagy összetett heterozigóta genotípus (317). A nagy méretű *FBN1* gén 230 kb-t foglal magába, 66 exont tartalmaz és eddig kb. 2400 különböző patogén mutációt írtak le, amelyek a teljes régióban előfordulnak (311) (HGMD 2020.1, 9. ábra).



9. ábra. Patogén *FBN1* mutációk (HGMD 2020.1).

A génben mutációs forró pont nincs. Régóta ismert az, hogy az első 16 exonban levő cisztein reziduumot érintő misszensz mutációk esetében nagyobb valószínűséggel fordul elő az ectopia lentis (305) és a 25-33-as exonig terjedő rész - ahol a cb-EGF domének vannak - kritikus régió a súlyos neonatális Marfan szindrómát illetően. Az is valószínű, hogy az aorta történések kockázata a trunkáló vagy haploinsufficienciát eredményező variánsok esetén (nonszensz vagy splicing helyet érintő variánsok) nagyobb valószínűséggel fordul elő (318). Ugyan a penetrancia komplett, de mivel rendkívül nagy variabilitás van mind családok között, mind családon belül ugyanazon mutáció esetében is, így a Marfan szindrómás betegeket pusztán a genotípusuk alapján nem lehet

monitorozni, a genotípushoz nem lehet klinikai predikciót társítani. A mutációk 2/3-a misszensz mutáció (319). Kis inzerciók, deléciók, duplikációk 10-15%-ban felelősek a betegségért, többségük korai láncterminációt okoz, míg másik 10-15% különböző splicing hibát eredményez az exon-intron határokon levő invariábilis dinukleotidok mutációja folytán (319). Előfordulhat nonszensz mediálta mRNS lebontás is (320). A csírasejtes mozaicizmus igen ritka (316). A betegség kialakulásának egyik formája a domináns negatív hatás, ahol is az expresszálandó abnormális forma pathogenetikai szereppel bír, de ugyanígy a funkcióvesztő allélek által előidézett haploinsufficiencia is oka lehet a domináns betegségnek (316).

1.3.4.5. Genetikai tesztelés

A genetikai tesztelés gén panelek formájában mind a szindrómás, mind a nem szindrómás HTAD formák esetében használható. Az egyedüli kivétel ezek között éppen az *FBNI* gén analízis, amelyet a Marfan szindróma gyanúja esetén használunk és míg ebben az esetben az egyedi gén tesztelés az elfogadott standard, minden más esetben a panel tesztelés (294). A Marfan szindróma klinikai laboratóriumi genetikai tesztelési stratégia első lépése a szekvencia analízis, amelyet a CNV (deléció, duplikáció) analízis követ abban az esetben, ha kis skálájú variáns nem mutatható ki, bár CNV maximum 5%-ban van jelen (316). Az *FBNI* szekvencia analízis Marfan szindróma esetén 90-93%-ban pozitív (316). A patogén variánsok több mint 90%-a egyedi (299). Lehetőség van prenatális és preimplantációs genetikai diagnosztikára is (316).

1.3.4.6. Terápia, menedzsment

A Marfan szindróma esetén a génterápia nem egyszerű feladat. Nagy kihívás a megfelelő vektor rendszer kialakítása, mely hatékony és hosszútávú gén transzferre képes a vasculatúra falába juttatva (299). A másik probléma az a betegség domináns jellegéből adódik. Nem feltétlenül elegendő pótolni a normál fehérjét akkor, ha domináns negatív hatás alakította ki a betegséget (321). Terápiás megközelítés lehet a domináns negatív hatás leküzdésére a mutáns fibrillin expressziójának csökkentése (299). Mindazonáltal a preventív sebészeti eljárások génterápia hiányában is nagy előrelépést jelentenek a legfontosabb komplikáció kivédése szempontjából. A terhesség menedzsment nagyon fontos, hiszen a Marfan szindrómás nők esetében a terhesség alatt 3 mm-el nő az aorta átmérő (322) és az alap kockázathoz képest az aorta komplikációknak veszélye ötszörösésre növekszik meg, az aorta disszekció kockázata 10%-ra nő abban az esetben, ha az

aorta átmérője meghaladja a 4 cm-t (323). Marfan szindrómás terhes nők esetében az aorta disszekció közvetlenül a szülés után nagyon nagy kockázatú (324).

1.3.4.7. Vizsgálataink Marfan szindrómában

Hasonlóan más súlyos monogén betegségekhez (pl. ARPKD), vizsgálatainkat a klinikai igény hívta életre, hiszen mikor beállítottuk a tesztek, hazánkban nem volt lehetőség a rendkívül munkaigényes, Sanger DNS szekvenálási alapú klinikai laboratóriumi genetikai diagnosztikára. Később, az új generációs DNS szekvenálási technológia implementálása során először a piroszekvenálást (Roche), később a szintézis alapú (Illumina) szekvenálást állítottuk be az *FBNI* gén analízisére. A publikáció alapjául szolgáló hazai beteg kohorsz 26 fős volt, Debrecenen kívül az ország több pontjáról (Miskolc, Budapest). Ugyan genetikai háttér felderítése egyedi hazai esetben már került közlésre (325), hasonló létszámú kohorsz még nem (PubMed keresés 'Marfan' és 'Hungary' kulcsszavakkal, 2020.04).

A Marfan szindróma, ellentétben a többi általunk vizsgált súlyos monogén betegséggel (pl. SLO, CF, ARPKD), nem csak korai kezdetű betegség lehet, sőt, tünetei általában felnőttkorban jelentkeznek. Ez más, a diagnosztikai genetikai tesztelésen túli perspektívákat nyújt. A Marfan szindróma (és rokon betegségei) esetén lehet mérlegelni a prediktív/preszimptomatikus genetikai tesztelést, és különös jelentőséget kap a kaszkád vizsgálat is (azaz a vér szerinti családtagok célzott analízise). A Marfan szindróma azon betegségek csoportjába tartozik, ahol az időben (akár a tünetek megjelenése előtt) felállított genetikai diagnózis a megfelelő beavatkozási lehetőségek (szív ultrahang, aorta sebészet) birtokában életmentő lehet. A prediktív/preszimptomatikus genetikai eredmény fontosságát támasztja alá az a tény is, hogy a Marfan szindróma (együtt Loeys-Dietz szindrómával, mint HTAD betegségek) szerepel az ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) olyan listáján, amelyet az USA-ban minden, exom vagy genom szekvenáláson átesett beteg esetében meg kell vizsgálni, patogén mutációk preszimptomatikus keresése céljából (326), függetlenül attól, hogy eredetileg milyen célból történt a szekvenálás.

1.4. Multifaktoriális betegségek vizsgálata

A multifaktoriális kórképek genetikai, laboratóriumi vizsgálatai több évtizedes múltra tekintenek vissza, elég, ha a leggyakrabban végzett - ellentmondásoktól nem mentes - genetikai tesztre, a faktor V Leiden mutációra gondolunk. A nagy populációt érintő betegségek kialakulásának megakadályozása, a kezelési lehetőségek genetikai alapon történő alkalmazása és fejlesztése számos esetben bizonyították helyüket a medicinában. A multifaktoriális kórképek vizsgálata során előfordulhat, hogy ki kell lépni a genetikai módszertanból, és szélesebb körű metodológiát kell alkalmazni. Munkám során korábban már vizsgáltam thrombosis genetikai hátterét (327-330) szerteágazó módszertani megközelítéssel, ezt a szemléletet próbáltam alkalmazni a Gas6 vizsgálatok során. A komplex betegségek genetikai analízisét kiterjesztettük két kifejezetten nagy népegészségügyi problémára, az időskori macula degenerációra és férfi infertilitásra is.

1.4.1. Multifaktoriális betegségek vizsgálata - a Gas6 és receptorai

A Gas6 fehérje az azonos nevű génnek a terméke, mely gén szérum megvonás körülmények között tartott fibroblastokban felülszabályozott expressziójú (331). A Gas6 multimoduláris K-vitamin függő fehérje, rendkívül nagy homológiát mutat a véralvadás szabályzó fehérjéjével, a protein S-sel. Expressziója széleskörű, expresszálódik az endotheliális sejtekben a vasculáris simaizomsejtekben és a csontvelőben (331-333). A Gas6 három különböző receptor tirozin kináznak (RTK) a ligandja, melyek az Tyro-3, Axl és MerTK (TAM család). A receptor-ligand kötéskor a receptor dimerizálódik, autofoszforilálódik az intracelluláris tirozin kináz doménen (334). A Gas6 számos élettani folyamatban játszik szerepet, beleértve a sejt migrációt (335, 336), adhéziót (334, 337), a sejt növekedését és túlélését (338-342). A Gas6 aktivitás γ -karboxilációt igényel, tehát olyan Gla domént, amely γ -karboxiglutaminsavakat tartalmaz (343).

A TAM család tagjai olyan egyes típusú transzmembrán receptor tirozin kinázok, melyek nagy funkcionális homológiát mutatnak mind onkogenitás, mind pedig apoptotikus sejtek eltávolítása és a veleszületett immunitás szabályozása szempontjából (344-346). Az Axl *bona fide* ligandja a Gas6 (347, 348). Ligand és a receptor között a kötődés nagyon erős (349), két-három nagyságrenddel magasabb, mint a Gas6-MerTK és a Gas6-Tyro3. A Tyro3 inkább a protein S-hez mutat nagyobb affinitást, a MerTK pedig mindkettő irányába alacsonyabban (350, 351). A Tyro3 és a MerTK a foszfatidil-szerin pozitív apoptotikus sejtek jelenlétében aktiválódik, ezért elképzelhető, hogy foszfatidil-szerin szenzorként működnek az apoptotikus és tumor sejtek mikrokörnyezetében

(352). A knock out egér modellekben nem kellően hatékony az apoptotikus sejtek eltávolítása, a hármass receptor knock-out súlyos következményekkel jár, SLE-szerű autoimmun betegség alakul ki (353, 354), illetve az RPE elhalása vaksághoz vezet (355). A Gas6 a sAxl-lel komplexben kering (356). A Gas6 deficienciája egérben preventív a máj gyulladással és fibrosissal szemben (357), de a colitis-asszociált tumorgenezist az egér modellekben elősegíti (358).

1.4.1.1. A Gas6 betegségekkel való kapcsolata

A Gas6 számos különböző betegség etiológiájának részese lehet, mint a rheumatoid arthritis (359), nephrotoxikus nephritis (360) és emlődagány (361). A Gas6-nek lehet szerepe az inzulinrezisztenciában, a kettes típusú diabetesben és a gyulladásban is (362-364). A Gas6/TAM szignalizáció fontos szerepet játszik a szisztémás gyulladás kialakulásában különböző betegségek esetén, mint pl. a stroke, az akut coronaria szindróma, az elhízás vagy a fertőzések (365, 366). Számos tumorban az Axl receptor tirozin kináz overexpressziót mutat (367), ami összefüggésben van a metasztázissal (368) és rossz prognózist jelent (369, 370). Az emelkedett Gas6 szint kapcsolatba hozható vénás thromboemboliás betegségekkel (371), diabeteses nephropátiával (372) és idiopathiás ismétlődő vetéléssel is (373). A Gas6 szint emelkedett lehet gyulladásos állapotokban, mint szepszisben (374), SLE-ben (375, 376). Különösen érdekes a *Gas6* egy introni polimorfizmusa, a c.834+7G>A. A *Gas6* c.834+7G>A SNP-nek a kettes típusú diabetesben betöltött potenciális pathogenetikai szerepét illetően azt találták, hogy az AA genotípussal rendelkezőkben magasabb Gas6 szintet és alacsonyabb HbA1c szintet lehetett detektálni, mint GG genotípus esetén, valamint az AA genotípus ritkábban fordult elő a kettes típusú diabetesben szenvedő betegekben összevetve az egészséges normál glükóz toleranciát mutató egyénnel. Végül soron az AA genotípus kettes típusú diabetes-szel szembeni védő hatását mutatták ki (363).

1.4.1.2. A Gas6 és a véralvadás

Nincs konszenzus arra nézve, hogy melyik RTK expresszálódik a thrombocytán (377). A Gas6 knock-out egér normális fejlődést mutat, fenotípusos eltérésekkel nem rendelkezik (378), a véralvadási faktor szintek és a véralvadási idők a normál tartományban vannak, a thrombocytáik morfológiája is normál (378). Spontán vérzés vagy thrombosis nem figyelhető meg, viszont a Gas6 knock-out egér mind arteriális mind vénás thrombosisból védettnek bizonyult (378). A Gas6 és az RTK (TAM) egy úgynevezett outside-in szignalizációs útvonalnak lehet része, azaz a Gas6-RTK

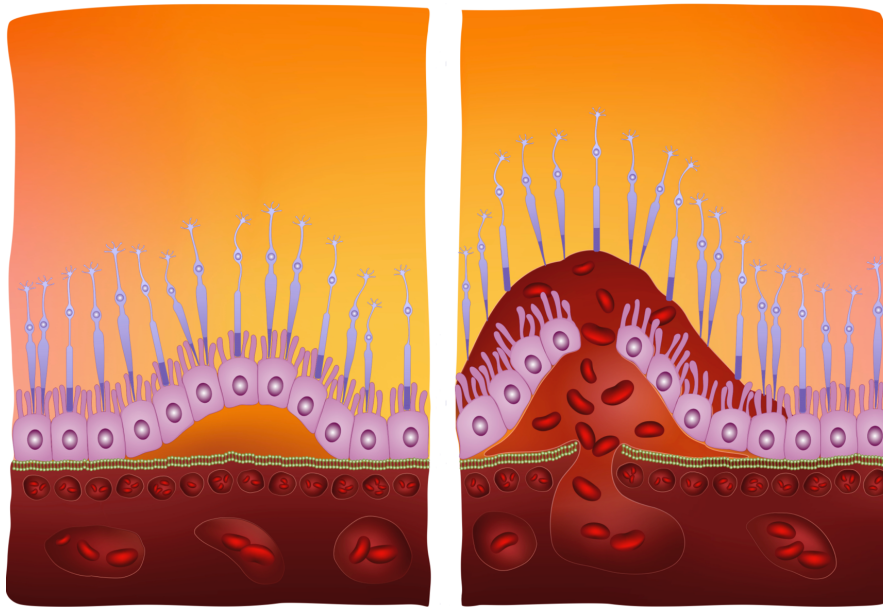
útvonal nem elsődleges aktivátora a thrombocytáknak, hanem sokkal inkább a más agonisták által elindított aktivációs folyamatot potenciálja (379, 380). Összességében a jelenlegi ismeretek arra utalnak, hogy a Gas6/TAM útvonal gátlása csökkenti az artériás és vénás thrombosit - legalábbis az egerek esetében - és ez egy ígéretes gyógyszerkutatási irányt jelenthet.

Posztdoktori munkámat 2001-2003 között a Lundi Egyetemen Malmöben végeztem, a véralvadás genetikájának egyik legfontosabb felfedezését, az APC rezisztenciát felismerő Björn Dahlbäck laboratóriumában. A genetikai érdeklődésemnek megfelelően egy olyan munkába kezdhettem bele, ami érintette mind az artériás, mind a vénás thrombosit. A munka a Gas6-re vonatkozott, mert egy korábbi megfigyelés, melyben Dahlbäck professzor is társszerző volt, azt mutatta ki, hogy a Gas6 knock-out egér érdekes módon mind vénás, mind artériás thrombosis ellen védett (lásd fentebb) (378). Feladatomban az volt, hogy a Gas6 esetében a genetikai meghatározottságot fehérjeszinten mérni képes kísérleti rendszer(ek)e)t fejlesszek ki. Hazatérve a Gas6 munkát immáron ismét DNS szinten folytatva, jelölt gén analízissel egy eset-kontroll tanulmány keretében vizsgáltuk a *Gas6* génben levő c.834+7G>A SNP esetleges hatását a nedves típusú időskori macula degenerációra nézve.

1.4.2. Multifaktoriális betegségek vizsgálata - időskori macula degeneráció (age-related macular degeneration, AMD)

Az AMD a retina középső, az éles látásért felelős területét, a maculát érintő komplex progresszív betegség (381). Kialakulásához három fő tényező járul hozzá. A kor előrehaladtával a kockázat nő, jelentős a környezeti faktorok (dohányzás, oxidatív stressz), valamint a genetikai kockázati tényezők szerepe (382, 383). A macula fundus megjelenése alapján az AMD-t három fő kategóriára lehet osztani, melyek a korai, a köztes és a késői állapotok. A korai és köztes AMD állapotokban tipikus a lipidekben és fehérjékben gazdag depositumok, az úgynevezett drusenek megjelenése. A korai és köztes AMD diagnózisa nagy kockázatot jelent arra, hogy a betegség tovább fejlődik és kialakul a késői AMD (384). A késői AMD vagy száraz vagy nedves típusú lehet (10. ábra). A száraz típus esetében úgynevezett geográfiai atrophia mutatható ki, fotoreceptor vesztés és egy kifejezett retinális pigment epithelium (RPE) atrophia figyelhető meg. A nedves változat esetében - amit exudatívnak vagy neovascularisnak is nevezünk - neovascularizáció figyelhető meg. A neovascularis AMD esetében abnormálisan fejlődő törékeny vérerek infiltrálják a retinát. Amikor ezek az erek eltörnek, a vér a retinába jut és ez látásvesztést eredményez (10. ábra). Ugyan a neovascularizáció az AMD esetek 15-20%-ában mutatható ki, mégis sokkal

súlyosabb forma, a látásvesztésért nagyrészt ez felel. A betegség következménye a centrális látás elvesztése. Az AMD a fejlett országokban az időskori vakság vezető oka (385), a 2020-as évben már majdnem 200 millió embert érint a világon (386). A terápiás beavatkozási lehetőségek korlátozottak, a leginkább kezelhető változat a késői exudatív forma, ahol a kezelés az intravitreális anti-vasculáris endotheliális növekedési faktor (anti-VEGF) terápia (387). A száraz korai vagy késői AMD esetén jelenleg nincsen olyan kezelési mód, amely a kórfolyamatot megállítaná vagy visszafordítaná (388).



10. ábra. A száraz (bal oldal) és nedves (jobb oldal) típusú AMD.

Forrás: Balogh et al. Molekuláris diagnosztika,

https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Molekularis_diagnosztika_hu_book/adatok.html

Addig amíg 1997-ben egy genetikai prediszponáló gén volt ismert, 1998-ban kettő, addig 2015-ben már 34 olyan egymástól független lókuszt ismertek fel a különböző típusú genetikai asszociációs vizsgálatok során, amelyek az AMD kialakulásához vezethetnek (389). Az AMD genetikai okainak feltárásában 2005-ben történt óriási előrelépés, amikor egymástól függetlenül több tanulmány igazolta a komplement faktor H (CFH) egy polimorfizmusának az összefüggését az AMD kialakulásával (390-392). A CFH a komplement út egyik fontos szabályzó fehérjéje. Egy CFH kockázati allél által jelentett populációs járulékos kockázat a korai AMD esetében 10%, míg a késői esetében 53% (393). Ez a polimorfizmus az Y402H (a helyes, de nem elterjedt nomenklatúra szerint p.Tyr402His) a hetedik SCR (short consensus repeat) doménben foglal helyet, amelyről ismert, hogy a heparin, glükózaminoglikán és C-reaktív protein (CRP) kötőhelyét tartalmazza (394, 395). A gyakori SNP-ken kívül ritka mutációk is összefüggésbe hozhatók AMD-

vel, az SCR 19-20-ban, illetve az SCR 1-4 között (396). A jelenleg élő hipotézis (397) szerint a MAC (membrane attack complex) kialakulása vezet a choroid endothelium károsodásához és következményesen az RPE csökkent vérellátásához. Ez a csökkent vérellátás vezet hypoxiához és az RPE illetve a fotoreceptorok károsodásához. Valószínű, hogy a C5a faktor a mononukleáris fagocita odavonzáshoz és a choroid neovaszkuarizációhoz is hozzájárul, míg a C3a (398) és a CFH (399) szerepet játszik a szub-RPE depozit formák kialakulásában és a choriokapilláris jellegű MAC kialakulásában, és ez vezethet a choriokapillárisok károsodásához, és a látáscsökkenéshez (400). A családvizsgálatok alapján azt találták, hogy az AMD betegek első fokú rokonai között az AMD 2,4-szer gyakoribb (401). Komplement-asszociált gének polimorfizmusait számos esetben összefüggésbe hozták AMD-vel: C2/CFB (402), C3 (403), C7 (404), CFI (405) és SERPING (406). A veleszületett immunitás rendkívül fontos részét képező komplement kaskád rendszer több, mint 30 fehérjét foglal magába. A komplement kaskád aktivációja végső soron a MAC (membrane attack complex) kialakulását jelenti, ez fogja a támadó sejtek lízisét elvégezni. A retina sejtek megszintetizálják a saját komplementjüket (407). A krónikus intraoculáris komplement mediálta gyulladás a genetikailag érzékeny kockázati tényezővel rendelkező egyéneknél, akik ráadásul környezeti kockázattövelő mechanizmusoknak is ki vannak téve, mint például a dohányzás vagy az oxidatív stressz, együtt okozza a progresszív retina változásokat (408). A CFH Y402H polimorfizmus esetén a minor allél többek között a CRP kötődést befolyásolja (409). A minor allél-asszociált szabályozási defektus megemelkedett MAC depozícióhoz és ebből következően az endoteliális sejtek halálához vezet, és károsítja a choriokapillárisokat, melyek a sejtmarradványokat nem tudják megfelelően elszállítani, így ezek a salakanyagok akkumulálódnak a drusenben (410). Vannak azonban más, a komplement rendszertől független gének is amelyek szerepet játszanak az AMD kialakulásában, mint pl. az *ARMS2/HTRA1* lókus, amelyben a két gén egymással rendkívül szoros kapcsoltságban van (411, 412). Nemrégiben kimutatták azt, hogy valószínűleg inkább az *ARMS2* és nem a *HTRA1* amely az AMD kockázati tényezőjét jelenti (413), de a funkcionális hatás még mindig nem tisztázott. Más AMD-vel kapcsolatba hozott gének érintik az angiogenezist (*TGFBR1*, *VEGFA*), az extracelluláris kollagén mátrixot (*COL10A1*, *COL8A1*) és a lipid metabolizmust (*APOE*, *CETP*, *LIPC*) (414-416). Végső soron tehát azok a gének, amelyek az AMD-vel kapcsolatba hozhatóak 5 lényeges (sejt)élettani folyamathoz kapcsolhatók: (A) gyulladás és immunválasz, (B) lipid metabolizmus és transzport, (C) angiogenezis, (D) sejt stressz válasz, (E) extracelluláris mátrix és sejt adhézió (417). A lipid transzportban résztvevő ApoE jelen van a retinában is (418). Az ApoE 3 gyakori genetikai variánsa ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) két polimorfizmus (rs429358 és rs7412) kombinációja eredményeképpen áll elő (419). Az $\epsilon 2$ esetében cisztein van

mind a 112-es mind a 158-as pozícióban, az $\epsilon 3$ esetében cisztein a 112-es míg arginin a 158-as helyen és $\epsilon 4$, ahol arginin a 112-es és a 158-as helyen is. Összesen így 6 biallélikus genotípus lehetséges, melyek közül a $\epsilon 3/\epsilon 3$ a leggyakoribb, a továbbiak pedig a $\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 4/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 4$ és $\epsilon 2/\epsilon 2$ típusok. A drusenek tartalmaznak ApoE fehérjét. Az utóbbi években számos ApoE AMD eset-kontroll vizsgálat történt, beleértve metaanalíziseket is (420).

Fentiekből látható, hogy az AMD, mely tipikus példája a későn manifesztálódó multifaktoriális betegségeknek, számos genetikai komponenssel bír. Ennek megfelelően minden olyan adat, ami a genetikai diagnosztikában felhasználható, legyen az a kezelés hatékonyságának megbecsülése, a genetikai háttér feltárása, beleértve a poligénes kockázat meghatározását, klinikai hasznossággal bírhat. Ezirányú vizsgálatainkat két publikációban foglaltuk össze (421, 422). Mindkét esetben jelölt gén eset-kontroll tanulmány keretei között vizsgáltuk a potenciális genetikai predisponáló faktorok előfordulását érintett és kontroll populációkban. Célunk volt az esetleges magyar populáció-specifikus sajátosságok feltárásán túl a korábban mások által nem vizsgált Gas6 c.834+7G>A polimorfizmus asszociációjának felmérése.

1.4.3. Multifaktoriális betegségek vizsgálata - az infertilitás, mint multifaktoriális kórkép genetikai meghatározottsága

Az infertilitás valódi népegészségügyi probléma, a gyermeket vállalni kívánó párok 14%-át érinti és az esetek feléért a férfi oldal a felelős (423). A férfi infertilitás multifaktoriális kórkép, melynek heterogén fenotípusos megjelenései lehetnek. Négy etiológiai kategóriát különböztethetünk meg: (1) a hipotalamusz-hipofízis tengely diszfunkciói, (2) a spermatogenezis mennyiségi eltérései, (3) a spermatogenezis minőségi eltérései, (4) ductalis obstrukció/diszfunkció (424). Mind a négy esetben szerepet játszhatnak genetikai tényezők. A nagy genetikai eltérések közül megemlíthető a kromoszómák számbeli és struktúrális eltérései, illetve az Y kromoszóma mikrodeléciók, melyek 15%-ban mutatható ki a súlyos férfi infertilitás esetek hátterében (423).

1.4.3.1. Az infertilitás monogén formái

A monogén okok sokkal szerteágazóbbak, de rutin genetikai tesztelésük sokkal korlátozottabb. Monogén okok lehetnek a congenitalis hypogonadotrop hypogonadismus (CHH), a vas deferens hiány (CBAVD, congenital bilateral absence of vas deferens), az enyhe androgén inszenzitivitás és a monomorf terato/asthenozoospermia (423). Az esetek 40%-a idiopátiás. A hímvarsejtek

fenotípusa alapján 4 csoportot különíthetünk el: (1) azoospermia esetében az ejakulátumban spermiumok nem találhatók, (2) cryptozoospermia: <1 millió spermium/mL, (3) oligozoospermia: <15 millió spermium/mL, (4) normozoospermia: >15 millió spermium/mL. Azoospermia esetében 35 olyan, a GnRH neuronok fejlődéséhez, migrációjához vagy hatásához kapcsolódó gént ismerünk, amely a CHH-val kapcsolatba hozható (424, 425). A CHH változó expresszivitású és penetranciájú ritka betegség 1:8000 incidenciával (425). Megkésett pubertás, eunuch-szerű külső, ritka vagy hiányzó szőrzet, gynecomastia, cryptorchidismus, micropenis jellemzi, azonban néhány esetben kizárólag a csökkent spermium termelés és az enyhe hypoandrogenismus az egyedüli jelei, ami késői diagnózishoz vezet (423). A spermatogenezis mennyiségi eltérései közül a legjobban ismert az androgén receptor gén (*AR*) (OMIM: 313700) defektusai. A mutációk következménye a keringő tesztoszteronnal szembeni rezisztencia és ez az androgén inszenzitivitás szindróma (AIS) az a szexuális nemi fejlődési zavarok leggyakoribb oka. Több mint 1000 *AR* mutáció ismert (426). Az Y kromoszóma olyan géneket tartalmaz, amelyek a here fejlődéséhez és funkciójához elengedhetetlenek, ilyenek pl. az AZF régióban levő gének illetve az *SRY* gén (OMIM:480000). A részletesebb lentebb ismertetett AZF régiót deletáló Y kromoszóma mikrodeléciók a spermatogenezis hibájának fontos okai (423). Több olyan gén, van ami kapcsolatba hozható a spermatogenezis minőségi eltéréseivel, de valójában rutinszerűen csak a globozoospermia gént (*DPY19L2*, OMIM 613893) szokták vizsgálni. Mutációi az infertilis férfiak 0,1%-át érintik, a betegség rendkívül ritka kör alakú fejű acrosomamentes spermatozoával jár. Az obstrukciós eredetű infertilitás leggyakoribb oka a CF, mely esetben az oki mutációk CBAVD-t eredményeznek. Ezek előfordulhatnak izoláltan és cystás fibrosissal együtt, de az obstruktív azoospermias betegek 25%-ában *CFTR* gén mutációk állnak (427), így vizsgálatuk CBAVD betegekben ajánlott (428). Fontos a genetikai tanácsadás illetve a reprodukív tervezés szempontjából, hogy a *CFTR* gén mutációk miatt kialakuló CBAVD esetében a testicularis funkció nem érintett, így az *in vitro* fertilizációnak nincs akadálya.

1.4.3.2. Y kromoszóma mikrodeléciók és infertilitás

Az emberi Y kromoszóma méretében, szerkezetében és gén tartalmában is nagyon különbözik a többi kromoszómától (429). A két pszeudoautosomális régióval (PAR1 és PAR2) közrefogott MSY (male-specific Y) régióból épül fel, amely MSY régió a teljes Y kromoszóma 95%-át foglalja el (430). Az Y kromoszómán nagyon kevés, összesen 54 protein kódoló gén van, míg a másik nemi kromoszómán, az X kromoszómán 700 (430). Az Y kromoszómán levő géneknek fontos

szerepük van a spermatogenezisben. Ezek a gének alapvető funkciójú fehérjéket kódolnak, legyen az transzkripcionális csendesítés, ubikvitináció vagy DNS repair rendszer. Az MSY régió belüli géneknek két fő csoportja van, az egy kópiaszámban jelen levő és a sokszoros kópiaszámban jelen levő gének (430). Az egy kópiaszámban jelen levő géneknek van az X kromoszómán homológjuk. Ezek a gének elsősorban az AZFa és AZFb régiókban helyet foglaló gének, pl.: *USP9Y* és *DDX3Y* (AZFa régióban), *EIF1AY*, *RPS4Y2*, *KDM5D* (AZFb régióban) (430), ezen gének együttes deléciója a spermatogenezis elmaradásához vezet. Az AZF régió kívül fekvő gének szerepe is felmerül, mint a spermatogenezisben résztvevő gének és fehérjék. A sok kópiaszámban levő MSY gének 5 fontos funkciót töltenek be, (1) kromatin módosítás (2) transzkripció, (3) splicing, (4) transzláció, (5) ubikvitináció (430). Ide tartozik a *DAZ* az *RBMYL*, *CDY*, *HSFY* (430). Az MSY géneknek akár alapvető, akár finom moduláló szerepük van a spermatogenezisben, de még mindig rendkívül keveset tudunk a pontos biológiai funkciójukról. Az Y kromoszómához kötött CNV-k 3 fő csoportra oszthatók: (1) teljes vagy részleges AZF deléciók (AZFa, AZFb deléciók), (2) részleges AZFc deléciók/duplikációk, (3) TSPY array (430). A teljes AZF régió kiesését jelentő Y kromoszóma mikrodeléciók a spermatogenezis elmaradásának vezető okai, és ezért a súlyos oligozoospermia/azoospermia esetén ennek a mikrodeléciónak a vizsgálata a rutin genetikai diagnosztika részét képezi (431). Ezek a deléciók több tucat génkópia deletálódását jelentik. A leggyakoribb az AZFc régió deléciója, ez kb. 80%, ezt követi az AZFa (0,5-4%), az AZFb (1-5%) és az AZBbc (1-3%) (431). A hatás egyértelmű, hiszen teljes AZF deléciót normozoospermias férfiakban nem mutattak még ki (430). A deléciók meghatározásának klinikai jelentősége az, hogy a teljes AZFa deléció az az úgynevezett SCOS (Sertolli cell-only syndrome) míg az AZFb teljes deléciója a spermatogenic arrest (SGA) jelenséget okozza, melyek azoospermiával járnak, míg a ritka részleges AZFa és AZFb deléciók erősen csökkent, de létező spermium sejt termeléssel járnak. A teljes AZF deléció változatos tünetekkel jár, lehet oligozoospermia, de azoospermia is. A spermium extrakció a teljes AZFa és AZFb deléciókban nem ajánlott, míg a AZFc deléció esetében 50% esély van megfelelő minőségű spermium sejtek kinyerésére (432, 433), így asszisztált reprodukciós technológiával saját biológiai szülő lehet az oligo- vagy azoospermias férfi. A deléciók legnagyobb része *de novo*. A sokszoros kópiaszámú génekben igen gazdag AZFc régióban duplikációk és deléció/duplikáció kombináció is lehet. Ezek klinikai jelentősége nem tisztázott. Ami bizonyosan fontos részleges AZFc deléció, az az úgynevezett gr/gr (434). Ez a deléció variábilis fenotípussal jár, következménye lehet azoo- vagy normozoospermia is, előfordulása azonban oligozoospermias férfiakban lényegesen magasabb (435, 436). A gr/gr deléción túl két részleges AZFc deléció van, a b2/b3 és b1/b3. Mindkét deléció 12 génkópiát

deletál és úgy tűnik, hogy ezek nincsenek markáns hatással az férfi infertilitásra (436, 437). Összességében látható, hogy az Y kromoszómát érintő, férfi infertilitást eredményező mechanizmusok fontos egészségügyi problémát jelentenek, ezért ezek populációs szintű felmérése elsődleges fontosságú az adott populációra nézve.

1.4.3.3. A mikroRNS-ek kapcsolata a férfi infertilitással

A mikroRNS-ek olyan rövid, 20-23 nukleotidból álló rendkívül konzervált (438, 439) egyszálú nem kódoló RNS molekulák, amelyek gén expresszió szabályozásban vesznek részt. Ez a szabályozás poszt-transzkripcionális szinten történik meg, a cél mRNS-ek 3' le nem fordított szakaszához történő kötődéssel és a mRNS degradációjának vagy translációs repressziójának következményével. Lokalizációjuk lehet fehérjét kódoló géneken belüli, illetve gének közötti régióban (440). Egy miRNS több 100 cél mRNS szabályozásában vehet részt, míg egy mRNS-nek is több miRNS kötőhelye lehet. Ennek megfelelően a miRNS-ek számos élettani folyamatot szabályoznak, legyen az proliferáció, differenciáció, fejlődés, apoptózis. A fehérje kódoló génekhez hasonlóan a miRNS gének is mutatnak szövet specificitást. Ellentétben az mRNS-el a miRNS-ek rendkívül stabilak a különböző testfolyadékokban, miRNS-eket megtalálták a spermiumokban, az ondóban és a here szövetben is. Több vizsgálat történt a miRNS-ek férfi infertilitással történő kapcsolatának feltárására (441-444). A miRNS expressziós mintázatban való eltérést kapcsolatba hozták a spermatogenezis hibáival (asthenozoospermia, oligozoospermiával) és feltételezik azt is, hogy a férfi infertilitás biomarkereiként is funkcionálhatnak (441, 445-448).

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Súlyos, az életminőséget nagyban befolyásoló monogén betegségek genetikai okainak feltárása, a személyre szabott kezelés illetve a reprodukciós döntéshozatal támogatása egyedi esetekben. Vizsgáltunk anyagcsere betegségeket (monogén diabetes, hyperinsulinismus, C-típusú Niemann-Pick betegség), véralvadási zavart (Faktor V deficiencia) illetve a vázizomrendszer megbetegedését (Duchenne/Becker izomsorvadás).

2. Súlyos monogén betegségek magyarországi mutáció spektrumának felmérése. A genotípus alapú mutáció-specifikus kezelés alapjainak megteremtése, a prenatális diagnosztikai lehetőségek kialakítása. A vizsgált betegségek a cystás fibrosis, a Smith-Lemli-Opitz szindróma, az autoszomális recesszív polycystás vesebetegség és a Marfan szindróma. A Smith-Lemli-Opitz szindróma vizsgálatok kapcsán különböző gyógyszerek koleszterin bioszintézisre kifejtett hatásának vizsgálata.

3. Multifaktoriális betegségek populációs szintű vizsgálata, különös tekintettel a thrombosiszal kapcsolatba hozható Gas6 mérési rendszerének kifejlesztésére, az időskori macula degeneráció genetikai komponenseinek vizsgálatára és a férfi infertilitás hátterében álló struktúrális és szabályozási genetikai tényezők vizsgálatára.

4. A klinikai laboratóriumi genetikai diagnosztikai gyakorlatban használt eljárások fejlesztése, optimalizálása és tesztelése. Pirosekvenálási alapon működő új generációs DNS szekvenálási módszer analitikai paramétereinek vizsgálata. Az invazív mintavétellel nyert magzati minta anyai sejt kontamináció diagnosztikai tesztek zavaró hatásának vizsgálata.

3. BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Betegek

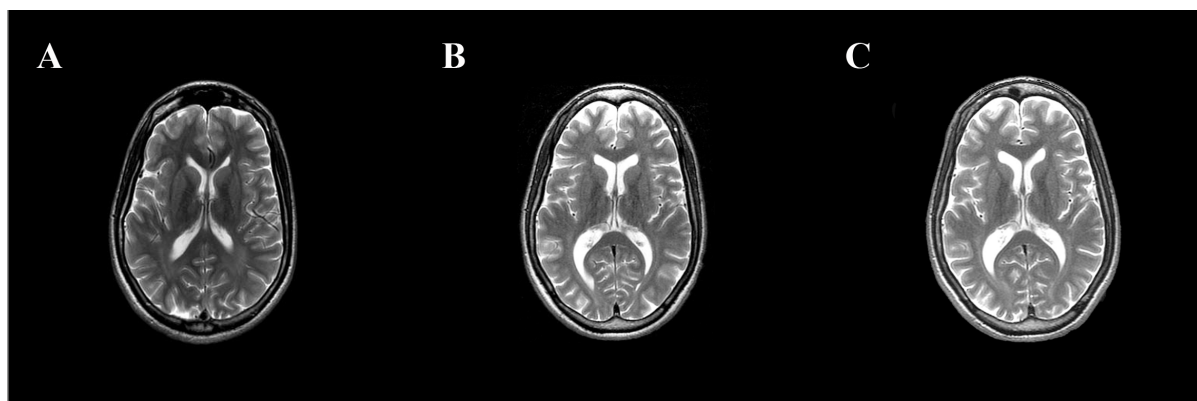
3.1.1. Faktor V deficiencia

A fiú újszülött születéskor subduralis haematoma jelentkezett. Később intramuscularis injekciókat követő súlyos haematomák voltak megfigyelhetők.

A diagnózis első lépése során mért PI, APTI nagyfokú megnyúlást mutatott. A PI 58,1 másodperc volt (kontroll: 8,7-11,5 sec), az APTI pedig 198,8 másodperc (kontroll: 29,5-42,7). A plazmában mért alvadási faktorok aktivitása referencia tartományon belüli volt, kivéve a FV esetében.

3.1.2. Niemann-Pick C

Az általunk vizsgált férfi beteg egymással rokoni kapcsolatban nem álló egészséges szülők gyermekeként született. Perinatális periódusa és gyermekkorra említésre méltó esemény nélkül zajlott. Pszichomotoros fejlődése felnőtt koráig megfelelő volt, habár figyelemzavart és a környezeti stimulusokra adott késleltetett reakciót már óvodáskortól megfigyeltek. 14 éves korában elkent beszéd és koordinációs problémák miatt gyermek neurológus vizsgálta. A szülők gyakori elesésekről és egyensúlyvesztésről számoltak be. Az agy MRI normál mintázatot mutatott. Később dyslexia és dysgraphia alakult ki, de a 17 éves koráig a beteg a normál tanrendben tanult és megfelelő jegyeket szerzett. A gyermekpszichológus az intellektusát normálnak találta, a szóbeli képességeit az átlagosnak megfelelőnek, a motoros képességeit pedig enyhén az átlag alattiként írta le. A finom motoros képességek csökkenése gyorsuló ütemben indult meg. 17 éves korban dysphagia alakult ki. A megismételt neurológiai vizsgálat, enyhe centrális facialis paresist írt le, csökkent pharyngeális reflexeket, dysarthriát, dysphagiát, enyhe cerebelláris ataxiát, a kezek dystoniáját és a lefelé nézéskor vertikális tekintésbénulást. Neurodegeneratív betegség merült fel, de az MRI nem mutatott abnormalitást (11. ábra A).

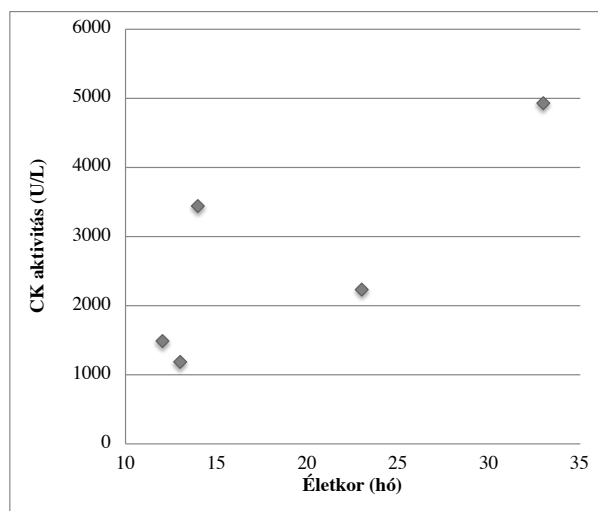


11. ábra. 17 (A), 20,5 (B) és 23 (C) éves korban felvett axiális síkú T2 súlyozott MRI felvételek.
Dr. Berényi Ervin felvétele, forrás: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpn.2013.08.002>.

A hasi ultrahang izolált splenomegáliát írt le 440 mL-es térfogattal. Ez, együtt a vertikális tekintésbénulással és a folyamatosan visszafejlődő motoros képességekkel Niemann-Pick C irányú kivizsgálást tett szükségessé. A csontvelő biopszia CD68 pozitív habos makrofágokat írt le. A filipin festés fibroblast mintából a Mayo Klinikán (Rochester, MN) történt, mely nem volt konkluzív.

3.1.3. Duchenne/Becker muscularis dystrophia

A 6 hónapos csecsemő a neurológiai vizsgálat alapján enyhe generalizált izomgyengeség, hypotonia és megkésett motoros fejlődés jeleit mutatta. Tünetek nem javultak, így felmerült neuromuscularis betegség gyanúja. Az elektromyográfia myopathiás jeleket írt le. A szérumban kreatin kináz (CK) aktivitása egy éves korában 1497 U/L volt, (referencia tartomány: 24-195 U/L), így dystrophinopathia/Duchenne izomsorvadás gyanúja merült fel. Genetikai analízise 14 hónapos korában indult, családi halmozódás nem volt. A fizikai vizsgálatok későbbiekben fekvésből való felülés nehezítettségét írtak le, scapula alata-t, a felső végtagok csökkent izomtömegét és a vádli enyhe hypertrophiáját. A CK szint progresszíven emelkedő tendenciát mutatott (12. ábra). A beteg klinikai menedzsmentje és a CK mérés a Jósa András Megyei Kórházban történt (Dr. Merő Gabriella, Gyermekosztály, Dr. Ajzner Éva Központi Laboratórium).



12. ábra. A kreatin kináz (CK) aktivitás változása a beteg szérumában.
Referencia tartomány: 24–195 U/L. Dr. Ajzner Éva (Jósa András Megyei Kórház) adatai.

3.1.4. Neonatalis diabetes mellitus

A vizsgált eset (449) egy olyan nőbeteg, aki a *KCNJ11* c.685G>A (p.Glu229Lys) mutációval rendelkezett és korábbi klinikai diagnózisa neonatális diabetes volt. Ez 3 és 10 éves életkora között többször remisszióba került, amikor is inzulinterápiát alkalmaztak. Genetikai diagnózisa 13 évesen történt meg, ekkor gliclazid (sulfonylurea) terápiára került. 16 évesen terhes lett és 11 hetes terhesen került a klinikára, ekkor a HbA_{1c} 8,2% volt. Az inzulinterápia nem eredményezett megfelelő glükóz kontrollt (ún. brittle diabetes), ami arra a döntésre sarkallta a Gaál Zsolt főorvos által irányított klinikai csoportot (Jósa András Megyei Kórház, Nyíregyháza), hogy gliclazid kezelést vezessenek be a terhesség alatt is. Az eljárás megkapta a kórházi etikai bizottság engedélyét.

3.1.5. *HNF4A*-MODY

A vizsgálatok során két beteget vizsgáltunk, édesanyát és lányát. A 42 éves édesanya esetében 20 éves korában gesztációs diabetest diagnosztizáltak, ekkor diéta indult, ami a vércukor szintet megfelelő tartományban tartotta. 26 éves korában egy tüdőgyulladás kapcsán találtak magas vércukor értéket, ekkor inzulin terápiát indítottak. A beteg 16 éven keresztül volt inzulin terápián a genetikai vizsgálatok elvégzését megelőzően. Lánya esetében 13 éves korban észlelték, hogy folyadék igénye megnőtt. Diabetest állapítottak meg, amit kezdetben 2-es típusúnak véltek, ekkor egy évig csak diétát tartott. Egy év után inzulin kezelést vezettek be. 6 éven keresztül részesült

inzulinterápiában. A családfa felvétele során kiderült, hogy a családban számos diabeteses rokon volt.

3.1.6. Hypoglycaemias hyperinsulinismus

A beteg, egy kisfiú, aki az édesanya első, eseménytelen terhességéből született 4050 gr (95-97 percentilis) születési súllyal. Az egy perces Apgar score 9 volt, az 5 perces 10. Diszmorfológia nem volt megfigyelhető. Az édesanyjának a terhesség alatt diabeteze nem volt. Mivel az újszülött a gesztációs korához képest nagy méretű volt, rutinszerű vércukor monitorozás kezdődött, és egy óras életkorban hypoglycaemia került detektálásra, mely intravénás glükóz infúzióval és hydrocortisonnal kezeltek. A mellékvese elégtelenséget kizárták. 6 napos korban a vércukorszint normalizálódott és az újszülött semmilyen további gyógyszeres ellátást nem igényelt, melynek megfelelően tranziens hypoglycaemia diagnózist állítottak fel. Két hónapos életkorban került kórházba az alsó és később a felső végtagokban jelentkezők gyakori myoclonus miatt. A hypoglycaemiás epizódok során izzadt és sápadt volt, a plazma glükóz szint 1,1-1,9 mmol/L között ingadozott. A hypoglycaemia során 1,6 mmol/L-es glükóz szintnél a mért inzulin szint 16,65 mU/L volt, míg a C-peptid szint 2,43 ng/mL-nek adódott. Diazoxid terápiát kezdtek, amelyre nem megfelelően reagált, továbbra is fenntartó glükóz infúzióra volt szükség. Így a glükóz szint 2,1-2,3 mmol/L között volt tartható, az inzulin 4,5 mU/L, a C-peptid pedig 0,76 ng/mL volt (2. táblázat).

	Felvételkor	1. nap	2. nap	Referencia tartomány
Glükóz (mmol/L)	1,6	2,1	5,6	3,6-6,0
Inzulin (mU/L)	16,65	4,46	nem mért	2,6-24 (normoglycaemia esetén)
C-peptid (ng/mL)	2,43	0,76	nem mért	0,48-5,0 (normoglycaemia esetén)
Kezelés	glükóz infúzió	diazoxide	octreotide	

2. táblázat. Glükóz, inzulin és C-peptid szint a kezelés korai időszakában.
Dr. Balogh Lídia (Semmelweis Egyetem) adatai

Octreotid terápia indítása után a glükóz szint emelkedni kezdett, a subcutan octreotidot sikeresen váltották ki lancreotiddal, amelyet minden negyedik hétben adtak a gyermeknek. A klinikai vizsgálatok és a beteg menedzsmentje a Semmelweis Egyetem I. számú Gyermekgyógyászati Klinikáján történtek, Dr. Balogh Lídia tanárnő irányítása alatt.

3.1.7. Cystás fibrosis

A CF diagnózisát az elfogadott klinikai és laboratóriumi kritériumok által állítottuk fel. A verejték klorid mérés Wescor vagy Sanasol verejték analizátorral (Sanasol, Magyarország) konduktivitás méréssel történt. A betegség genetikai hátterét két tanulmányban vizsgáltuk. Az elsőben (450) 40 beteget vizsgáltunk, átlag életkoruk 14,4 év volt ($\pm$ SD: 8,7 év). A betegek Kelet-Magyarországról származtak. A másodikban (451) 45 beteget (22 férfi és 23 nő) vizsgáltunk, átlag életkoruk 10,1 volt ($\pm$ SD: 8,1 év). A mintagyűjtés és analízis 2010 és 2014 között történt, a betegek klasszikus CF fenotípussal rendelkeztek, és azokat vontuk be ebbe a tanulmányba, ahol mindkét mutációt identifikáltuk. Ebben az esetben a beteg minták a CF klinikai ellátóhelyeiről érkeztek, elsősorban a budapesti régióból, Szegedről és Debrecenből.

3.1.8. Smith-Lemli-Opitz szindróma

1. Beteg

Az újszülött a 37. gesztációs hétre (2510 gr) született császármetszéssel az édesanya első terhességéből. A terhesség során pre-eclampsziát és diabetest diagnosztizáltak. Tünetek: generalizált enyhe ödéma, generalizált izom hypotonia, microcephalia, microphthalmia, rövid szemrés, bal oldali cataracta, alacsonyan ülő fülek, hypoplasiás nyelv, fogíny hypertrophia, a jobb oldalon komplett, bal oldalon részleges choana atresia, micrognathia, postaxiális polydactylia minden végtagon, négy ujjredő, asszimetrikus nagyajkak, hiányzó kisajkak, anus atresia, és sacralis sinus pilonidalis. Az első életnapon légzési elégtelenségben meghalt. Fontos megjegyezni, hogy ezt követően az édesanyának két terhessége volt, és mindkettő spontán vetéléssel végződött a 7. és a 14. héten.

2. Beteg

Az édesanya 5. terhességéből, a 39. terhességi hétre született újszülöttnél császármetszéssel, többszörös fejlődési rendellenességet észleltek. Az édesanyának ezt megelőzően három spontán

vetélése volt és egy egészséges kislánya született. A perinatális asphyxia szülést követően újraélesztést igényelt. A fejkörfogat 32,5 cm, a születési hossz 46 cm és a születési súly 2810 gramm volt. Születéskor generalizált izom hypotonia és bizonytalan genitáliák voltak megfigyelhetők (micropenis, hasadt scrotum, perineoscrotalis hypospadias, bilateral cryptorchidismus). A citogenetikai vizsgálat 46,XY kariotípust igazolt. Microcephalia, kicsi orr és széles lapos orrgyök volt megfigyelhető, valamint előrenéző orrnyílások, micrognathia, magasan ívelt szájpád lágyszájpád hasadékkal és széles alveoláris szegélyek. A csontrendszert érintő abnormalitások érintették mindkét kezét és a jobb lábat, postaxiális polydactiliával és kétoldali részleges bőrt érintő syndactyliával és ebben az esetben is négyujjredő volt megfigyelhető. Az egyéb eltérések közül említésre méltó a kétoldali cataracta, a corpus pineale cysta, az oldalkamra tágulat és pylorus stenosis.

3. Beteg

A második beteg testvére, 6. terhességből született az édesanya 37. terhességi hetében császármetszéssel. Fejkörfogat 33,5 cm, testhossz, 46 cm, testsúly 2700 gramm volt. Ugyan nála a fenotípus rögzítése kevésbé volt részletes, mint a testvérénél, de a klinikai tünetek miatt az SLO szindróma hamar gyanúba került. Tipikus craniofaciális jellegzetességeket mutatott, mint a micrognathia, magasan ívelt szájpád lágyszájpád hasadékkal, kicsi orr széles orrgyökkel, előrenéző orrnyílások és ebben az esetben is bizonytalan genitáliák voltak megfigyelhetők, postaxiális polydactilia a jobb kézen, clinodactylia az 5. ujjon a bal kézen, kétoldali részleges bőrt érintő 2-es 3-as ujj syndactiliája és majdnem teljes 4-5 ujj syndactilia a bal lábon, itt is négyujjredő volt megfigyelhető, vesicoureterális reflux és következményes pyelectasia, izom hypotonia és adrenális hyperplasia.

4. Beteg

Ez a kislány a 35. terhességi héten született az édesanya első terhességéből, születési súly 2000 gramm, testhossz 36 cm, fejkörfogat 31 cm volt. Többszörös fejlődési rendellenességeket figyeltek meg; arc dysmorphia (micrognathia, lágyszájpád hasadék, szájpádhhoz tapadt nyelv), postaxiális polydactilia, részleges 2-3 és teljes 5-6 ujj syndactylia, vertebrális deformáció, atrioventricularis septum defektus, nyitott ductus arteriosus, tricuspidális billentyű elégtelenség és a bal vese agenziája. A beteg 12 napos életkorban keringési elégtelenség miatt meghalt (az újraélesztés eredménytelen volt). A postmortem vizsgálat a tüdő lobulációjának hiányát és hypoplasiát írta le, hepatomegaliát, pneumoniát és uterus bicornist igazolt.

5. Beteg

A kislány a 38. terhességi hétre született 3090 grammos testsúllyal. Minor rendellenességeket figyeltek meg: kétoldali 2-3-as ujj részleges syndactyliája, clinodactylia, a jobb kezén négyujjredő, microcephalia, magasan ívelt szájpad, uvula bifida, hosszú philtrum, alacsony széles orrgyök és enyhe hypertelorizmus volt megfigyelhető.

6. Beteg

A kislány a 38. terhességi hétre született 2840 grammos testsúllyal és 52 cm-es testhosszal, fejkörfogat 32 cm volt. Alacsonyan ülő fülek, kemény szájpad hasadék, postaxiális polydactylia a jobb kézen, bilaterális 2-3 ujj syndactylia, dongaláb a bal oldalon, 11 borda a bal oldalon, jobb kamra hypertrophia, tricuspidális billentyű elégtelenség, gastroesophagealis reflux, táplálási nehézségek, dystopias vese és agyi atrophia. 1,5 éves korában halt meg nagy valószínűséggel anesztéziát kísérő adverz reakciók következtében.

7. Beteg

Az édesanya első terhességéből született a 39. terhességi hétre császármetszéssel meconiummal festenyzett magzatvíz miatt. Az alábbi eltérések voltak megfigyelhetők: microcephalia, szájpadhasadék, retrognathia, alacsonyan ülő fülek, postaxiális polydactylia, négyujjredő, részleges 2-3. ujj syndactylia, micropenis, hypospadias, corpus callosum részleges dysgenezis, atrioventrikuláris szeptum defektus és táplálási nehézségek.

8. Beteg

42. terhességi hétre született első terhességéből 3160 grammal. Minor anomáliák voltak megfigyelhetők: micrognathia, epichanthus, rövid szemrések, hypertelorismus, magasan ívelt szájpad, gingiva hypertrophia, kétoldali négyujjredő, 2-3 ujj syndactylia, távol ülő mellbimbók, hasadt scrotum, micropenis, flexibilis ízületek és bőr. Szomatomentális fejlődése lassú volt. 8 hónapos korában halt meg többszervi elégtelenségben, amely szeptikus eredetű volt.

9. Beteg

A kislány 38. terhességi hétre született 2710 grammos testsúllyal. Izom hypotonia, micrognathia, epichanthus, széles orrgyök, előrenéző orrnyílások, részleges 2-3 ujj syndactylia, négyujjredő, bifid uvula jellemezte, valamint táplálási nehézségek és megnagyobbodott oldalkamrák.

10. Beteg

A fiúgyermek a 36. hétre született császármetszéssel preeclampsia miatt. Esetében intrauterin retardáció miatt amniocentézist és kromoszóma vizsgálatot végeztek 46,XY kariotípust igazolva. A megfigyelt abnormalitások a következők voltak: intersex genitáliák, hypospadiasis, hypertelorismus, alacsonyan ülő fülek, magasan ívelt szápad, postaxiális polydactylia a jobb oldalon, 2-3 ujj syndactylia, nyitott ductus arteriosus, enyhén megnagyobbodott jobb oldalkamra és súlyos Hirschsprung betegség.

11. Beteg

A lánygyermek a 38. hétre született, korábban az édesanyának három spontán vetélése volt és egy egészséges fiú gyermeket szült. Születési súly 2350 gramm volt, postaxiális polydactylia minden végtagon, négyujjredő bal oldalon, hypertoniás végtagok, rövid felkar és comb, mindkét oldalon részleges 2-3 ujj syndactylia, magasan ívelt szápad, rövid nyak, távol ülő mellbimbók, intersex genitáliák, kariotípus 46,XY, pylorus stenosis, biliary cirrhosis és atrioventikuláris szeptumdefektus. A pylorotomia a táplálási nehézséget nem oldotta meg. 3 hónapos korában többszörös infekciót követően hunyt el.

12. Beteg

A fiúgyermek a 35. terhességi hétre született diabetesszel és magas vérnyomással komplikált terhességből preeclampsia miatt császármetszéssel. 1725 gramm volt a születési súlya, inguinalis sérv a bal oldalon, kétoldali részleges 2-3 ujj syndactylia, hypospadias, hasadt scrotum és pitvari szeptumdefektus került leírásra.

13. Beteg

Ennek a nőbetegnek volt a legenyhébb fenotípusa az összes közül. Klinikailag postaxiális polydactylia, 2-3. ujj syndactylia, pitvari szeptumdefektus, mentális retardáció, scoliosis, strabismus és nagyothallás. Vizsgálatainkkor 18 éves volt. Volt egy idősebb nővére aki 38. terhességi hétre született acut asphyxiás állapotban 2500 grammos születési súllyal, eredményesen újraélesztették. A minor anomáliák miatt és a veleszületett szívfejlődési rendellenesség miatt Turner szindróma lehetősége merült fel nála, de a kromoszóma analízis normál kariotípust igazolt. Súlyos kardiovaszkuláris rendellenességek voltak megfigyelhetők: atrioventriculáris szeptumdefektus, nyitott ductus arteriosus, részleges tüdővéna transzpozíció, hiányzó

tüdőlobuláció és epehólyag agenesia. Fejlődésben elmaradt a súlyos cardialis dekompenzáció miatt. Egy hónapos korában meghalt (SLO szindróma irányú kivizsgálás esetében nem történt).

3.1.9. ARPKD betegek

36, egymással rokoni kapcsolatban nem álló beteget vizsgáltunk, akik magyarországi gyermek nefrológiai centrumokban kerültek (Debreceni Egyetem, Semmelweis Egyetem, Szegedi Tudományegyetem, Jósa András Megyei Kórház, Nyíregyháza) felvételre. A bekerülési kritériumok az alábbiak voltak:

1. ultrahangos vizsgálattal igazolt 2 cm-nél kisebb átmérőjű mikrocisztákat tartalmazó hiperreflektív vesék.
2. A vese hossz legalább 1 oldalon 50 percentilisével nagyobb.
3. A betegség öröklődésmenete autoszomális recesszív öröklődésmenettel kompatibilis legyen.
4. Ne legyen húgyúti malformáció.
5. Ne legyen más ciliopáthiára utaló extrarenális vagy máj érintettség.

Egyetlen egy család esetében sem volt ismert rokon házasság. A betegek és/vagy a szülők beleegyezésüket adták a vizsgálathoz.

3.1.10. ARPKD obligát heterozigóták

Hat házaspár genetikai vizsgálatára is sor került. Ezekben az esetekben vagy terhesség termináció, vagy ARPKD okozta perinatális halálozás volt a vizsgálat indikációja, azonban az érintett betegről mintanyag nem állt rendelkezésre, így indirekt módon, a szülők vizsgálatával próbáltuk a genetikai diagnózist felállítani. A nem publikált vizsgálati adatokat az 3. táblázat tartalmazza.

Szülők (érintett terhesség)	Életkor (gesztációs hét)	Terhesség termináció	Ultrahang jelek
C1 (1)	21	+	O, V
C2 (2)	újszülött	-, perinatális halálozás	O, V
	29	-, perinatális halálozás	
C3 (1)	nincs adat	+	nincs adat
C4 (1)	34	-, perinatális halálozás	O, V, HTH
C5 (1)	26	-, perinatális halálozás	O, V, HTH
C6 (4)	30	-, perinatális halálozás	O, V, HTH
	21	+	
	22	+	
	21	+	

3. táblázat. Az indirekt *PKHD1* mutáció analízisben részt vevő obligát heterozigóták. Rövidítések: O: oligohydramnion, V: megnagyobbodott vesék, HTH: a hólyag töltődés hiánya. Nem publikált adat.

3.1.11. Marfan szindróma

Vizsgálataink során 26 beteg adatait dolgoztuk fel. A klinikai diagnózis minden esetben Marfan szindróma gyanúja vagy valamilyen ezzel rokon kötőszöveti betegség volt. A diagnosztikai vizsgálatok az érvényben levő nemzeti szabályozásnak megfelelően történtek, minden beteg (vagy gondviselőjük) írásos beleegyezésével. A klinikai diagnózist klinikai genetikus, gyermekgyógyász vagy belgyógyász állította fel a módosított Ghent nozológia alapján (296). A betegek átlag életkora 19 év volt (tartomány: 0,1-52 év), 17 beteg esetében alacsonyabb, mint 20 év és két beteg esetében alacsonyabb, mint 1 éves életkor.

3.1.12. Betegek és referencia populáció a Gas6 ELISA tesztelésére

94 egészséges, antikoagulálásban nem részesülő önkéntes kórházi dolgozó vérből nyertünk plazma mintát (57 nő és 37 férfi). 9 térfogat vért vettünk 0,129 mol/L citrátot tartalmazó BD Vacutainer csőbe, 1500 g-n 15 perces centrifugálást követően, amely szobahőn történt a plazmát eltávolítottuk és -20 fokon tároltuk. A csövek összehasonlítása érdekében a 0,129 mol/L citrátos, K₃-EDTA-s, szérum és lítium-heparin BD Vacutainer csöveket használtunk. A warfarin hatásának megítélésére a plazma Gas6 szintek meghatározásához 96 mintát warfarin terápiában résztvevő egyéntől nyertünk (46 férfi és 50 nő). Az INR értékei ezeknek a betegeknek 2,0 és 4,5 között voltak. Mivel ez a része a vizsgálatnak anonim módon zajlott, a klinikai adatok nem álltak rendelkezésünkre, kivéve az INR érték, a kor és a nem paraméterek.

3.1.13. Időskori macula degeneráció

E tárgyban két epidemiológiai munkát végeztünk. Az elsőben 105 AMD beteg és 95 rokoni kapcsolatban nem álló etnikailag ugyanolyan csoportba tartozó egészséges kontroll kelet-magyarországi populációt vizsgáltunk eset-kontroll tanulmány kereti között (421). A kontrollok minor refraktív betegségekkel (myopia vagy hypermetropia < 3,0 D) vagy presbyopiával rendelkeztek. A szemészeti vizsgálatokat a kutatócsoport szemész szakorvosai végezték. A betegekről és a kontrollokról színes fundus fotográfia készült. Az exudatív AMD vizsgálatára fluorescein angiográfiát használtunk, a súlyosság meghatározása az AREDS grading system és az International Classification System (452, 453) alapján történt. A statisztikai analízisre a betegeket két fő csoportba osztottuk, a súlyosabban érintettek esetében a késői, illetve a korai AMD-s

csoportokba. A geográfiai atrófia vagy exudatív jelekkel rendelkező súlyos vizuális defektussal rendelkező betegeket minősítettük késői AMD-nek, míg korainak azokat minősítettük, akiknél nem voltak ezek a jelek, de legalább egy drusen $> 125 \mu\text{m}$ volt vagy közepes drusenek összesen nagyobb, mint $125\mu\text{m}$ volt.

A tanulmányt az intézményi Regionális Kutatásetikai Bizottság jóváhagyásával végeztük. Kérdőívet töltöttünk ki minden tanulmányban résztvevővel, az ismert vagy gyanított nem genetikai környezeti kockázati tényezőkre vonatkozóan (dohányzás, kék fény expozíció, AMI, ischemiás szívbetegség, MVT). Azokat a betegeket minősítettük dohányzónak, akik legalább 10 cigarettát szívtak több, mint 10 éven keresztül naponta. A másodikban 213 beteget exudatív AMD-vel, 67 beteget száraz AMD-vel és 106 egymással rokoni kapcsolatban nem álló, etnikai háttérét tekintve a betegekkel azonos egészséges kontrollt vizsgáltunk meg, mindannyian kelet-magyarországi eredetűek voltak (422). A kérdőív a korábbi tanulmányhoz hasonlóan volt felépítve, a szemészeti vizsgálat is hasonlóan történt és a statisztikai analízishez a betegeket két csoportba osztottuk, hasonlóan a korábbi analízishez.

3.1.14. Infertilitás háttérének vizsgálata

Az Y kromoszóma mikrodeléciók vizsgálatához beválasztási kritériumként a nem obstruktív azoospermiát vagy oligozoospermiát határoztuk meg (454). A betegcsoport 347 infertilis férfi mintáját tartalmazta, akik közül 101 azoospermiás (életkor: 24-39 év) és 246 oligozoospermiás (életkor: 22-41 év) volt. A kontroll csoport 111 normozoospermiás egészséges férfi mintáját tartalmazta. A kariotipizálás 46 XY kariotípust igazolt minden vizsgált férfin. A spermium analízise a WHO ajánlások alapján történt (455), a spermium koncentráció az oligozoospermiás betegek közt maximum $15 \times 10^6/\text{mL}$ volt, minimum 32%-os progresszív motilitással (tartomány: 35-80%) volt. A normozoospermiás kontrollok esetében a spermium paraméterek koncentráció tartománya $45-164 \times 10^6/\text{mL}$ és a progresszív motilitás pedig 45%-87%-ig. A miRNS analízisekhez 10 oligozoospermiás egyéntől, 10 asthenozoospermiás egyéntől és 10 egészséges kontrolltól nyert minta anyagot dolgoztunk fel (456).

3.2. DNS szintű módszerek

A genomiális DNS-t perifériás vér leukocitáiból izoláltuk QIAamp DNA Blood Mini Kittel (Qiagen, Hilden, Németország). A DNS koncentrációt NanoDrop 2000 Spectrophotometerrel mértük (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS).

A DNS szekvenáláshoz a PCR termékeket ultrafiltrációval tisztítottuk (Microcon YM-100 Millipore) és a tisztított PCR termékeket BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) szekvenáltuk. A be nem épült nukleotidokat gél filtrációval távolítottuk el (DyeEx Kit, Qiagen). A kapilláris elektroforézist ABI Prism 310 Genetic Analyzerrel végeztük (Life Technologies).

3.2.1. Mutáció analízis FV deficiencia esetén

A PCR reakció során korábban publikált primerekkel (457) és saját tervezésű primerekkel végeztük el a *F5* gén vizsgálatát. Fontos itt megjegyezni, hogy ma már szinte elképzelhetetlen nehézségekbe ütközött a PCR primerek megtervezése, hiszen a vizsgálataink kivitelezésekor a *F5* gén szekvencia sokkal kevésbé volt ismert, mint napjainkban. Ennek az lett a következménye, hogy számos exon esetében nem tudtunk olyan primereket tervezni, amelyek korrektül mind a kódoló régiót, mind az exon-intron határokat tudták volna analizálni, mint pl. 2-es exon esetében az ismert szekvencia annyit tett lehetővé, hogy pontosan az exon eleje előtt érjen véget a forward primer, aminek eredményeképpen az AG dinukleotidot (splicing akceptor hely) nem lehetett vizsgálni, hiszen a primer elfedte azt, de hasonló problémákba ütköztünk a 21-es exon esetében, ahol a reverse primer rendkívül közel volt az exon végéhez, a 22-es primer esetében ahol a forward primer az exon elejéhez hasonlóan a korábbiakhoz és a 25-ös exon esetében is, ahol a forward primer gyakorlatilag az exon előtt közvetlenül ért véget. Ez a diagnosztikai szenzitivitást csökkentő probléma ma már nem fordulhat elő a teljes genom ismeretében, de akkor amikor ezt a vizsgálatot végeztük, ezeknek a teszteknek, tesztrendszereknek a beállítása és kivitelezése rendkívül aprólékos optimalizációs munkát követelt meg. A *F5* gén Sanger szekvenálásához tervezett primer szekvenciákat az 15. ábra mutatja (Melléklet: primerszekvenciák fejezetben).

3.2.2. Mutáció analízis NPC esetén

A genetikai vizsgálat során az *NPCI* exonokat individuálisan amplifikáltuk és Sanger szekvenálással vizsgáltuk. (primer szekvenciák: 4. táblázat, Melléklet: primerszekvenciák fejezetben).

3.2.3. Mutáció analízis Duchenne/Becker muscularis dystrophia esetén

3.2.3.1. Deléció/duplikáció analízis

A deléció/duplikáció analízisre MLPA módszert használtunk, a SALSA MLPA próba mixekkel a P034 és P035 kitekkel (MRC-Holland, Amsterdam, Hollandia). A kísérletek kivitelezése és az adatelemzés a gyártó leirata szerint történt, a relatív csúcsmagasságokat minták közti és mintán belüli normalizációt követően kontrollhoz viszonyítva analizáltuk. Duchenne izomsorvadás vizsgálatakor a próbák abban az esetben tudnak behibridizálni a templát DNS-hez, ha az jelen van, tehát egy hemizigóta deléció a próba hibridizációjának elmaradását ezáltal a jel hiányát eredményezi.

3.2.3.2. A *DMD* gén 4-es exon Sanger DNS szekvenálása

A szekvenálást a 4-es exonra tervezett primerekkel történt PCR amplifikációt követően (458) 3.1 Cycle Sequencing kittel (Applied Biosystems, Foster City, CA) végeztük a gyártói utasításoknak megfelelően. A mintákat ABI PRISM 310 Genetic Analyzer műszeren futtattuk meg és az adatelemzés Sequencing Analysis Software-rel történt (Applied Biosystems).

3.2.3.3. A *DMD* gén teljes kódoló régiójának vizsgálata

A *DMD* gén teljes kódoló régiójának szekvenálása piroszekvenálás módszerével újgenerációs DNS szekvenálással történt GS Junior rendszeren (Roche 454 Life Sciences, Branford, CT). A felhasznált diagnosztikai kit a Multiplicom DMD MASTR kitje volt (Multiplicom, Niel, Belgium). A kit a teljes *DMD* kódoló régiót négy multiplex PCR-rel összesen 118 amplikon formájában vizsgálja. Az adatelemzést a GS Amplicon Variant Analyzer software-rel (Roche 454 Life Sciences) végeztük.

3.2.4. Mutáció analízis monogénis glükóz metabolikus zavarok esetén

3.2.4.1. NDM, *KCNJ11* analízis

A *KCNJ11* gén egy exont tartalmaz. A kódoló régió vizsgálata négy (részben átfedő) amplikon Sanger szekvenálásán alapult. A primerek szekvenciáját az 5. táblázat mutatja (Melléklet: primerszekvenciák fejezetben).

3.2.4.2. HNF4A-MODY

Vizsgálatainkat PCR-t követő Sanger szekvenálással végeztük. A 3 leggyakoribb MODY gént vizsgáltuk (*HNF1A*, *HNF4A* és *GCK*). A PCR amplifikációhoz és Sanger szekvenáláshoz felhasznált primerek szekvenciáit a 6. táblázat mutatja (Melléklet: primerszekvenciák fejezetben).

3.2.4.3. Hypoglycaemias hyperinsulinismus

A genetikai analízis új generációs szekvenálással történt a Multiplicom MODY MASTR Kitjével amely az *ABCC8*, *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B*, *INS* és *KCNJ11* géneket tartalmazza. A kit 5 multiplex PCR reakcióban generál 118 amplikont. Az amplifikáció, tisztítási lépések, DNS szekvenálás során követtük a gyártói utasításokat (Multiplicom, Roche). A szekvenálás a Roche Junior készüléken történt. Az adatelemzést a GS Amplicon Variant Analyzer software-rel (Roche 454 Life Sciences) végeztük. A detektált mutáció jelenlétét Sanger szekvenálással konfirmáltuk.

3.2.5. Anyai sejt kontamináció szimulációs kísérletek

Az MCC szimulációját genomiális DNS-sel végeztük el úgy, hogy vad típusú (ún. magzati) DNS-t heterozigóta (ún. anyai) DNS-sel kevertük össze. Ezek 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%-os arányú keverékek voltak, amelyek végső soron 0,5%, 2,5%, 5%, 10%, 15%, 20% mutáns allél arányt jelentettek az összekevert DNS-ben.

3.2.5.1. Sanger szekvenálás MCC érzékenységének meghatározása

A Sanger DNS szekvenálás érzékenységét hat kis skálájú mutáció analízisével végeztük el. A hat mutációból öt egy nukleotidot érintő nukleotid csere, míg az utolsó egy három bázispáros deléció.

A vad típusú (tehát magzatinak minősített) DNS-t kevertük össze a heterozigóta "anyai" DNS-sel a következő nukleotid cserékre: (c.8870T>C, c.3407A>G, c.7916C>A, c.6992T>A, és c.107C>T, számozás az NM_138694.3 referencia szekvencia alapján). Ezek a mutációk a *PKHD1* génben vannak, mely gén felelős az autoszomális recesszív policisztás vesebetegség kialakulásáért.

A vad típusú "magzati" DNS-t kevertük össze heterozigóta "anyai" DNS-sel, amely a *CFTR* génben bekövetkező c.1521_1523delCTT (F508del a hagyományos nomenklatura szerint, referencia szekvencia: NM_000492.3). Ez a mutáció a leggyakoribb cystás fibrosist okozó genetikai eltérés.

Az amplikonokat PCR módszerrel generáltunk, a PCR termékeket tisztítottuk és BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kittel szekvenáltuk (Applied Biosystems, Foster City, CA) a gyártó utasításai szerint. A szekvenálási termékeket ABI PRISM 310 Genetic Analyzer műszeren analizáltuk. Az adatokat a Sequencing Analysis Software segítségével elemeztük.

3.2.5.2. MLPA MCC érzékenységének meghatározása

Az MLPA érzékenységét az anyai sejt kontaminációra egy több exont érintő deléció és egy több exont érintő duplikáció analízisével vizsgáltuk. Az MLPA-t minden esetben a gyártó utasításainak megfelelően végeztük. Mintán belüli intranormalizációt és minták közötti normalizációt végeztünk el és ezt követően vizsgáltuk a görbe alatti területeket vagy a csúcsmagasságot. Az deléció analízishez a vad típusú női "magzati" DNS-t kevertük össze az anyai mintával, ami heterozigóta volt az *MID1* exon1-3 delécióra (NG_008197.1(NM_000381.3):c.(?-365)_(864 + 1_865-1)del). A *MID1* génben bekövetkező mutációk az X kromoszómához kötött Opitz szindrómát okozzák. Az MLPA analízist a SALSA MLPA próbamix P233-B2 MID1 (MRC-Holland, Amszterdam, Hollandia) kittel végeztük el. Az X kromoszómához kötött öröklődésment miatt a próba felismerési szekvenciájában lévő deléció teljes jelhiányhoz vezet abban az esetben, ha csak X kromoszóma van jelen a mintában, illetve ha hemizigóta a deléció, míg egy heterozigóta deléció esetében 35-50%-ig redukálódik a jel intenzitása. A duplikáció analízishez vad típusú "magzati" DNS mintát az anyai heterozigóta DNS mintával kevertük, ez a heterozigótaság a *PKHD1* exon33-35 duplikáció volt (NG_008753.1(NM_138694.3):c. (5236 + 1_5237-1)_(5751 + 1_5752-1)dup). Ebben az esetben a SALSA MLPA próbamix P341-B2/P342-B2 próbamixét használtuk. A heterozigóta duplikáció 30-65%-os növekedést jelent általában a jel intenzitásban.

3.2.5.3. Az új generációs DNS szekvenálás MCC érzékenységének meghatározása

Ebben az esetben a vad típusú "magzati" DNS-t anyai DNS-el kevertük, amely anyai DNS heterozigóta volt egy bázispáros cserére (NM_000138.4: c.4727T>C) az *FBNI* génben. Az *FBNI* mutációk Marfan szindrómához vezetnek, autoszomális domináns öröklődésmenetet mutatva. A kétirányú piroszekvenálást GS Junior rendszeren végeztük el, az adatelemzés a GS Amplicon Variant Analyzer softwarrel történt (Roche 454 Life Sciences, Branford, CT). Minden mintát duplikátumban vizsgáltunk. A mutációk nomenklatúrájánál a HGVS (Human Genome Variation Society) aktuális ajánlásait követtük, kivéve a cystás fibrosis esetén, ahol a történelmi nevet is megadtuk.

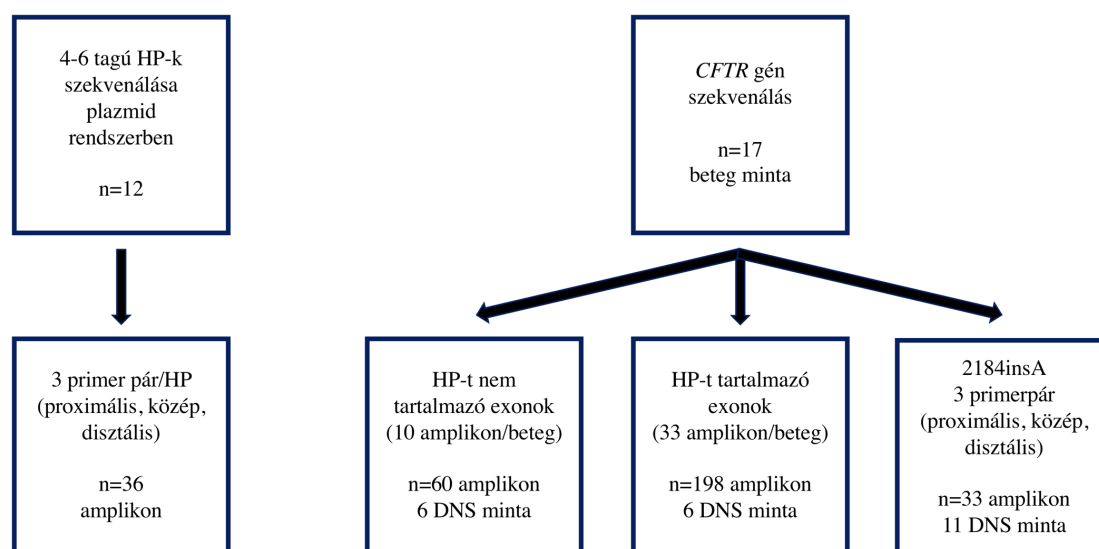
3.2.6. Piroszekvenálás analitikai teljesítőképességének vizsgálata

3.2.6.1. Plazmid rendszer

A Roche 454 Life Sciences, GS Junior műszer teljesítőképességének vizsgálatára pcDNA3.1 plazmid vektort (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) használtunk. Összesen 12 klónt gyártottunk: 4, 5, 6 tagú homopolimereket állítottunk elő a négy nukleotiddal Quikchange II helyspecifikus mutagenézis kit segítségével (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Minőségi kontrollként a helyspecifikus mutagenézis után Sanger szekvenálással vizsgáltunk két telepet minden mutáció esetében. A plazmid rendszerben minden homopolimert három primerpárra vizsgáltunk (13. ábra) annak a hipotézisnek a tesztelésére, hogy a szekvenálás kezdetekor a jel-zaj arány magasabb mint később, ezért ott még lehetővé teszi a pontos HP hossz meghatározását. A különböző primerszetteket az alábbiak szerint terveztük meg:

- 1) a HP a forward amplifikációra és szekvenálásra használt primer közvetlen közelében volt annak 3' irányában,
- 2) a vizsgált homopolimerek az amplikonnak hozzávetőleg a közepén foglaltak helyet,
- 3) a reverz amplifikációs és szekvenáló primer 3' vége volt rendkívül közel a homopolimerhez.

A primereket, amelyeket a mutagenézishez, amplifikációhoz és szekvenáláshoz használtunk a 7. táblázat mutatja (Melléklet: primerszekvenciák fejezetben). A HP klónok hossza amplifikált amplikonok hossza 366 és 387 bp között volt.



13. ábra. A homopolimerek vizsgálatának kísérleti terve.

3.2.6.2. *CFTR* gén analízis

A második kísérleti beállításban a *CFTR* gént vizsgáltuk. 17 klinikai mintát vizsgáltunk ismert *CFTR* mutációs státusz mellett. A primer tervezés hasonlóan történt a plazmid rendszerhez, kivéve, hogy a középső típusú ampikon közepére tervezett HP részt nem végeztük el. A primereket a 8. táblázatban foglaltam össze (Melléklet: primerszekvenciák fejezetben). Összesen 33 homopolimert tartalmazó ampikont vizsgáltunk betegenként. A primerek tervezésekor figyelemmel voltunk arra, hogy az allél drop-out elkerülésére ismert, magasabb frekvenciával előforduló SNP-k ne legyenek a primerek alatt. Primereket terveztünk azokra a *CFTR* exonokra is amelyek nem tartalmaznak HP szekvenciákat (9. táblázat, (Melléklet: primerszekvenciák fejezetben)), hogy képesek legyünk a teljes *CFTR* gén vizsgálatára. A gén legkritikusabb szekcióját (e14) további analízisnek vetettük alá: 11 olyan humán DNS mintát vizsgáltunk, ahol 4 vad típusú és 7 heterozigóta volt a 2184insA mutációra nézve. A plazmid rendszerhez hasonlóan három addicionális primer párt terveztünk a proximalis, középső és distalis HP lokalizációnak megfelelően. A proximális primerek 5-11 bázis párral voltak feljebb a poli-A homopolimertől. Az amplifikáció során a hibajavító (proofreading) aktivitással rendelkező PicoMaxx enzimet használtuk. A szekvenálási adatokat Amplicon Variant Analyzer segítségével vizsgáltuk. A statisztikai analízist GraphPad Prism v5.03-mal végeztük. A genotipizálási pontosságot úgy határoztuk meg, hogy a pontos read-eket %-ban adtuk meg az ismert genotípusok esetében. Az elfogadható genotipizálási pontosságot a legalább 75%-ban pontos leolvasás esetén fogadtuk el.

3.2.7. CF monogén kohorsz

A DNS izolálás standard módszerek szerint történt QIAgen Blood Mini Kit, Qiagen, Germany által. Három szintű genetikai analízist végeztünk. Az első szinten (1) Elucigene CF29 v2 Kitet (Tepnel Diagnostics, UK) használtunk, amelyet (2) a második szinten a CFTRdele2,3(21kb) delécióval (214) egészítettünk ki és (3) harmadik szinten a fenti két módszerrel nem kimutatott mutációkat teljes DNS szekvenálással vizsgáltuk (459). A 6b exon esetében ahol módosítottuk a primereket: 6BF (5'-CTG TAC AGC GTC TGG CAC AT-3') és 6BR (5'-CAA ACA TCA AAT ATG AGG TGG AA-3'). Az Elucigene CF29[™] v2 Kit az alábbi mutációkat tudja detektálni : p.Asp1152His (c.3454G>C), c.1585-1G>A, p.Gly542X (c.1624G>T), p.Trp1282X (c.3846G>A), p.Asn1303Lys (c.3909C>G), p.Phe508del (c.1521_1523delCTT), c.3717+12191 C>T, p.Leu88IlefsX22 (c.262_263delTT), c.489+1G>T, p.Ser1251Asn (c.3752G>A), p.Gly551Asp (c.1652G>A), p.Arg117His (c.350G>A), p.Arg1162X (c.3484C>T), p.Arg334Trp (c.1000C>T), p.Ala455Glu (c.1364C>A), p.Lys684SerfsX38 (c.2051_2052delAAinsG), p.Lys1177SerfsX15 (c.3528delC), p.Phe316LeufsX12 (c.948delT), p.Ile507del (c.1519_1521delATC), p.Arg347Pro (c.1040G>C), p.Arg553X (c.1657C>T), p.Glu60X (c.178G>T), c.2988+1G>A, c.2657+5 G>A, c.1766+1G>A, c.579+1G>T, p.Gly85Glu (c.254G>A), c.p.Lys684AsnfsX38 (c.2052delA), és p.Arg560Thr (c.1679G>C). A DNS szekvenálásra a PCR termékeket ultrafiltrációval tisztítottuk (Microcon YM-100, Millipore, USA). A tisztított PCR terméket BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kittel (Applied Biosystems, USA) szekvenáltuk. A be nem épült nukleotidokat gél filtrációval távolítottuk el, (DyeEx Kit, Qiagen). A kapilláris elektroforézist ABI Prism 310 Genetic Analyzeren végeztük (Applied Biosystems), a *CFTR* kópiaszámbeli változásokat pedig MLPA Kittel vizsgáltuk a P091-B1 *CFTR* (MRC-Holland, The Netherlands) kittel. A mutációk esetében a hagyományos nevet használtuk és zárójelben tüntettük fel a javasolt (HGVS) nevet. Egy nagy átrendeződést, amelyet MLPA vizsgálattal mutattunk ki (CFTRdele2, c.54-5811_164+2186del273+6780_273+6961inv), allél specifikus PCR-rel és DNS szekvenálással is igazoltunk (460).

3.2.8. *DHCR7* gén szekvenálás

A *DHCR7* gén kódoló régiójának analízise a publikált PCR primerekkel történt (223). A 7-es és 9-es exon bizonyos primerjei helyett saját tervezésűeket használtunk (10. táblázat, Melléklet: primerszekvenciák fejezetben). Az elektroferogramokat a referencia szekvenciához hasonlítottuk (NG_012655.2). A mutációk kimutatását követően a betegben történt analízist követően a szülői

minták analízise is megtörtént annak igazolására, hogy a két mutáció transz öröklődésmentet mutatott a szülőkből. A 11-es számú beteg esetében kizárólag a szülőktől volt hozzáférhető minta. Egy esetben, a 13-as betegben ahol a fentebb említett standard metodológia nem igazolta mindkét mutáció jelenlétét, csak egyet heterozigóta formában, ott megvizsgáltuk a promotor régiót (461) illetve a 3' poliadenilációs szignál körülöttei szekvencia környezetet is (primer szekvenciák: 10. táblázat, Melléklet: primerszekvenciák fejezetben). A c.374A>G mutáció jelenlétét egészséges egyénekben *Sna*B1 enzim emésztéssel vizsgáltuk PCR-RFLP módszerrel. A *DHCR7* gén megfelelő szakaszát 250bp hosszú PCR termék formájában amplifikáltuk. Homozigóta vad típusú minták esetében a *Sna*B1 121 és 129 bázispáros fragmentet eredményezett, míg a mutáció esetén ez az *Sna*B1 hely elvesztődik.

3.2.9. *PKHD1* mutációk analízise ARPKD-ben

A genomiális DNS-t perifériás vér minták fehérvérsejtjeiből standard módszerekkel izoláltuk. Az exonok és az exon-intron határok PCR módszerrel történő amplifikációja a Losekoot et al. (462) alapján történt. A Sanger szekvenálás ABI Prism 310 Genetic Analyzeren történt (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). A kópiaszám variánsok vizsgálata MLPA módszerrel történt (P341 és P342). A beteg mintákban kimutatott mutációkat célzottan vizsgáltuk a szülői mintákban a szegregáció és a (transz) öröklődés igazolása céljából.

3.2.9.1. Más génekben történő CNV és kis skálájú mutációk vizsgálata

Azokban a betegekben, akikben nem találtunk két *PKHD1* mutációt a fenotípus klinikus általi reevaluációja történt és annak megfelelően más génekben történő mutáció keresés is indult. Az *NPHP1*, *HNF1B*, *TSC2* és *PKD1* gén deléciók vizsgálata QMPSF (quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments) analízissel történtek a korábbi közléseknek megfelelően (463, 464). A *PKD1* deléció validálása MLPA teszttel történt.

A kódoló régiók és exon-intron határok a *HNF1B* és *TMEM67* esetében Sanger szekvenálással kerültek analízisre. A SZTE kifejlesztett egy domináns policisztás vese panelt, mely új generációs szekvenálással Ion Torrent 316 készüléken került vizsgálatra, ezekben az esetekben a cél szekvenciák több, mint 95%-a legalább 50-szeres lefedettséggel került analízisre. A lehetséges betegséget okozó variánsok megerősítése Sanger szekvenálással történt. Ezen második lokusz

analízisek a Semmelweis Egyetemen és a Szegedi Tudományegyetemen történtek (Dr. Tory Kálmán, Dr. Maróti Zoltán, Dr. Kalmár Tibor).

3.2.9.2. ARPKD: Klinikai exom szekvenálás

A klinikai exom szekvenálást korábbi vizsgálatainkhoz hasonlóan végeztük (465). A cél szekvenciák több, mint 95%-a legalább 20-szoros lefedettséggel bírt, a szekvenálási leolvasásokat a hg19 NCBI37 referencia genomhoz illesztettük. A DNS szekvencia variánsok meghatározását a NextGene 2.4.2 (SoftGenetics, State College, PA) szoftverrel végeztük. A betegben talált mutációkat kódoló régióra és a splicing régióra szűkítettük, ismert vagy gyanítottan cystás vesebetegségekkel kapcsolatba hozható gének esetében.

3.2.10. A kódoló *FBNI* régiók és az exon-intron határok vizsgálata Marfan szindrómában

Az *FBNI* gént 15 beteg esetében 65 individuális PCR reakcióban amplifikáltuk korábban publikált primerek segítségével (466, 467). 27 primer esetében újraterveztük Primer3 szoftverrel (<http://primer3.ut.ee>) (11. táblázat, Melléklet: primerszekvenciák fejezetben).

A piroszekvenálást két irányból végeztük 40×-es minimum lefedettség meghatározásával Roche GS Junior 454 piroszekvenáló új generációs DNS szekvenáló rendszeren (Roche 454 Life Sciences, Branford, CT). A piroszekvenálás homopolimer szekvenciákat érintő inherens hibáját - többek között saját kísérletes munkánkból - ismerve (468), 49 exont piroszekvenálással vizsgáltunk, hiszen ezekben nem volt olyan hosszúságú homopolimer szakasz ami zavart okozott volna. 16 exon esetében Sanger DNS szekvenálást használtunk BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kittel (Applied Biosystems, Foster City, CA) a gyártó utasításainak megfelelően. Ezekben az esetekben a mintákat ABI PRISM 310 Genetic Analyzer-en futtattuk és a Sequencing Analysis Software-t használtuk értékelésre. Az új generációs szekvenálási adatokat az Amplicon Variant Analyzer szoftverrel vizsgáltuk.

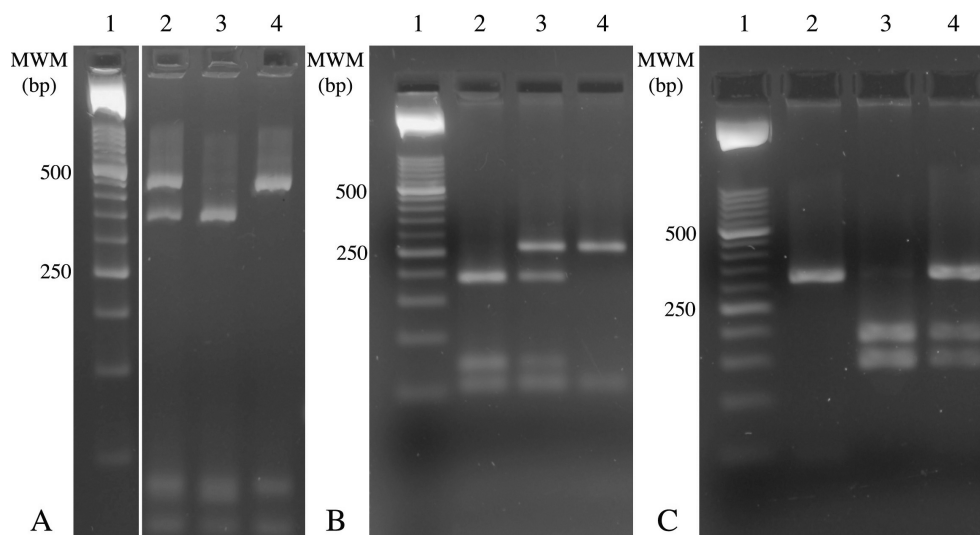
3.2.10.1. Illumina platformon történő NGS szekvenálás

Ebben az esetben a Marfan MASTR gyári kitet használtuk (Multiplicom, Niel, Belgium). 8 beteg esetében történt meg ez a vizsgálat. 3 másik esetben saját tervezésű könyvtár készítő reagens kitet használtunk. Ekkor a *TGFβR1* és *TGFβR2* géneket is vizsgáltuk, ez a saját tervezésű kit a Qiagen

könyvtárkészítő elvét használta (Qiagen, Hilden, Germany). Ezeket a mintákat Illumina Miseq (Illumina, San Diego, CA) szekvenálón futtattuk, az adatok elemzése NextGene programmal (SoftGenetics, State College, PA) történt. Azokban az esetekben, ahol az amplikonok lefedettsége nem érte el a 40-et, Sanger szekvenálást használtunk. A potenciálisan patogénnek minősített variánsokat Sanger szekvenálással erősítettük meg. A referencia szekvenciák az *FBNI* génre vonatkozóan: LRG_778, LRG_778t1, LRG_778p1.

3.2.11. AMD

Az *ApoE*, *CFH* Y402H, a *LOC387715* rs10490924 illetve a *HTRA1* rs11200638 polimorfizmusok vizsgálatát különböző molekuláris genetikai módszerekkel végeztük. A DNS izolálása QIAamp Blood Mini Kittel történt. Az *ApoE* E2, E3 és E4-es allélek meghatározása korábban publikált módszerrel (469) történt. A másik 3 polimorfizmus esetében saját fejlesztésű PCR-RFLP módszert állítottunk be. A *CFH* Y402H polimorfizmus esetében amplifikációra a Haines által publikált (391) primereket használtuk. A restrikciós emésztés *Nla*III restrikciós enzimmel történt, amely 3 hasítási helyet tartalmaz az 587 bp vad típusú PCR terméken, 418 bp és rövidebb fragmenseket eredményezve, mely 333 bp-ra rövidül a T-C tranzíció jelenlétében. A restrikciós termékeket 3%-os agaróz gélen (NuSieve 3:1; Cambrex, East Rutherford, NJ) futtattuk meg és ethidium bromiddal vizualizáltuk, Reprezentatív elektroforetikus mintázat a 14. ábra A részén található. Az rs10490924 polimorfizmus vizsgálatára, a következő oligonukleotidokat használtuk: 5'-TAC CCA GGA CCG ATG GTA AC-3' illetve 5'-GGG GTA AGG CCT GAT CAT CT-3'. A PCR termék 316 bp volt. A vizsgálatra *Sat*I restrikciós enzimet használtunk, mely emésztés 191 bp, 71 és 54 bp restrikciós termékeket eredményezett vad típusú (G) allél esetén. A mutáns T allél egy restrikciós helyet megszüntet, így 262 és 54 bp fragmenseket lehet látni az agaróz gélen (14. ábra B). Az rs11200638 polimorfizmus vizsgálatára az 5'-ATG CCA CCC ACA ACA ACT TT-3' és az 5'-GGG GAA AGT TCC TGC AAA TC-3' primereket használtuk. Az amplifikáció 322 bp terméket eredményezett és az *Xma*III restrikciós enzimmel történő emésztés 183 és 139 bp restrikciós termékeket eredményezett a vad típusú (G) allél esetén. A minor allél (A) esetén a restrikciós hely elveszlik, így összesen a 322 bp termék marad (14. ábra C). A random mintákon végzett Sanger szekvenálós validálás során minden esetben a restrikciós enzim emésztésnek megfelelő nukleotidot detektáltuk.



14. ábra. PCR-RFLP módszer fejlesztése a *CFH* Y402H (A), a *LOC387712* rs10490924 (B) és a *HTRA1* rs11200638 (C) polimorfizmusok kimutatására. Forrás: doi: 10.1111/j.1755-3768.2009.01687.x.

A *F13A* Val34Leu polimorfizmust (470), a *Gas6* rs8191974 (c.834+7G>A) polimorfizmust és a *MerTK* rs86016 (g.2920G>A) polimorfizmust (471) hibridizációs próbákkal vizsgáltuk. A komplement C3 rs2230199 (p.Arg102Gly) polimorfizmust PCR-RFLP módszerrel vizsgáltuk. Az amplifikációhoz az alábbi primereket használtuk: 5'-CAG GGA GTT CAA GTC AGA AAA GG-3' és TCT TGT CTG TCT GGA TGA AGA GG-3'. A 131 bázispáros PCR terméket *Cfo*I restrikciós enzimmel emésztettük, az egyedüli restrikciós hely akkor keletkezik, ha a mutáció nincs jelen, tehát vad típus esetén, ez elveszik a mutáció jelenlétében. A *CFI* génben levő rs10033900 polimorfizmust, a *MerTK* I1b rs17835605 (g.4916C>T), *MerTK* I1c rs10496440 (g.8809A>C) és a *MerTK* I4 rs7573344 (g.60127A>G) polimorfizmusokat TaqMan SNP genotipizáló teszttel vizsgáltuk (471). A kontrollok több, mint 98%-a és a betegek több, mint 96%-a genotipizálásra került. A saját módszerek validálása során az adott metodikát véletlenszerűen választott minták DNS szekvenálásával ellenőriztük. A szekvenálás és az adott mutáció detektálási módszer általi eredmény minden esetben azonos volt.

3.2.12. Infertilitás - Y kromoszóma mikrodélécio analízis

Minden régiót két primer párral amplifikáltunk: az AZFa régiót sY84 és sY86 primerekkel, az AZFb régiót sY127 és sY134 primerekkel, az AZFc régiót SY254 és SY255 primerekkel. A délécio jelenlétét az amplifikált termékek hiánya jelezte (431). Pozitív kontrollként normál spermatogenezissel rendelkező férfiak mintáját, míg negatív kontrollként női DNS mintát használtunk. No-template kontrollként a DNS helyett vizet tartalmazó reakciót használtunk. Belső

kontrollnak ZFX/ZFY géneket használtunk. Az Y kromoszóma jelenlétét az SRY gén jelenlétével igazoltuk. Az AZFb régió töréspontok meghatározására sY105 és sY121 (proximális), sY143 és sY153 (disztális) primereket használtunk. Az sY160 analízise a b2/b4 (AZFc) régió delécióját határozta meg.

3.2.12.1. Részleges AZFc deléciók vizsgálata

A gr/gr deléció típust akkor definiáltuk, ha az sY1291 deletálódott, míg az sY1161, sY1191, sY1201 és sY1206 jelen volt. A b2/b3 deléciót az sY1191 hiánya míg az sY1161, sY1201, sY1206 és sY1291 jelenléte igazolta. A b1/b3 deléció esetében az sY1161, sY1191, sY1291 deletálódott míg az sY1201 és sY1206 volt jelen.

3.2.12.2. A *DAZ* és *CDY1* gének kópiaszám és kópiatípus, valamint az Y kromoszóma haplotípus meghatározása

A *DAZ* és *CDY1* gének kópiaszámának meghatározására kvantitatív tesztet végeztünk, korábban publikált módszer felhasználásával (472, 473). A *DAZ* kópiaszám meghatározás, egy egyidejű, intron 10 fragment amplifikációt jelent az AZFc *DAZ* *DAZ* kópiákból és a *DAZL* homológ szekvenciájából egyetlen primer párral (o1130 és o1313). Ez az intron egy kópiában van jelen a *DAZ* és a *DAZL* génben, mely közül a *DAZ* normál esetben 4, míg a *DAZL* 2 kópiaszámmal van jelen. A PCR termékek analízise 310-es Genetic Analyzeren (Applied Biosystems) történő elektroforézist követő kvantitálás (Peak Scanner Software, Thermo Fisher Scientific) történt. A kvantitálás a görbe alatti területek összehasonlításával történt a *DAZ* és a homológja a *DAZL* között. A *CDY1* kópiaszám meghatározása hasonlóan történt, a *CDY1* és a *CDY2* összehasonlításából. A *DAZ* és *CDY1* kvalitatív meghatározása lehetővé teszi a *DAZ1/2* és *DAZ3/4* valamint a *CDY1a* és *CDY1b* elkülönítését (472). Az Y kromoszóma haplotípus meghatározás során minden esetben elvégeztük a YAP, 12f2 és 92R7 polimorfizmusok vizsgálatát (474), míg a részleges AZF delécióval és duplikációval rendelkező egyének esetén további genotipizálást végeztünk (475).

3.3. Vizsgálatok RNS szinten

3.3.1. *DHCR7* mRNS vizsgálat

A 13-as beteg esetében a kiterjesztett genetikai vizsgálat nem tudta mindkét oki eltérést kimutatni, ezért a mRNS-t cDNS-re átírva szintén vizsgáltuk. Az össz RNS-t Trizol reagenssel (Invitrogen) izoláltuk, a reverz transzkripció High Capacity cDNA kittel (Life Technologies) történt. A *DHCR7* cDNS-t 4 átfedő fragmens formájában amplifikáltuk nagy pontosságú DNS polimerázzal (Pfu DNA polymerase, Agilent Technologies, primer szekvenciák: 10. táblázat, Melléklet: primerszekvenciák fejezetben).

3.3.2. *FBNI* mRNS analízis

A 26-os beteg esetében bőr biopsziás mintavételre került sor. A fibroblaszt tenyésztést követően (3-5. passzálás) a fibroblastokból totál RNS-t izoláltunk TRIzolate reagenssel (UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Ltd., Debrecen, Magyarország), ezt az RNS-t reverz transzkripcióval High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kittel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) írtuk át cDNS-é. A reverz transzkripció után a 26-os exon és a mellette körbe fogó exon-exon kapcsolati pontok amplifikálásra és Sanger szekvenálásra kerültek (primer szekvenciák: *FBNI* cDNS25-27F: 5'-GAA ACA CCA TTG GCA GCT TT-3', *FBNI* cDNS25-27R: 5'-GGC ATT CAC AGC GGT AAC CT-3'). A mutáns/vad típusú allél arányokat a cDNS-ben és a genomiális DNS-ben piroszekvenálással határoztuk meg.

3.3.3. miRNS vizsgálatok infertilitásban

Össz RNS-t izoláltunk mind a spermium sejtekből, mind az ondóból Trizol reagens (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) felhasználásával a gyártó utasításainak megfelelően. Az RNS koncentrációját és tisztaságát Nanodrop ND-2000 spektrofotométerrel (Thermo Scientific, Waltham, MA) határoztuk meg, míg az RNS minőségét Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) felhasználásával vizsgáltuk. A miRNS mennyiségi meghatározásokra egy kis RNS specifikus stem-loop RT-qPCR tesztrendszerrel használtunk, amelyben a megfelelő próbákat egy Debrecenben kifejlesztett szoftver segítségével állítottuk elő (476). A cDNS szintézis a totál RNS-ből miRNS specifikus primerekkel történt a TaqMan

MicroRNA assay protocol felhasználásával (Applied Biosystems, Foster City, CA). A kvantitatív PCR reakciót ABI PRISM 7900, Applied Biosystems, Foster City, CA) segítségével végeztük. 0,1 µg totál RNS-t reverz transzkripcióval cDNS-é átváltunk majd PCR reakcióval TaqMan próbákkal vizsgáltunk. Endogén kontrollként SnoRNA 202-t használtunk, minden kísérletet triplikátumban végeztük. Minden kísérlethez RT enzimet illetve DNS-t nem tartalmazó mixeket is használtunk kontrollként. Ezek egyik esetben sem eredményeztek amplifikációt. A cél miRNS-ek koncentrációját az SnoRNA 202-re normalizáltuk.

3.4. Vizsgálatok fehérjeszinten

3.4.1. FV aktivitás és antigén tesztek

A FV koaguláns aktivitás mérése egyfázisú PI alapú teszttel került kivitelezésre. Hasonlóan, a thrombocytalizátumból is ilyen módszerrel mértük a FV aktivitást. A FV, FV nehéz lánc (heavy chain, HC) és FV könnyű lánc (light chain, LC) antigén szinteket szendvics ELISA módszerrel mértük a következő elsődleges (capture) antitestek felhasználásával: birka anti-humán FV poliklonális antitest (The Binding Site, Birmingham, United Kingdom), monoklonális antitest a B doménben elhelyezkedő 150kd-os aktivációs peptid ellen (cloneB10, Chemicon, Temecula, CA) és egy monoklonális antitest a C2 domén LC ellen (Sigma). Nyúl anti-humán FV antiszérumot (Diagnostica Stago, Asnières, France) használtuk második antitestként, amit kecske peroxidáz jelölt anti-nyúl immunglobulin (Dako, Glostrup, Denmark) követett.

3.4.2. FV immunprecipitáció, SDS-poliakrilamid (SDS-PAGE) gél elektroforézis és immunblotting

A vérplazmából biotinált birka poliklonális anti-FV antitesttel (The Binding Site) és sztreptavidin agaróz (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, United Kingdom) segítségével immunoprecipitáltuk a FV-öt. Az immunprecipitátumokat és a teljes plazma mintát SDS-PAGE analízissel vizsgáltuk, amelyet Western blotting követett. Első antitestnek az alábbiakat használtuk: biotinált anti-FV birka poliklonális antitest, nyúl anti-FV antiszérum (Assera V, Diagnostica Stago) és egy egér monoklonális antitest a B-domén ellen (Chemicon). A reakciót a biotinált antitest utáni avidin és biotinált peroxidáz komplex (Vectastain ABC kit) (Vector, Burlingame, CA) segítségével tettük láthatóvá. A nem biotinált anti-FV nyúl antitest és az anti-FV

B-domén egér antitest reakciókat, peroxidáz jelölt kecske anti-nyúl IgG-vel és nyúl anti-egér IgG-vel inkubáltuk, a kötődő peroxidázt pedig ECL-Plus reagenssel (Amersham) tettük láthatóvá.

3.4.3. Izom hisztológia, dystrophin immunhisztokémia

Az izombiopsziából 7 mikrométeres vastagságú fagyasztott szekciókat készítettünk ezeket standard protokollokkal vizsgáltuk (477). Immunohisztokémiát a dystrophin 1 (centrál core domén), 2 (C-terminális), 3-as (N-terminális) epitóp ellen termeltetett monoklonális antitestekkel végeztünk (Novocastra, Newcastle, Egyesült Királyság). Az elsődleges antitest 1:20 hígításban került felvitelre, vizsgáltuk a sarcoglycan alpha, beta, gamma, delta alegységeket (Novocastra 1:50, 1:100, 1:100 és 1:50 hígításban), a merosint (Novocastra, 1:100) és a spektrint (Novocastra, 1:100). Az elsődleges antitesteket egy órán át szobahőn inkubáltuk. Ezek a vizsgálatok Dr. Hortobágyi Tibor (DE Pathológiai Intézet) irányításával történtek.

3.4.4. Gas6 analitikai módszerek

A laboratóriumi reagenseket a Sigmától vásároltuk, a Hi-Trap protein G és NHS oszlopokat az Amersham Biosciences-től, a sejt tenyésztés médiumokat és reagenseket a Gibcotól, a streptavidin és a biotinált torma peroxidáz (HRP, horseradish peroxidase) szignál amplifikációs reagenst (ABC) az ELISA-ra és az immunoblottingra a DAKO és a Vector Laboratóriumoktól.

3.4.4.1. Antitestek

A poliklonális nyúl antiszérum (P05) és az egér monoklonális antitesteket (M1 és M7) rekombináns humán Gas6 (rhGas6) ellen termeltettük. A rhGas6-et immunaffinitás kromatográfiával tisztítottuk szérum mentes médiumból, amelyet HEK293 sejtekből stabilan transzfektált módon termeltetett Gas6 esetén használtunk anti-Gla monoklonális antitest (Prof. Johan Stenflo ajándéka) felhasználásával (478). Az antitesteket biotinamidokaproát NHS észter reagenssel biotináltuk a gyártó utasításainak megfelelően. A P05, M1 és M7 antitesteket Hi-Trap protein G oszlop segítségével tisztítottuk a gyártó utasításainak megfelelően. Az antitesteket teszteltük ELISA-val és immunoblotting módszerrel, annak figyelembevételével, hogy jelölik-e a rhGas6-et. Anti-rhGas6 kecske poliklonális antitestet (aminosavak 118-678, AB885) az R&D Systemstől (Minneapolis, MN) vásároltuk. A a Gas6 karboxi- és amino-terminusával szemben

termeltetett kecske poliklonális peptid antitesteket (C-20 és N-20) a Santa Cruz Biotechnology-től (Santa Cruz, CA) vásároltuk. A nyúl poliklonális antitest, a humán protein S elleni és a másodlagos biotinált antitestek a DAKO (Glostrup, Denmark) termékei voltak.

3.4.4.2. Humán plazma és rekombináns Gas6 izolálása és tisztítása

Egy liter citrát foszfát dextróz-antikoagulált friss fagyasztott plazmán a korábbiaknak megfelelően bárium citrát precipitációt végeztünk (479). A visszaoldott precipitátumból a Gas6-et Hi-Trap NHS immunaffinitás oszlopon tisztítottuk az M1 vagy az M7 antitestek felhasználásával. Az eluált frakciókat SDS-PAGE elektroforézissel vizsgáltuk. A rhGas6 tisztítására (480) ugyanezt a protokolt használtuk. A tisztított rhGas6-et használtuk az aminosav összetétel analízisre a moláris extinciókoefficiens kalkulálására, mégpedig úgy, hogy az Asp (Asp+Asn), Glu (Glu+Gln+Gla), Val, Ile és Tyr reziduumok esetében ahogy korábban ez már publikálásra került (481). A kalkulációban 82 kDa molekulasúlyt használtunk. A kiszámolt moláris extinciókoefficiens $83676 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ -nek adódott. A tisztított rhGas6 funkcionálisan aktív volt (480).

3.4.4.3. Tömegspektrometria

A mintákat előkészítés után (482) tömegspektrometriával vizsgáltuk. Nano-electrospray ionizációs (nanoESI) tömegspektrométert (API QSTAR Pulsar-i quadrupole time-of-flight tömegspektrométer (Applied Biosystems/MDS Sciex) NanoSpray ion forrással (MDS Proteomics)) használtunk. Bizonyos peptid ionokat, amelyek jelen voltak mind a rhGas6-ben és a gyanított, gélből kivágott Gas6-nek tűnő sávban is, tovább analizáltuk tandem tömegspektrometriával (MS/MS), hogy aminosav szekvencia adatokat nyerjünk belőlük.

3.4.4.4. Gas6 ELISA teszt kifejlesztése

A teszt során mindvégig $100 \mu\text{L}$ teszt térfogatot használtunk. A mosó puffer PBS-0,05% Tween-20 (PBS-T). Minden mosási lépés 5 alkalommal került kivitelezésre. Minden inkubációs lépés - ha máshogy nem írjuk - szobahőmérsékleten történt. Az antitestek optimális koncentrációjának meghatározása sorozat hígítással történt. Az ELISA lemezt először AB885 antitesttel fedtük ($2,9 \mu\text{g/mL}$), majd teszt pufferrel (PBS-1% BSA-val) blokkoltuk, ezután a mintákat 10- és 20-szoros hígítással adtuk hozzá. A lemezt 4°C -on egy éjszakán keresztül inkubáltuk és utána a biotinált

P05 másodlagos antitestet adtuk hozzá 2 µg/mL-es koncentrációban és 5 órán keresztül inkubáltuk. Ez az inkubációs periódus egy ABC szignál amplifikáció lépéssel folytatódott. Ezután az OPD szubsztrátot adtuk, amelyet 8 perc után 100 µL 1M kénsav hozzáadásával állítottuk le. Az abszorbanciát 490 nm-en mértük spektrofotométeren.

3.4.4.5. Thrombocyta izolálás és aktiválás

A thrombocyta kísérletekhez ACD csőben levett vénás vért használtunk (BD Vacutainer). A mosott thrombocyta szuszpenziót standard módszerekkel alakítottuk ki (483). A thrombocytaszámot $1000-1400 \times 10^9/L$ -re állítottuk be. A thrombocytaoldatot ezután almintákra osztottuk, a felét lizáltuk nyugvó állapotban 1% Triton X-100 segítségével. A másik felét aktiváltuk 5 U/mL végső koncentrációjú trombinnal és 20 percen keresztül 37 °C-on inkubáltuk. Ezután lecentrifugáltuk 13000 g-n 5 percen át, a felülúszót ezután szeparáltuk a maradék csapadéktól, amit szolubilizáltuk TBS 1% Triton X-100 segítségével. A thrombocyta mosási és aktivációs műveletek hatékonyságát immunblottinggal ellenőriztük, ahol különböző Gas6 antitesteket és mint pozitív kontrollt egy poliklonális nyúl anti protein S-t használtunk, hiszen a protein S esetén ismerjük azt, hogy jelen van a thrombocyta α -granulumban, onnan szekretálódik és proteolitikusan processzálódik a thrombocyta aktivációja során, tehát a trombin hasítja (484).

3.4.4.6. Immunprecipitáció, immunblotting

A thrombocyta és plazma immunprecipitációs kísérletekhez 5×10^8 thrombocytát használtunk (nyugvó vagy aktivált thrombocyta lizátumból vagy felülúszóból) és 120 µL citrát-antikoagulált plazmát. Protein A vagy streptavidinnel fedett agaróz gyöngyöket használtunk, inkubáltuk a megfelelő antitesttel, majd az antigént tartalmazó oldatot adtuk hozzá. 4°C-on egy éjszakán keresztüli inkubációt követően a gyöngyöket TBS-sel mostuk és a hozzákötődött anyagot eluáltuk SDS minta pufferrel, majd SDS-PAGE szeparálás következett, melyet blotolás követett és utána különböző antitestekkel történő vizualizálás. Különböző mennyiségű fehérjét vittünk fel 10%-os SDS-PAGE elektroforézisre, ezt követően a fehérjéket PVDF (polyvinylidene fluoride) membránra transzferáltuk (Pall Corporation). A blokkolást követően a membránt a megfelelő antitesttel inkubáltuk, ahol jelöletlen elsődleges antitestet használtunk, a membránt biotinált másodlagos antitesttel inkubáltuk. A jel amplifikáció ABC HRP kittel (Vector) történt. Szubsztrátként DAB-ot (diaminobenzidine) használtunk.

3.4.4.7. A *Gas6* c.834+7G>A polimorfizmus esetleges hatásának vizsgálata a *Gas6* szintre

Ezeket a vizsgálatokat svéd kollaborációban végeztük. 300 anonim egészséges véradó plazmamintájának mérése történt meg a Lundi Egyetemen az általam kifejlesztett ELISA módszer segítségével (485) míg a genetikai analízist én végeztem.

3.5. Egyéb biomarkerek vizsgálata

3.5.1. Klinikai kémiai analízisek SLO szindrómában

A szérum mintákból 7-DHC szintet határoztunk meg (247). A szérum totál koleszterin szint mérése enzimatisz kolorimetriás teszttel történt (Modular, Roche, Mannheim, Germany). Az alpha, beta-lipoproteinek és kilomikron frakciók meghatározása agaróz gél elektroforézissel történt (Hydragel 15, Sebia, AL Instruments, Lisses, France). Az enzim aktivitások meghatározása UV kinetikus módszerrel történt szérum minta felhasználásával. Ezeket a méréseket Dr. Oláh Anna végezte.

3.5.2. Kis molekulák hatása a koleszterin bioszintézisre

Közös munkánkban a sejt- és szubsztrát mérési vizsgálatokat kollaborációs partnerünk, a Dr. Mirnics Károly (Vanderbilt University, Nashville, TN) vezette kutatócsoport végezte (486, 487), míg a mi feladatunk a genetikai tesztelés volt. Az amerikai kutatócsoport olyan sejt kultúra modellt illetve új analitikai folyadék kromatográfiával összekötött tömegspektrometriás módszert fejlesztett ki, amely alkalmas arra, hogy a kis molekulák koleszterin bioszintézis útra kifejtett hatását vizsgálja. A mi szerepünk ebben a kísérlet sorozatban az volt, hogy rendelkezésre bocsátottunk, beleegyező nyilatkozatot követően olyan fibroblaszt tenyészeteket, amelyeket magyar Smith-Lemli-Opitz szindrómás betegekből izoláltunk (Dr. Koczok Katalin). Az analitikai protokoll PTAD által történő szterol derivatizáción alapul, rendkívül megbízhatóan képes mérni a 7-DHC szintet, így ezt a módszert a kutatócsoport arra alkalmazta, hogy egy farmakológiailag aktív kis molekula súlyú anyagok hatását a koleszterin szintre mérje. A sejtvonal alapú tesztrendszer Dhcr7- deficiens Neuro2a sejt típusból állt.

Ennek a tanulmánynak továbbvitele során a vizsgálataink célja az volt, hogy *DHCR7* null mutációra nézve heterozigóta egyének, azaz az általunk korábban diagnosztizált betegek szüleinek

a fibroblaszt sejtvonalát hasonlítsuk össze normál fibroblasztokkal aripiprazole és trazodone expozíciót követően. A kísérletek közül a sejtvonalak kezelése, a *de novo* lipid bioszintézis vizsgálata és a szterol mérés a Vanderbilt Egyetemen, míg a genetikai tesztelés a korábbiaknak megfelelően a mi laboratóriumunkban történt. A fibroblaszt minták biokémiaileg és genetikailag igazolt SLO szindrómás betegek szüleiből származtak. A heterozigóta szülők genotípusa az alábbi volt: c.[1097G>T];[=], c.[964-1G>C];[=], c.[1295A>G];[=], c.[1328G>A];[=], c.[730G>A];[=], c.[976G>T];[=]. A laboratóriumi mérések a korábbiaknak megfelelően történtek. Hat heterozigóta fibroblaszt analízisére került sor hat kontroll minta mellett. A kontrollok között az általunk végzett *DHCR7* gén DNS szekvenálás két ismeretlen jelentőségű variánst igazolt, az egyik egy misszensz mutáció (c.1012G>A heterozigóta formában, ami p.Val338Met cserét jelentett), a másik pedig a csendes c.1341C>T (p.Asp447Asp) ami egy potenciálisan splicingot befolyásoló genetikai eltérés. A másik négy kontroll fibroblasztban a DNS szekvenálásunk patogén *DHCR7* genetikai eltérést nem igazolt.

3.6. Statisztikai analízisek

A minták eloszlásának vizsgálata Shapiro-Wilk vagy Kolmogorov-Smirnov tesztel történt. A mennyiségi változókat Kruskal-Wallis, Mann-Whitney vagy Student t tesztel hasonlítottuk össze. A korreláció vizsgálatot Pearson korreláció tesztel végeztük (Sperman's rho kalkuláció). A genotípus frekvenciákat chi-négyzet próbával teszteltük. Az eset-kontroll tanulmányokban a relatív kockázatot különböző genotípusok és allélek esetén logisztikus regresszióval határoztuk meg és esélyhányadosként írtuk le. A potenciális zavaró tényezőket vizsgáltuk és amennyiben statisztikailag kimutathatóan asszociáltak bizonyos genotípusokkal, korrigáltunk rájuk a logisztikus regresszió során. A statisztikai analíziseket GraphPad Prism 7.03. szoftverrel (GraphPad, San Diego, CA) valamint SigmaStat és SPSS szoftverrel végeztük (Systat Software Inc., San Jose, CA, és SPSS Inc., IBM, Chicago, DE). $p < 0,05$ alatti értéket fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

3.7. *In silico* analízisek

3.7.1. Dystrophin *in silico* vizsgálata

A vizsgálatokhoz különböző adatbázisokat használtunk fel. Az dystrophin és rokon fehérjéi aktin kötő doménjeinek a kristályszerkezetét (dystrophin PDB ID: 1DXX (488), utrophin PDB ID: 1QAG (489), α -actinin 3 PDB ID: 1WKU (490) és fimbrin PDB ID: 1AOA (491)) fehérjéknek a Protein Adatbankból (PDB) használtuk fel míg, más fehérje információkat az UniProt adatbázisból (dystrophin UniProt ID: P11532, utrophin UniProt ID: P46939, α -actinin 3 UniProt ID: Q08043 és fimbrin UniProt ID: P13797). A strukturális képeket a PyMOL Molecular Graphics Systemmel készítettük el (Version 1.3 Schrödinger, LLC). A stuktúra alapú szekvencia összehasonlításokat a SALIGN webszerverrel végeztük (492). A másodlagos struktúra predikcióját a JPred4 szerverrel végeztük (493). A fehérje stabilitásában bekövetkező változásokat a FoldX algoritmus (494) és az SDM webszerver (495) használatával végeztük el a dystrophin ABD kristályszerkezetének felhasználásával. Az aggregációs tulajdonság predikciója az N-ABD A lánc szerkezete alapján az Aggrescan3D szerver dinamikus predikciós módjának felhasználásával történt (496). Az *in silico* szerkezeti/predikciós vizsgálatokat Dr. Mótyán János (DE Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) végezte.

3.7.2. Predikciós algoritmusok használata új mutáció esetén

A fehérjék illesztését ClustalW-vel végeztük (497). A korábban le nem írt mutációk patogenitásának megítélésére különböző predikciós algoritmusokat használtunk: Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>), SIFT (<http://sift.jcvi.org>), és a PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>) algoritmusokat.

3.8. Engedélyek, finanszírozás

Vizsgálatainkat minden esetben a hatályos jogi szabályozásnak megfelelően végeztük beleegyező nyilatkozatok birtokában. Ahol szükséges volt, etikai engedélyt vagy intézményi kutatásetikai bizottsági engedélyt szereztünk. A vizsgálatok során elvégzett klinikai laboratóriumi diagnosztikai tevékenység végzéséhez hatósági engedéllyel rendelkezünk. A disszertációmban szereplő ábrák és táblázatok közléséhez, ahol szükséges volt, a kiadó engedélyét megszereztem.

Tudományos kutatómunkámat az évtizedek során számos szervezet támogatta. Az alábbiakban a fő finanszírozókat, pályázatokat sorolom fel:

FKFP 0214/2001 (2001-2004): Öröklött véralvadási faktorhiányok molekuláris biológiai és biokémiai jellemzése.

EU Marie Curie European Reintegration Grant, ERG 511775 (2005-2006): Stabilization of blood coagulation factor XIII-A in blood plasma: identification of the binding domain(s) involved in the binding with FXIII-A on FXIII-B.

OTKA F60643 (2006-2009): A XIII-as véralvadási faktor két alegységének kapcsolódása.

Debreceni Egyetem, OEC Mecenatúra Pályázat (2005-2007): Génpolimorfizmusok hatása az időskori macula degeneráció kialakulására.

UD Faculty of Medicine Research Fund (Bridging Fund, 2012-2013): Epidemiological and functional characterization of mutations causing severe inherited diseases.

Debreceni Egyetem Kutatóegyetemi Belső Pályázat (2013-2016): "Variants of unknown significance" - detection and functional characterization of genetic alterations in inherited diseases.

OTKA 109076 (2014-2018): "Variants of unknown significance" - detection and functional characterization of genetic alterations in inherited diseases.

MDT-Novo Nordisk klinikai kutatási pályázat (2014-2015): Monogénes diabetesesek klinikai és genetikai vizsgálata.

„Stratégiai K+F műhelyek kiválósága” GINOP-2.3.2-15-2016-00039 (2017-2021). A projekt debreceni koordinátora vagyok.

3.9 Melléklet: primerszekvenciák

e1
CCCACAGCCTCTAGAGCTCATTGCAGCTGGGACAGCCCGAGTGTGGTTAGCAGCTCGGCAAGCGCTGCCCAGGTCTGGGGTGGTG
 GCAGCCAGCGGGAGCAGGAAAGGAAGCATGTTCCAGGCTGCCACGCCTCTGGGTCTTGGTGGTCTTGGGCACCAGCTGGGTAGGC
 TGGGGGAGCCAAGGGACAGAAGCGGCACAGCTAAGGCAGTTCACGTGGCTGCTCAGGGCATCAGTTGGAGTACCAGCTGAGCCC
 ACAAACTCAGgtaact**cagggtgtggagtcggg**

e2
ttagtttttgtatttttattt**ccag**TTTGAATCTTCTGTAACTTCCTTTAAGAAAAATTGTCTACAGAGAGTATGAACCATATTTTAA
 GAAAGAAAAACCAATCTACCATTTCAGgtaagcctgaaatatacttttttaatttttaaagataaaatttctatgggttaatttggca
 ttcacatgcatctaaaaatat**ccatttactgaaaatttatagaaac**

e5
ctgcagtgctactgaaaacatgtcttttcctttcatagGGACCCTAACTGAGGGTGGGACACAGAAGACGTTTGACAAGCAAAATCGTG
 CTACTATTTGCTGTGTTTATGAAAGCAAGAGCTGGAGCCAGTCATCATCCCTAATGTACACAGTCAATGGATATGTGAATGGGACA
 ATGCCAGgtaacacgagggtgtgtaccattaaacaacagtaaaatcattagtaatttttcggtcctgtttttctcaagcactaga
 gaagttgaccatactcactgtttt**gcaactccctatcaagaaggaaa**

e7
ttcttctcttggagtattttcattgtctttctgtcctaactcagCTGGGATGCAGGCTTACATTGACATTA AAAACTGCCCAAAGAAA
 ACCAGGAATCTTAAGAAAATAACTCGTGAGCAGAGCGGCACATGAAGAGGTGGGAATACCTCATTGCTGCAGAGGAAGTCATTGG
 GACTATGCACCTGTAATACCAGCGAATATGGACAAGtgagttgttggggt**ctataccactgggcaaa**

e8
atttgagaaagtggtttaatttttttttacttcactttaagAAAAACAGGTCTCAGCATTTGGATAATTTCTCAAAACCAAAATTGGA
 AAACATTATAAGAAAGTTATGTACACACAGTACGAAGATGAGTCCCTCACCAACATACAGTGAATCCCAATATGAAAGAAGATGGG
 ATTTTGGGTCCATTATTCAGAGCCAGGTGAGAGACACACTCAAAGtaagtaacacaaatcacagaatcattggggaattacatagt
 aaaatatattggagtacctggttatttttttaatttttaaaagaaaagat**gctcatataatttttaatttcaaatg**

e13
gattattgtgttttcatgtctttttccagacttccagatctctctctgtctgtctctctctgtagGAAC TTGGATGTTAACTTCC
 ATGAATTCTAGTCCAAGAAGCAAAAGCTGAGGCTGAAATTCAGGGATGTTAAATGTATCCCAGATGATGATGAAGACTCATATGAG
 ATTTTTTGAACCTCCAGAATCTACAGTCATGGCTACACGGAAAAATGCATGATCGTTTAGAACCTGAAGATGAAGAGAGTGATGCTGAC
 TATGATTACCAGAACAGACTGGCTGCAGCATTAGGAATCAGGTCAATCCGAAACTCATCATTTGAATCAGGAAGAAGAGAGTTCATAT
 CTTACTGCCCTAGCTCTGGAGAAATGGCACTGAATTCGTTTCTCAAAACACAGATATAATTTGTTGGTTCAAAATATTCTTCCCAAGT
 AATATTAGTAAGTTCACCTGCAATAACCTTGCAGAACTCAGAAAGCCCTTCTCACCAACAAGCCACCACAGCTGGTTCCCACTG
 AGACACCTCATTTGGCAAGAACTCAGTTCTCAATTTCTCCACAGCAGAGCATTCAGGCCATATTTCTGAAGACCCATAGAGGATCCT
 CTACAGCCAGATGTCACAGG**ATACGCTCACTTTCACTTGGT**GCTGGAGAATTCAAAAGTCAAGAACATG**CTAAGCATAAGGGACCC**
AAGTAGAAAGAGATCAAGCAGCAAAGCACAGGTTCTCTGGATGAAATTAAGTACACATAAAAGTTGGGAGACACCTAAGCCAAGAC
 ACTGGTTCTCCTTCCGGAATGAGGCCCTGGGAGGACCTTCTAGCCAAAGACACTGGTTCTCCTTCCAGAATGAGGCCCTGGAAGGAC
 CCTCTAGTGATCTGTTACTCTTAAACAAAGTAACTCATCTAAGATTTTGGTTGGGAGATGGCATTGGCTTCTGAGAAAGGTAGC
 TATGAAATAATCCAAGATACTGATGAAGACACAGCTGTTAACAATTTGGTGATCAGCCCCAGCAATGCCTCAGTGCTTTGGGAGAA
 AGCACCCCTCTTGCCAACAAGCCTGGAAAGCAGAGTGGCCACCCAAAGTTTCTAGAGTTAGACATAAAATCTCTACAAGTAAGACAG
 GATGGAGGAAAGAGTAGACTGAAGAAAAGCCAGTTTCTCATTAAGACACGAAAAAAGAAAAAGAGAAGCACACACACCATGCTCCT
 TTATCTCCGAGGACCTTTCACCTCTAAGAAGTGAAGCCT**ACAACACATTTTCAGAAAGAAG**ACTTAAGCATTCGTTGGTGCTTCAT
 AAA**TTCCAATGAAACATCTCTTCCC**ACAGACCTCAATCAGACATTGCCCTCTATGGATTTTGGCTGGATAGCCCTCACTTCTTGACCAT
 AATCAGAAATTCCTCAAATGACACTGGTCAGGCAAGCTGTCTCCAGGTCTTTATCAGACAGTGCCCCAGAGGAACATATCAAACA
 TTCCCCATTCAAGACCTGATCAAATGCACCTCTACTTCAGACCCAGTCACAGATCCTCTCTCCAGAGCTCAGTGAATGCTTGAG
 TATGACCGAAGTCACAAGTCTTCCCCACAGATATAAGTCAAATGTCCCCCTCTCCAGAACATGAAGTCTGGCAGACAGTCATCTCT
 CCAGACCTCAGCCAGGTGACCTCTCTCCAGAACTCAGCCAGACAAACCTCTCTCCAGACCTCAGCCACACGACTCTCTCTCCAGAA
 CTCATTCCAGAGAAACCTTTCCCCAGCCCTCGGTGAGATGCCATTTCTCCAGACCTCAGCCATACAACCTTTCTCCAGACCTCAGC
 CATACAACCCCTTTCTTAGACCTCAGCCAGACAAACCTCTCTCCAGAACTCAGTCAGACAAACCTTTCTCCAGCCCTCGGTGAGATG
 CCCCTTTCTCAGACCTCAGCCATACAACCTTTCTCTAGACTTCAGCCAGACAAACCTCTCTCCAGAACTCAGCCATATGACTCTC
 TCTCCAGAACTCAGTCAGACAAACCTTTCCCCAGCCCTCGGTGAGATGCCATTTCTCCAGACCTCAGCCATACAACCTTTCTCTA
 GACTTCAGCCAGACAAACCTCTCTCCAGAACTCAGTCAAACAAACCTTTCCCCAGCCCTCGGTGAGATGCCCTTTCTCCAGACCCC
 AGCCATACAACCTTTCTCTAGACCTCAGCCAGACAAACCTCTCTCCAGAACTCAGTCAGACAAACCTTTCCCCAGACCTCAGTGAG
 ATGCCCTCTTTGAGATCTCAGTCAAATTTCCCTTACCCAGACCTCGACAGATGACACTTTCTCCAGACCTTGGTGAGACAGAT
 CTTTCCCCAAACTTTGGTGAGATGTCCTTTCCCCAGACCTCAGCCAGGTGACTCTCTCTCCAGACATCAGTGACACCACCTTCTC
 CCGGATCTCAGCCAGATATCACCTCTCTCAGACCT**TTGATCAGATATTCTACC**CTTCTGAATCTAGTCAGTCATTGCTTTCTCAAGAA
 TTTAATGAGTCTTTTCTTATCCAGACCTTGGTGAGATGCCATCTCTCT**CATCTCCTACTCTCAAT**GATACTTTTCTATCAAAGGAA
 TTTAATCCACTGGTTATAGTGGGCCTCAGTAAAGATGGTACAGATTACATTGAGATCATTTCAAAGGAAGAGGTCCAGAGCAGTGAA
 GATGACTATGCTGAAATGATTATGTGCCCTATGATGACCCCTACAAAACCTGATGTTAGGACAAACATCAACTCTCCAGAGATCCT
 GACAACATTGCAGCATGGTACCTCGCAGCAACAATGGAACAGAAGAAATTTATACATTGCTGCTGAAGAAATATCTCGGATTAT
 TCAGAATTTGTACAAAGgttttggcagttttctctcttttttattt**ctatttttccattactgtgta**

e17
ctgtgtcaacagatttttaattgatttcaactctttgtcctttcagCCATTAATGGGATGATCTACAGCTTGCCCTGGCCTGAAAATG
TATGAGCAAGAGTGGGTGAGGTACACCTGCCTGAACATAGGCGGCTCCCAAGACATTACGTGGTTCACTTTACGGCCAGACCTTG
CTGGAAATGGCAATAACAGCACCAGTTAGGGGTCTGGCCCCCTTCTGCCTGgtaaagattgggtaaatgggaagaggtccctgctaa
gaaatcacgggaaaaggcaatctgtaactccttctcatttctt

e21
gaatttaggcagtggtgacttggtgacaaggacagttctgtttactggctttcctatatattgcagGTGGACATGCAAAAGGAAGTCA
TAATCACAGGGATCCAGACCAAGTGCCAAACACTACCTGAAGTCCTGCTATACCACAGAGTTCTATGTAGCTTACAGTTCCAACC
AGATCAACTGGCAGATCTTCAAAGGGAACAGCACAAGGAATGTGATGgtttgtgtgcatatttctatctgaatctctaga

e22
taaacttttctccttttctctagTATTTTAATGGCAATTCAGATGCCTCTACAATAAAAGAGAATCAGTTTGACCCACCTATTGTGG
CTAGATATATTAGGATCTCTCAACTCGAGCCTATAACAGACCTACCTTCGATTGGAAGTCAAGGTTGTGAGGTAATGgtaagg
tacaaagatgcattattttctcactgccactcaaagaatcaagatttgga

e24
caaaggttttaacatcttctctatctatgtgtttttgtcattttcatagGCAACAACAATAAGCAGTGGCTAGAAATGATCTACT
CAAGATCAAGAAGATAACGCAATTATAACAGGGCTGCAAGTCTCTGCTCTGAAATGTATGTAAAGAGCTATACCATCCACTA
CAGTGAGCAGGAGTGGAATGGAACCATACAGGCTGAAATCCTCCATGGTGGACAAGgtagagtggcatctgggcaagagaagc
aatctgaagactgtgc

e25
tttctctatttggctttcagATTTTGAAGGAAATACTAATACCAAAGGACATGTGAAGAATTTTCAACCCCCCAATCATTTCC
AGGTTTATCCGTGTCATCTTAAACATGGAATCAAGTATTGCACCTCGCCTGGAACCTTTGGCTGTGATATTACTAGAAATGA
ACATTCAAAAACCCCTGGAAGAGACTCTTTAAGACCTCAACCATTTAGAAT

15. ábra

Az *F5* gén Sanger szekvenálásához tervezett primerek. Piros színnel jelölve a nem teljes analitikai szenzitivitású régiók, vastagon szedve a primer szekvenciák, nagy betűvel az exon szekvenciák, iniciátor és termináló kodonok aláhúzva. Transzkript: F5-202 ENST00000367797.8.

NPC1 (referencia szekvencia: ENST00000269228)			
Exon	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	PCR termék hossz
1	AACAGCCCGGGGAAGTAG	CGGAGACAGAAACAGGACAAG	300 bp
2	TGAGTGGGCACTTCTTGTG	CCTCCACCCTGCAATAACAT	286 bp
3	AGTTCAGTGAGGAATGTTGACC	AAGAATAAATGGAAAGCTGAGCA	257 bp
4	CTTGCTGGCCCTATTATGTGTG	CAATTTGCTCTGCTGTCCTG	292 bp
5	CCTCGTGAATTACAGCAAGC	GCAATTCTCTTGCCTCAGTC	337 bp
6	ATTCCATAGGACGAAGCAGC	CCATGCAATGGTATTCATGGAGG	551 bp
7	GAAGGCAGTAATTAGGGAGG	TGCAACCCCACTGAGGAAACG	285 bp
8	GTTCCGACTTTCAGGAACGGC	AGCCCCAAATCCCCATCTAGC	530 bp
9	AATCAAGATCTGAGAGAAATGTGA	GCTTTTGCCCATGTACCCTA	360 bp
10	AGCCAGCCTCATCAATGTT	AAACTGCCCAATTTATGAAATCTT	298 bp
11	GTTGTGATTTTCCCCTGGT	GAAAATGAAGTTTAAGTGCTTGC	267 bp
12	GGGAGAAGTTTCTTACTTAGCTGTCA	TGGAATAAGAATAAAGAGGCAAAAA	345 bp
13	GCCCTGTAAAGTAAAAAGGAGGA	GCCATTCACAGTCCCTGAAA	335 bp
14	CAAGGCAGCAAGAAATGGCG	CATGTTCAAGGTAGCCAGCTC	262 bp
15	CATGCACATGAACATAAGACCTG	AGGGGACAGAGGGAAACAAA	300 bp
16	TTGGTGCCAGGATTATAGTCTATTT	AAGGCATGTGATAATCTGTTTCA	293 bp
17	TGTATCCCTATTAGCCTGTC	CTTGCTTGAAACACCTACGTGC	318 bp
18	ACCTCCTGGCACCCCTCTTAT	GCTGACTGCCTGGCTGAG	349 bp
19	AAAAGGAAGTTAGGTTTAAAGAAAAAG	AATAGGTATAAACTGAGGCACGA	300 bp
20	GGAAAGTAATCGATAGAGAAGAAAGT	CCCAGTCCTCTCCTAGTTTCT	320bp
21	TTTGCTTAGCCTCAAGTGCTC	ACTCCCACCCAGTGTAGGC	345 bp
22	GTGGTGACAGGATGAACACG	CAATTCACCCCAAGTGAAACA	362 bp
23	TGGGTAATTAGCACCCATCC	AAGTACAGGATCCAGACTCTTCAG	290 bp
24	GGGCAGGAGAATCACTTGAA	GCCTCAGGATAGAATTCCCTTT	338 bp
25	GGCTGGTCTCAAGCAATTCTC	GTGTTCAACTTGGCCTTGC	300 bp

4. táblázat. Az *NPC1* gén amplifikációjához és Sanger szekvenálásához használt primerek szekvenciája és az amplikonok hossza.

Fragment	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	PCR termék hossz
1	CCGAGAGGACTCTGCAGTGA	TAGTCACTTGGACCTCAATG	477 bp
2	GTGCAGCTGGCTGCTCTT	GATGGTGGCGCTGATGAT	406 bp
3	CGCCTCTGCTTCATGCTA	CTGTGGTCCCTCATCAAGCTG	479 bp
4	CTGCACCACCACCAGGAC	CGGGCTACATACCACATGG	413 bp

5. táblázat. A *KCNJ11* gén amplifikálására és Sanger szekvenálására használt primerek szekvenciája és az ampikonok hossza. Referencia szekvencia: ENST00000339994.

GCK (referencia szekvencia: ENST00000403799)			
Exon	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	PCR termék hossz
1	TCCACTTCAGAAGCCTACTG	TCAGATTCTGAGGCTCAAAC	195 bp
2	TGCAGATGCCTGGTGACAGC	CACAGCTGCTTCTGGATGAG	290 bp
3	TAATATCCGGGCTCAGTCACC	CTGAGATCCTGCATGGCCTTG	295 bp
4	GTCCCTGAGGAATAGCTTGG	GGTATGGGGGCTACATTTGA	301 bp
5,6	TAGCACCTGCCTCCAGTAT	GCCCTTGAAGCCTGTTGTA	430 bp
7	CAGCTCTCGCTGACAGTCC	CAAGCCCATTATCTGCAATG	312 bp
8	TGCCTGCTGATGTAATGGAC	TGAGACCAAGTCTGCAGTGC	263 bp
9	ACTGTGCGGAGCGACACTCAG	CTTGGAGCTTGGGAACCGCA	367 bp
10	GTCGACTGCGTGACGGGCGC	TGTGGCATCCTCCCTGCGCT	263 bp

HNF1A (referencia szekvencia: ENST00000257555)			
Exon	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	PCR termék hossz
1	CAGTGGGTGCAAGGAGTTTG	GCCCTCTAGGCTCTCCTG	491 bp
2	GGTTCAGCACCCAGGAC	TGTGTAATGGGGATGGTGAA	380 bp
3	AGTGATGGCATGTGTGCTGT	GCCAGGCTAAGCCAATATCA	498 bp
4	GGACAGGGTTCCTCTGAGC	AAAGAGGTTTAGGTGACTGCTG	385 bp
5,6	GGCAGACAGGCAGCTGGCCTA	GTTGCCCCATGAGCCTCCAC	647 bp
7	CTCTGGGAAGGAGAGGTGGT	GTCCCAGAGACACATGCAGA	397 bp
8,9	GAGGCCTGGGACTAGGGCTGT	CGGACAGCAACAGAAGGGGTG	504 bp
10	AGGGTAGAGGTGTGACTTTGGG	CATCTGCCATGAACAGGCTTT	528 bp

HNF4A (referencia szekvencia: ENST00000316673, ENST00000316099)			
Exon	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	PCR termék hossz
1 (P1)	CCAACAAACAGCCAAATCCCT	GGCTTCACTTGGCAACACCT	534 bp
1 (P2)	ACGTATCCACCCACCTTGG	AAACACACGGGGAGGTGTC	300 bp
1b	TCTGGTGTGCACGACTGCAC	CTGGAGCTGCAGCCTCATAC	325 bp
2	GAGGTGATGGAGTGGGAACAG	AGAAGAGCCTTGAAGGCCCT	431 bp
3	CCTAGTTCTGTCCTAAGAGG	GTCATAAAGTGTGGCTACAG	275 bp
4	CCCACTCCTCATCAGTCACA	AGAATGGAGGTGGAGGAGGT	264 bp
5	CCCTCCGTTTTTACCCTGAG	CCACGGCTATATCCCAGGT	400 bp
6	ACAGTTCAGGCAGGTAGAGGCA	CCCTGATCGTGCTCTGACTTC	455 bp
7	GCACCAGCTATCTTGCCAAC	AGGAGAAGTCTGGCAGAGCG	311 bp
8	AATTCATGCTGGCGTACCCT	CTTAGAACAGTGACTGGCACGTG	626 bp
9	ATATTGGATGGGCTGGTTGA	TTGCCCTTTATTCCCTACCC	395 bp
10	GATCTGGGACTCACAGAAGGTTG	TGTTATCCAGAGCAGGGCG	537 bp

6. táblázat. A három leggyakoribb MODY gén amplifikációjához és Sanger szekvenálásához használt primerek szekvenciája és az ampikonok hossza.

Primer	Homopolimer típus és hossz	Primer szekvencia (5'-3')
Mutgen 4A F	4A	CGGATCCACTAGTCCAAAAGTGTGGTGGGAATTCTG
Mutgen 4A R		CAGAATTCCACCACACTTTTGGACTAGTGGATCCG
Mutgen 5A F	5A	CGGATCCACTAGTCCAAAAAGTGTGGTGGGAATTCTG
Mutgen 5A R		CAGAATTCCACCACACTTTTGGACTAGTGGATCCG
Mutgen 6A F	6A	CGGATCCACTAGTCCAAAAAGTGTGGTGGGAATTCTG
Mutgen 6A R		CAGAATTCCACCACACTTTTTTGGACTAGTGGATCCG
Mutgen 4T F	4T	CGGATCCACTAGTCCATTTTGTGTGGTGGGAATTCTG
Mutgen 4T R		CAGAATTCCACCACACAAAATGGACTAGTGGATCCG
Mutgen 5T F	5T	CGGATCCACTAGTCCATTTTGTGTGGTGGGAATTCTG
Mutgen 5T R		CAGAATTCCACCACACAAAATGGACTAGTGGATCCG
Mutgen 6T F	6T	CGGATCCACTAGTCCATTTTGTGTGGTGGGAATTCTG
Mutgen 6T R		CAGAATTCCACCACACAAAATGGACTAGTGGATCCG
Mutgen 4C F	4C	CGGATCCACTAGTCCACCCCGTGTGGTGGGAATTCTG
Mutgen 4C R		CAGAATTCCACCACACGGGGTGGACTAGTGGATCCG
Mutgen 5C F	5C	CGGATCCACTAGTCCACCCCGTGTGGTGGGAATTCTG
Mutgen 5C R		CAGAATTCCACCACACGGGGTGGACTAGTGGATCCG
Mutgen 6C F	6C	CGGATCCACTAGTCCACCCCGTGTGGTGGGAATTCTG
Mutgen 6C R		CAGAATTCCACCACACGGGGTGGACTAGTGGATCCG
Mutgen 4G F	4G	CGGATCCACTAGTCCAGGGGTGTGGTGGGAATTCTG
Mutgen 4G R		CAGAATTCCACCACACCCCTGGACTAGTGGATCCG
Mutgen 5G F	5G	CGGATCCACTAGTCCAGGGGTGTGGTGGGAATTCTG
Mutgen 5G R		CAGAATTCCACCACACCCCTGGACTAGTGGATCCG
Mutgen 6G F	6G	CGGATCCACTAGTCCAGGGGTGTGGTGGGAATTCTG
Mutgen 6G R		CAGAATTCCACCACACCCCTGGACTAGTGGATCCG
Mutamp 1 F	változó	AAGACTCGGCAGCATCTCCA GAGCTCGGATCCACTAGTCC
Mutamp 1 R		GCGATCGTCACTGTTCTCCA CCCCAGAATAGAATGACACC
Mutamp 2 F	változó	AAGACTCGGCAGCATCTCCA CGTGTACGGTGGGAGGTCTA
Mutamp 2 R		GCGATCGTCACTGTTCTCCA CAACAGATGGCTGGCAACTA
Mutamp 3 F	változó	AAGACTCGGCAGCATCTCCA CACCAAAATCAACGGGACTT
Mutamp 3 R		GCGATCGTCACTGTTCTCCA GATATCTGCAGAATTCACCA

7. táblázat. A plazmid rendszerben vizsgált homopolimerek létrehozásához és amplifikálásához használt primerek szekvenciái.

Primer	HP c.DNS pozíció	HP típus és hossz	Primer - HP távolság (bp)	Primer szekvencia (5'-3')
CF e1-1-A F	c.44_50	7T	21	AAGACTCGGCAGCATCTCCA GGGAAAGAGCAAAAGGAA(G/A)G
CF e1-1-A R				GCGATCGTCACTGTTTCTCCA CACGTGCTTTCCGAAG(C/T)TC
CF e1-1-B F			5	AAGACTCGGCAGCATCTCCA AAAA(G/A)GCCAGCGTTGTCTC
CF e1-1-B R				GCGATCGTCACTGTTTCTCCA TCAGCTTCAGTTTCATTCTTCCA
CF e2-1-A F	c.152_156	5A	21	AAGACTCGGCAGCATCTCCA TTCCATATGCCAGAAAAGTTGA
CF e2-1-A R				GCGATCGTCACTGTTTCTCCA TGAATTTCTCTCT(T/C)CAACTAAACAATG
CF e2-1-B F			5	AAGACTCGGCAGCATCTCCA (C/T)TGTTG(A/T)TTCTG(C/T)TGACAATCT
CF e2-1-B R				GCGATCGTCACTGTTTCTCCA CTCCTGGTCTCAAGCAATCC
CF e3-123-A F	c.193_197 c.228_233 c.259_263	5A 6T 5T	változó	AAGACTCGGCAGCATCTCCA CCTTGGATATACTTGTGTGAATCAA
CF e3-123-A R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA CATAATGAATGTACAAATGAGATCCT
CF e3-123-B F				AAGACTCGGCAGCATCTCCA GCAACTTATTGGTCCCACTTTT
CF e3-123-B R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA CACCAGATTTCGTAGTCTTTTCA
CF e4-1-A F	c.425_429	5T	12	AAGACTCGGCAGCATCTCCA TTTCTGTGTTTTCCCTTTTG
CF e4-1-A R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA GCATTCCAATGTGATGAAGG
CF e4-1-B F			14	AAGACTCGGCAGCATCTCCA TGAGGACACTGCTCCTACACC
CF e4-1-B R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA GAGCATTAATTAATCTCGCCATTT
CF e6-1-A F	c.704_708	5T	19	AAGACTCGGCAGCATCTCCA CTGCTTCTGTGGACTTGGT
CF e6-1-A R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA GACACTGAAGACTCACTGTTCTATGC
CF e6-1-B F			19	AAGACTCGGCAGCATCTCCA TGCTCAGAACCAC(G/T)AAGTGT
CF e6-1-B R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA TCATCATCATTTCTCCTAGCC
CF e7-1-A F	c.845_850	6A	0	AAGACTCGGCAGCATCTCCA AATAAAATAATGCCATCTGTTG
CF e7-1-A R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA CAACTTACTGTCTTAAGTTTTCATCA
CF e7-1-B F			5	AAGACTCGGCAGCATCTCCA GCATACTGTGGGAAGAAGC
CF e7-1-B R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA CCCATGAAAGTGAATTTGTGC
CF e8-1-A F	c.955_959	5T	1	AAGACTCGGCAGCATCTCCA TTCCATTCCAAGATCCCTGA
CF e8-1-A R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA (A/C)GTGCATA(G/C)GGAAGACAGA
CF e8-1-B F			0	AAGACTCGGCAGCATCTCCA TTCTCAGGGTCTTTTGTGGTG
CF e8-1-B R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA GCACATTTTGCAAAAGTTCA
CF e10-1-A F	c.1257_1261	5A	11	AAGACTCGGCAGCATCTCCA GGCCATGTGCTTTTCAAAC
CF e10-1-A R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA TTAAGTGAAGAAGAGGCT(G/A)TCATC
CF e10-1-B F			9	AAGACTCGGCAGCATCTCCA TTTGAGAAAGCAAAACAAAACAA
CF e10-1-B R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA CCTTCCAGCACTACAACTAGAA
CF e13-1-A F	c.1748_1752	5A	8	AAGACTCGGCAGCATCTCCA GCTACTTTCGACCACACTTTTGA
CF e13-1-A R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA AAGGTATTCAAAGAA(C/A)ATACCTTTCA
CF e13-1-B F			5	AAGACTCGGCAGCATCTCCA TCTCCTTTTGGATA(C/T)CTAGATGTTT
CF e13-1-B R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA TGAATCCTGGCCAGTAGG
CF e14-123 F	c.1874_1878 c.2046_2052 c.2083_2088	5T 7A 6A	változó	AAGACTCGGCAGCATCTCCA AATTTTGCATGAAGGTAGCAG
CF e14-123 R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA TCGTATAGAGTTGATTGGATT(G/C)AGA
CF e14-123C F	c.2046_2052	7A	11	AAGACTCGGCAGCATCTCCA TTGCATGAAGGTAGCAGCTATT
CF e14-123C R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA CCCAACTCTCCAGTCTGT
CF e14-V3 F	c.2046_2052 c.2083_2088	7A 6A	változó	AAGACTCGGCAGCATCTCCA GATGCTCCTGTCTCTGGAC
CF e14-V3 R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA -CAGGACAGACTGCCTCCTC3'
CF e15-123 F	c.2497_2502 c.2579_2583 c.2606_2610	6T 5T 5T	változó	AAGACTCGGCAGCATCTCCA GCCATAATTCTTTTATTCAAGGAGTG
CF e15-123 R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA TTTACAATAGAACATTCTTACCTCT(G/T)C
CF e20-1-A F				c.3317_3321
CF e20-1-A R	GCGATCGTCACTGTTCTCCA TGAAGGTAAC(A/G)GCAAT(G/A)AAGAAGA			
CF e20-1-B F	8	AAGACTCGGCAGCATCTCCA CGCTGGTTCCAAATGAGAAT		
CF e20-1-B R		GCGATCGTCACTGTTCTCCA TGGAAATTCAAAGAAATCACTTG		
CF e22-1-A F	c.3619_3623	5G	0	AAGACTCGGCAGCATCTCCA TTGTGAAATTGCTGCCATTCT
CF e22-1-A R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA TGAGATCTTTGACAGTCA(T/C)TTGG
CF e22-1-B F			17	AAGACTCGGCAGCATCTCCA TGAGAATT(C/G)ACACGT(G/T)AAGAAAG
CF e22-1-B R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA TGCTTCAGGCTACTGGGATT
CF e23-1-A F	c.3768_3773	6T	19	AAGACTCGGCAGCATCTCCA TGTGCAACAAGGTTTGAATGA
CF e23-1-A R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA CCAT(C/T)(G/A)ATCTGGATTCTCC
CF e23-1-B F			6	AAGACTCGGCAGCATCTCCA TGGATCAGGGAAGAGTACTTT(G/A)TT
CF e23-1-B R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA TTTCTTGAGTACAAGTATCAAATAGCA
CF e24-12-A F	c.3884_3889 c.3903_3908	6T 6A	változó	AAGACTCGGCAGCATCTCCA AAAGAATGATACAAAGCAGACATGA
CF e24-12-A R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA CCACTGTTTCA(T/G)GGATCCAA
CF e25-1-A F	c.4024_4028	5G	18	AAGACTCGGCAGCATCTCCA TCAAATGGTGGCAGGTAGTG
CF e25-1-A R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA AGCAGATCAA(C/G)TGCTTGTGG
CF e25-1-B F			8	AAGACTCGGCAGCATCTCCA TGGGAAGCTTGA(C/T)TTGTCC
CF e25-1-B R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA TCACCATGAAGCAGGCATAA
CF e26-1-A F	c.4237_4241	5T	16	AAGACTCGGCAGCATCTCCA TTAAGT(T/C)TCTGTGATATTATGTGTGG
CF e26-1-A R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA AAGGGCAATGAGATC(T/G)TAAGTAAA
CF e26-1-B F			10	AAGACTCGGCAGCATCTCCA CAGGATAGAAGCAATGCT(G/A)GA
CF e26-1-B R				GCGATCGTCACTGTTCTCCA CACCACATGGCTCAGATCAA

8. táblázat. A *CFTR* génben vizsgált homopolimerek amplifikálásához használt primerek szekvenciái.

Primer	Primer szekvencia (5'-3')
CF e5 F	AAGACTCGGCAGCATCTCCATGTTGAAATTATCTAACTTTCCATTTT
CF e5 R	GCGATCGTCACTGTTCTCCAAGGGAAGCTAGAGCTGAGCA
CF e9 F	AAGACTCGGCAGCATCTCCAGCTTGGCAAATTAACCTTAGAACA
CF e9 R	GCGATCGTCACTGTTCTCCACGCCATTAGGATGAAATCCA
CF e11 F	AAGACTCGGCAGCATCTCCACAAGTGAATCCTGAGCGTGA
CF e11 R	GCGATCGTCACTGTTCTCCATGGGTAGTGTGAAGGGTTCAT
CF e12 F	AAGACTCGGCAGCATCTCCAGAAGGAAGATGTGCCTTTCAA
CF e12 R	GCGATCGTCACTGTTCTCCACTAGCCATAAAACCCAGGA
CF e17 F	AAGACTCGGCAGCATCTCCAGCTGCCAAATAACGATTTCC
CF e17 R	GCGATCGTCACTGTTCTCCAAACCACAGGCCCTATTGATG
CF e18 F	AAGACTCGGCAGCATCTCCATTTGGGTCTGAATGCGTCT
CF e18 R	GCGATCGTCACTGTTCTCCACAGGACTTCAACCCTCAATCA
CF e19 F	AAGACTCGGCAGCATCTCCAGACACACTTTGTCCACTTTGC
CF e19 R	GCGATCGTCACTGTTCTCCATGAGTATCGCACATTCAGTGC
CF e21 F	AAGACTCGGCAGCATCTCCAGGTTCAATTTACGTCTTTTGTGC
CF e21 R	GCGATCGTCACTGTTCTCCATGACAGATACACAGTGACCTCA
CF e27 F	AAGACTCGGCAGCATCTCCATTCTGTCCCTGCTCTGGTCT
CF e27 R	GCGATCGTCACTGTTCTCCAGAGCAAATGTCCCATGTCAA
CF e16 F	AAGACTCGGCAGCATCTCCAGCATGGGAGGAATAGGTGAA
CF e16 R	GCGATCGTCACTGTTCTCCATGCTTGGGAGAAATGAAACA

9. táblázat. A *CFTR* homopolimert nem tartalmazó exonjainak amplifikációs primerjei.

<i>DHCR7</i> saját tervezésű primerek gDNS szekvenáláshoz			
Szakasz	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	PCR termék hossz
e2	GAGCTTCTGCCCTCTCCTG	TCAACGCTGTGAAGCCATAG	247 bp
e7	GCTGGGCTCTCGCTAAGTAA	GCAGTAGATTAAGGTCATGGGAAT	383 bp
e9	-	ATGTAGAAGTAGGGCAGCAGGTGGC	372 bp
PM1	CCTGACACCCATGTGTTTACC	CCGACTCGAGATTGACG	366 bp
PM2	AGCTGGGATCCCGAAGAAG	CACGCCGCCTACCCTCTA	290 bp
PM3	GCAATCGCTGACATC ATCC	CCTGTGAGTGGGCACCTG	234 bp
3UTR1	CTACATGGCCATCCTGCTG	CCCCAGGGACACTGATTAGA	381 bp
3UTR2	GTTCTTGCTTTTGCCTTCA	GGAGGGGGATCTAGAGCTGA	300 bp

<i>DHCR7</i> saját tervezésű primerek cDNS szekvenáláshoz			
Exon	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	PCR termék hossz
DHCR7mR1	TGACAGAACCGCATCTCAA	CTCCTACGTAGCCGGGTAGA	323 bp
DHCR7mR2	TACCTTGTGGGTCACCTTCC	ATTGGTCACATGGCTGTGG	505 bp
DHCR7mR3	GATCGGGAAGTGGTTTACT	GCCACCGGAAGATGTAGTA	378 bp
DHCR7mR4	GACTGTGTCTGGCTGCCTTA	AGGATGGCCATGTAGATGATG	389 bp

10. táblázat. A *DHCR7* gén genomiális DNS (gDNS) és komplementer DNS (cDNS) analíziséhez használt saját tervezésű primerek szekvenciája és az ampikonok hossza. Rövidítések: PM (promoter), 3UTR (3' le nem fordított régió).

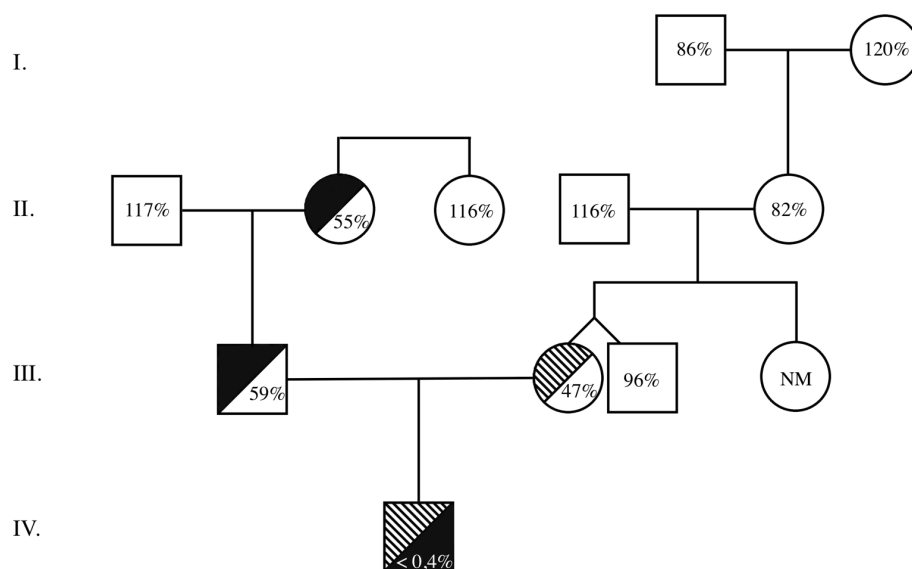
Exon	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	PCR termék hossz
1	GCAAGAGCGGCGGGAG*	TGAAACTTGGGAGACCCAC*	246 bp
2	TCTGCCAGGATTCATCTTGC*	CAACACAACAAAAGAAGGAC*	248 bp
3	TCGTGTTCCAAATCCATGTG*	GGGGTATAACCACATAAAATAAT*	196 bp
4	AACTCCTGTGAGCTGTTGC*	GCTGTGTCCAGGTAATCG*	271 bp
5	TTTATTGTTGTCCTTCCAGAGG**	GCCATGCAGACCCAATGTC**	271 bp
6	TCTGCATGATGGTTCCTGC*	CCAGAGCAATAAGATTAATCC*	307 bp
7	TCTGCAATGAATTTTCATATGAG*	ACTACACCCCCCACTGC*	222 bp
8	ACTGACGAATGGTTTATATTG*	TACACAAACCATGCATGCTG*	224 bp
9	GTTACAAGTATTATCTCAGCG*	TGAGGGCTGGGATGGGATA***	261 bp
10	CAGCTGTGTGTTTGTGTTTG*	ATGTTAACTTGAACAATGCAAG*	268 bp
11	ACTGATGAAAGATACCATAGTT*	AGGAACAGAATTACAACAGAC*	249 bp
12	CTTAGAATTATGAGGTATTGCT***	CAGTTAGCATATATGTCCAC*	226 bp
13	TCCCTAAATAAAGCTATTTC*	TGAAACTGCAATGGAAGGAG*	218 bp
14	TCTGGTCATAAGAAAATGTATG*	AGGAGAAAAGGCACGTGAAG***	208 bp
15	TGTCACCTTCATTTTAAATAAGTG*	GTGACAGAGGCTGAACCTC*	212 bp
16	CTCATCTGTTTGAAGTGACAG*	GGTGGCAGAAGGCTGGC*	251 bp
17	TTTAAATGGGAGCCTGGTG***	ACCCACAAGAAAGCCTGATG***	295 bp
18	TGAGAAAAAGAGACAGAGTGT*	TCTAAGCTACTCAAAGGCAG*	375 bp
19	AAAGTTTGGGCCCTTTTAAAG*	ATAGCAAAGTACACAGTATAAG*	211 bp
20	CCAAGACTAGATTTTAGCAG*	TTAAGTATAACAACATTGATAAAC*	220 bp
21	GTGTATGTTTGAATTTTATATAG*	TTCTCATGTGAGCCTAGATAAA***	290 bp
22	CTACTTCATGTTCCAGGTC*	CTGTTCCGTTTTGTAGTTCCTC*	311 bp
23	GTTTTATGAACTTACCAGGTTTC*	ACCTGAAGCTAAGTGCTCA***	333 bp
24	GCCGTGTGGCTCTATTTAAC***	ATTGGCCATGGAAAACGTAA***	298 bp
25	CAAGAACTTCCAACTTCATG*	TTAAAGGACGTCCTCTCTC*	271 bp
26	AATTAAGGCTGTCTGAGAC*	CATGGAATCCTTCTCTTCTG*	227 bp
27	GGCCCCACCTTTTAACATG*	GTGTGAAAGTCTTTCTCCT***	185 bp
28	TGCCAAAGTTGGAAGCTTATG*	TCAGAGTACATAGAGTGT***	300 bp
29	CAGACATCCAAACCATATCAG*	GAACCTACTGAGAGATTCAAC*	214 bp
30	AATAGTCTTATGCTAGTAGGC*	ACAGTGCTTATGACTAACAAG*	292 bp
31	GTACTCAATGATATCAAAATAGC*	ACCAATCTCTTAACCTACTTAATA*	230 bp
32	CCAAAAGACATTGTGCTGAG*	GTGTAATCTATGCAGTCTTG*	226 bp
33	GGTTTTAAATACCACCCTTTC*	CTGGCTTCTCTGACTAGTG*	224 bp
34	CGAGGAAGAGTAACGTGTG*	TCAAGCCAGCAAGGCTC*	203 bp
35	AGTTTTTGTCTTTTCTCCCTC*	CGGGACACCAGGGAGCTG*	197 bp
36	GATAACTCCACTACTCAGT***	AATACACAGTATGCTTGCTC*	199 bp
37	GTAGAAAGATTCTGCCTGATG*	GAAGTGGCTGGAGTTGAAAT*	260 bp
38+39	AAAAACTTTAGATTCAAAACAACCTCAA***	CCTTATCATCTACCAGGACCA***	366 bp
40	AAATGTGAAGTTTTTCATATTCAC*	CATGCATTACTGAGAAAAGCT*	201 bp
41	GCTTGTGTAGATCCACTTAG*	GCTTCCTTCGCTAAGACTG*	332 bp
42	CTATCCTCCCATCCCACCTT***	CAGGGTGTGTCACAGTTTG***	273 bp
43	TGTCCTGTCACTCATGAATG*	CTCTTTTCTGGATATGATAAAG*	200 bp
44	CTGTTCCTTCAAATTCAGT*	GTAGGCATGTCCAGCCTG*	193 bp
45	GAGCTAGGATTACTCCTGAG*	CTGCTGCATATCTGTCTGTG*	362 bp
46	AAGTTCTCAGCCTATGGATG*	TGGAACACTAGAGATGATGC*	317 bp
47	TATTAAGGATTGTTGGGGA**	TTCCAGGTCTTTCTAAGTCC**	189 bp
48	GATGGAAGTCATGCCAGTG*	GGACACCCGACACTCCTC*	219 bp
49	TGATGATGTCTCCATCGTGT**	TGCAGCATTGAAAGCCCAAA**	217 bp
50	ACGGACTCAGTAGGAAAGC*	CAGTCTGCACCCTGCATG*	249 bp
51	AATCACAGATGCCAAGGAG***	CTGAGAAATGCTGAGAATCCA***	297 bp
52	TTTTGTCCCTTCATTTAGATAGCA***	TTTGTAAGTTCTATGGAAGAAAA***	291 bp
53	TTATCTCAATTCATCATGTTTG***	CCATCAGGCCTAGATGATC*	291 bp
54	TTTTGTGCTGTCCATGATC*	CTCACAGATAAAGCTTCCTG*	222 bp
55	GCAGATATATGCATTTCTTTG*	GTCCACTGTCACCTCTGATG*	236 bp
56	TGGTCAGATGACTCTTCTTG*	GTGTGGAGGCTGAGGTTAG*	219 bp
57	ATTTCCTGACATCCCTTTG*	CAAATAAATAGATTCCCTGCAAG*	295 bp
58	CACTGAAGTGACCCCTTAC*	AATTTCCAATTGAGGATAAGC*	243 bp
59	GCGTGTACACATCATTTTAG*	ATGTGTACAGGAGCTAGGTG*	222 bp
60	ATCCTGTTTTGTTGGCTTGAC*	GAATCGCTACAATCCATGTAG*	210 bp
61	GTATGTGTGAGCACACCTG*	CTCCACAAGGATTCACCAG*	323 bp
62	AGAGATGTTGAGTTGGCATC*	TAGGACCTGATAGCCATGC*	211 bp
63	AAGTGGCCAGATCCAATGTC***	ATCTCCAACCATGACCAGGA***	341 bp
64	CCTACCTGTCTTCCCATTC*	AGTTTCTCCCTGGGAGC*	344 bp
65A	AATATGAGAGCTAAGTGGCATATGTA***	TGAATAGGTTCCAGCCACTG***	319 bp
65B	CAACCAAAAGGAAGGGATCA***	TGATTCTGATTGGGGGAAAA***	278 bp

11. táblázat. Az *FBN1* gén exonjainak amplifikálására és szekvenálására használt irodalmi (*: (466), **: (467)) és saját tervezésű primerek (***) szekvenciája és az ampikonok hossza.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. FV deficiencia

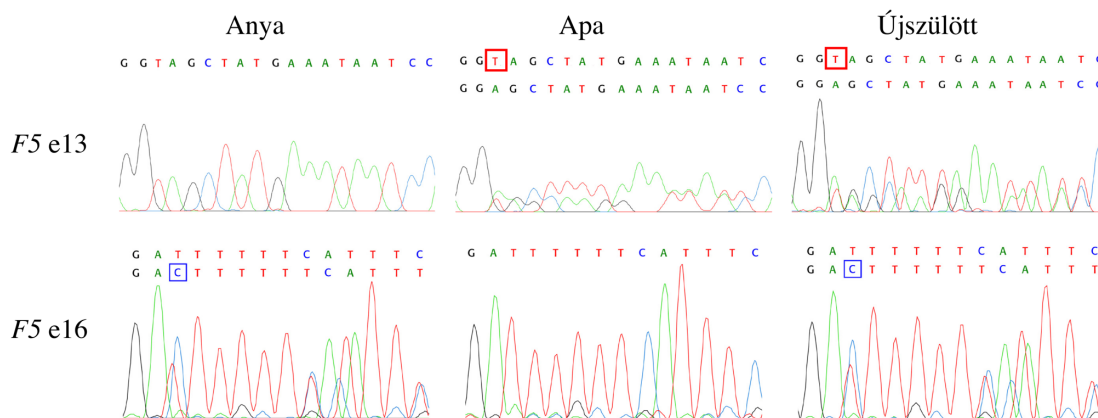
Az FV aktivitás szint a beteg plazmájában (16. ábra) és thrombocyta lizátumában is detektálhatatlanul alacsony volt.



16. ábra. FV aktivitás a betegben és családtagjaiban.

NM: nem mért, fekete kitöltés: c.2952delT, sátrózás: c.5493insG heterozigóta mutáció a *F5* génben.

Az apa, az anya és az egyik nagymama esetében az enyhén csökkent FV aktivitás szint a heterozigóta állapotnak felelt meg. A DNS szekvenálás két kóroki eltérést definiált, mindkettőt heterozigóta formában, a c.2952delT és a c.5493insG mutációkat (17. ábra).



17. ábra. Mutáció analízis a *F5* génben. Az érintett nukleotidok bekeretezve (az e16 esetén a reverse szál elektroferogramját tüntettem fel).

Az édesanya heterozigóta volt az 5493insG-re, míg az édesapa heterozigóta a 2952delT-re. Mindkét kóroki mutáció olvasási keret eltolódást és korai terminációt okoz, az egyik a 930., a másik az 1776. aminosav pozícióban. A FV antigén szint a beteg plazmájában rendkívül csökkent, de detektálható mennyiségben volt mérhető (12. táblázat).

	FV antigén szint (%)	FV nehéz lánc antigén szint (%)	FV könnyű lánc antigén szint (%)
I.1	74	84	64
I.2	112	123	107
II.1	86	96	92
II.2	32	41	50
II.3	86	135	105
II.4	99	132	118
II.5	97	116	91
III.1	62	37	50
III.2	33	30	49
III.3	110	122	105
beteg	1,03	1,7	< 0,5
Referencia tartomány	64-139%		

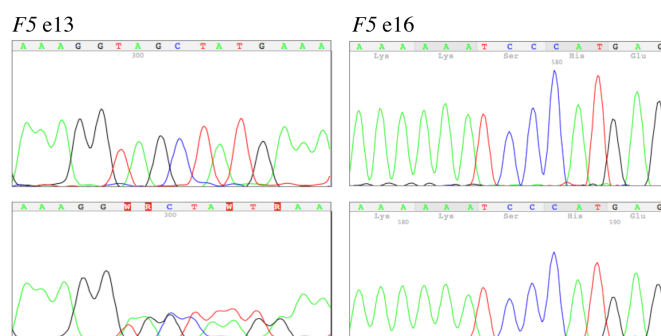
12. táblázat. FV antigén szint három különböző ELISA-val mérve. Dr. Ajzner Éva mérései.

Az ELISA rendszerek a FV N-terminálisát (nehéz lánc és B-domén) tudták csak kimutatni. A szülők 50% körüli antigén szinttel rendelkeztek. A beteg plazmájában Western blottal FV molekulát nem lehetett kimutatni, de az immunprecipitációval százszorosra koncentrált FV antigént egy nagyon halvány 236 kDa körüli sáv formájában lehetett kimutatni monoklonális anti-FV B-domén ellenes antitesttel (itt nem mutatom be), illetve poliklonális anti-faktor V antitesttel is. Intakt FV-öt nem lehetett detektálni. Úgy gondoljuk, hogy ez a 16-os exonban mutáns fehérje, amely esetében a könnyű lánc jelentős része hiányzik és az 1775 aminosavas antigén végső soron

200 kDa körüli molekula súlyú lenne (figyelembe véve, hogy B-domén nagyon glikozilált). A kimutatott sáv megfelelhet ennek a 236 kd-os fehérjének is, amelyet az immunprecipitációt követő immunoblottinggal sikerült detektálni.

A teljes FV hiány nem összeegyeztethető az élettel, de elképzelhető, hogy az igen kevés antigén amit ki tudunk mutatni, elegendő a túléléshez szükséges prokoaguláns aktivitáshoz. Lehetséges, hogy ennek a rövidebb, trunkált fehérjének van egy nagyon kicsi maradék prokoaguláns aktivitása, amely megóvja a beteget a végzetes következményektől.

Ennek a tanulmánynak a publikáltakon túli tanulsága az, hogy egyik első példája volt a diagnosztikai tudományos tevékenységünk során, hogy a családra jellemző detektált mutációk vizsgálatát prenatális diagnosztikai eljárásban is fel tudtuk kínálni a szülőknek. Ebben az esetben a prenatális diagnosztika chorion biopsziából történt és a magzat esetében az egyik mutáció heterozigóta voltát a másik mutáció esetében a vad allél jelenlétét igazolta (18. ábra), ezáltal a FV hiány kizárható volt, amely tény egyébként születés után megerősítést is nyert.

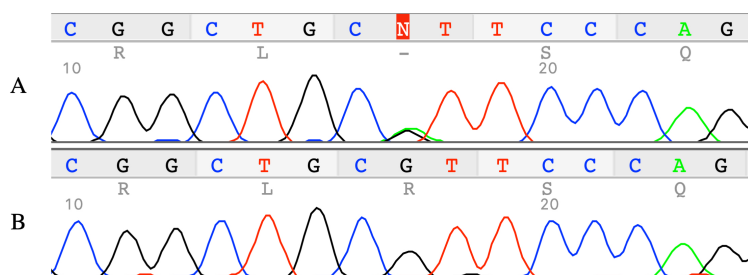


18. ábra. Magzati minta célzott vizsgálata a *F5* c.2952delT (e13) és a *F5* c. 5493insG (e16) mutációkra (nem publikált eredmény). A magzat heterozigóta a *F5* c.2952delT mutációra.

Összességében ezek a genetikai eredmények vezethetnek oda, hogy gyors és pontos célzott molekuláris teszteléssel lehet vizsgálni a családra jellemző mutációkat egy ilyen súlyos ritka betegség esetében. Az ebben a tanulmányban levő fehérje szintű vizsgálatokat Dr. Ajzner Éva végezte, én a DNS szekvenálás megtervezésében, kivitelezésében, optimalizációjában, az eredmények értékelésében vettem részt.

4.2. *HNF4A*-MODY első hazai esete

A szekvenálás a *HNF1A* és *GCK* génekben patogén eltérést nem tudott kimutatni, míg a *HNF4A* génben a c.869G>A, p.Arg290His misszensz mutációt detektált heterozigóta formában (19. ábra).



19. ábra. A *HNF4A* c.869G>A, p.Arg290His mutáció (A), normál kontroll (B).

Ez a mutáció a szakirodalomban korábban leírt, ismert patogén eltérés (498). Eredményeink alapján mindkét beteg esetében az inzulin terápia felfüggesztésre került, diéta tartása mellett sulfonylurea (gliclazid) adása indult meg. A terápiaváltást követő egy évben a betegek követése során a klinikum kiváló anyagcsere helyzetet észlelt, a betegek panaszmentesek. Kaszkád vizsgálatot végeztünk, az elérhető vérszerinti rokonok egyikében sem tudtuk kimutatni a fenti mutációt.

Ebben a munkában két beteg, anyja és lánya történetét dolgoztuk fel, sikerrel definiáltuk a MODY molekuláris genetikai okát. Az eset kiválóan példázza azt a nehézséget, amellyel a klinikum szembesül a (monogén) diabetes diagnosztikája és klasszifikációja során. Ebben az esetben a két beteg 16 éven, illetve 6 éven keresztül részesült inzulin terápiaiban, mielőtt a monogén diabetes (ez esetben MODY) genetikai diagnózisa felállításra került volna és ezáltal az inzulinterápia elhagyhatóvá vált, nagy mértékű életminőség javulást eredményezve. A két beteg esetében korábban mind 2-es, mind 1-es típusú diabetes diagnózisát felállították, annak ellenére, hogy a családi halmozódás valamint a diabetes sajátosságai egyértelműen a MODY irányába mutatnak. Ennek a publikációnak a személyre szabott kezelésen túli tanulságait az alábbiakban látom:

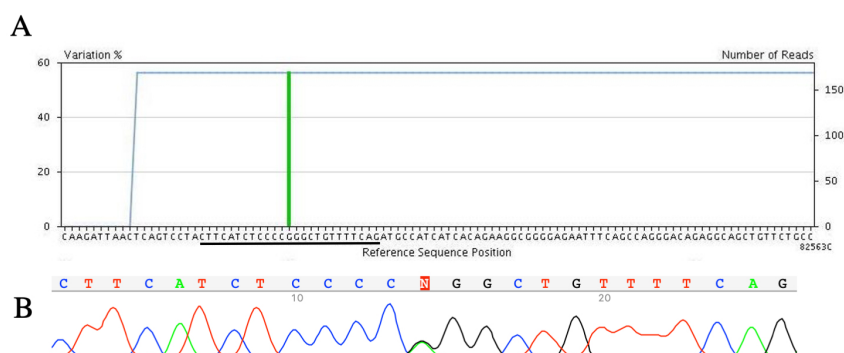
- a) a családfa analízis fontossága, hiszen a családfa analízissel látható a családban halmozódó diabetes, azaz felhívhatja a figyelmet az esetleges monogén öröklődésre, b) a klinikai vizsgálat fontossága, mi szerint a betegek nem voltak elhízottak, tehát a klasszikus 2-es típusú diabetes nem igazán merült fel,
- c) mind az anyja, mind a lánya esetében az inzulin igény alacsony volt, ami a klinikumot a monogén diabetes felé orientálta, d) a kaszkád vizsgálatok jelentősége: a prediktív,

preszimptomatikus tesztelés, illetve a felesleges tesztelések elkerülése irányába tett erőfeszítések, hiszen a család mutációval nem rendelkező tagjai esetében a MODY kialakulásának a valószínűsége elhanyagolható, ezáltal a fiatal korban végzett szükségtelen vércukor mérések is elkerülhetők.

A fenti analízis klinikai értékelését, a családfa analízist Dr. Jermendy György végezte Budapesten a Bajcsy- Zsilinszky Kórház III. Belgyógyászati Osztályán.

4.3. *De novo* ABCC8 mutáció kimutatása hypoglycaemias hyperinsulinismusban

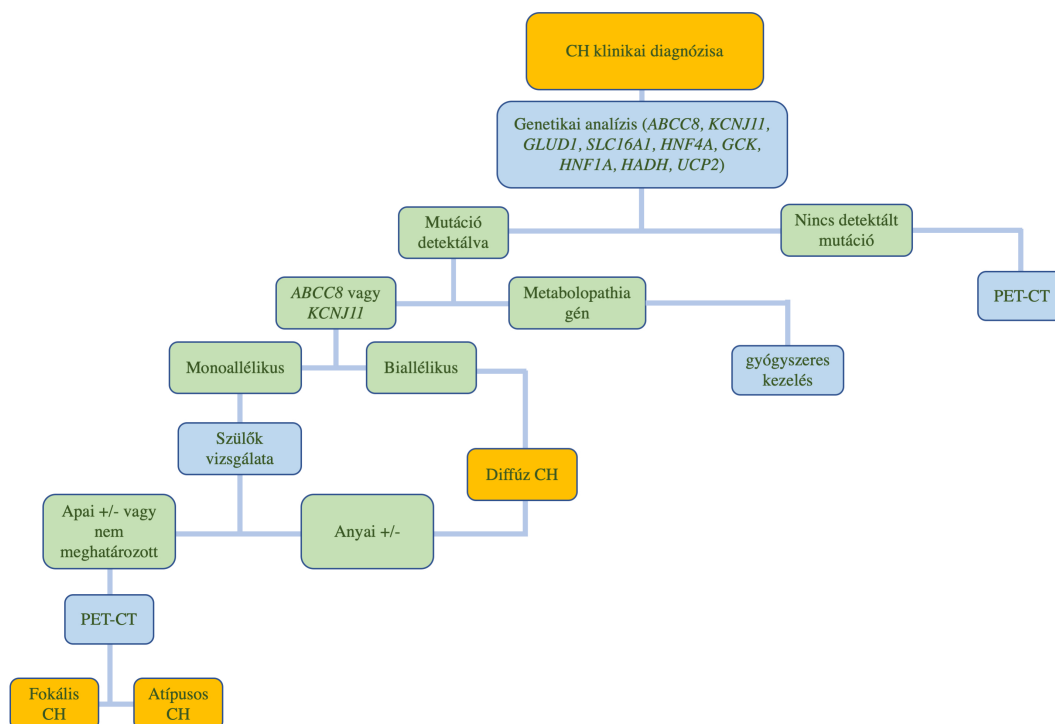
Az *ABCC8* génben egy heterozigóta introni mutációt detektáltunk, a c.4415-13G>A mutációt heterozigóta formában (20. ábra).



20. ábra. Az *ABCC8* c.4415-13G>A mutáció kimutatása NGS módszerrel (A) és confirmálása Sanger szekvenálással (B).

A szülők genetikai analízise a mutáció *de novo* voltát bizonyította. Ugyan funkcionális adattal nem rendelkezünk, amely megmagyarázná a mutáció következményét, a c.4415-13G>A mutációt több veleszületett hyperinsulinismusban szenvedő betegben leírták már (499-501), több közlés is patogénnek minősíti octreotid reszponzív fokális HH hisztológiai forma esetében (502).

A HH esetében a kezelés célja az agyi károsodás megelőzése. A klinikai menedzsmentben kritikus a gyors genetikai tesztelés, hiszen a döntési folyamat magában foglalja a genetikai vizsgálatot is. A genetikai vizsgálatot tartalmazó klinikai (diagnosztikus) algoritmust a 21. ábrán mutatom be.

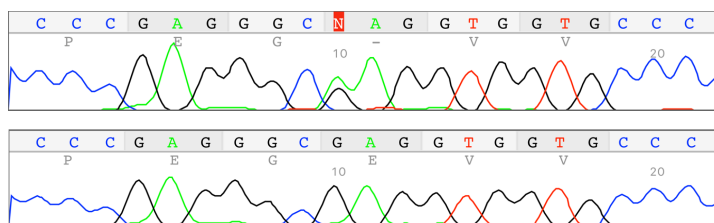


21. ábra. Integrált diagnosztikai algoritmus veleszületett hyperinsulinismus (CH) kivizsgálására

Fontos annak eldöntése is, hogy a heterozigóta mutáció az apai oldalról öröklődő vagy *de novo* (nem pedig homozigóta vagy összetett heterozigóta - hiszen ezekben az esetekben általában diffúz hyperinsulinismus forma figyelhető meg), ha lehet, még a 18-fluoro-dopa PET-CT előtt, mert a fokális léziónak a PET-CT-vel történő kimutatása utat nyithat ennek a hyperinsulinismus fókusz sebészeti eltávolítása felé. A kezelési algoritmusok a K_{ATP} agonista diazoxid első vonalbeli terápiáját javasolják, a mi betegünk octreotid reszponzív volt, hasonlóan ahhoz az első leírt beteghez (502).

4.4. Terhesség alatti mutáció-specifikus kezelés *KCNJ11* mutáció által okozott diabetesben

A vizsgált beteg egy ismert *KCNJ11* mutációt hordozó család tagja. Egy reprezentatív elektroferogramot mutat a 22. ábra.



22. ábra. A *KCNJ11* c.685G>A (p.Glu229Lys) mutáció kimutatása Sanger szekvenálással. Beteg: felső panel, kontroll: alsó panel.

Stabil sulfonilurea kezelés alatt normoglycaemiássá vált, a HbA_{1c} szintje 5,8, 5,2 és 5,2% volt a terhessége alatt. A 38. terhességi héten császármetszéssel adott életet egy kislánynak 3010 gr születési súllyal, az egy perces Apgar értéke 10-es volt, a neonatális periódus eseménytelenül zajlott. Az újszülött köldökzsínórvér mintájából elvégeztük a genetikai analízist és kimutattuk a mutáció jelenlétét. A publikáció közlésekor (449) 18 hónapos volt a kislány, nem volt diabeteses és normálisan fejlődött, mely helyzet még 8 éves korában is fennállt (112). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a K_{ATP} csatorna gén mutációknak és azok ismeretének fontos szerepe lehet a terhesség menedzsmentjében, hiszen az anyai genotípusnak számottevő a magzatra gyakorolt hatása. Abban az esetben, ha az édesanya neonatális diabeteset okozó mutációt hordoz és a magzat erre nézve vad típusú, a sulfonilurea kezelés macrosomiához és neonatális hyperinsulinaemiás hypoglycaemiához vezet, míg abban az esetben, ha az édesanya mutációja mellett a magzat is mutáció hordozó, normális születési súly várható, sőt nagyon sokáig a diabetes nem is jelentkezik (112, 449, 503, 504). Ezekben az esetekben a magzati DNS vizsgálata nem invazív módszerekkel a terhesség során rendkívül nagy hatással lehet a terhesség menedzsmentjére.

Összességében az eredményeink arra utalnak, hogy a sulfonilureák inzulin alternatívaként szerepelhetnek az érintett várandós nők esetében, abban az esetben, ha a Kir6.2 K_{ATP} csatorna mutáció által okozott diabetesről van szó, és különösen akkor, ha az érintett beteg visszautasítja az inzulin kezelést. A mi eredményeink, együtt értelmezve egy hasonlóan kivitelezett lengyel kezelési stratégiával arra utalnak, hogy ezekben az esetekben fejlődési abnormalitások nem lesznek (449). A klinikai vizsgálatok és a beteg menedzsmentje a Jósa András Megyei Kórház. IV. Belgyógyászati Osztályán történtek, Dr. Gaál Zsolt irányítása alatt.

4.5. Új misszensz mutáció detektálása dystrophinopathiában

4.5.1. Genetikai analízis

Az MLPA-val végzett deléció/duplikáció analízis a beteg mintájában a DMD gén 4-es exonjának teljes (hemizigóta) hiányát írta le. A 4-es exonra specifikus primerekkel végzett PCR amplifikáció azonban a 4-es exon delécióját nem támasztotta alá, arra utalva, hogy az MLPA eredmény fals pozitív. A 4-es exon Sanger szekvenálása egy új hemizigóta pontmutációt írt le (c.227A>T, p.Asn76Ile). Az édesanya célzott genomiális DNS analízise a mutáció *de novo* voltát igazolta. Annak igazolására, hogy más patogén mutáció nincsen a DMD génben, a teljes kódoló régiót megszekvenáltuk. Az adatelemzés a promóter, a exoni régiók és az exon/intron határtól +/-5 nukleotidra levő régiók vizsgálatára korlátozódott és három hemizigóta variánst mutatott ki. A fenti c.227A>T mutáción kívül két sokkal gyakoribb eltérést sikerült kimutatnunk, mindkettőt hemizigóta formában (13. táblázat).

Lokalizáció	Genotípus (hemizigóta)	Fehérje szintű következmény	dbSNP azonosító	MAF
e4	c.227A>T	p.Asn76Ile	-	-
e37	c.5234G>A	p.Arg1745His	rs1801187	0,47
e59	c.8810A>G	p.Gln2937Arg	rs1800280	0,12

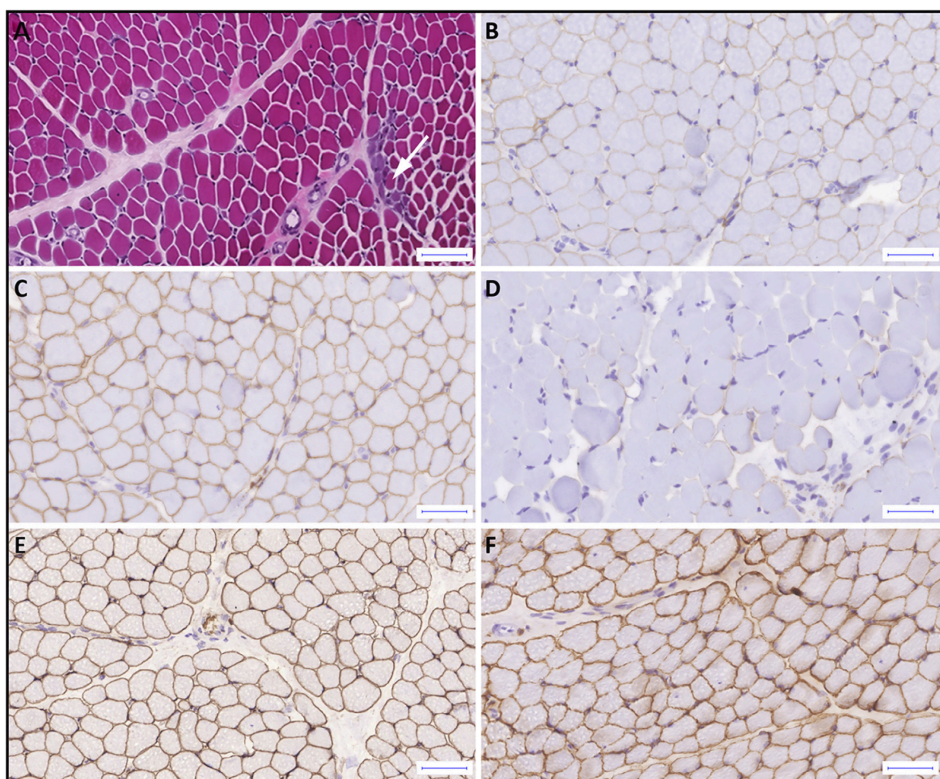
13. táblázat. A DMD gén szekvenálásának eredménye. Referencia szekvenciák: LRG_199t1 (DNS), LRG_199p1 (fehérje). MAF: minor allél frekvencia (1000 Genom Projekt).

A c.227A>T mutációt az LOVD (Leiden Open Variation Database) adatbázisba feltöltöttük (ID: 00105210).

4.5.2. Izom hisztológia, dystrophin immunhisztokémia

Az izombiopszia enyhe dystrophias jeleket írt le (23. ábra). A dystrophin expresszió az egyes antitesttel változó intenzitásúnak adódott, sarcolemmális jelölődéssel, szegmentálisan súlyosan csökkent vagy hiányzó jellel, a kettes antitesttel intenzív lineáris sarcolemmális expressziót, normál mintázatot mutatott, míg a hármas antitesttel az izomrostok zöme negatív volt, néhány revertáns rost volt kimutatható teljes vagy szegmentális sarcolemmális expresszióval (23. ábra B, C, D). A spektrin immunhisztokémia normál lineáris sarcolemmális expressziót mutatott (23. ábra E). Az α , β , γ és δ sarcoglycan lineáris sarcolemmális expressziót közepes vagy magas

intenzitással, néha csökkent expressziós szinttel mutatott. A merosin erős lineáris sarcolemmális expressziót mutatott (23. ábra F).



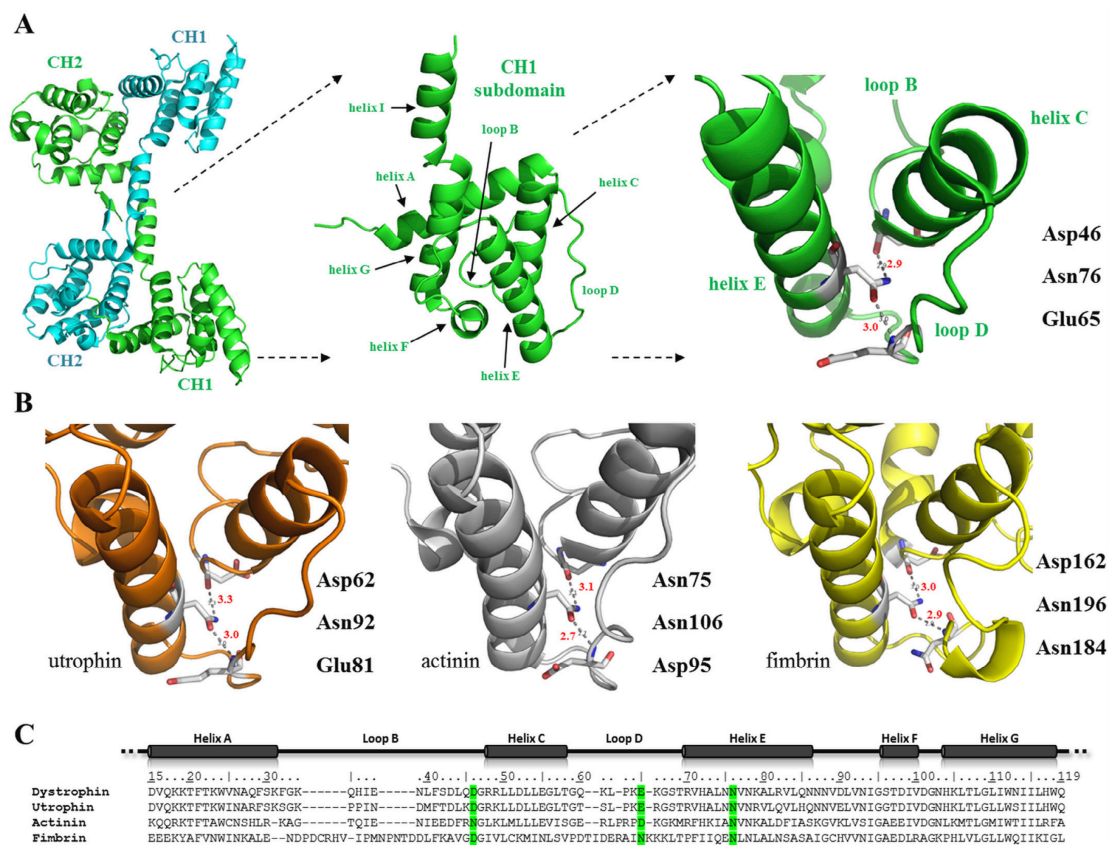
23. ábra. Izom biopszia vizsgálata. Ábramagyarázat a szövegben. Forrás: <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2017.12.003>. Dr. Hortobágyi Tibor felvételei.

4.5.3. A p.Asn76Ile mutáció hatásának *in silico* vizsgálata

A kristályszerkezet alapján a 76Asn reziduum az N-ABD aktin kötő doménben van, a CH1 szubdoménben az E hélixben (24. ábra A). Jelenlegi ismereteink szerint az Asn76 az aktin kötőhelynek nem része, közvetlenül az aktinhoz nem kötődik (488). Az Asn76 oldallánca nem a CH1 szubdomén felszíne felé néz, sokkal inkább a C és E hélixek és a D loop közt van elrejtve. Az oldallánc atomok a 76-os aszparaginnál hidrogén kötési távolságban vannak az Asp46 és Glu65 fő lánc atomjaival. Ezek a hidrogén hidak elképzelhető, hogy stabilizáló interakciókat jelentenek a CH1 szubdoménben, amely lehetővé teszi az E hélix (Asn76) a B loop (Asp46) és a D loop közti kapcsolat kialakítását (24. ábra A). A humán dystrophin szekvencia összehasonlítása az utrophin, α -actinin 3 és fimbrin szekvenciájával az N-ABD domének esetében az Asn76 reziduum nagyfokú konzerváltságát mutatja (24. ábra C) összhangban a korábbi analízisekkel (488, 505, 506).

A másodlagos szerkezet predikció nem utal az E hélix sérülésére; a mutáns fehérje fenntartja a teljes másodlagos szerkezetét a vad típushoz hasonló módon. A mutáns dystrophin fehérje a

konzervált hidrogén hídját, amely az Asn76 és az Asp46 valamint a Glu65 között van, nagy valószínűséggel elveszíti azáltal, hogy a poláros aszparagin reziduum hidrofób izoleucinná változik. Ez a mutáció a predikció alapján rendkívül destabilizáló ($\Delta\Delta G > 3$ kcal/mol), ami fehérje funkció sérülést jelezhet. A mutáns fehérje aggregációs hajlama nem tűnik fokozottnak, hiszen az érintett pozíció az aggregációra hajlamos régióktól távol esik.



24. ábra. A humán dystrophin, utrophin, α -actinin 3 és fimbrin szerkezete és szekvenciája. A) A dystrophin aktin kötő doménje. B) A konzervált aszparagin aminosavak interakciói utrophin, α -actinin 3 és fimbrin esetén. C) Az aktin kötő domének szerkezet-alapú szekvencia összehasonlítása. Az Asp46, Glu65 és Asn76 reziduumok zöld színnel jelölve. Forrás: <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2017.12.003>. Dr. Mótyán János munkája.

A 14 hónapos kisfiúnál tapasztalt enyhe hypotónia és a motoros fejlődés késése valamint a nagyon emelkedett CK aktivitás BMD/DMD gyanút vetett fel. A molekuláris genetikai analízis igazolta a dystrophinopathiát, mindössze egy kórokinak tűnő misszensz variáns detektálásával. Fontos megemlíteni azt, hogy az MLPA teszt fals pozitív eredményt adott, hiszen a mutáció pontosan a hibridáló próba alatt fekszik, ezáltal a próba amplifikáció előfeltétele, a ligálás nem jöhet létre a két, megfelelően hibridizált próba hiányában. A gyártói előírat, miszerint az egy exont érintő deléció/duplikációt mindenképpen független módszerrel meg kell erősíteni, itt rendkívül nagy jelentőséget nyert, hiszen egy nem megerősített eredmény hemizigóta deléciót írna le, holott itt

pontmutációról van szó. A variánst valószínűen patogénnek minősítjük (507) a következő tények miatt:

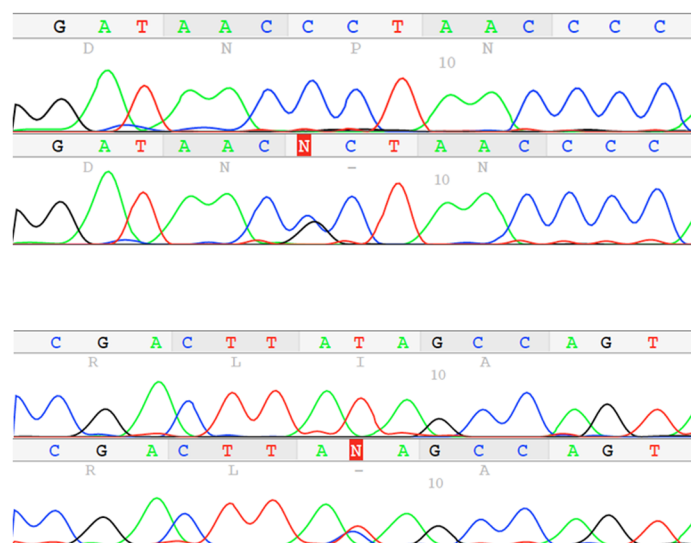
1. A variáns *de novo* voltát igazoltuk
2. A nagy, populációs szintű adatbázisokban a mutáció nincs jelen (ExAC, 1000 genom projekt)
3. Az érintett aminosav evolúciós konzerváltsága és a beteg fenotípusa specifikus az egy genetikai etiológiával leírható betegségre.

A dystrophinopathia gyanúját felveti a magas CK aktivitás és a klinikai kép. Az izombiopszia is enyhe myopathiás változásokat mutatott ki, és a dystrophin expressziós mintázata egyértelműen kóros volt, a dystrophin nagymértékben csökkent és szegmentálisan hiányzó festődést mutatott a core régióban, és teljesen csökkent vagy nagyon erősen csökkent festődést mutatott az N-terminálison. Ezek az eredmények egybehangzóak a genetikai analízis eredményével is. A misszensz mutációk ritkák a Duchenne/Becker izomsorvadásban, de nagy részük pontosan az N-ABD dystrophin domént érinti (89, 508). Az Asn76 evolúciósan (24. ábra C) és struktúráisan is (24. ábra B) konzervált. Másodlagos szerkezetbeli változást nem sikerült kimutatnunk, de a stabilitás vizsgálat a mutáció nagyfokú destabilizáló hatását írja le, mely hatását valószínűleg egy lokális konformáció változáson - amelynek a stabilizáló interakciók elmaradása lesz az oka - keresztül fejt ki. Ebben az esetben a klinikai genetika egyik legfontosabb feladatát, a fenotípust illető hosszútávú előrejelzést igen nehéz adni, hiszen egy korábban le nem írt misszensz mutáció rendkívül korai detektálása bőven a Duchenne/Becker izomsorvadás klasszikus klinikai tüneteinek jelentkezése előtt, a még most is csak 4 éves a gyermek esetében történt. Az *in silico* analízis sejteti a patogenitást, de nem tud információt adni a betegség súlyosságára nézve. Összességében véleményünk szerint ez a mutáció Becker izomsorvadáshoz vezet, de a klinikai fenotípust újra és újra vizsgálni kell. Mivel a mutáció *de novo* és a *de novo* mutációk esetében a genetikai tanácsadás 2%-os ismétlődési kockázatot ír le, ezt fontos figyelembe venni a tanácsadás folyamata során (509). A genetikai tesztelés szempontjából fontos tanulsága ennek az anyagnak az, hogy az egy exont érintő strukturális változásokat, amelyeket MLPA-val detektálunk, más független módszerrel meg kell erősíteni. Megjegyzendő továbbá, hogy egy detektált eltérés funkcionális következményének vizsgálata milyen sokféle módon lehetséges, beleértve az immunhisztokémiát és a különböző *in silico* módszereket is. A genetikai vizsgálatokat Dr. Koczok Katalin PhD hallgatóm, míg a beteg klinikai menedzsmentjét Dr. Merő Gabriella (Jósa András Megyei kórház, Nyíregyháza) végezte.

4.6. Kezelést megalapozó genetikai tesztelés - Niemann-Pick C

4.6.1. Genetikai analízis

A klinikai laboratóriumi genetikai diagnosztika összetett heterozigóta misszensz mutációkat mutatott ki az *NPC1* génben: c.3019G>C (p.Pro1007Ala) és c.3182T>C (p.Ile1061Thr) összetett heterozigóta formában (25. ábra). Mindkét mutáció szakirodalomban szerepel bizonyítottan patogén eltérés (510, 511). A szülők vizsgálata igazolta az összetett heterozigóta genotípust.



25. ábra. *NPC1* összetett heterozigóta genotípus. Felső panel: c.3019G>C mutáció, alsó panel: c.3182T>C mutáció heterozigóta formában. A felső elektroferogram mindkét esetben normál kontroll.

Forrás: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpn.2013.08.002>.

4.6.2. Terápia

A beteg 20,5 éves korában rendkívüli kognitív és viselkedésbeli változások történtek: hallucinációk, paranoid gondolatok és valóságtorzulás. Térbeli tájékozódó képességét elvesztette és a mindennapi helyzetekben inadekváultan reagált, demencia és a kognitív képességek leépülése volt megfigyelhető. A következő 4 hétben üldözési téveszmék, alvászavar és szorongás fejlődtek ki, ezért pszichiátriai fekvőbeteg ellátásra volt szüksége, ahol az alkalmazott kezelések lényegében hatástalanok voltak. Az agyi MRI közepes diffúz cereberális atrophíát írt le (11. ábra B). Olazapine, clonazepam terápiát, később haloperidol terápiát indítottak, de dystoniás krízis alakult ki, majd aripiprazolt mint első generációs antipszichotikumot alkalmaztak, de szintén olyan súlyos mozgás zavar alakult ki, hogy a kezelést nem lehetett folytatni. A beteg terápiája - közvetlenül a

gyógyszer magyarországi engedélyezését követően - miglustat formájában folytatódott, amely a pszichotikus betegség kurzusa alatt kezdődött. Mellékhatásként hasmenés volt megfigyelhető, amely 6 hónapos terápia után megszűnt. 3 hónappal a miglustat terápia kezdete után és 2 héttel az összes többi antipszichotikum terápia befejezése után a pszichotikus tünetek oldódtak és azóta sem tértek vissza. 22 és 23 éves korban az agyi MRI nem mutatott betegség progressziót (11. ábra C). 23 évesen, 3 éves követés után a beteg IQ-ja 79 volt, bizonyos képességei súlyosabban, míg mások enyhébben sérültek. A szóbeli intelligenciája átlagos, míg a performance intelligencia enyhe csökkenést mutatott. Jelenleg (2020. április) 31 éves, ez a meglehetősen jó pszichomotoros státusz megtartott maradt, és ugyan teljes időben felügyeletet igényel a szülők által, de ambuláns maradhatott. Önellátásra képes, minden nap sportol, az elmúlt 3 évben a pszichózis nem tért vissza. Az MRI azóta sem mutat betegség progressziót.

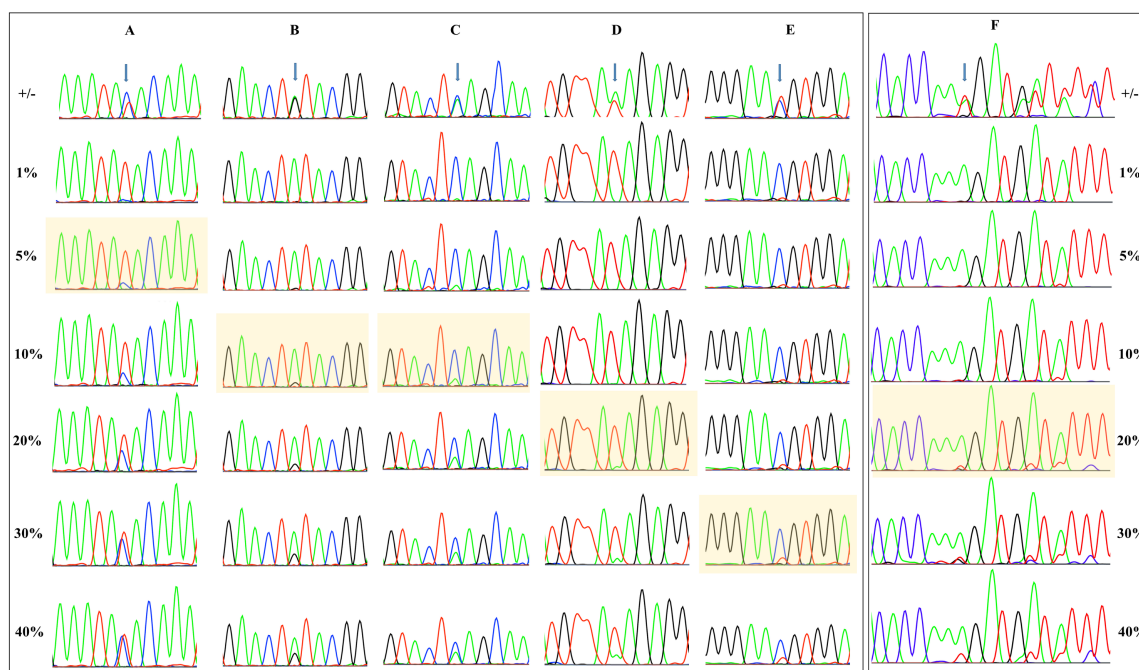
Ennek a tanulmánynak a legfontosabb tanulsága az, hogy egy ritka neurológiai betegség korai felismerése célzott terápiában nyilvánulhat meg. A ritka betegségek, és különösen igaz ez a NPC betegségre, rendkívül nehezen diagnosztizálhatóak. Ebben az esetben a vertikális tekintésbénulás, míg az izolált splenomegalia és a pszichotikus tünetek együttesen irányították a klinikum gyanúját az NPC felé. Meggyőződésünk, hogy a hatás, amit elértünk, a miglustat terápiának köszönhető azon alapul, hogy semmilyen érdemleges hatás nem történt az antipszichotikus kezelések során, a kezelésre adott klinikai válasz csak akkor történt, amikor már csak miglustatot kapott és mást már nem. A pszichotikus tünetek a 10 éves követésben sem tértek vissza. Ez a publikáció, mely számos klinikai (Dr. Szakszon Katalin - a beteg klinikai diagnózisának felállítója, a beteg kezelőorvosa és a tanulmány első szerzője -, Dr. Szegedi István, Dr. Magyar Ágnes, Dr. Oláh Éva - gyermekgyógyászat, Dr. Andrejkovics Mónika, Dr. Balla Petra - pszichiátria, Dr. Lengyel András - neurológia és diagnosztikai (Dr. Berényi Ervin - radiológia, valamint én, mint klinikai laboratóriumi genetikus) szakma multidiszciplináris együttműködésének fontosságát mutatja be egy ilyen ritka betegség diagnosztikája és célzott kezelése kapcsán.

4.7. Az anyai sejt kontamináció hatása a molekuláris genetikai diagnosztikai tesztekre invazív mintavételt követő prenatális diagnosztika során

4.7.1. A Sanger DNS szekvenálás MCC érzékenysége

Ezeket a kísérleteket 6 különböző mutációval végeztük el. A vad típusú magzati DNS-t heterozigóta anyai DNS-el kontamináltuk a következő detektálási határértékeket tudtuk

meghatározni: az NM_138694.3:c.8870T>C esetében 2,5%-os mutáns allél (5% anyai sejt kontamináció, 26. ábra A) az NM_138694.3:c.3407A>G és a c.7916C>A mutációk esetében 5%-os mutáns allél (10%-os anyai sejt kontamináció, 25. ábra B,C) míg az NM_138694.3:c.6992T>A mutáció esetében 10%-os mutáns allél (20%-os anyai sejt kontamináció, 26. ábra D), végül az NM_138694.3:c.107C>T esetében 15%-os mutáns allél (30%-os anyai sejt kontamináció 26. ábra E). Amikor a vad típusú "magzati" DNS-t heterozigóta anyai DNS-el kontamináltuk amely a 3 bázispárú *CFTR* delécióra vonatkozik (NM_000492.3:c.1521_1523delCTT) ez a detektálási limit 10%-nak adódott (20% MCC, 26. ábra F).



26. ábra. A Sanger DNS szekvenálás anyai sejt kontamináció érzékenysége. A detektálási határ sárga háttérrel jelölve. További ábramagyarázat a szövegben. Forrás: DOI: 10.1002/pd.5319.

4.7.2. Az MLPA módszer MCC érzékenysége

Ezt két különböző mutáció típusra, egy több exont érintő delécióra és egy több exont érintő duplikációra határoztuk meg. Az első kísérlet sorozatban vad típusú női "magzati" DNS mintát női "anyai" DNS heterozigóta mintával kontamináltuk (*MID1* del e1-3). A keveréses vizsgálatok azt mutatták, hogy 30%-ig a genotipizálás eredményére az anyai sejt kontaminációnak nem volt hatása, a próbák eredményei normál tartományban maradtak. 40%-os anyai sejt kontamináció - ami megfelel 20%-os mutáns allél aránynak - eredményezett egy 0,70-0,89-ig tartalmazó jel csökkenést a megfelelő próbák esetén, amely már diagnosztikai bizonytalansághoz vezethet (14.

táblázat). Ha a jel erősséget a vad típusú minta esetében 100%-nak vesszük, akkor az a csökkenés, amely a megfelelő próbák esetében megfigyelhető volt a kontamináló minták esetén, az 0%, 1,96%, 3,92%, 9,8%, 15,68% és 21,56% volt az 1%-os, 5%-os, 10%-os, 20%-os, 30%-os, 40%-os modellezett anyai sejt kontamináció esetén (14. táblázat). A második kísérlet sorozatban a vad típusú "magzati" DNS mintát kevertük a duplikációra nézve heterozigóta anyai mintával (*PKHDI* dup33-35), ezekben az esetekben a heterozigóta duplikáció 1,39-1,46-ig terjedő dózis kvóciens eredményezett. Ezekből az adatokból az látszik, hogy még akár egy 40%-os szimulált anyai sejt kontaminációnak sem volt hatása a genotipizálás eredményére, minden esetben itt normál tartománynak adódott, azaz eddig a határig a teszt a CNV-t normál tartományba mérte. Ha a releváns próbák dózis kvóciensét 100%-nak vesszük, a növekedés ezekben a kontamináló minta esetén 2,02%, 3,03%, 8,08%, 12,12% és 13,13% volt az 5%, 10%, 20%, 30% és 40%-os szimulált anyai sejt kontamináció esetén (14. táblázat).

MLPA (deléció analízis)			
DNS minta típusa	Átlag dózis kvóciens (tartomány)	Átlag jel csökkenés	Elméleti magzati genotípus
vad típus	1,02 (0,97-1,12)	NA	NA
1% MCC	1,02 (0,89-1,10)	0%	vad típus
5% MCC	1,00 (0,85-1,10)	1,96%	vad típus
10% MCC	0,98 (0,88-1,09)	3,92%	vad típus
20% MCC	0,92 (0,85-0,98)	9,8%	vad típus
30% MCC	0,86 (0,81-0,91)	15,68%	vad típus
40% MCC	0,80 (0,70-0,89)	21,56%	bizonytalan
heterozigóta deléció	0,57 (0,51-0,65)	44,11%	NA

MLPA (duplikáció analízis)			
DNS minta típusa	Átlag dózis kvóciens (tartomány)	Átlag jel növekedés	Elméleti magzati genotípus
vad típus	0,99 (0,96-1,02)	NA	NA
1% MCC	0,98 (0,96-1,02)	-	vad típus
5% MCC	1,01 (0,98-1,04)	2,02%	vad típus
10% MCC	1,02 (0,99-1,06)	3,03%	vad típus
20% MCC	1,07 (1,03-1,10)	8,08%	vad típus
30% MCC	1,11 (1,08-1,15)	12,12%	vad típus
40% MCC	1,12 (1,09-1,15)	13,13%	vad típus
heterozigóta duplikáció	1,42 (1,39-1,46)	43,43%	NA

14. táblázat. Az MLPA módszer anyai sejt kontamináció érzékenysége. NA: nem alkalmazható. A deléció analízis során vad típusú női DNS mintát kevertünk heterozigóta *MID1* dele1,3 női DNS mintával (próbák száma: 8). A duplikáció analízis során vad típusú DNS mintát kevertünk *PKHDI* dupe33,35 DNS mintával (próbák száma: 4).

4.7.3. A piroszekvenálás alapú új DNS szekvenálás MCC érzékenysége

Itt a vad típusú "magzati" DNS mintát anyai heterozigóta DNS mintával kontamináltuk (heterozigóta *FBNI* c.4724T>C). Kellően mély analízis esetén, azaz nagy lefedettségi adat esetén már 0,5%-os mutáns allél is kimutatható volt piroszekvenálással (15. táblázat). Ebben a tartományban 2,5%, 5%, 10%, 15% és 20%-os mutáns allél frakciók esetén a mennyiségi meghatározás rendkívül pontosnak adódott. Az átlagos lefedettség 752-szeres (tartomány 437 - 1165), ezekben az esetekben a várt és a megfigyelt mutáns allél frakció nagyon jól korrelált egymással. A legalacsonyabb 0,23% volt 2,5%-os mutáns allél frakció esetében és a legnagyobb 1,92% a 20%-os allél frakció esetében az eltérés a kettő közt.

Új generációs piroszekvenálás			
MCC %	Számított mutáns allél arány (%)	Mért mutáns allél arány (%)	Szekvenálási mélység
1	0,5	0,14	802
1	0,5	0,37	545
5	2,5	2,9	1165
5	2,5	2,56	772
10	5	4,23	974
10	5	4,57	459
20	10	8,42	1065
20	10	9,56	530
30	15	17,66	645
30	15	14,5	1029
40	20	16,86	437
40	20	19,3	448

15. táblázat. Az új generációs piroszekvenálási módszer anyai sejt kontamináció érzékenysége. A vizsgálat során vad típusú DNS mintát kevertünk heterozigóta *FBNI* c.4724T>C DNS mintával. A mért érték a bidirekcionális szekvenálási adatok átlaga. A szekvenálási mélység a bidirekcionális szekvenálási adatok összege. A minták duplikátumban futottak.

Ezekben a vizsgálatainkban a molekuláris genetikai prenatális diagnosztika leggyakoribb scenárióit vázoltuk fel, azokat a tipikus klinikai helyzeteket, amikor ismert családi mutáció(k) kimutatására kerül sor invazív mintavétellel vett mintával. Ebben az esetben az édesanya hordozó valamilyen autoszomális recesszív vagy X kromoszómához kötött recesszív mutációra nézve, de természetesen előfordulhat a dominánsan öröklődő eltérés is.

A Sanger DNS szekvenálással nyert eredményeink tanulsága szerint a detektálási határ rendkívül széles tartományban mozog, a mutáns allél arány 2,5-15%, ami 5-30%-ig terjedő anyai sejt kontaminációt jelent. Adataink alapján ilyen anyai kontaminációs szint felett a magzati prenatális

diagnosztika bizonytalanságokhoz vezet és akár még hamis eredményt is adhat. Szimulált mintáinkhoz valós klinikai helyzet lehet a szomatikus mutációk analízise, amivel egyébként a szolid tumorokban és különböző más betegségekből is hasonló eredményeket láthatunk (512-515). A legtöbb vizsgált mutáció esetében a detektálási limit a 15-20%-ig terjedő mutáns allél aránynak adódott, ami azt mutatja, hogy a Sanger szekvenálás egyáltalán nem érzékeny az alacsony fokú mozaicizmusra (512, 514, 515). Ez összességében nem meglepő, hiszen általánosan elfogadott, hogy a Sanger szekvenálás kvantitálásra nem alkalmas. Egy olyan kombináció esetén, ahol a magzat hordozó egy apai autoszomális domináns mutációra nézve és az anyai kontamináló DNS homozigóta normál, figyelembe véve a Sanger DNS szekvenálás érzékenységét, az anyai kontamináció szignifikancia szintje még magasabb lesz, hiszen az apai mutáns allél detektálható lesz, ha kimutatható legalább 2,5-15%-ig a magzati mintában. Amennyiben a magzat hordozó az apai mutáns allélre egy autoszomális recesszív mutáció esetén, az anyai sejt kontamináció rendkívül nehezíti az apai mutáció kimutatását. A Sanger DNS szekvenálás esetében sok tényező problémakörrel van szó, a mutáció MCC szempontból történő megítélése függ a mutáció típusától, a szekvencia környezetről, az alapvonal variabilitásáról, az öröklődés típusától és akár a DNS minőségétől is.

Az MLPA módszer esetén a heterozigóta deléció vizsgálata során a genotipizálás hatékonyságára az akár 15%-os mutáns allélnek megfelelő 30%-ig szimulált anyai sejt kontamináció sem gyakorolt hatást. A 40%-os anyai sejt kontamináció, ami megfelel 20%-os mutáns allélnek már eredményezett 30%-os dózis kvóciens csökkenést, ami már okozhat diagnosztikai bizonytalanságot. A heterozigóta duplikációs kísérleteink azt mutatták, hogy a genotipizálásra akár 20%-os mutáns allélnek megfelelő 40%-os anyai sejt kontamináció sem gyakorol hatást. Összességében az MCC hatása az MLPA eredményekre 40% fölötti anyai sejt kontamináció vezethet magzati genotipizálási hibához több exont érintő deléció esetén, míg a duplikáció 40%-ig a vizsgált esetben nem okoz genotipizálási bizonytalanságot. Mások is, hasonlóan a mi MLPA eredményeinkhez alacsonyabb szenzitivitást találtak a duplikációknál, mint deléciók esetében (516). Ezek az eredmények összességében azt mutatják, hogy anyai sejt kontaminációra az MLPA érzéketlen. Mivel az ismert adatok alapján a magzati mintában 20%-nál nagyobb anyai sejt kontamináció rendkívül ritkán (a minták 0,3-1,3%-ában) van jelen (186), ami azt jelenti, hogy a legnagyobb mintaszámban akár chorion biopsziáról akár amniocentézisről beszélünk, az anyai sejt kontamináció megfelelően alacsony lesz ahhoz, hogy Sanger DNS szekvenálást és MLPA módszereket lehessen használni. Az anyai sejt kontaminációs tesztek 5%-os ajánlott szenzitivitása (182) 3-8-szorosa az MLPA és Sanger DNS szekvenálás esetében szignifikáns anyai sejt

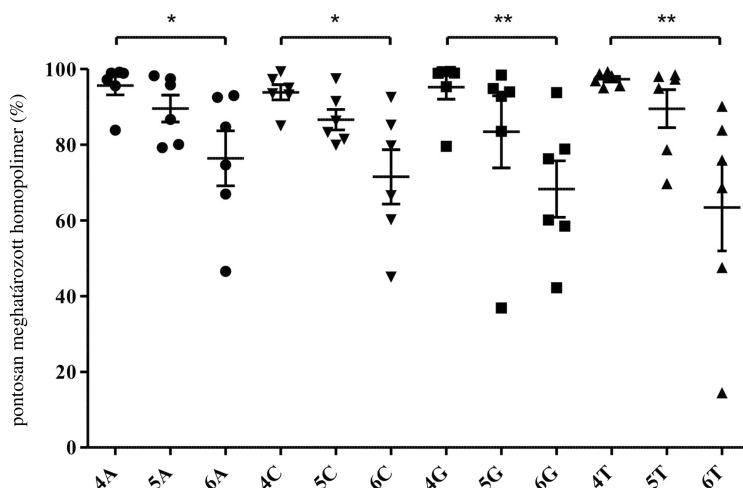
kontamináció szintnek.

A harmadik kísérletsorozatban egy új generációs DNS szekvenálás, a piroszekvenálás érzékenységét vizsgáltuk meg. Ebben az esetben a beállított teszt rendszer igen pontosnak bizonyult. Akár 0,5% mutáns allél is biztonsággal ki lehetett mutatni nagy lefedettség mellett, bár tény, hogy ebben a tartományban az új generációs szekvenálás alulbecsülte a mutáns allél arányt, de 2,5-20%-ig igen pontosan jelezte azt. Összességében az NGS mint módszer, rendkívül pontos kvantitálást tesz lehetővé és igen érzékeny az anyai sejt kontaminációra. Az allél arányok pontos meghatározása így még az anyai sejt kontamináció jelenlétében is azonban mindig lehetővé teszi a diagnosztikai eredmények korrekt interpretációját. A vizsgálatokat Dr. Koczok Katalin PhD hallgatóm végezte.

4.8. Piroszekvenáláson alapuló új generációs DNS szekvenálás analitikai paramétereinek vizsgálata

A helyspecifikus mutagenézis kísérleteket Sanger szekvenálási kontroll mellett végeztük el, minden mutáció estében duplikátumban, nem találtunk eltérést egyetlen egy mutáció esetében sem.

A homopolimert tartalmazó plazmid rendszer esetében a szekvenálás átlagos lefedettsége 479 ± 145 volt. Negatív korreláció volt megfigyelhető a HP hossz és a leolvasás pontossága között (27. ábra).



27. ábra. Homopolimerek kimutatása a plazmid rendszerben. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

Az átlagos pontos lefedettségi ráta 95,8% (tartomány: 79,6-99,3%), 87,4% (tartomány: 36,9-98,4%) és 72,1% (tartomány: 14,5-93,8%) volt a 4, 5 és 6 nukleotid hosszak esetében. Amíg a piroszekvenálási alapú új generációs DNS szekvenálási teszt képes volt az akár hat tagú poli-A

homopolimereket is pontosan kimutatni átlagban 76,4%-os pontossággal, 75% alá csökkent a poli-C, poli-G és poli-T 6-mer-ek esetében (71,5%, 68,3% és 63,4%). A hosszabb homopolimerek alacsonyabb genotipizálási pontosságot jelentettek, de a legpontosabb leolvasások még mindig elérték a 98,4%-ot az 5-mer-eknél és a 93,8%-ot a 6 mer-eknél, ami arra utal, hogy egy nagyon gondosan megtervezett a szekvencia kontextust is figyelembe vevő optimalizáció során megtalálható a legpontosabb, amely a teszt rendszerben jól használható. A primer lokalizáció nem mutatott összefüggést a genotipizálás pontosságával.

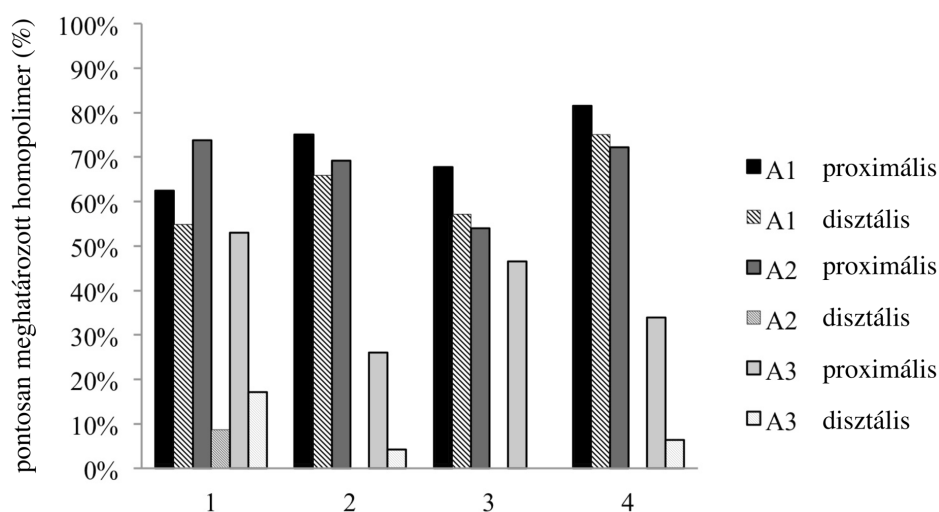
Hat ismert genotípusú CF betegben vizsgáltuk a *CFTR* kódoló régiót és az exon-intron határokat. Az átlagos lefedettség 263 ± 178 volt. Összesen 246 amplikont vizsgáltunk az adatelemzésünk során. Habár az egyedi pontosság nagy tartományban szórt (52,2-99,1%) az átlagos pontosság nagyon jónak adódott (89,3%). A tesztrendszer képes volt kimutatni a kis skálájú mutációk közül a misszensz, nonszensz, splice helyeket érintő mutációkat, az olvasási keret eltolódást, és olvasási keret eltolódást nem okozó deléciókat és inzerciókat, amelyeket korábban Sanger szekvenálással mutattunk ki, 100%-os szenzitivitással és specificitással (16. táblázat).

HGVS név	Történeti név	Mutáció típus	Szenzitivitás
c.654-10delAGTT	786-10delAGTT	Splicing	1/1
c.743+40A>G	875+40A/G	Splicing	1/1
c.869+11C>T	1001+11C>T	Splicing	1/1
c.926C>G	A309G	Misszensz	1/1
c.1394C>T	T465I	Misszensz	1/1
c.1397C>G	S466X	Nonszensz	1/1
c.1521_1523delCTT	F508del	Deléció	1/1
c.1624G>T	G542X	Nonszensz	1/1
c.2012delT	2143delT	Deléció	1/1
c.2051_2052delAAinsG	2183AA>G	Deléció/inzerció	1/1
c.2052_2053insA	2184insA	Inzerció	1/1
c.2052delA	2184delA	Deléció	1/1
c.2562T>G	2694T/G	Szinonim	1/1
c.2657+5G>A	2789+5G>A	Splicing	1/1
c.2856G>C	M952I	Misszensz	1/1
c.3454G>C	D1152H	Misszensz	1/1
c.3846G>A	W1282X	Nonszensz	1/1
c.4389G>A	4521G/A	Szinonim	1/1

16. táblázat. Az NGS tesztrendszer analitikai teljesítőképessége *CFTR* kis skálájú mutációk detektálására.

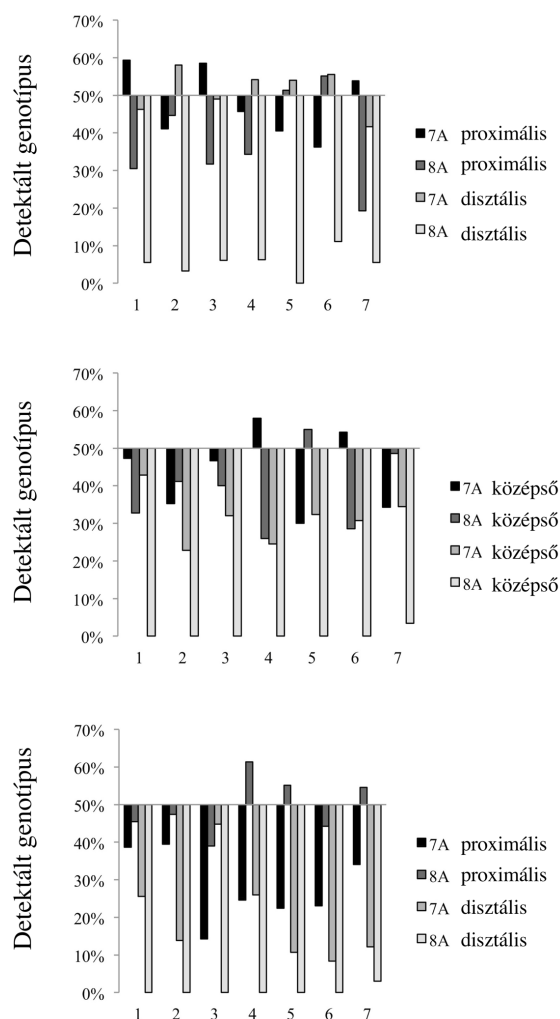
A 24 homopolimer vizsgálata során a saját tervezésű primerek jó teljesítményt mutattak, több mint 80%-os genotipizálási pontossággal egy kivétellel minden homopolimer esetén. Ez a kivétel a 7A HP mintázat (c14, c.2046_2052) volt, ahol mindössze 52,2%-os pontosságot értünk el. Ezért ezt a gyakori mutációt (2184insA, c.2052_2053insA) tovább vizsgáltuk három primer szettel (13. ábra). A primer típusától függően a 7A pontos kimutatási aránya elérhette a 81%-ot is (28. ábra). A c.2052_2053insA heterozigóták esetében az elméleti 7A/8A jelek 50%-os aránya rendkívül széles

tartományban szórt (átlagosan 16-49%-ig), de az eredmények függtek nagymértékben a primerektől.



28. ábra. A *CFTR* e14 hét nukleotidos homopolimer vizsgálata három különböző primerpárral négy vad genotípusú DNS felhasználásával.

Két primer pár (29. ábra középső és alsó panel) nagyon pontatlannak mutatkozott 45-50% hibás genotipizálási rátával. A harmadik primer szettel elfogadható pontossággal tudtuk kimutatni a 7A és 8A nukleotidokat (29. ábra felső panel) de még így is 27 hibás leolvasás született, és ez a kombináció sem tudta a 8 adenint kimutatni kb. 200 bp távolságból.



29. ábra. 7 és 8 nukleotidból álló homopolimerek vizsgálati pontossága a CFTR gén e14-ben. Három különböző ampikon szekvenálási eredménye. 7, a 2184insA mutációra heterozigóta minta vizsgálata történt meg, az oszlopdiagramok az elméleti 50%-tól történő eltérést mutatják.

Napjainkra az összes mutációs szűrő módszer helyét elfoglalják az új generációs DNS szekvenálási technológiák. Ennek az az oka, hogy nagy áteresztő képességgel és bizonyos kivételektől eltekintve nagy pontossággal képesek a kis skálájú mutációk kimutatására, rendkívül olcsón és hatékonyan, valamint a legújabb könyvtárkészítési módszerekkel már a CNV-k vizsgálatát is lehetővé teszik, tehát egyszerűsítik a genetikai tesztelés metodológiáját. Hátrányuk a rövid leolvasási hossz és problémát jelenthetnek a hamis genotipizálások (517, 518). A piroszekvenálás komoly limitációja a HP-k pontatlan analízise. A homopolimerek vizsgálatára először egy plazmid rendszert alakítottunk ki. Azt találtuk, hogy a piroszekvenálás elfogadhatóbb a rövidebb HP-ek esetében és ahogy nő a hossz, egyre pontatlanabbá válik (27. ábra). Azt a hipotézisünket, mely szerint amennyiben a homopolimer szakasz közel van az amplifikációs/szekvenáló primerhez, az pontosabb HP meghatározást tenne lehetővé, nem tudtuk igazolni. A vizsgálataink második részében *CFTR* klinikai laboratóriumi genetikai diagnosztikai tesztfejlesztést végeztünk és annak

analitikai teljesítőképességét vizsgáltuk klinikai mintákon. A teszt kifejezetten jó szenzitivitást és specificitást mutatott, az összes variánst (misszensz, nonszensz, splice hely mutációk, kis deléciók, inzerciók), amelyet korábban Sanger szekvenálással kimutattunk, képes volt konfirmálni mind a homopolimert tartalmazó, mind a homopolimert nem tartalmazó régiók esetében. Kivétel volt a 2184insA mutáció környezete, ahol nem sikerült elérni az elvárt pontosságot semmilyen optimalizációs módszerrel. Ebben az esetben a piroszekvenálás mellett még mindig szükséges Sanger szekvenálással vizsgálni ezt a régiót.

Az új generációs DNS technikák rutin klinikai laboratóriumi genetikai diagnosztikába történő beállításának abszolút előfeltétele a pontos mutáció kimutatás. Bizonyos új generációs DNS szekvenálási módszerek komplex munkamenetet igényelnek, hogy elérjék az elvárható analitikai szenzitivitást és specificitást, azaz fragment analízis beállítását vagy bizonyos nukleotid régiók esetében Sanger szekvenálás használatát. Kifejlesztettünk egy plazmid rendszert, ahol a genotipizálási pontosságot meg tudtuk határozni és fejlesztettünk egy *CFTR* gént vizsgáló rendszert, ahol a megfelelő primerek használatával a homopolimereket is egyértelműen tudtuk genotipizálni, kivéve a 2184insA mutációt, amely esetében a Sanger szekvenálástól még mindig nem lehetett eltekinteni. A tanulmányban szereplő analíziseket Dr. Ivády Gergely PhD hallgatóm végezte.

4.9. *CFTR* mutációk Kelet-magyarországi CF betegekben

A betegekben az átlagos verejték klorid koncentráció 108 mmol/L volt (tartomány: 55-173 mmol/L). Egy beteg kivételével minden esetben emelkedett volt a verejték klorid koncentráció. Az Elucigene CF29 v2 teszttel a p.Phe508del mutációt 56/80 CF allélen sikerült kimutatnunk (70%). Gyakori mutációk voltak a p.Asn1303Lys (4x; 5%), p.Gly542X (3x; 3,75%), 1717-1G>A és p.Arg347Pro (1x mindkettő; 1,25%). A *CFTR*dele2,3(21 kb) mutáció 4 CF allélen volt jelen (5%). Egy mutáns allélt sikerült kimutatnunk 11 minta esetén, így ezeket tovább vizsgáltuk DNS szekvenálással. 4 betegben a p.Gln685ThrfsX4 (2184insA, 5%) mutációt tudtuk kimutatni. Két betegben a p.Leu101X (2,5%) mutációt, míg a további minták a p.Gln220X, a p.Ser466X, p.Tyr1092X és a p.Glu831X alléleket hordozták, mindegyiket egy esetben (1,25%) találtuk. Egyetlen egy betegben a második *CFTR* mutáció definiálása nem volt sikeres. A 19 összetett heterozigóta beteg közül 12 esetben tudtuk a szülőket megvizsgálni, minden esetben a mutációk transz öröklődését bizonyítottuk. Egyetlen egy beteg maradt, akiben csak a p.Phe508del mutációt detektáltuk egy nem identifikált alléllal együtt és MLPA is negatív volt ebben az esetben.

Ebben a vizsgálatunkban egy évtizedes elmaradást kívántunk pótolni, hiszen a korábbi vizsgálatok, amelyek a magyar mutáció spektrumot fedték le, meglehetősen régen készültek, a legfrissebb is 1996-ra datálható (519-521). Vizsgálati kohorszunk Magyarországnak egy kb. 2 milliós lakosságszámú régiójából származik. A mutációk heterogenitása az észak-déli európai gradiensbe beleilleszthetők (522). Összesen 6 mutáció volt magasabb előfordulású, mint 1,30%: p.Phe508del, p.Asn1303Lys, *CFTR*dele2,3(21 kb), 2184insA, p.Gly542X és p.Leu101X. Rendkívül érdekes és korábban nem ismert tény volt az, hogy a szláv eredetű *CFTR*dele2,3 (21 kb) 5%-ban fordult elő, mely a harmadik leggyakoribb Csehország (6,37%) és Oroszország (5,69%) mögött (214) (6). A magyarázat erre az lehet, hogy a Kárpát-medencét szláv törzsek népesítették be a honfoglalás idején és ezek a szláv törzsek asszimilálódtak az ő területeiket elfoglaló magyar törzsekbe. Szintén érdekes a 2184insA magas frekvenciája (5%), amely szintén szláv eredetű mutáció. Nyugat Ukrajnában ez a második leggyakoribb mutáció 7,2%-os előfordulással (523). Ennek megfelelően a mutáció magas frekvenciája nem meglepő a mi általunk vizsgált régióban, és megerősíti a korábban feltételezett galíciai eredetet (523). A vizsgálatainkra a kaszkád megközelítést alkalmaztuk (524), mely során először a gyakoribb mutációkat vizsgáljuk, majd pedig szekvenálást végzünk valamint a nagy átrendeződések vizsgálatát. A CF29v2 teszttel a mutációk 81,25%-át tudtuk kimutatni, míg a szláv deléció vizsgálata a detektálási szenzitivitást 86,25%-ra emeli. A *CFTR* gén szekvenálás pedig ahhoz szükséges, hogy kimutassuk a további mutációkat. Összességében a CF-t okozó patogén mutációk 98,75%-át sikerült kimutatni. A vizsgálataink, a módszertanunk alkalmas lehet a CF újszülöttkori szűrés genetikai teszt oldalának a megalapozására.

4.9.1. Kiterjesztett betegcsoport *CFTR* mutáció analízise, kapcsolat a mutáció specifikus kezeléssel

2014-ben meghívást kaptam a 10th EFLM Symposium for Balkan Region konferenciára, melyet Belgrádban rendeztek meg 2014.09.11-12 között. Ez a publikáció ennek a meghívott kongresszusi előadásnak az írott anyaga, amely az előző CF mutáció spektrum kiegészítése új beteg kohorsz adatainak elemzésével immáron az egész országra kiterjedő beteg csoport bevonásával.

A detektált mutációk előfordulását cseh (525) lengyel (526) és a korábbi magyar (450) publikációkkal történő összehasonlításban az 17. táblázatban mutatom be.

HGVS név	Történeli név/ fehérjeszintű következmény	Magyarország (2011, n=80)	Csehország (2013, n=1200)	Lengyelország (2014, n=1476)	Jelen tanulmány (n=90)
c.1521_1523delCTT	F508del	70,0%	67,4%	54,5%	53,3%
c.3846G>A	W1282X	0,0%	0,6%	0,6%	4,4%
c.3909C>G	N1303K	5,0%	2,4%	1,2%	4,4%
c.54-5940_273+10250del21kb	CFTRdele2,3(21kb)	5,0%	5,8%	4,5%	4,4%
c.2052_2053insA	2184insA	5,0%	0,4%	1,0%	4,4%
c.1624G>T	G542X	3,8%	2,0%	1,7%	2,2%
c.489+1G>T	621+1G>T	0,0%	0,4%	0,3%	2,2%
c.3276C>A	Y1092X	1,3%	0,0%	0,1%	2,2%
c.302T>G	L101X	2,5%	0,0%	0,1%	1,1%
c.1397C>G	S466X	1,3%	0,0%	0,1%	1,1%
c.2012delT	2143delT	0,0%	0,9%	1,8%	2,2%
c.53+1G>T	185+1G>T	0,0%	0,2%	0,0%	1,1%
c.1394C>T	p.Thr465Ile	0,0%	0,0%	0,0%	1,1%
c.1037_1038insA	p.Leu346Hisfs*	0,0%	0,0%	0,0%	1,1%
c.2051_2052delAAinsG	2183AA>G	0,0%	0,1%	0,7%	1,1%
c.2657+5G>A	2789+5G>A	0,0%	0,5%	0,0%	1,1%
c.3717+12191C>T	3849+10kbC>	0,0%	1,7%	3,9%	1,1%
c.215C>A	A72D	0,0%	0,0%	0,0%	1,1%
c.3454G>C	D1152H	0,0%	0,0%	0,1%	1,1%
c.3731G>A	G1244E	0,0%	0,0%	0,0%	1,1%
c.1727G>C	G576A	0,0%	0,0%	0,3%	1,1%
c.3302T>A	M1101K	0,0%	0,0%	0,0%	1,1%
c.2591_2592delTT	2723delTT	0,0%	0,0%	0,0%	1,1%
c.3822G>A	W1274X	0,0%	0,0%	0,0%	1,1%
c.2002C>T	R668C	0,0%	0,0%	0,2%	1,1%
c.325_327delTATinsG	p.Tyr109Glyfs*	0,0%	0,0%	0,0%	1,1%
c.54-5811_164+2186del273+6780_273+6961inv	CFTRdele2	0,0%	0,2%	0,0%	1,1%

17. táblázat. *CFTR* mutációk előfordulása Kelet-európai országokban cseh (525), lengyel (526) és korábbi saját magyar (450) adatokkal összevetésben.

Összesen 27 különböző mutációt találtunk, az F508del 53,3%-ban volt jelen. Négy mutációt (W1282X, N1303K, CFTRdele2,3 (21kb) és 2184insA) mutattunk ki 4,4%-ban, míg másik 4 mutációt (G542X, Y1092X, 621+1G>T, és 2143delT) mutattunk ki több, mint egy allélen. Az analitikai szenzitivitás értékeket a 18. táblázat mutatja be. Az MLPA analízis a 2-es exont érintő deléciót mutatott ki egy betegben heterozigóta formában, melyet allélspecifikus PCR-rel és szekvenálással igazoltunk, ez az egy exon deléció egy korábban már leírt deléció (527).

HGVS név	Történeti név/ fehérjeszintű következmény	Allélek száma (n=170)	Allél- gyakoriság	Mutáció <i>transz</i>	Detektált mutációk aránya
c.1521_1523delCTT	F508del	104	61,2%	különböző mutációk	Elucigene CF29v.2 75,9%
c.3846G>A	W1282X	4	2,4%	F508del, 2184insA, W1282X	
c.3909C>G	N1303K	8	4,7%	különböző mutációk	
c.1624G>T	G542X	5	2,9%	különböző mutációk	
c.1585-1G>A	1717-1G>A	1	0,6%	F508del	
c.1040G>C	R347P	1	0,6%	G542X	
c.2051_2052delAAinsG	2183AA>G	1	0,6%	D1152H	
c.2657+5G>A	2789+5G>A	1	0,6%	1G>T	
c.489+1G>T	621+1G>T	2	1,2%	F508del, 2789+5G>	
c.3454G>C	D1152H	1	0,6%	2183AA>G	
c.3717+12191C>T	3849+10kbC>	1	0,6%	F508del	"Szláv" PCR 4,7%
c.54-5940_273+ 10250del21kb	CFTRdele2,3(21kb)	8	4,7%	F508del, N1303K, Y109G	
c.2052_2053insA	2184insA	8	4,7%	F508del, G542X, W1282	
c.2012delT	2143delT	2	1,2%	F508del	CFTR e14 szekvenálás 6,5%
c.2002C>T	R668C	1	0,6%	G576A	
c.3276C>A	Y1092X	3	1,8%	F508del	
c.302T>G	L101X	3	1,8%	F508del, 2723delTT	A teljes CFTR kódoló régió szekvenálása 11,8%
c.1397C>G	S466X	2	1,2%	F508del	
c.53+1G>T	185+1G>T	1	0,6%	N1303K	
c.1394C>T	p.Thr465Ile	1	0,6%	F508del	
c.1037_1038insA	p.Leu346Hisfs*	1	0,6%	F508del	
c.215C>A	A72D	1	0,6%	N1303K	
c.2491G>T	E831X	1	0,6%	N1303K	
c.658C>T	Q220X	1	0,6%	F508del	
c.3731G>A	G1244E	1	0,6%	F508del	
c.1727G>C	G576A	1	0,6%	R668C	
c.3302T>A	M1101K	1	0,6%	F508del	
c.2591_2592delTT	2723delTT	1	0,6%	L101X	
c.3822G>A	W1274X	1	0,6%	F508del	
c.325_327delTATinsG	p.Tyr109Glyfs*4	1	0,6%	CFTRdele2,3(21kb)	
5811_164+2186del273+678 0_273+6961inv	CFTRdele2	1	0,6%	F508del	MLPA 0,6%

18. táblázat. Mutációk előfordulása és analitikai szenzitivitás értékek. Az új mutációk vastag betűvel szedve.

Munkánk során sikeresen bővítettük ki a magyar CF adatbázist. A kombinált adatbázisból az alábbi következtetéseket vonhatjuk le.

31 különböző mutációt találtunk a korábbi és a jelenlegi vizsgálatban, kettő ezek közül új volt. Ezek az új mutációk minden valószínűség szerint patogén eltérések, az egyik olvasási kereteltolódást okoz és egy korai terminációt 17 aminosavval később (c.1037_1038insA, p.Leu346Hisfs*17). Az új, korábban le nem írt misszensz mutációt (c.1394C>T, p.Thr465Ile) az alábbiak miatt ítéltük patogénnek:

1. Az érintett reziduum egy filogenetikailag rendkívül konzervatív pozíciót foglal el (Bos taurus, Equus caballus, Felis catus, Mus musculus).
2. Egy másik patogén eltérést, amely ugyanezt az aminosavat érinti (p.Thr465Asn) mutációt már leírtak (528).
3. A SIFT analízis károsító hatást ír le a mutációt illetően.

A legújabb ACMG klasszifikáció szerint is valószínűleg patogén kategóriába sorolható ez a mutáció, mégpedig négy kategória alapján: PM1, PP2, PM2, PP3, PP4, azaz nem szinonim variáns egy mutációs forrópont és kritikus jól ismert funkcionális doménben, olyan génben, amelyben a

misszensz mutációk a patogenitás gyakori okai. Ezen kívül a GnomAD populációs adatbázisban extrém alacsony előfordulási gyakorisággal rendelkezik, a predikciós módszerek egybehangzóan patogénnek ítélik ezt a variánst, valamint a beteg fenotípusa nagyon specifikus az adott betegségre nézve és végül a recesszív betegség esetében *in trans* öröklődésment egy patogén variánssal. 11 mutációt találtunk nagyobb, mint 1%-os frekvenciával. Az 30. ábra tanulsága szerint a földrajzi tendenciák mindkét szláv mutáció esetén felismerhetőek.



30. ábra. A szláv eredetű *CFTR*dele2,3(21kb) és 2184insA mutációk földrajzi előfordulása. o – *CFTR*dele2,3(21kb), x – 2184insA, ● – más mutációk.

A *CFTR*dele2,3 egy kivételével és a 2184insA pedig mindegyik esetben az északi országrészekből származó betegekben van jelen, a 2184insA pedig méginkább csak észak-keletiekben, ami nem meglepő hiszen Nyugat-Ukrajnában ez a mutáció nagy frekvenciával fordul elő (523). A 75,9%-os analitikai szenzitivitáshoz, amit a kereskedelmi forgalomban kapható kit jelent, a szláv delécio vizsgálata 4,7%-ot, míg a 14-es exon szekvenálása 6,5%-ot ad, az MLPA analízis 0,6%-ot és a direkt szekvenálás pedig 11,8%-ot.

Konklúzióként levonhatjuk, hogy a vizsgálatok azon túl, hogy megállapítja a mutációk előfordulását a magyar CF betegekben, nagyon jó alapul szolgálhatnak az újszülöttkori szűrésben, amennyiben olyan teszt kombinációt lehet elérni, hogy a 85-90% elvárt szenzitivitást az újszülöttkori szűrő teszt DNS alapú vizsgálata tudja biztosítani (529).

Vizsgálataink megkezdésekor nem álltak még rendelkezésre mutáció specifikus terápiák, de az elmúlt időszakban a molekuláris epidemiológiai felméréseink megnyitották a lehetőséget egy sokkal kiterjesztettebb, teljes áttekintést adó olyan vizsgálat sorozatra, amely jelenleg is folyik és amelynek feladata a teljes magyar CF regiszter több, mint 500 fős betegcsoportjának genetikai revíziója. Meggyőződésem, hogy ez a genetikai revízió hozzásegítheti a magyarországi CF betegeket is ahhoz, hogy megkaphassák a legmodernebb mutáció specifikus kezeléseket abban az

esetben, ha azok Magyarországon engedélyeztetésre kerülnek. Ennek a munkának az egyik - eddig nem publikált eredménye - a 19. táblázatban kerül bemutatásra, ahol azt látjuk, hogy a jelenleg engedélyeztetés alatt álló gyógyszerek esetében milyen betegszámban lehet gondolkodni a magyar CF betegek esetében.

Mutációspecifikus gyógyszer	Kezelésre alkalmas genotípus	Kezelhető betegek száma
Kalydeco (ivacaftor)	2789+5G>A, D110H, F1052V, G551S, R117H, S549R, 3272-26A>G, D1152H, F1074L, K1060T, R347H, S945L, 3849+10kbC>T, D1270N, G1069R, L206W, R352Q, S977F, 711+3A>G, D579G, G1244E, P67L, R74W, A1067T, E193K, G1349D, R1070Q, S1251N, A455E, E56K, G178R, R1070W, S1255P, D110E, E831X, G551D, R117C, S549N	29
Orkambi (lumacaftor + ivacaftor)	Phe508del homozigóta	196
Symdeco (tezacaftor + ivacaftor)	Phe508del homozigóta, E56K, R117C, A455E, S945L, R1070W, 3272-26A>G, P67L, E193K, S977F, F1074L, 3849+10kbC>T, R74W, L206W, D579G, F1052V, D1152H, D110E, R347H, 711+3A>G, K1060T, D1270N, D110H, R352Q, E831X, A1067T, 2789+5G>A	211
Trikafta (elexacaftor+tezacaftor+ivacaftor)	Phe508del heterozigóta	353

19. táblázat. A magyar CF betegek mutációspecifikus személyre szabott kezelése irányába tett erőfeszítéseink eredménye (nem publikált adat, Deák Anna TDK hallgató munkája).

Azt gondolom, hogy a korábbi molekuláris epidemiológiai felméréseink nélkül ez az összefoglaló, standardizált módszerekkel történő genetikai analízis nem jöhetett volna létre, ami felhívja a figyelmet arra, hogy a súlyos monogénis betegségek molekuláris epidemiológiai felmérése, a mutáció spektrum meghatározása, direkt transzlációval rendkívül gyorsan terápiás kezelési információkra fordítható le.

4.10. SLO kutatómunka

4.10.1 SLO kohorsz vizsgálat

A koleszterin és a 7-DHC szintek mérése során minden beteg esetében extrém emelkedett szérumszintet tudtunk mérni (20. táblázat). A koleszterin szintek általában alacsonyak voltak a betegek zömében, a korszpecifikus referenciatartományhoz viszonyítva. A 13-ból 12 beteg esetében sikeresen állítottuk fel a molekuláris genetikai diagnózist (20. táblázat).

Betegek	Genotípus	Fehérjeszintű hatás	Súlyossági fok	7-DHC (mg/L)	Koleszterin (mmol/L)
1	c.[964-1G>C];[964-1G>C]	olvasási keret eltolódás	55-S	109	0,31
2	c.[964-1G>C];[1190C>T]	olvasási keret eltolódás/p.Ser397Leu	50-T	302	1,4
3	c.[964-1G>C];[1190C>T]	olvasási keret eltolódás/p.Ser397Leu	40-T	253	1,08
4	c.[964-1G>C];[1190C>T]	olvasási keret eltolódás/p.Ser397Leu	55-S	174	0,58
5	c.[452G>A];[740C>T]	p.Trp151*/p.Ala247Val	10-E	130	3,47
6	c.[976G>T];[374A>G]	p.Val326Leu/p.Tyr125Cys	40-T	205	2,1
7	c.[730G>A];[976G>T]	p.Gly244Arg/p.Val326Leu	40-T	155	0,72
8	c.[326T>C];[452G>A]	p. Leu109Pro/p.Trp151*	30-T	126	0,77
9	c.[1295A>G];[1328G>A]	p.Tyr432Cys/p.Arg443His	15-E	217	2,0
10	c.[452G>A];[976G>T]	p. Trp151*/p.Val326Leu	20-T	156	1,57
11	c.[725G>A];[452G>A]	p.Arg242His/p.Trp151*	55-S	215	0,8
12	c.[452G>A];[1295A>G]	p.Trp151*/p.Tyr432Cys	20-T	274	1,47
13	c.[452G>A];[?]	p. Trp151*/?	15-E	87	2,44

20. táblázat. A magyarországi SLO betegek klinikai, genetikai és biokémiai jellemzői. A Magyarországon jelenleg ismert 14 SLO-szindrómás betegből a táblázat a hazánkban diagnosztizált 13 adatait tartalmazza. Rövidítések: E (enyhe), T (típusos), S (súlyos). Korspecifikus referenciatartományok: 7-DHC: <0,15 mg/L, Koleszterin: 0–1 év: >1,3, >1 év: 2,8–5,2 mmol/L. Módosítva az eredetiből (DOI: 10.1556/650.2015.30256).

Az ismert nonszensz, misszensz és splicing defektust okozó mutációk mellett egy korábban nem leírt misszensz mutációt, a c.374A>G (p.Tyr125Cys) mutációt mutattuk ki heterozigóta formában. A mutáció patogenitását az alábbiak támasztják alá:

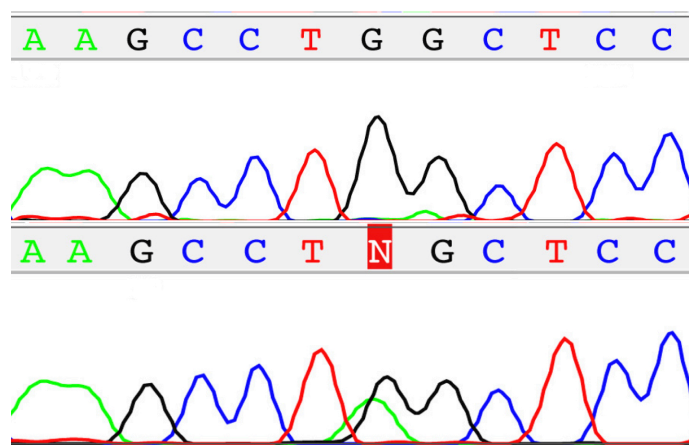
1. Az érintett aminosav reziduum filogenetikailag rendkívül konzervált (31. ábra)
2. A Grantham - differencia 194.
3. A SIFT alapján az érintett reziduum a tirozin-cisztein cserét nem tolerálja.

ember	CHKFLPGYVGGIQEGAVTPAGVVNKYQING
rhesus makákó	CHKFLPGYVGGIQEGAVTPAGVVNKYQING
kutya	CHKFLPGYVGGVQEGAVTPAGIVNKYEING
egér	CHRFLPGYVGGVQEGAITPAGVVNKYEVNG
zebradánió	LHKILPGYVGGVQDGARTPAGLINKYEVNG

31. ábra. A Tyr125 (vastagon jelölve) filogenetikai konzervativizmusa. Forrás: DOI: 10.1159/000343923.

Mindezek mellett ez volt az egyetlen gyaníthatóan kóroki mutáció, amit *in trans* detektáltunk egy ismert másik SLO-t okozó mutációval, a c.976G>T (p.Val326Leu) mutációval az érintett betegben. A fehérje ezen részében írtak már le kóroki mutációkat (p.His119Leu (226), p.Gly138Val (530)). A c.374A>G mutáció esetében a PCR-RFLP analízis kizárta annak a valószínűségét, hogy ez egy ártalmatlan polimorfizmus lenne, amely jelen van a magyar populációban. 100 allélt reprezentáló 50 egészséges egyénben a mutáció nem volt kimutatható. Ez az eltérés a gnomAD adatbázisban sem szerepel (https://gnomad.broadinstitute.org/gene/ENSG00000172893?dataset=gnomad_r2_1, 2020. 04. 21-i keresés).

Az emelkedett 7-DHC specifikus SLO szindrómára (229), így a 13-as beteg esetében a diagnózis az emelkedett 7-DHC szint és a klinikai tünetek alapján felállítható volt annak ellenére, hogy csak egy patogén mutációt tudtunk kimutatni. Ebben az egyedi esetben egy rendkívül alapos három szintű genetikai analízist végeztünk el. Az első szintű a kódoló régió vizsgálata egy korábban leírt patogén mutációt mutatott ki (c.452G>A (p.Trp151*)). A második szintű genetikai tesztelésben a nem kódoló exonokat és a szabályzó régiókat vizsgáltuk meg, ez eredménytelen volt, a harmadik szinten pedig cDNS szekvenálást végeztünk a beteg mintájában, amely az alábbi konklúzióhoz vezetett. Nem volt kimutatható más mutáció, ami érintené a kódoló régiót, ami arra utal, hogy inkább az mRNS mennyisége, mint minősége érintett a másik, nem identifikált genetikai eltérés által. A DNS és RNS szinten, vizsgálataink bebizonyították a nonszensz mediálta mRNS lebomlás jelenlétét, hiszen a fehérvérsejtekből nyert mRNS-ben nem volt kimutatható p.Trp151* allél (32. ábra).



32. ábra. A nonszensz-mediálta mRNS lebomlás (NMD) jelensége SLO-ban. A gDNS-ben jelen levő adenin (alsó panel) az mRNS-ből hiányzik (felső panel). Forrás: DOI: 10.1159/000343923.

A *DHCR7* mutációk esetén mutattak már ki NMD jelenséget (461). Nem könnyű ezt a beteget elhelyezni az SLO spektrumában, fenotípusa enyhébb. Az összes exon és az exon-intron határok vizsgálata kb. 95%-os detektálási szenzitivitást jelent (531). Nem zárható ki annak a lehetősége, hogy valamilyen távoli szabályzó elembe bekövetkező mutáció csökkenti, de meg nem szünteti az mRNS keletkezését, hiszen a cDNS szekvenálás bizonyította a másik mutációt hordozó allél mRNS szintű expresszióját, mert a cDNS szekvenálás a p.Trp151* allél hiányát mutatta ki.

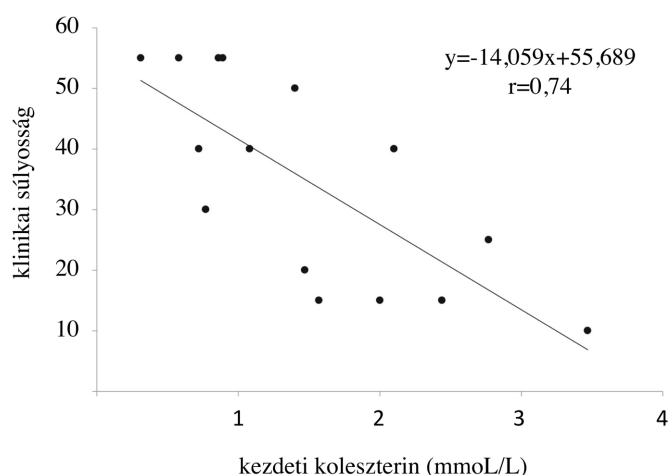
A földrajzi különbségek jelen vannak az SLO mutáció spektrumában is. Az irodalomban leírt leggyakoribb c.964-1G>C mutáció, amely valószínűleg brit eredetű (249) és gyakran kimutatható a Mediterráneumban (532), viszont szinte teljesen hiányzik a szláv eredetű népességből (532, 533)

a mi beteganyagunkban is a második leggyakoribbnak találtatott, négy allélen volt jelen. A mi kohorszunkban a p.Trp151* 6 esetben volt kimutatható, ami a leggyakoribb mutációvá tette ezt az eltérést. Összességében ez a mutáció úgy tűnik, hogy meglehetősen gyakran előfordul Lengyelországban, Ausztriában, Csehországban, Szlovákiában és igen ritka Nagy-Britanniában és Olaszországban. A másik tipikus kelet európai mutáció, a p.Val326Leu (249) nagyon hasonló eloszlási mintázatot mutat. Összességében ez azt mutatja, hogy az allél heterogenitás különbözik Európa különböző népeiben.

Egy család kivételével a patogén mutáció kombinációk nonszensz-misszensz, misszensz-misszensz vagy splicing-misszensz mutációk, ami azt jelenti, hogy egyfajta reziduális enzim aktivitás ezekben az esetekben nem zárható ki. Egy nonszensz mutáció bizonyosan, míg egy splicing mutáció nagyon valószínűen teljes funkcióvesztést jelent, de egy misszensz mutáció esetében valamilyen fokú aktivitás megtartott maradhat. Az egyedüli eset, ahol kettő igazolt null allélt mutattunk ki (c.964-1G>C) az első érintett gyermek az első életnapon halt meg és a második és harmadik terhessége az édesanyának spontán vetéléssel végződött a 7. és 14. héten. A második magzatból molekuláris genetikai tesztelés nem történt, de a másik kettő esetében kimutattuk a c.964-1G>C mutációt. Összességében ezek az eredmények arra utalnak, hogy a korábbi megfigyelések valószínűleg helytállóak, miszerint két súlyos null allélt eredményező mutáció nagyon ritka kivételtől eltekintve nem kompatibilis az élettel. Emellett azt is alátámasztjuk, hogy az érintett gyermekek fenotípusa nagy mértékben a genotípustól függ, de nem zárható ki egyéb genetikai és környezeti módosító tényezők fontos szerepe. Hasonlóan számos, rendkívül súlyos monogén betegséghez, az SLO esetében is a klinikai laboratóriumi genetika célja a reprodukciós döntéshozatal segítése. Eddigi munkánk során öt család esetében kilenc alkalommal végeztünk prenatális genetikai diagnosztikát (hét esetben chorion biopszia, két esetben magzatvíz mintavétel). Két esetben detektáltunk kóros genotípust, míg a megszületett hét gyermek közül mind az öt vizsgált esetben egyezett a pre- és posztnatális molekuláris diagnosztika eredménye (négy gyermek heterozigóta hordozó, egy gyermek vad típus). A prenatális molekuláris diagnosztika esetén a minta laboratóriumba érkezése és az eredmény közti leletátfordulási idő átlagosan 2,55 nap (legrövidebb 1, leghosszabb 4 nap) volt.

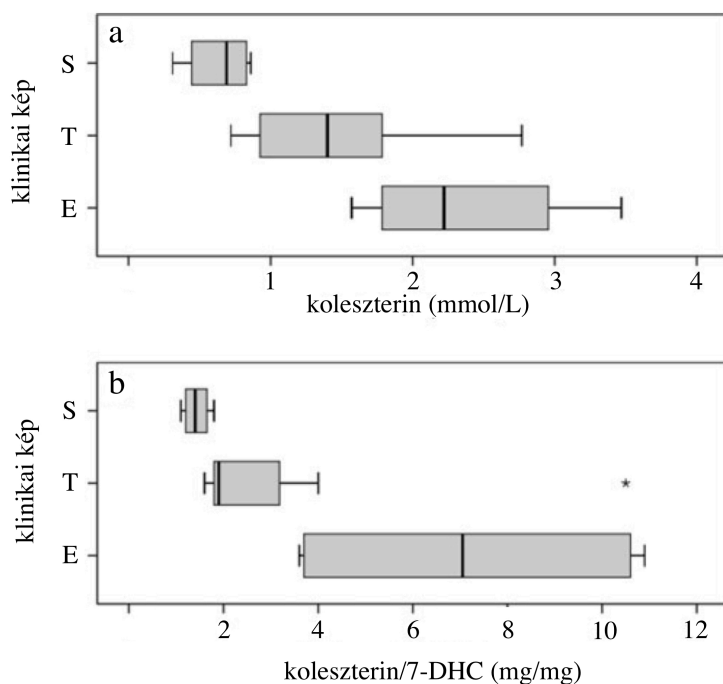
4.10.2. Biomarkerek használata az SLO szindróma klinikai súlyosságának megítélésében

A kezdeti koleszterin koncentráció klinikai súlyossággal történő korrelációját mutatja az 33. ábra (n=15; r=0,74).



33. ábra. A klinikai súlyosság összefüggése a kezdeti koleszterin szinttel SLO szindrómában. Forrás: DOI 10.1007/s00431-012-1925-z. Dr. Oláh Anna mérései.

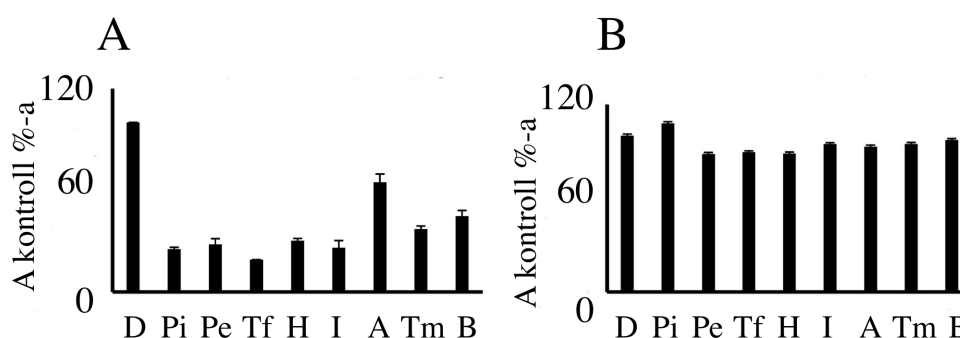
A kezdeti koleszterin-7DHC ráta a klinikai súlyossági fokkal egy hasonló gyenge inverz kapcsolatot mutatott ($r=0,669$). A három SLO súlyossági csoport statisztikai analízise szignifikáns különbségeket mutatott a kezdeti koleszterin szintekben és az enyhe és súlyos csoportok között (Bonferroni teszt, $p=0,01$; 34. ábra a). A Cho/7DHC ráták a csoportok közt szintén különbséget mutattak (Kruskal-Wallis test, $p=0.004$; 34. ábra b).



34. ábra. (a) A kezdeti koleszterin szint súlyos (S), típusos (T) és enyhe (E) klinikai képet mutató SLO betegekben. (b) A kezdeti koleszterin/7-DHC hányados a betegcsoportban. Forrás: DOI 10.1007/s00431-012-1925-z. Dr. Oláh Anna mérései.

4.10.3. Kis molekulák hatása a 7-DHC szintre

A 727 kis molekulású anyagból 30 csökkentette a 7-DHC szintet az egyik alapvető sejtvonal alapú tesztrendszerben, a Dhcr7- deficiens Neuro2a sejtekben. Ezek a kísérletek azt mutatták, hogy statinok, ösztrogén receptor modulátorok és bizonyos antifungális szerek a 7-DHC szintet csökkentik (35. ábra A, B).



35. ábra. A 7-DHC szintet csökkentő kis molekulák humán SLO fibroblasztokon vizsgálva. A 7-DHC (A) csökkenése mellett a koleszterin szintre (B) kifejtett minimális hatás figyelhető meg. Rövidítések: D (DMSO), Pi (pitavastatin), Pe (perphazine), Tf (Trifluoperphanazine), H (hydroxyzine), I (Imatinibe), A (Acitretin), Tm (trimebutine), B (budesonide). Forrás: DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01696. Dr. Zeljka Korade, Dr. Mirmics Károly, Dr. Ned Porter mérései.

Ez a publikáció még egy fontos adalékkal szolgál: a normál kontroll Neuro2a sejteken tesztelve a kutatócsoport kimutatta, hogy az aripiprazole és a trazodone a 7-DHC szint emelkedését eredményezi ezen a sejtvonalon.

A 7-DHC csökkentő terápia felé vezető úton a 7-DHC szint csökkentő kis molekulású anyagok felmérése jelentős lépés lehet. Az aripiprazole és a trazodone, melyek nagyon gyakran használt antipszichotikumok 7-DHC szint növelő hatásának megfigyelése egy újabb kutatási irányt indított (lásd lentebb).

4.10.4. A *DHCR7* patogén mutációt hordozó heterozigóták érzékenyek az aripiprazole és trazodone kezelésre

A különböző koncentrációval tesztelt aripiprazole és trazodone expozíció 6 napos tenyésztést követően szignifikánsan megemelkedett 7-DHC szintet okozott mind a heterozigóta, mind a kontroll fibroblasztokban, a heterozigóta fibroblastokban ez a 7-DHC szint átlagban kétszerese volt a kontrollokhoz képest. Az össz koleszterin szintet a kezelés mindkét esetben enyhe mértékben csökkentette. A *de novo* lipid bioszintézis tesztelésére a laboratórium ^{13}C -Lan kezelést

alkalmazott, és ezt követően a mérések azt mutatták, hogy az aripirazole és trazodone kezelés a koleszterin bioszintézis *de novo* útját érinti. A heterozigóták esetében szignifikánsan kevesebb koleszterin keletkezett a vad típusúakhoz képest, mind aripirazole mind trazodone kezelés esetén, míg a 7-DHC keletkezése vagy magas szintje volt kimutatható, különösen a heterozigótákban. A két VUS (kontroll) fibroblaszt esetében érdekes eredményeket kaptunk. A c.1341C>T genotípusú sejtvonal, amely esetében egy potenciálisan splicingot érintő mutációt mutattunk ki, a heterozigótáknak megfelelő vagy arra hasonló módon reagált az aripirazole kezelésre, de a trazodone-ra inkább kontrollként. A c.1012G>A mutációt hordozó sejtvonal mindkét kezelésre normál kontrollnak megfelelően válaszolt, ami azt mutatja, hogy kevésbé valószínű, hogy a hatása patogén lenne, míg a c.1341C>T mutáció némiképp átmeneti lehet.

Összességében ennek a tanulmánynak a konklúziója 5 pontban foglalható össze.

1. Az aripirazole és trazodone kezelés szignifikánsan megemeli a 7-DHC szintet a heterozigóta fibroblasztokban.
 2. Az aripirazole és trazodone kezelés hatása dózisfüggő.
 3. A *DHCR7* vad típusú és heterozigóta fibroblasztok a humán terápiás tartományú aripirazole és trazodone kezelésre különféleképpen reagálnak. A heterozigóta genotípusú fibroblasztoknak a 7-DHC szintekre nézve sokkal határozottabb válasza van, mint a kontroll fibroblasztoknak.
 4. Az izotópos mérések bizonyították azt, hogy a kezelések során a koleszterin *de novo* bioszintézise érintett, nem pedig a stabilitása vagy a körforgása (turnover). Mivel a koleszterin prekursor profil nem változott a kezelés során, az elsődleges aripirazole és a trazodone hatás a 7-DHC-koleszterin átalakulásban érhető tetten. Ugyan az eredményeink heterozigóta fibroblasztokon történő kísérletekből jöttek létre, de könnyen lefordíthatók a betegségben érintett egyik kritikus szervrendszer, a központi idegrendszer nyelvére is, hiszen a neuronok jelentős koleszterin szintetizátorok, a *DHCR7*-nek rendkívül erős expressziója van az agyban (534, 535). A koleszterinnek strukturális szerepén túl számos funkcionális feladata is van, ebből következően a nem megfelelő koleszterin mennyiségnek illetve a prekursor 7-DHC felszaporodásának rendkívül káros hatása lehet. Jól ismert, hogy a 7-DHC emelkedés káros, hiszen rendkívül reaktív lipid molekula (234), amely spontán szabadgyök peroxidáción megy keresztül, több mint egy tucat oxidációs terméket eredményezve. Ezek az oxiszterolok (235) citotoxikus, sejt proliferációt csökkentő hatásúak. Eredményeink alapján a potenciális következményekről a hipotézis felállítását az alábbi tények segíthetik.
1. A *DHCR7* heterozigóta státusz emelkedett 7-DHC szinttel jár.
 2. A fejlődési defektusok az élve született újszülöttek 3-5%-ában kimutathatóak (536).

3. A teratogén hatások 1%-áért gyógyszerek felelősek (537).

4. Az USA-ban Abilify néven forgalmazott aripirazole-t igen széleskörűen alkalmazzák, 2013-ban a legtöbbet felírt gyógyszer volt.

Összességében a mi megközelítésünk a személyre szabott medicina irányába tett erőfeszítésként értelmezhető. Ezekkel a vizsgálatokkal keretbe foglalva az SLO tanulmányokat látható az, hogy egy súlyos monogénes betegség molekuláris epidemiológiai felmérése milyen új kutatási irányokat nyithat meg.

A genetikai tesztelés beállítása (2008) óta végzett prenatális diagnosztika az, amit ebben az esetben felkínálhatunk a szülőknek és célzott diagnosztikával az egészséges gyermekek születése biztosítható. Ezen túlmenően, a sokkal nagyobb populációt érintő kitekintések is, akár a pathomechanizmus jobb megértése, akár a szinte népegészségügyi jelentőségű következtetések levonásában rejlő lehetőségeket is jelentheti, hiszen a munkánk hozzájárult ahhoz, hogy egy nemzetközi kollaborációban részt vegyünk abban a tanulmányban, amely bizonyította, hogy a koleszterin bioszintézis útra bizonyos kis molekulású farmakológiai aktív anyagok komoly hatással bírnak, valamint ehhez betegből származó fibroblasztokkal jártunk hozzá. E tanulmánynak a következtetése egy új irányt indított meg, amelyben immáron heterozigóta - tehát a populációban szignifikánsan előforduló - egyének potenciális veszélyeztetettségét jelenti bizonyos nagy populációban használt antipszichotikumok használata esetén, ha a gyógyszert szedő heterozigóta éppen gyermeket vár. Ennek bizonyítása nagy populáción még várat magára, de a tanulmányunk az elvi lehetőségre felhívta a figyelmet. Az SLO munkánk jelentős része kollaboráció keretében zajlott. Ez magában foglalta a klinikai (Dr. P. Szabó Gabriella), a laboratóriumi diagnosztikai (Dr. V. Oláh Anna) és az alapkutatói (Dr. Zeljka Korade, Dr. Mirnics Károly, Dr. Ned Porter, Vanderbilt University) együttműködéseket egyaránt.

4.11. Monogénes kohorsz vizsgálatok: Fenokópiák ARPKD-ben

A 36 ARPKD klinikai diagnózissal rendelkező beteg esetében 27 esetben (75%) esetében találtunk kettő *PKHD1* kóroki mutációt (21. táblázat), ezek közül 25 beteg biallélikus pont mutációkat tartalmazott (P1-25), kettő pedig összetett heterozigótának bizonyult egy pont mutációra és egy CNV-re (dupe33-35, P26, dele1-55, P27). Egy beteg (P28) egy heterozigóta olvasási keret eltolódást eredményező mutációval rendelkezett. Egyetlen egy *PKHD1* mutációt sem sikerült találni nyolc családban (23. táblázat, 36. ábra). Két mutációt, a p.Thr36Met és a p.Ser2639* találtunk gyakoribbnak a többinél, 15/54 (28%) és 8/54 (15%) aránnyal rendelkeztek a mutáns

allélek között. 7 új, korábban le nem írt mutációt sikerült kimutatni, a fentebb bemutatott két CNV mellett 3 trunkáló mutációt (c.5_8delCTGC, p.Ala3Glyfs*2; c.5088delTG, p.Gly1696fs*1; c.12036delA, p.Gly4013Alafs*24) és két aminosav cserével járó eltérést (c.4328G>A, p.Cys1443Tyr és c.10621A>T, p.Asn3541Tyr). A két utolsó mutáció patogenitását az alábbi tények alapján állapítottunk meg:

(A) A gnomAD adatbázisban nem szerepelnek, (B) mindkét aminosav konzervatívizmust mutat, (C) a Polyphen-2 és a MutationTaster algoritmussal patogénnek minősített eltérésekről van szó.

Család	Beteg	PKHD1 mutáció (eredet, m. anyai, p. apai)	Fehérje szintű következmény	Utolsó vizsgálat/életkor (kor)	Légzési elégtelenség	Diagnóziskori életkor	Diagnóziskori veseshossz (SD pontszám), jobb-bal (kor)	A legnagyobb veseciszta átmérője (kor)	Utolsó mért veseshossz (SD pontszám), jobb-bal (kor)	Vesefunkció (kor)	Hypertensio (kor)	Máj érintettség (kor)
F1	P1	c.107C>T hom (m.p)	p.Thr36Met	vese Tx: 4 év	-	újszülött	+6,55;+8,67 (6 hó)	10 mm (6 hó)	NM	VSVE (2 év)	+ (6 hó)	HM, EME (0,5 év)
F2	P2	c.6992T>A het (p) c.7916C>A het (m)	p.Ile2331Lys p.Ser2639*	8 év	+	újszülött	+8,45;+8,45 (1 nap)	6 mm (1 nap)	NM	KVE II. (8 év)	+ (1 hó)	CHS, HM, EME, F (2 év)
F3	P3	c.8935C>T het (m) c.7916C>A het (p)	p.Arg2979* p.Ser2639*	† 6 nap	+	intrauterin	+8,71;+8,71 (5 nap)	18 mm (5 nap)	NA	VE (6 nap)	-	CHS, C, HM (4 nap)
F4	P4	c.107C>T het (p) c.6992T>A het (m)	p.Thr36Met p.Ile2331Lys	8 év	+	1 hó	+2,4;+3,07 (2 hó)	<10 mm (2 hó)	+4,08;+5,83 (6 év)	N (8 év)	+ (1 nap)	HM, AS (2 hó)
F5	P5	c.10658T>C het (p) c.7122delT het (m)	p.Ile3553Thr p.Phe2374Leufs*41	11 év	-	4 év	+3,1;+3,1 (4 év)	2 mm (4 év)	+2,59;+1,05 (9 év)	N (11 év)	-	C (4 év)
F6	P6	c.107C>T het (p) c.474G>A het (m)	p.Thr36Met p.Trp158*	† 3 hó	+	újszülött	+12,82;+12,82 (4 nap)	3 mm (4 nap)	+8,96;+8,96 (3 hó)	VSVE (3 hó)	+ (1 nap)	enyhe HM (4 nap)
F7	P7	c.7916C>A hom (m.p)	p.Ser2639*	† 7 hét	+	intrauterin	+2,42;+2,42 (4 nap)	NM	NM	VE (4 hét)	-	HM (4 nap)
F8	P8	c.107C>T hom (m.p)	p.Thr36Met	† 6 hét	+	újszülött	+14,42;+14,42 (4 nap)	5 mm (1 hó)	NM	VE (6 hét)	+ (1 nap)	-
F9	P9	c.107C>T het c.7916C>A het	p.Thr36Met p.Ser2639*	† 3 nap	+	újszülött	+6,47;+5,09 (1 nap)	4 mm (1 nap)	NA	NA	-	enyhe HM, EME, AS (1 nap)
F10	P10	c.5513A>G het (p) c.3463C>T het (m)	p.Tyr1838Cys p.Gln1155*	vese Tx: 4 év	+	újszülött	+12,36;+12,36 (1 nap)	4 mm (3 nap)	+7,88;+7,88 (3 év)	VSVE (4 év)	+ (1 hét)	máj Tx: 4 év
F11	P11	c.3747T>G het (p) c.5513A>G het (m)	p.Cys1249Trp p.Tyr1838Cys	12 yrs	+	intrauterin (32. gesztációs hét)	+9;+9 (1 hó)	6 mm (1 hó)	+8,77;+6,59 (12 év)	KVE IV. (12 év)	+ (3 hó)	EME (1 hó)
F12	P12	c.7916C>A het (m) c.10658T>C het (p)	p.Ser2639* p.Ile3553Thr	vese Tx: 25 év	-	7 év	+4,85;+4,85 (10 év)	5 mm (10 év)	+4,46;+4,46 (18,5 év)	VSVE (25 év)	+ (10 év)	máj Tx: 25 év
F13	P13	c.547C>T het (p) c.4870C>T het (m)	p.Gln183* p.Arg1624Trp	14 év	-	intrauterin (30. gesztációs hét)	+0,05;+1,8 (3 hó)	6 mm (8 év)	+5,15;+7,5 (14 év)	N (14 év)	-	-
F14	P14	c.5_8delCTGC het (p) c.12036delA het (m)	p.Ala3Glyfs*2 p.Gly4013Alafs*25	15 év	-	5 hó	+2,59;+3,8 (5 hó)	1 mm (9 év)	+8,28;+10,08 (15 év)	KVE II. (15 év)	+ (3 év)	-
F15	P15	c.107C>T het (p) c.8552T>C het (m)	p.Thr36Met p.Ile2851Thr	6 év	+	újszülött	+9,69;+9,69 (5 hó)	9 mm (5 hó)	+19,16;+19,1 (6 év)	KVE III. (6 év)	+ (1 nap)	C (1 nap), AS, HM (3 év)
F16	P16	c.664A>G het (m) c.5513A>G het (p)	p.Ile222Val p.Tyr1838Cys	8 év	-	csecsemőkor	+5,24;+5,24 (3 év)	4 mm (3 év)	+3,83;+3,83 (8 év)	N (8 év)	-	-
F17	P17	c.107C>T het (p) c.664A>G het (m)	p.Thr36Met p.Ile222Val	5 év	-	3 hó	+3,8;+3,8 (4 hó)	10 mm (4 hó)	+6,21;+6,21 (5 év)	N (5 év)	-	-
F18	P18	c.2341C>T het (p) c.10621A>T het (m)	p.Arg781* p.Asn3541Tyr	17 év	-	16 év	+1,59;+3,64 (16 év)	11 mm (16 év)	NM	KVE II. (17 év)	-	AS (16 év)
F19	P19	c.7916C>A hom (m.p)	p.Ser2639*	† 3 hét	+	intrauterin	+12,36;+12,36 (1 nap)	8 mm (1 nap)	+16,79;+16,7 (9 (1 hét)	VE (1 hét)	+ (1 nap)	-
F20	P20	c.4328G>A het (m) c.8870T>C het (p)	p.Cys1443Tyr p.Ile2957Thr	4,5 év	+	újszülött	+4,01;+4,01 (4 hó)	3 mm (4 hó)	+10,31;+9,14 (5 év)	KVE II. (4,5 év)	+ (1nap)	AS (4 hó), F (10 hó), HSM (1 év)
F21	P21	c.107C>T het c.5088delTG het	p.Thr36Met p.Gly1696fs*1	† 1 nap	+	intrauterin (32. gesztációs hét)	+18,87;+18,87 (1 nap)	4 mm (1 nap)	NA	NA	NM	-
F22	P22	c.107C>T hom (m.p)	p.Thr36Met	vese Tx: 1,8 év	+	intrauterin (33. gesztációs hét)	+4,79;+4,79 (8 nap)	1 mm (8 nap)	+21,95;+21,9 (5 (1 év)	VSVE (1 év)	+ (1 nap)	F (1 nap), EME (3 hó)
F23	P23	c.107C>T hom (m.p)	p.Thr36Met	† 6 hét	+	újszülött	+15,09;+15,09 (2 nap)	4 mm (2 nap)	NM	VE (6 hét)	+ (1 nap)	-
F24	P24	c.107C>T het (m) c.6992T>A het (p)	p.Thr36Met p.Ile2331Lys	3 év	+	5 hó	+0,2;+0,2 (6 hó)	4 mm (6 hó)	-1,75;+1,75 (3 év)	KVE II (1,5 év)	-	-
F25	P25	c.2167C>T het c.8870T>C het	p.Arg723Cys p.Ile2957Thr	6 év	+	újszülött	+5,92;+5,92 (5 hó)	8 mm (5 hó)	+10,6;+10,6 (6 év)	VSVE (6 év)	+ (1 év)	HSM (5 hó), C (3 év)
F26	P26	c.(5236+1_5237-1)_ (5751+1_5752-1)dup. het	p.His3124Tyr abnormális mRNS	vese Tx: 11 év	+	3 hó	+9,24;+4,48 (3 hó)	10 mm (3 hó)	NM	VSVE (11 év)	+ (3 hó)	C, HM (3 hó)
F27	P27	c.1-43098_8643-31del het (p) c.10174C>T het (m)	nincs fehérje p.Gln3392*	† 10 hét	+	intrauterin	+4,1;+4,1 (1 nap)	NM	NM	VE (10 hét)	+ (1 nap)	-
F28	P28	c.8114delG het (m)	p.Gly2705Valfs*11	26 év	-	4 év	+7,26;+3,26 (4 év)	10 mm (4 év)	+3,73;+3,73 (26 év)	KVE II. (26 év)	+ (17 év)	F, HM, EME (4 év)

21. táblázat. Az ARPKD betegek genotípusa és klinikai fenotípusa. Rövidítések: het (heterozigóta), hom (homozigóta), Tx (transzplantáció), NM (nem mért), NA (nincs adat), VSVE (végstádiumú vese elégtelenség), KVE (krónikus vese elégtelenség), VE (vese elégtelenség), HM (hepatomegalia), EME (emelkedett máj enzim szintek), CHS (cholestasis), F (fibrosis), AS (abnormális szerv struktúra), HSM (hepatosplenomegalia).

Forrás: doi.org/10.1007/s00467-018-3992-5.

Indirekt ARPKD diagnosztikát végeztünk obligát heterozigótákban (nem publikált adat). A *PKHD1* analízis a hat érintett pár minden tagjában igazolta a patogén *PKHD1* eltérést, utat nyitva a következő terhesség esetén a prenatális diagnosztika felé. A mutációk adatai az 22. táblázatban láthatók.

Obligát heterozigóta párok	Anyai genotípus	Apai genotípus
C1	p.Trp2383*/+	p.Val2763Phe/+
C2	p.Gly1970Arg/+	p.Cys91Trp/+
C3	p.Ser2639*/+	p.Ser2639*/+
C4	p.Thr36Met/+	p.Ser2639*/+
C5	p.Ser2639*/+	c.881-1G>A/+
C6	p.Asn3586Serfs*22/+	p.Ser2639*/+

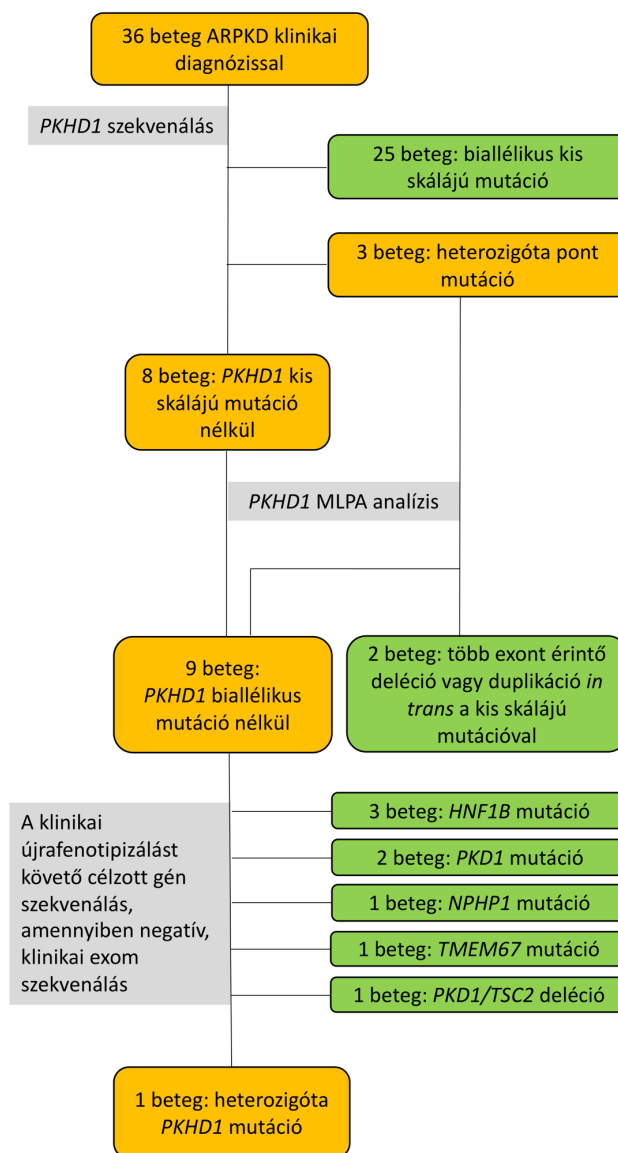
22. táblázat. Az indirekt *PKHD1* mutáció analízisben részt vevő obligát heterozigóták genotípusa. Nem publikált eredmények.

Mind a nyolc család esetében, ahol *PKHD1* mutációt nem sikerült kimutatnunk, más génekben bekövetkező kóroki mutációkat sikerült detektálnunk (23. táblázat, 36. ábra). Három gyermek, akik esetében normál méretű hyperechogén vesét írtak le *in utero* vagy csecsemőkorban, *de novo* delécióval rendelkezett a *HNF1B* génben. Két gyermek 2 és 4 év közötti vese morfológiai reanalízise ADPKD-t valószínűsített, mindkét esetben *de novo PKD1* mutációkat sikerült detektálni. Egy beteg esetében (P31) sclerosis tuberosa diagnózist állítottak fel 4 éves korban, ő egy új *de novo TSC2/PKD1* deléciót hordozott. A P35-ös beteg esetében a 11 éves korban bekövetkező végstádiumú vesebetegség juvenilis nephronophthisist vetett fel. Ő összetett heterozigótának bizonyult egy teljes és egy részleges *NPHP1* delécióra nézve (464). Egy hyperechogén vesékkal és máj fibrózissal diagnosztizált testvér pár (P36, P37) a leggyakoribb *TMEM67* p.Cys615Arg (538) mutációra nézve volt homozigóta (a számításokban csak az egyik testvér adatait vettük figyelembe). Neurológiai érintettségük nem volt. A P28 beteg esetében, aki heterozigóta *PKHD1* mutációra nézve, más génben bekövetkező patogén mutációt nem tudtunk kimutatni az igen alapos genetikai tesztelés ellenére sem (klinikai exom szekvenálás, mely magas lefedettséget biztosított az *NPHP2*, *NPHP3* és *WDR19/NPHP13* gének esetében is). A mutáció kivizsgálási protokoll az 35. ábrán kerül bemutatásra.

Család	Beteg	Mutáció más génben	Fehérje szintű következmény	Utolsó vizsgálat (kor)	Légzési elégtelenség	Diagnóziskori életkor	Diagnóziskori vesehossz (SD pontszám), jobb-bal (kor)	A legnagyobb veseciszta átmérője (kor)	Utolsó mért vesehossz (SD pontszám), jobb-bal (kor)	Vesefunkció (kor)	Hypertensio (kor)	Máj érintettség (kor)
F29	P29	<i>PKD1</i> c.12310_12313delGTTA het (de novo)	p.Val4104Phefs*93	4 év	-	intrauterin	+3.26;+3.26 (7 hó)	3 mm (7 hó)	+2.17;+3.23 (4 év)	N (4 év)	-	-
F30	P30	<i>PKD1</i> c.920delT het (de novo)	p.Phe307Serfs*27	3,5 év	-	intrauterin (32. gesztációs hét)	+2.19;+0.24 (1 nap)	15 mm (1 nap)	+6.93;+0.95 (3,5 év)	N (3,5 év)	-	-
F31	P31	<i>PKD1/TSC2</i> 16:g.(?_2088232)_(2134081_?)del het. (de novo)	nincs fehérje termék	6,5 év	-	6 ws	+0.44;+0.54 (3,5 év)	10 mm (2 hó)	+0.42;+0.42 (6,5 év)	N (6,5 év)	-	-
F32	P32	<i>HNF1B</i> (?-1)(*)?-?del het (de novo)	nincs fehérje termék	9 év	-	intrauterin (16. gesztációs hét)	+1.32;+1.32 (2 hó)	8 mm (2 hó)	+2.82;+2.82 (9 év)	N (9 év)	-	-
F33	P33	<i>HNF1B</i> (?-1)(*)?-?del het (de novo)	nincs fehérje termék	6 év	-	újszülött	+1.62;+1.62 (1 nap)	9 mm (5 év)	+0.15;+0.5 (6 év)	N (6 év)	-	-
F34	P34	<i>HNF1B</i> (?-1)(*)?-?del het (de novo)	nincs fehérje termék	11 év	-	intrauterin	-0.1;+0.23 (3 hó)	3 mm (3 hó)	+0.53;+0.53 (10 év)	KVE II. (10 év)	-	EME (7 év)
F35	P35	<i>NPHP1</i> (?-1)(*)?-?del het (m)	nincs fehérje termék	Vese Tx: 12,5 év	-	11,5 év	+0.42;+0.42 (11,5 év)	10 mm (11,5 év)	NA	VSVE (11,5 év)	+ (11,5 yrs)	EME (11,5 év)
		<i>NPHP1</i> c.(1810+1_1811-1)(*)?-?del (p)	?									
F36	P36	<i>TMEM67</i> c.1843T>C hom	p.Cys615Arg	Vese Tx: 9 év	+	intrauterin	+1.29;+1.8 (1 hó)	9 mm (1 hó)	-4.74;-4.74 (9 év)	VSVE (9 év)	-	-
F36	P37			20 év	-	3 hó	+1.51;+1.51 (3 hó)	2 mm (9 év)	-2.88;-2.78 (18 év)	VSVE (19 év)	-	EME (11 év), F (20 év)

23. táblázat. A fenokópiák genotípusa és klinikai fenotípusa. Rövidítések: het (heterozigóta), hom (homozigóta), Tx (transzplantáció), NA (nincs adat), VSVE (végstádiumú vese elégtelenség), KVE (krónikus vese elégtelenség), EME (emelkedett máj enzim szintek), F (fibrosis). Forrás: doi.org/10.1007/s00467-018-3992-5.

A kohorsz betegek esetében megállapítottuk a fenotípusos jellemzőket is. A *PKHD1* mutációt hordozó 27 betegből 19 gyermeknél (70%) perinatális légzési elégtelenség volt kimutatható. Kilenc beteg (33%) perinatálisan, 3 hónapos életkor előtt elhunyt. Ezzel ellentétben a más génekben bekövetkező mutációt hordozó 8 családból 9 betegből összesen egy beteg mutatott átmeneti perinatális légzési elégtelenséget, amely egyébként infekció következtében alakult ki (23. táblázat). A perinatális periódust túlélő *PKHD1* mutációval rendelkező 10 gyermekből 9 esetben egy éves korra hipertensio fejlődött ki, míg a más génekben bekövetkező mutációt hordozó betegek esetében egy sem mutatott hipertenziót. A diagnóziskori +4 SD-nél nagyobb átlagos vese hossz a *PKHD1* ARPKD-re volt specifikus. A 27 biállélus *PKHD1* betegből 19 (70%) míg a 9 más génekben bekövetkező mutációt hordozó betegből egynek sem volt ennyire megnagyobbodott veséje. Ezen adatoknak alapján a P28 beteg, akinél nem sikerült tisztázni a genetikai háttér, valószínűsíthetően a *PKHD1* által okozott közepesen súlyos ARPKD-ben szenved (korai hipertensio, nagy mértékben megnagyobbodott vese és máj fibrózis volt jelen).



36. ábra. Az ARPKD klinikai diagnózis esetén alkalmazott mutáció keresési algoritmus. Sárga háttér: genetikailag nem megoldott eset, zöld háttér: genetikai diagnózis, szürke háttér: elvégzett klinikai, illetve klinikai laboratóriumi genetikai vizsgálatok. Forrás: doi.org/10.1007/s00467-018-3992-5.

Ebben a vizsgálat sorozatban, az ARPKD genetikai hátterét derítettük fel a magyarországi ARPKD betegekben. A *PKHD1* pozitív esetek aránya 78% volt, ami jól korrelál a nemzetközi adatokkal (277, 284, 539-542). A *PKHD1* kis skálájú mutációk analízisét követően vizsgáltuk a CNV-eket is a *PKHD1* negatív betegek között. Biallélikus CNV-t nem sikerült kimutatnunk, mely eredményünk is jól korrelál más betegcsoportok vizsgálatával, azaz, hogy a biallélikus CNV-k jelenléte igen ritka a *PKHD1* génben (277, 278, 539, 540, 543, 544). Detektáltunk egy 3 exonos duplikációt és egy igen nagy méretű deléciót. A duplikációk a *PKHD1* génben rendkívül ritkák, mi publikáltuk a második ilyen esetet (543). Ezek az eredmények azt hangsúlyozzák, hogy a CNV-

k analízise a heterozigóta *PKHD1* pontmutációval rendelkező ARPKD betegek esetében elkerülhetetlen.

Vizsgálatainkat nagyon munkaidő- és költségigényes módszerekkel kezdtük, Sanger szekvenálással. A CNV-ket MLPA analízissel vizsgáltuk. Mivel kizárási tesztként egy genetikai vizsgálat nem használható, mert minden régiót nem vizsgálunk, minden szabályozással nem vagyunk tisztában, ezért indirekt módon próbáltuk meg a *PKHD1* mutációkat kizárni, mégpedig úgy, hogy más génekben bekövetkező mutációkkal kapcsoljuk össze a betegek fenotípusát azon esetekben ahol biallélikus *PKHD1* mutációt nem sikerült kimutatnunk. Minden olyan betegben, akiben nem volt *PKHD1* mutáció, a fenotípus re-evaulációját követő genetikai vizsgálat kimutatta a kóroki tényező(ke)t, azaz a kiindulási klinikai ARPKD diagnózis 22%-a fals diagnózisnak adódott. Az utolsó betegben (P28) egyetlen egy heterozigóta *PKHD1* mutációt sikerült kimutatnunk. Esetében a rendkívül extenzív genetikai analízis sem eredményezte a másik mutáció kimutatását, még klinikai exom szekvenálással sem találtuk meg, mindazonáltal a beteg fenotípusa alapján a *PKHD1* biallélikus mutációja valószínűsíthető. Ez felhívja a figyelmet arra, hogy még a jelenleg elérhető legmélyebb genetikai analízis sem képes 100%-os diagnosztikai szenzitivitás elérésére bizonyos lokalizációjú mutációk esetén, és felhívja a figyelmet arra is, hogy mély introni szekvenciákban vagy szabályozó elemekben bármikor előfordulhat mutáció, amely utána nagyon markáns hatással van a fehérje funkciójára nézve. A *PKHD1*-től független génekben történő eredményes genetikai analízisünk a betegek fenotípusos szempontból történő re-evaluációjának jelentőségére világít rá. A differenciál diagnózis a diagnózis idején nagyon nehéz lehet az enyhe és középsúlyos formák esetében, akiknél nincsenek extrémén megnagyobbodott vesék és légzési elégtelenség. Ebben a betegcsoportunkban a csecsemő korban bekövetkező hipertensió nagyon jól korrelált a *PKHD1* mutációk jelenlétével. A szakirodalommal egybehangzóan a *PKHD1* mutációt hordozó betegek fenotípusa erősen korrelál a kóroki mutáció típusával, olyan beteget nem találtunk, aki túlélte volna a perinatális periódust, a bizonyosan funkcióvesztő biallélikus mutációk jelenléte esetén (277, 545, 546). Egy beteg (P14) érdekes módon összetett heterozigóta egy második és egy utolsó exon trunkáló mutációra, ahol az utolsó exon trunkáló mutáció a p.Gly4013Alafs*24 mutáció. Őt 5 hónapos korban diagnosztizálták, még 9 évesen is normál GFR-rel rendelkezik, ami arra utal, hogy a C-terminálison jelen levő 62 aminosav a fibrocisztin fehérje teljes funkcióvesztésével nem jár. Ismert az, hogy a fibrocisztin a 192 aminosavból álló C-terminális része az mTOR útvonalat modulálja (547). Szintén tartalmazza a ciliáris lokalizációt biztosító (targeting) szekvenciát (p.3876_3893CLVCCWLKRSKSRKTKPE), ami e mutáció esetében nem módosul (270). Ennek a C-terminális trunkációnak a hipomorf sajátosságait

aláhúzza az is, hogy az egér esetében a 67-es exon hiánya - amely egyébként a nukleáris lokalizációs szignált és a polycystin 2-kötő domént tartalmazza - normál fenotípust mutat (548). Összefoglalásképpen, elsőként vizsgáltunk Magyarországon egy nagy ARPKD kohorszt. Az ARPKD esetek negyedében fenokópiákat igazoltunk, amelyek más génekben bekövetkező mutációk miatt alakultak ki. Az adataink azt támasztják alá, hogy a perinatális légzési elégtelenség, a +4 SD-nél nagyobb vese hossz és a korai jelentkező hypertensio a *PKHD1* által okozott ARPKD-re utal. Azokban az esetekben ahol *PKHD1* mutáció analízis negatív, fontos, hogy a fenotípus re-evaluációra kerüljön és javasoljuk a *PKHD1* kópiaszám analízist is azokban a betegekben, akik heterozigóta kis skálájú mutációval rendelkeznek, és azokban a családokban, ahol nem kérdéses a fenotípus.

Az obligát heterozigóta szülők eredményes genetikai analízise lehetőséget nyújt a következő terhességben a prenatális diagnosztika elvégzésére. Ez az indirekt diagnosztika rendelkezésre áll az olyan egyértelmű ARPKD esetekben, ahol az érintett betegről minta már nem hozzáférhető.

Ez a munka hazai kollaborációban valósult meg, a legfontosabb partnerek Dr. Szabó Tamás (Debreceni Egyetem) és Dr. Tóty Kálmán (Semmelweis Egyetem) voltak.

4.12. Monogén kohorsz vizsgálatok: Marfan szindróma

A kohorszba a betegek bizonyosan Marfan szindróma, Marfan szindróma gyanú vagy ezzel rokon fibrillinopathia klinikai diagnózisával kerültek be. Genomiális DNS, illetve egy esetben RNS mintát vizsgáltunk 26 betegben. Összesen 23 kóroki vagy lehetségesen kóroki tényezőt definiáltunk 23 betegben. A 23 betegből 7 esetében (30,4%) új, korábban le nem írt mutációt, míg 16 esetben (69,6%) korábban leírt variánst találtunk. 23 beteg esetében állt rendelkezésünkre családfa adat. Hét betegben a betegség sporadikus előfordulása volt, míg 16 esetben familiáris forma fordult elő. Misszensz mutációt definiáltunk 69,6%-ban (16/23), kis delécia/duplikációt 13%-ban (3/23) és splicing mutációt 17,4%-ban (4/23). Egy visszatérő csendes mutációt definiáltunk három nem rokoni kapcsolatban álló betegben, amely mutációt az mRNS analízist követően benignusnak minősítettünk (lásd lentebb).

A 16 misszensz mutációt hordozó betegből 11 esetben (68,8%) a konzervált cisztein reziduumokat érintő mutáció volt. A jelenleg érvényben levő kritérium rendszer (296) szerint minden olyan misszensz mutáció, amely cisztein aminosavat érint, akár keletkeztet vagy megszüntet, patogénnek minősítendő. Három mutáció, a 4-es, 9-es és 11-es betegek esetében új, korábban le nem írt volt. E betegek molekuláris genetikai és klinikai adatait a 24. táblázatban mutatom be.

Diagnózis, genetikai adatok							Klinikai tünetek		
Beteg	Diagnózis	Családi halmozódás	Életkor (év)	Genotípus	Fehérjeszintű hatás	Referencia	Ectopia lentis	Aorta gyök aneurysma	Összpont-szám
1	MFS	familiális	10	c.1510T>C	p.Cys504Arg	Comeglio et al., 2007	+	-	7
2	MFS	NA	13	c.1601G>A	p.Cys534Tyr	Kilpatrick et al., 1999	+	-	9
3	MFS?	familiális	8	c.1709G>A	p.Cys570Tyr	Loeys et al., 2001	+	NA	8
4	-	familiális	15	c.2288G>A	p.Cys763Tyr	nem leírt	+	NA	2
5	ELS?	familiális	22	c.2433C>G	p.Cys811Trp	Loeys et al., 2004	+	NA	3
6	MFS	sporadikus	11	c.2585G>A	p.Cys862Tyr	Song et al., 2013	+	+	10
7	MFS?	sporadikus	18	c.2777 G>T	p.Cys926Phe	umd.be/FBN1	-	-	8
8	MFS?	sporadikus	8	c.4898G>C	p.Cys1633Ser	Comeglio et al., 2007	+	-	10
9	ELS	familiális	27	c.6032G>C	p.Cys2011Ser	nem leírt	+	-	10
10	MFS?	sporadikus	7	c.6332G>A	p.Cys2111Tyr	Hayward et al., 1997	+	NA	7
11	MFS	familiális	39	c.6947G>T	p.Cys2316Phe	nem leírt	-	+ (dissectio)	10

24. táblázat. Cisztein aminosavat érintő patogén misszensz mutációk az *FBN1* génben. Rövidítések: MFS: Marfan szindróma, ELS: Ectopia lentis szindróma. Referenciák: Comeglio et al (549), Kilpatrick et al (550), Loeys et al 2001 (551), Loeys et al 2004 (552), Song et al (553), Hayward et al (554). Az új mutációk vastagon szedve. Forrás: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.05.012>

Az esetek kb. 1/3-ban (5/16, 31,2%) olyan misszensz mutációkat találtunk, amelyek nem cisztein aminosavakat érintenek (a molekuláris és klinikai adatok a 25. táblázatban láthatók). Egy mutáció (c.3038G>T, p.Gly1013Val) korábban le nem írt, új volt. A kimutatott misszensz mutációk besorolása a módosított Ghent nozológia (296) és az ACMG legutolsó ajánlása alapján történt (507).

Diagnózis, genetikai adatok								Klinikai tünetek		
Beteg	Diagnózis	Családi halmozódás	Életkor (év)	Genotípus	Fehérjeszintű hatás	Variáns besorolás	Referencia	Ectopia lentis	Aorta gyök aneurysma	Összpont-szám
12	MFS?	familiáris	10	c.640G>A	p.Gly214Ser	valószínűleg patogén	Sui et al., 2004	+	-	8
13	neonatalís MFS	familiáris	0,1	c.3038G>T	p.Gly1013Val	valószínűleg patogén	nem leírt	-	+	12
14	MFS	familiáris	33	c.3838G>A	p.Asp1280Asn	patogén	rs794728210	-	+	7
15	MFS?	familiáris	14	c.4727T>C	p.Met1576Thr	VUS	Rommel et al., 2005	-	-	4
16	-	sporadikus	25	c.5582G>A	p.Ser1861Asn	VUS	rs766358553	-	-	7

25. táblázat. Más, nem ciszteint érintő misszensz mutációk az *FBN1* génben. Rövidítések: MFS: Marfan szindróma, VUS: ismeretlen jelentőségű variáns (VUS, variant of uncertain significance). Referenciák: Sui et al (555), Rommel et al (556). Az új mutáció vastagon szedve. Forrás: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.05.012>

A c.640G>A (p.Gly214Ser) mutáció már korábban leírt eltérés Marfan szindrómában, ectopia lentis szindrómában és sporadikus aorta disszekció esetén (555, 557-559). Ez a mutáció együtt szegregál a fenotípussal számos családtag esetében és nem volt kimutatható a nem érintett családtagoknál illetve nagy kontroll populációban (555, 557), valamint a mutáció nincs jelen a GnomAD illetve 1000 Genom Projekt adatbázisokban. A Gly214 filogenetikai konzervativizmust mutat és az *in silico* predikciós algoritmusok patogénnek minősítik, így ezek az adatok alapján a variánst 'valószínűleg patogén'-nek (likely pathogenic) minősítettük. A 12-es számú betegünk 10

éves korában ectopia lentis-szel és szisztémás érintettséggel rendelkezik, de jelenleg még nincs aorta gyök dilatációja (potenciális Marfan szindróma betegnek minősíthető).

A c.3038G>T (p.Gly1013Val) egy új misszensz mutáció (a 13-as betegben detektálva), ez egy olyan aminosav pozíciót érint, ahol egy másik misszensz mutáció, a c.3037G>A (p.Gly1013Arg) már korábban leírt patogén eltérés (466, 551, 560). A Gly1013 evolúciós konzervativizmust mutat és 50 kontroll mintában, amely 100 allélt reprezentál nem volt kimutatható. A variáns nincs jelen a GnomAD és az 1000 Genom Projektben sem, betegséget okozónak minősítjük. A mi betegünk fenotípusa igen súlyos Marfan szindróma, neonatális prezentációval, hasonlóan a korábban publikált esetekhez (466, 551, 560). A rendelkezésre álló adatok alapján a variánst 'valószínűleg patogén'-nek (likely pathogenic) minősítettük (a szülőket nem vizsgáltuk, de a *de novo* eredet igazolása esetén ezt a mutációt patogénnek reklasszifikálhatjuk).

A c.3838G>A (p.Asp1280Asn) nem volt jelen a GnomAD vagy 1000 Genom Projektben, egyetlen egyszer van jelen a ClinVar adatbázisban mint valószínűleg patogén eltérés. A locus specifikus adatbázisban (<http://www.umd.be/FBN1/>) Marfan szindrómában detektálták korábban. Az 1280-as aszparaginsav egy evolúciósan konzervált aminosav és a konzervált cbEGF domén konszenzus szekvenciának része (X-D-X-(N/D)-E-C-X₍₆₎-C-X₍₄₎-C-X-N*-X₍₂₎-G-X-(Y/F)-X-C-X-C-X₍₂₎-G-X₍₉₎-C) (561), vastagon jelölve az érintett aszparaginsav. Ez betegséget okozónak minősíthető variánst az *in silico* algoritmusok is patogénnek minősítik.

A c.4727T>C (p.Met1576Thr) egy Marfan szindrómával korábban már kapcsolatba hozott variáns (556, 562) és akkor az egyik analízis alapján 400 kontroll kromoszómában nem volt jelen (562). Ezt a mutációt 3 betegben leírták adolescens idiopathiás scoliosisban (563). Mind a három betegben emelkedett SMAD2 foszforilációt lehetett igazolni, ami indirekt bizonyítéka a nem megfelelően szabályozott TGF- β szignalizációnak. A variáns a GnomAD adatbázisban igen ritka (34/282694) és nincs jelen az 1000 Genom Projektben. Habár az irodalom Marfan-asszociált mutációnak írja, a predikciós algoritmusok, mind a PolyPhen2, mind a SHIFT, mind a Mutation Taster benignusnak, azaz betegséget nem okozónak mutatja. Összességében az inkonkluzív adatok alapján mi ezt a variánst ismeretlen jelentőségűnek (VUS, variant of uncertain significance) minősítjük.

A c.5582G>A (p.Ser1861Asn) a ClinVar adatbázisban jelen van, mint VUS, ami összefügghet Marfan szindrómával. Ez a mutáció rendkívül alacsony frekvenciával van jelen a GnomAD-ban (4/245638). Teljes konzervativizmust a Ser1861 nem mutat. A rendelkezésre álló adatok alapján ezt a mutációt ismeretlen jelentőségű variánsnak minősítettük.

Három betegben találtunk kis duplikáció/deléciót (26. táblázat). Minden mutáció olvasási kereteltolódást és nagy valószínűséggel trunkált fehérjét vagy nonszensz-mediálta mRNS lebontás által lebontott mRNS-t eredményez, így mind a hármat patogénnek minősítjük. Két variáns új volt, míg egy korábban publikált (564) Marfan szindrómás beteg esetében.

Diagnózis, genetikai adatok								Klinikai tünetek		
Beteg	Diagnózis	Családi halmozódás	Életkor (év)	Genotípus	Fehérjeszint hatás	Variáns besorolás	Referencia	Ectopia lentis	Aorta gyök aneurysma	Összpontszám
17	MFS?	familiális	5	c.2272_2275dup	p.Thr759Ilefs*8	valószínűleg patogén	nem leírt	-	-	7
18	MFS	familiális	33	c.5196del	p.Cys1733Valfs*160	valószínűleg patogén	nem leírt	-	+	9
19	MFS	NA	44	c.7167_7168del	p.Cys2390Serfs*15	patogén	Biggin et al., 2004	-	-	6
20	MASS	familiális	27	c.1468+5G>A	p.?	patogén	Liu et al., 1997	-	-	8
21	-	NA	15	c.1837+4C>T	p.?	VUS	rs199950267	-	-	7
22	neonatalis MFS	sporadikus	0,8	c.3082+1G>A	p.?	patogén	nem leírt	+	-	6
23	MFS	familiális	52	c.4337-2A>G	p.?	patogén	Baudhuin et al., 2015	-	+	6

26. táblázat. Olvasási keret eltolódást okozó (17-19 beteg) és splicingot megzavaró (20-23 beteg) mutációk az *FBNI* génben. Rövidítések: MFS: Marfan szindróma, MASS: Marfan-szerű fenotípus (Mitral valve prolapse, Aortic root diameter at upper limits of normal for body size, Stretch marks of the skin, Skeletal conditions), VUS: ismeretlen jelentőségű variáns (VUS, variant of uncertain significance). Referenciák: Biggin et al (564), Liu et al (565), Baudhuin et al (566). Az új mutációk vastagon szedve. Forrás: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.05.012>

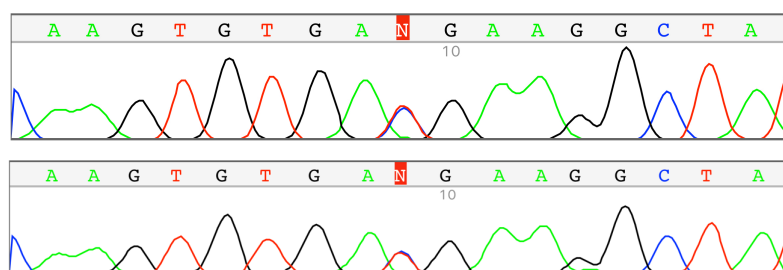
Négy splice mutációt detektáltunk (4/23, 17,4%) (26. táblázat). Két mutáció, a c.1468+5G>A és a c.4337-2A>G korábban leírt. A c.1468+5G>A (565) esetében fibroblasztokon RT-PCR-rel azt igazolták, hogy exon skippinget okoz, a c.4337-2A>G mutációt egy olyan nőbetegben mutatták ki, aki aorta disszekcióban hunyt el szülést követően (566).

A c.1837+4C>T - amely a ClinVar adatbázisban egyszer szerepel VUS-nak minősítve - rendkívül alacsony frekvenciával fordul elő a GnomAD-ban (9/246104). A mutációt a Human Splicing Finder algoritmus és a Mutation Taster algoritmus betegséget okozónak minősíti, azzal a megjegyzéssel, hogy a variáns a splicingot fogja megzavarni. A jelenleg rendelkezésünkre álló adatok alapján mi ezt a mutációt VUS-nak minősítjük. A mutáció és a betegség koszegregációja, *de novo* vagy öröklött volta hozzásegíthet ahhoz, hogy ezt a mutáció újra klasszifikációra kerüljön. A c.3082+1G>A egy 10 hónapos fiú csecsemőben került detektálásra, aki ectopia lentissel és részleges szisztémás érintettséggel rendelkezett. Le nem írt eltérés, az algoritmusok alapján betegséget okozó, a 24-es intronban lokalizálható és a +1-es invariábilis donor splicing helyet érinti. Ismert, hogy általában ezek a mutációk exon skippinget eredményeznek. Egy korábban az irodalomban már leírt csendes variáns, a c.3294C>T (p.Asp1098=) három betegben került kimutatásra, mindhárom beteg enyhe fenotípussal bírt (27. táblázat).

Beteg	Családi halmozódás	Életkor (év)	Ectopia lentis	Aorta gyök aneurysma	Összpontszám
24	familiáris	28	-	-	6
25	sporadikus	20	-	-	8
26	familiáris	18	-	-	9

27. táblázat. Az *FBNI* c.3294C>T (p.Asp1098=) csendes mutációt hordozó betegek klinikuma. Forrás: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.05.012>

A variáns jelen van a HGMD-ben és a Universal Mutation Database-ben. A mutáció és a fenotípus kapcsolatáról kevés adat áll rendelkezésre (562, 567). A patogenitásnak nincs egyértelmű bizonyítéka, de nem volt kizárható a splicing defektus a software predikciók alapján (562). A minor allél frekvenciája alacsonyabb, mint 0,01% a GnomAD-ban és az 1000 Genom Projektben. A Human Splicing Finder potenciálisan splicingot érintő mutációnak definiálja. Úgy döntöttünk, hogy ezt a mutációt, részletesebben, mRNA szintjén is megvizsgáljuk. A fibroblasztokból izolált mRNA-t a 26-os beteg esetén Sanger szekvenálással vizsgáltuk, a 26-os exont és az exon-exon kapcsolódási pontokat, és kimutattuk, hogy ez a mutáció kb. 50%-ban van jelen a beteg cDNS szekvenciájában (37. ábra).



37. ábra. Az *FBNI* c.3294C>T (p.Asp1098=) csendes mutáció analízise genomiális DNS (felső panel) és fibroblasztból izolált mRNA (alsó panel) mintán. Forrás: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.05.012>

A pontos allél arányokat piroszekvenálási módszerrel végpontos mennyiségi meghatározással határoztuk meg. A gDNS-ben 750-szeres lefedettség mellett az allélek aránya 57,47% : 42,53% (C:T) volt, míg a cDNS mintában 611-szeres lefedettség mellett 43,86% : 56,14% (C:T). Nem volt kimutatható sem nonszensz-mediálta mRNA lebontás, sem pedig exon 26 skipping. Ezek alapján a variánst mi jóindulatú benignus variánsnak minősítjük, a következők miatt:

(A) az allél frekvenciája ennek a variánsnak magasabb, mint amit elvárnánk egy betegséget okozó variánstól,

(B) aberráns splicingot detektálni nem tudtunk, habár elvégeztük az ez irányú analíziseket.

Ebben a vizsgálat sorozatban mi 23 *FBNI* variánst detektáltunk Marfan szindrómában vagy vele rokonítható kötőszöveti betegségben. A módosított Ghent nozológia rendkívül jó specificitást

mutat a Marfan szindróma betegek identifikálásában, meghatározza a kóroki *FBNI* mutációkra szolgáló kritérium rendszereket és ez nagy mértékben segíti a 25-30%-ban talált új mutációk klasszifikálását (296, 549). Azokban az esetekben, akik a Ghent nozológia szerint kerülnek klasszifikálásra, akár 97%-os mutációs detektálási ráta is elérhető (551, 552, 568). Mindazonáltal a Marfan szindróma klinikai diagnózisa nem egyszerű az átfedő fenotípusú betegségek esetében, a korfüggő klinikai tünetmegjelenés miatt illetve az erőteljes intra- és interfamiliáris expresszivitásbeli különbség okán. Összesen 23 kóroki vagy valószínűsíthetően kóroki *FBNI* variánst találtunk, amelyeknek egyharmada új mutáció volt. A mutációk 2/3-a misszensz mutáció volt, a nagy részük a cbEGF motívumokban foglalt helyet és kb. 70%-uk a konzervált cisztein aminosavakat érintette, jó összhangban az irodalommal (561). Öt olyan misszensz mutációt találtunk, ahol nem volt cisztein aminosav érintett. Ezek klinikai genetikai interpretációja néha igencsak nehéz lehet, hiszen pl. a c.4727T>C (p.Met1576Thr) mutációt nem csak Marfan szindrómával, aortagyök dilatációval mutatták ki korábban (556, 562), de serdülőkori idiopathiás scoliosisos betegben (563) is. Mind a 14 éves betegünk, mind a 16 éves testvére az édesapjuktól örökölték a mutációt, akinek a tüneteiről nem volt klinikai adatunk, és mindketten scoliosis és részleges szisztémás érintettséggel rendelkeznek. Esetükben rendszeres szív ultrahang javasolható, de nem egyszerű annak megítélése, hogy ez a genetikai eredmény hogyan érinti betegek az életvezetését, különösen a testvér esetében, aki kontakt sportot űz.

Az *FBNI* mutációkat a teljes kódoló régióban ki tudtuk mutatni, összesen egy forró pont definiálható. A legsúlyosabb és gyors progressziót mutató forma esetén a 24-32 exon között halmozódnak fel a mutációk. Nekünk két 1 éves kor előtt tesztelt betegünk volt. Egy misszensz (c.3038G>T, p.Gly1013Val a 24-es exonban, 13-as beteg), és egy splicing (c.3082+1G>A, a 24-es intronban, 22-es beteg) mutációról van szó. A 22-es beteg esetében a szülők nem voltak érintettek, így valószínűsíthetően *de novo* mutációs történés volt, míg a 13-as beteg esetében az édesapa a genetikai tesztelésbe nem egyezett bele, de fenotípusosan marfanoid jegyeket mutatott. A p.Gly1013Arg egy meglehetősen gyakori visszatérő mutáció, súlyos cardiovascularis, skeletális manifesztációkkal és ectopia lentissel jár együtt. A c.3082+1G>A splicing mutáció esetében a 24-es intron donor splicing helye érintett, így úgy gondoljuk, hogy a mutáció a 24-es exon skippingjéhez vezethet. Mindkét betegünk a spektrum súlyosabb felén helyezkedik el, összhangban az irodalmi adatokkal.

Exonban levő csendes mutáció okozhat exon skippinget (569). Megvizsgáltuk a c.3294C>T mutáció hatását az mRNS splicingra. Ez a mutációt korábban olyan kötőszöveti betegségben szenvedő betegekben írták le, akik nem egyértelműen minősíthetők Marfan szindrómásnak (296).

A mutáció esetében exon skipping nem volt igazolható. Az allél ráta vad típusú és mutáns allél esetében azonos volt, nagyon közel volt az 1:1 arányhoz mind a genomiális, mind a cDNS-ben. Meglepő, hogy ez a mutáció 3 egymással rokoni kapcsolatban nem álló betegben volt kimutatható és az irodalomban is hasonló klinikai tünetekkel rendelkező betegekben, ectopia lentis és aortagyök tágulat nélkül. Amennyiben ez a mutáció mégis patogén, egy eddig ismeretlen mechanizmus vezethet a tünetek kialakulásához.

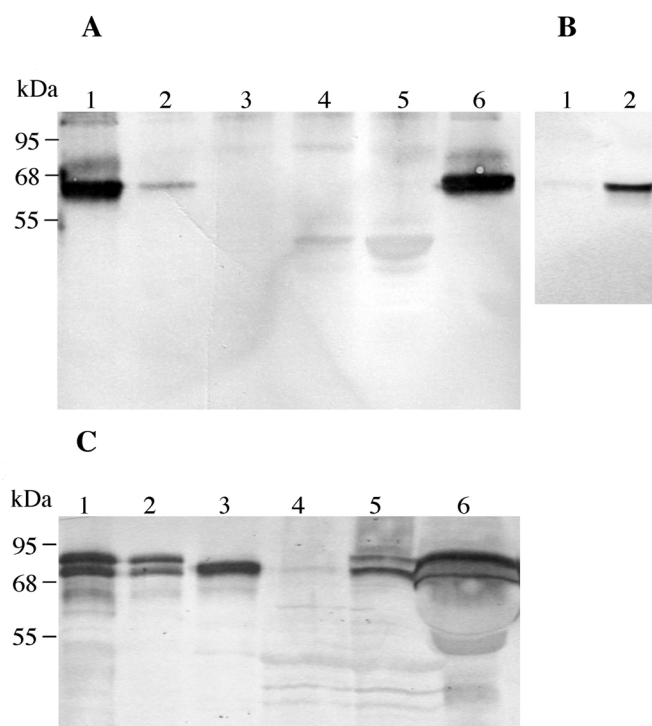
Ebben a munkában 26 egymással rokoni kapcsolatban nem álló egyén esetén, 7 új mutációt és 16 visszatérő mutációt definiáltunk 23 betegben. A mutációk zöme Marfan szindrómával volt rokonítható, két esetben korai jelentkezésű és nagyon súlyos formájával a betegségnek. Egy csendes mutáció esetében a patogenitást igazolni nem tudtuk. A munkánk jelentőségét az alábbiakban látom:

- (A) ez volt az első hazai nagy Marfan genetikai kohorsz,
- (B) genetikai diagnosztikai protokollt dolgoztunk ki, melyet folyamatosan alakítottunk a módszertan fejlődésének megfelelően,
- (C) megállapítottuk, hogy egy kivételtől eltekintve a magyar betegekben mutációs forrópont nincs, így mindenkor a teljes gén vizsgálat indokolt,
- (D) a Marfan szindróma rutin genetikai tesztelése megnyitja az utat a pontos klinikai genetikai tanácsadás felé,
- (E) a preszimptomatikus (kaszád) tesztelés életmentő megfigyelési/beavatkozási lehetőséget jelent,
- (F) a Marfan szindróma részét képezi az exom/genom szekvenálás során kötelezően vizsgálandó véletlen találati listának (ún. ACMG panel) (326), így eredményeink hozzájárulnak a megfelelő interpretációs protokoll kialakításához az egyre inkább teret nyerő exom/genom szekvenálási alapú klinikai laboratóriumi genetikai diagnosztika esetében. Az *FBNI* genetikai vizsgálatokat Madar László PhD hallgatóm végezte.

4.13. Gas6 vizsgálatok

A humán thrombocyta Gas6 tartalmának vizsgálatára izolált thrombocytákat vizsgáltunk Western blottinggal hat különböző, két monoklonális és 4 poliklonális Gas6 elleni antitest segítségével. Kontrollként a thrombocytákban igazoltan jelen levő protein S-t használtuk. A Gas6 nem volt kimutatható a thrombocyta lizátumban és az aktivált thrombocyták felülszójában. Ezzel ellentétben, a protein S egyértelműen detektálható volt a nyugvó thrombocytákban, az aktivált

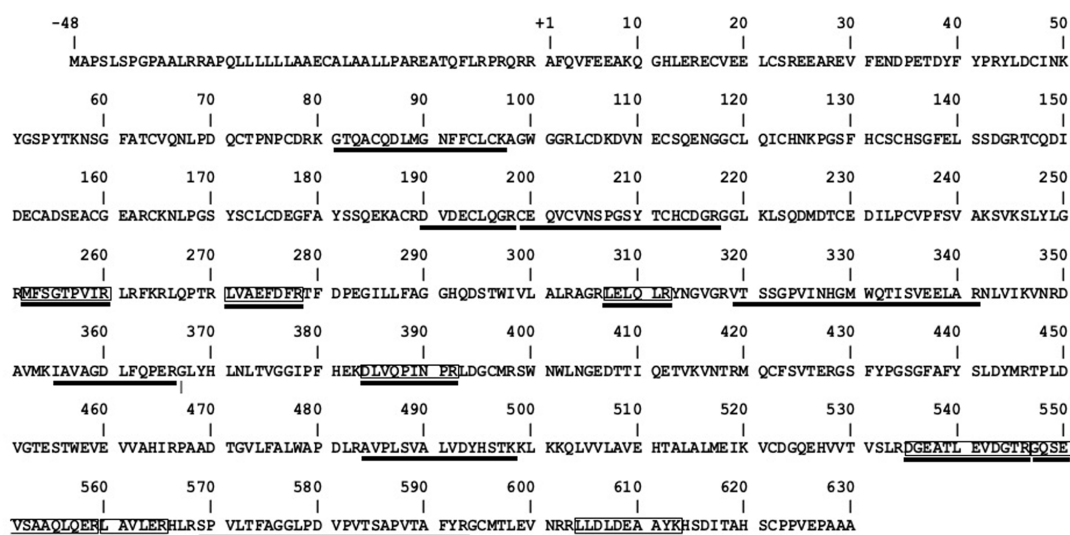
thrombocyták felülúszójában, de nem volt kimutatható a trombin aktivált thrombocytá lizátumban, amely arra utal, hogy a trombin aktiváció során a protein S kikerül a granulumokból (38. ábra C). Hogy tovább vizsgáljuk a Gas6 esetleges jelenlétét a thrombocytákban vagy a plazmában, immunprecipitációt végeztünk 70 µg biotinált monoklonális M1 anti Gas6 antitest segítségével, amelyet streptavidin-agaróz gyöngyökkel immobilizáltunk. Ekkor 5×10^8 thrombocytával dolgoztunk, amely equivalens 1-2 mL teljes vér thrombocytá tartalmával. Ezt a mintát, valamint 120 µL plazmát SDS-PAGE-en futtatva és blottolva, a Western blotting membránt biotinált poliklonális anti-Gas6 P05 antiszérummal inkubáltuk. Gas6 szintet nem tudtunk kimutatni a thrombocytá extraktumból (38. ábra A), viszont egy nagyon halvány sávot tudtunk detektálni a Gas6 plazma immunprecipitációs mintából (38. ábra A), amely olyan molekula súlyban vándorolt, ahol a rhGas6. Ezt a Gas6 immunprecipitációt két más antitest kombinációval is megismételtük, ahol az immunprecipitáció során 20 µg AB885-öt és 20 µg M7-et használtunk, míg az AB885-öt használtuk detektálásra. Gas6 nem volt kimutatható a thrombocytákban, egyik immunprecipitáció-immunblotting kombinációval sem.



38. ábra. Gas6 kimutatása plazmában és thrombocytában.

(A) 100 ng rhGas6 immunprecipitációja (1), 120 µL plazma (2), 5×10^8 trombin-aktivált izolált thrombocytá felülúszója (3), 5×10^8 trombin-aktivált izolált thrombocytá lizátuma (4), 5×10^8 nyugvó izolált thrombocytá lizátuma (5), 100 ng rhGas6. (B) Gas6 a Ba-citráttal precipitált humán plazmában. Mosó frakció (1), visszaoldott koncentrált precipitátum (2). (C) Protein S a thrombocytában (Western blot). 100 ng (1) és 10 ng (2) tisztított protein S, a trombin által hasított protein S kimutatható az aktivált thrombocytá felülúszóban (3) és hiányzik a lizátumban (4), nem hasított protein S a nyugvó thrombocytában (5), 0,5 µL plazma protein S tartalma. Forrás: DOI: 10.1161/01.ATV.0000163845.07146.48.

Hogy tovább vizsgáljuk a Gas6 potenciális - meglepő - jelenlétét a plazmában, egy tisztítási protokolt használtunk a plazma Gas6-re. Bárium citrát adszorpciót követően a precipitátumban egyértelműen tudtuk detektálni a Gas6-et (38. ábra B), de a mosó frakcióban nem. Hi-Trap oszlopon immobilizált monoklonális M7 antitestet használtuk affinitás kromatográfiára. Az eluált proteinek SDS-PAGE-en futtattuk meg, és azt a sávot, amely a rekombináns Gas6-nek megfelelő molekula súlyban vándorolt, gélen belüli tripszin emésztésnek vetettük alá, és utána tömegspektrometriával vizsgáltuk. Az elsődleges tömegspektrum számos olyan humán Gas6 frakció tömegét állapította meg, hogy összességében az identifikált peptidek az érett Gas6 szekvencia 28%-át lefedték. Az elsődleges tömegspektrum adat megerősítésére 8 peptidet választottunk további MS/MS szekvencia analízisre. Az összes szekvencia megerősítette, hogy a vizsgált anyag valóban Gas6 volt, azaz egyértelműen igazoltuk, hogy a Gas6 jelen van a humán plazmában. A tömegspektrometria elemzés részleteit a 39. ábra mutatja.



39. ábra. Plazma Gas6 tömegspektrometriás elemzése. Az elsődleges tömegspektrum által azonosított pepton ionok aláhúzva, a nyolc MS/MS módban identifikált szekvencia bekeretezve. Forrás: DOI: 10.1161/01.ATV.0000163845.07146.48.

Azért, hogy a Gas6-et mérni tudjuk különböző sejt folyadékokból és sejt extraktumokból, egy rendkívül érzékeny ELISA rendszert fejlesztettünk ki. A számos különböző próbált kombinációk közül az ELISA-ban a legnagyobb szenzitivitást az AB885-ös kecske poliklonális antitest mint fogó (capture) antitest és a biotinált nyúl poliklonális antiszérum (P05) detektáló antitest kombinációja adta. Mivel a plazma Gas6 koncentrációt alacsonynak találtuk, egy további szignál amplifikáció a streptavidin-biotinált HRP peroxidáz lépést is beiktattunk. A tesztrendszert tisztított rekombináns Gas6-el standardizáltuk. A teszt szenzitivitási limitje 0,4 µg/mL Gas6 volt és 6,25

µg/mL-ig lineárisnak adódott. Az optimális plazma vagy szérum hígítás 10- illetve 20-szorosnak adódott. A visszanyerés analízisben normál citrát anti-koagulált plazmát egészítettünk ki 20 µg/mL rekombináns Gas6-el és utána teszteltük az ELISA rendszerben (28. táblázat).

Minta (hígítás)	Gas6 szint hrGas6 hozzáadása előtt	Hozzáadott rhGas6	Gas6 szint hrGas6 hozzáadását követően	Visszanyerés
Minta 1 (10x)	14,3	20	33,9	98%
Minta 2 (10x)	15,8	20	33,9	90,5%
Minta 1 (20x)	15,2	20	38,2	115%
Minta 2 (20x)	16,9	20	37,5	103%

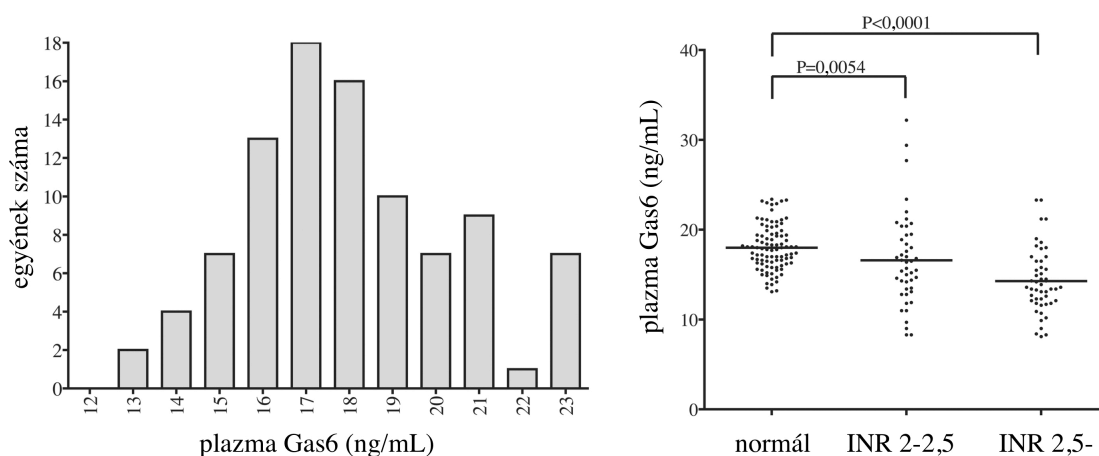
28. táblázat. A kifejlesztett Gas6 ELISA visszanyerés tesztje. A Gas6 szintek ng/mL-ben megadva. Forrás: DOI: 10.1161/01.ATV.0000163845.07146.48.

A visszanyerés az elméleti 100%-hoz nagyon közel volt, ami arra utal, hogy számottevő zavaró tényező a plazma mintában illetve a tesztrendszerben nincsen. A protein S-el történő keresztreakciót oly módon zártuk ki, hogy plazma mintához 20 és 40 µg/mL protein S-t adtunk. Ez a protein S körülbelül 1000 - 2000-szeres moláris túlsúlyt jelent a normál Gas6 szinthez képest és körülbelül 200-300%-os növekedést a normál protein S plazma szint fölött. Ez a protein S hozzáadása nem befolyásolta a mért Gas6 szintet. A teszt teljesítőképességének vizsgálatában 8 plazmát és szérumot analizáltunk 10- és 20-szoros hígításban. A CV 3,7%-nak adódott (átlag±2SD=16,0±0,6 ng/mL) és 7,9%-nak 20-szoros hígításban (19,0±1,4 ng/mL). A szérum esetében a CV a 10-szeres hígításban 5,4% volt (15,6±0,8 ng/mL) míg a 20-szoros hígításból 6,35% (18,0±1,1 ng/mL). Az inter-assay CV 13,1% volt 10-szeres hígításból (14,9±1,9 ng/mL) és 14,3% (16,6±2,4 ng/mL) a 20-szoros hígításból. A szérum minták hasonló CV-eket adtak a 10-szeres és 20-szoros hígítás esetén.

A fentebb részletezett ELISA módszert használtuk a Gas6 thrombocytá tartalom mérésére. Hígítatlan illetve 10-szeresen hígított mintából (1400×10⁹/L koncentrációra beállított nyugvó thrombocytá lizátumból) valamint aktivált thrombocytá felülszójának a vizsgálata során nem tudtunk jelet detektálni. Hogy megvizsgáljuk a potenciális zavaró hatását a Triton X-100-nak vagy más thrombocytafehérjének, 20 ng/mL rhGas6-et adtunk a nyugvó thrombocytalizátumhoz és az aktivált thrombocytafelülszóhoz és a mintákat 10-szeres hígításból visszamértük. A visszanyerés 83% a nyugvó thrombocytalizátumból és 91,5% az aktivált thrombocytá felülszóból, hat különböző egymástól független kísérlet tanulsága szerint.

A referencia tartomány meghatározására Gas6 koncentrációt mértünk 94 egészséges egyén citrát antikoaguált plazma mintáján. A csoport 57 nő és 37 férfiból állt, átlag életkoruk 44 év volt

(tartomány 22-65 év). A plazma Gas6 koncentráció normál eloszlású volt (40. ábra bal oldali panel).



40. ábra. A plazma Gas6 eloszlása (bal oldali panel) és szintjének warfarin-függése (jobb oldali panel). Forrás: DOI: 10.1161/01.ATV.0000163845.07146.48.

Korfüggést nem tudtunk megfigyelni. A megállapított referencia intervallum 13-23 $\mu\text{g/mL}$ -nek adódott a plazma Gas6 koncentrációra (29. táblázat). Négy különböző vérvételi csövet teszteltünk 5 önkéntestől, citrát, K_3 -EDTA, lítium-heparin és szérum csöveket. A következő eredmények adódtak (az adatok a citrátos cső százalékában kifejezve): $106,1\% \pm 6,9$ a K_3 -EDTA esetében, $107,7\% \pm 5,4$ a lítium-heparin esetében és $101,5\% \pm 6,1$ a szérum csövek esetében.

Azért, hogy a warfarin esetleges Gas6 expresszióra kifejtett hatását megvizsgáljuk, 96 warfarin kezelt betegtől származó plazma mintát teszteltünk. E csoport átlagéletkora 72 év volt, a tartomány 32-92 év. Nem tudtunk különbséget megfigyelni Gas6 szintben a kor illetve a nemek között, viszont szignifikánsan csökkent a plazma Gas6 a kezelt csoportokban és a plazma Gas6 átlagértéke $18,0 \mu\text{g/mL}$ volt a kontrol csoportban míg $15,4 \mu\text{g/mL}$ a beteg csoportban ($P < 0,0001$). A Gas6 szint progresszíven csökkent az emelkedő INR-el (40. ábra jobb oldali panel).

	N	Átlag $\pm$ SD, ng/mL	Referencia tartomány, ng/mL
Férfiak	37	$17,2 \pm 2,4$	12,4–22,0
Nők	57	$18,5 \pm 2,5$	13,5–23,5
Összesen	94	$18,0 \pm 2,5$	13,0–23,0

29. táblázat. A saját fejlesztésű ELISA teszttel mért plazma Gas6 referencia tartománya. Rövidítések: N (vizsgált egyének száma), SD (standard deviáció).

Ezzel a tanulmánnyal egy nagy ellentmondást próbáltunk meg tisztázni. Korábban bemutatták Gas6 jelenlétét patkány (570), egér (378) és emberi (378) thrombocytaiban. Ennek ellenére immunblotting, kombinált immunprecipitáció-immunblotting és egy rendkívül szenzitív és specifikus ELISA módszer kifejlesztését követően sem voltunk képesek a Gas6-et tisztított izolált humán thrombocytaiban detektálni. Négy különböző az immunprecipitáció-immunblotting kísérletekben felhasznált antitest három kombinációja sem tudta kimutatni a Gas6 jelenlétét a thrombocyta extraktumban. Ezzel szemben a Gas6-et meg tudtuk mérni a humán plazmában teljesen egyértelműen, ugyanezzel az immunprecipitáció-immunoblotting kombinációval. Ha azt feltételezzük, hogy az immunprecipitáció hatékonysága hasonló a plazma és a thrombocyta mintákban, meg tudtuk volna mérni 2 μ g Gas6-et 5×10^8 thrombocytaiban. Ez 2 mL teljes vér-ekvivalens thrombocyta tartalom ezek szerint kevesebb, mint 2 μ g Gas6-et tartalmaz. A visszanyerési kísérletek minden esetben az ELISA módszer működőképességét igazolták. Endogén thrombocyta Gas6-et nem lehetett kimutatni ezekben a thrombocyta mintákban még akkor sem, ha azokat nem hígított formában vizsgáltuk. Az általunk optimalizált tesztrendszer szenzitivitását figyelembe véve azt a konklúziót vontuk le, hogy a Gas6 vagy sincsen jelen a thrombocytaiban, vagy a Gas6 a thrombocytaiban kevesebb, mint 0,04 ng/ $1,4 \times 10^8$ thrombocyta, ami kb. 1 mL vérben levő thrombocyta-tartalom. Amennyiben ez igaz, akkor ki lehet mondani, hogy a vérben keringő Gas6 kevesebb mint, 1%-a van jelen a thrombocytaiban, azaz habár az ELISA rendszer szenzitivitása akár két nagyságrenddel is nagyobb volt az immunprecipitáció-immunblotting kísérletnek, ennek ellenére Gas6-et nem tudtunk kimutatni humán thrombocytaiban. Ezen számítások alapján minden thrombocyta kevesebb, mint két Gas6 molekulát tartalmaz, ami cáfolja a thrombocyta eredetű Gas6 bármilyen fiziológiai jelentőségét. Összehasonlításképpen, $1,4 \times 10^8$ thrombocyta kb. 230 ng protein S-t tartalmaz, azaz 12000 protein S molekulát thrombocytaént (484, 571), azaz a vizsgálatsorozatunk egy nagyon komoly ellentmondást mutat a humán thrombocytaiban a kimutatható Gas6 hiánya és a korábban bemutatott humán thrombocyta eredmények között (378). Mivel a koncentráció a plazmában is nagyon alacsony, ezért nagyon kevésbé valószínű, hogy a thrombocyta preparálás során használt plazma kontaminálta volna ezt a mintát. Ismert az, hogy a Gas6 a sejt felszínhez mind N- mind C-terminálisával tud kötődni. Az N-terminális Gla domén a foszfatidilszerint (PS) tartalmazó foszfolipidekkel, míg a C-terminális SHBG-szerű doménje pedig a TAM receptorokkal kerül interakcióba (572, 573). A Gas6 a Gla doménjén karboxilálva kell hogy legyen, hogy tudjon funkcionálni *in vitro* (480, 574, 575) és *in vivo* (576). Valószínű, hogy a Gas6 lokális koncentrációja emelkedik meg PS expozíció során, például az apoptotikus sejtek vagy aktivált

thrombocyták felszínén, tehát teljesen elképzelhető, hogy az aktivált thrombocyták - habár nem tartalmaznak Gas6-et - képesek a membrán felületükön illetve az általuk expresszált receptorokon keresztül a Gas6 megkötésére, így a lokális környezetben a Gas6 koncentráció valóban megnőhet. Ebben a tanulmányban azt találtuk, hogy a humán vérplazma alacsony koncentrációban tartalmaz Gas6-et (13-23 ng/mL, azaz 160-280 pmol/L), de azt kimutatták már, hogy a Gas6 angiogenezis inhibitor aktivitása még ennél is alacsonyabb (1 ng/mL) koncentrációban is megfigyelhető (577). Ebben a kontextusban vizsgálva a keringő Gas6 lokálisan akkumuláció hiányában is fontos mediátora lehet fiziológiai funkcióknak. A Wistar patkányok szérumában mért 1-10-ig ng/mL Gas6 szint jól egyezik a mi eredményeinkkel (360). Statisztikailag kimutatható csökkenést tapasztaltunk a Gas6 szintekben a warfarin kezelés során, ami arra utal, hogy a warfarin kezelés a Gas6 expressziót vagy szekréciót hasonlóan a többi K vitamin függő faktorhoz negatívan szabályozza (578, 579).

Összességében, különböző módszereket használva, amelyek magukba foglalták az immunprecipitációt, a BaCl₂ precipitációt, az immunaффinitás tisztítást, tömegspektrometriát, kimutattuk azt, hogy a Gas6 szubnanomoláris koncentrációban jelen van a humán keringésben, ezzel ellentétben nem tudtunk Gas6-et detektálni humán thrombocytában minden extenzív vizsgálódás ellenére sem, különböző módszerekkel sem, ezért úgy gondoljuk, hogy a Gas6 thrombocytá aggregációban igazolt szerepe (378) az eredetileg a keringésben levő Gas6-nek köszönhető. Ezt követően egy rendkívül szenzitív ELISA immunoassayt fejlesztettünk ki, teszteltünk és bemutattuk azt, hogy a teszt klinikai minták vizsgálatára is tökéletesen alkalmas, ahogy ezt a következő években (posztdoktori periódusom leteltével a Dahlbäck-laboratóriumból történő távozásom után) született számos publikáció igazolja (356, 374, 375, 580). Az ELISA teszt egyik első klinikai felhasználásaként egy, a disszertációban nem szereplő munkánkban (581) összefüggést mutattunk ki a Gas6 szint és a magzati növekedés restrikció közt. Ez abban az esetben állt fenn, ha abnormális köldökzsinór artéria Doppler értékeket lehet mérni. Ez az eredmény alátámasztotta azt a hipotézisünket, miszerint a Gas6 szerepet játszhat a növekedésben visszafogott magzatok esetén a fiziológiai véráram redistribúcióban.

A Gas6 plazma normál tartomány az elmúlt években - először általunk - meghatározásra került (485), a legtöbb tanulmány szerint 15-65 µg/L között van (582, 583). Mi nem találtunk fiziológiailag releváns Gas6 mennyiséget a humán thrombocytákban (485). Az mRNS detektálható (584) és mások a fehérjét is megtalálni vélték (379) 40 Gas6 molekula per thrombocytá mennyiségben (a mi adataink szerint kevesebb, mint 2 Gas6 molekula per thrombocytá). Mivel ugyanazon tesztrendszer a plazma Gas6 meghatározására többszörösen igazoltan, megbízhatóan

működik, nincs okunk azt feltételezni, hogy más analitikai képességekkel rendelkezne thrombocyta lizátum mérése esetén, sokkal valószínűbb, hogy a thrombocyta-pozitív adatok a rossz minőségű, protein S-sel keresztreakciót adó antitesteknek köszönhetőek (mi ezt megvizsgáltuk és igazoltuk, épp ezért választottunk más antitestet). Abban viszont mindenképp konszenzus van, hogy a thrombocytára kifejtett Gas6 hatás a plazma Gas6-nek tulajdonítható (379).

4.14. Komplement faktor H Y402H, LOC387715, HTRA1 és ApoE vizsgálata időskori macula degenerációban

Az első AMD munkánkban 105 beteget és 95 kontrollt vizsgáltunk. A betegek átlag életkora $74,2 \pm 10$ év, a kontrolloké $78,1 \pm 6,3$ év, ($p=0,001$) volt. A kontrollok 50,5%-a, míg a betegek 54,1%-a volt férfi. Az AMD alapján csoportba osztás 48 korai és 57 késői vagy előrehaladott AMD alcsoport beosztást eredményezett. A korai és a késői alcsoportok esetében a korban nem volt szignifikáns különbség. A kontrollok 37,5%-a, míg a betegek 38,4%-a dohányzott.

A genotípusok eloszlása a vizsgált csoportokban a 30. táblázatban kerül bemutatásra. A kontroll csoportban a Hardy-Weinberg egyensúlytól nem volt eltérés a *CFH* és a *LOC387715* genotípusok esetén, mely utóbbi a betegekben is egyensúlyban volt. Mindenhol, kivéve az *ApoE* gén esetén a betegekben felülreprezentált volt a minor allél. A *CFH* Y402H C allél 0,538 és 0,332 volt a betegekben és a kontrollokban, míg a *LOC387715* rs10490924 0,478 és 0,295 a betegekben és a kontrollokban és a *HTRA1* rs11200638 0,463 és 0,289 a betegekben és a kontrollokban. A *HTRA1* genetikai analízis 103 betegből történt meg. Az *ApoE* leggyakoribb E3 allélje a betegekben és a kontrollokban hasonló frekvenciával fordult elő (0,826 és 0,816), míg a potenciális kockázati tényező E2 allél alacsonyabb frekvenciával fordult elő a betegekben, mint a kontrollokban (0,066 és 0,1). Ezzel ellentétben az E4-es allél a betegcsoportban volt gyakoribb (0,108 és 0,084). Hat esetben nem volt teljes a kapcsoltság a *HTRA1* és a *LOC387715* polimorfizmusok között, 3 betegben és 3 kontrollban ($r^2=0,9382$). Négy esetben ezek közül a homozigóta *LOC387715* T allél heterozigóta *HTRA1* genotípussal, míg a másik két esetben a heterozigóta *LOC387715* genotípus homozigóta normál *HTRA1* genotípussal volt megfigyelhető.

Polimorfizmus		Betegek						Kontrollok (n=95)	
		Korai alcsoport (n=48)		Késői alcsoport (n=57)		Össz eset (n=105)		n	frekvencia
		n	frekvencia	n	frekvencia	n	frekvencia		
<i>Apo E</i>	3/3	35	0,73	38	0,67	73	0,70	64	0,67
	3/4 + 4/4	9	0,19	11	0,19	20	0,19	13	0,14
	2/3 + 2/2	4	0,08	6	0,11	10	0,10	17	0,18
	2/4	0	0,00	2	0,04	2	0,02	1	0,01
<i>LOC387715</i> rs10490924	GG	17	0,35	13	0,23	30	0,29	43	0,45
	GT	19	0,40	30	0,53	49	0,47	48	0,51
	TT	12	0,25	14	0,25	26	0,25	4	0,04
<i>HTRA1</i> rs11200638*	GG	17	0,35	13	0,23	30	0,29	43	0,45
	GA	18	0,38	32	0,56	50	0,48	49	0,52
	AA	11	0,23	12	0,21	23	0,22	3	0,03
<i>CFH</i> Y402H	TT	17	0,35	12	0,21	29	0,28	39	0,41
	TC	16	0,33	22	0,39	38	0,36	49	0,52
	CC	15	0,31	23	0,40	38	0,36	7	0,07

30. táblázat. A vizsgált polimorfizmusok genotípus megoszlása. Forrás: doi: 10.1111/j.1755-3768.2009.01687.x. *: két korai alcsoportba tartozó beteg genotípus adata hiányzik.

CFH esetében a CC genotípus 7,3-szoros kockázatot jelentett (95%-os fiducia intervallum (95%CI): 2,8-18,7 ($p<0,001$)), míg a legalább egy kockázati allélt hordozók, tehát a homozigóta CC és heterozigóta TC genotípusok 1,8-szeres kockázatot jelentettek (95%CI: 1,0-3,3; $p=0,046$) az AMD-re nézve a vad típusú TT genotípussal való összehasonlításban. A homozigóta CC genotípus összehasonlítva a vad típusúval 4,9-szeres (95%CI: 1,7-14,2; $p=0,003$) és 10,7-szeres (95%CI: 3,7-31; $p<0,001$) megnövekedett kockázat a korai és késői AMD-re nézve. A *LOC387715* TT genotípusa 9,1-szeres kockázatot jelent AMD-re nézve (95%CI: 2,9-28,8; $p<0,001$) ami szétbontva 7,4-szeres kockázatot jelent a koraira (95%CI: 2,1-26,2; $p=0,002$) míg 11,3-szeres kockázatot a későire (95%CI: 3,2-40,4; $p<0,001$). Amennyiben a mutáció hordozókat kombináltuk (TT és GT genotípusok), 2-szeres megnövekedett kockázat (95%CI: 1,1-3,6; $p=0,02$) volt megfigyelhető. Egy potenciális zavaró tényező sem volt összefüggésben a *LOC387715* genotípussal a kontroll csoportban, így korrekció nem történt. Azok az egyének, akiknek két kópiája volt a *HTRA1* kockázati allélből (AA genotípus) 11,6-szeres kockázatot szenvedtek el az AMD-re nézve (95%CI: 3,2-42,3; $p<0,001$), míg a legalább egy kockázati allélt hordozók (AA és GA genotípusok) 2,2-szeres kockázattal rendelkeztek (95%CI: 1,2-4; $p=0,009$) amennyiben az összehasonlítás alapja a vad típusú GG genotípus. A kockázati allélre nézve homozigóta genotípus 10,1-szeres (95%CI: 2,5-40,8; $p=0,001$) a koraira, és 13,5-szeres (95%CI: 3,3-55,4; $p<0,001$) kockázatot jelentett a késői AMD-re nézve. Korrekcióra itt sem volt szükség a potenciális zavaró tényezők esetében. Amennyiben a dupla vad típusú egyénnel való összehasonlítást végeztük el, azok, akik két *CFH* (CC genotípus) és egy *LOC387715* kockázati tényezővel (GT genotípus) rendelkeztek 9,3-szeres (95%CI: 2,4-35,8; $p=0,001$) kockázattal bírtak AMD-re nézve, amely még kifejezettebb volt a késői AMD alcsoportban: OR=15,0, 95%CI: 3,2-71,0; $p=0,001$. Abban az

esetben, ha ezt a genotípus kombinációt a korai AMD csoportra vizsgáltuk statisztikailag szignifikáns kockázat növekedés nem adódott (OR=4,8, 95%CI: 1,0-24,1; p=0,057).

Genotípus kombináció	n (%)		
	kontrollok	korai alcsoport	késői alcsoport
CFH Y402H TT genotípus LOC387715 rs10490924 GG genotípus (kettős vad típus)	16 (16,8%)	5 (10,4%)	4 (7,0%)
CFH Y402H CC genotípus LOC387715 rs10490924 GT genotípus	4 (4,2%)	6 (12,5%)	15 (26,3%)
CFH Y402H CT genotípus LOC387715 rs10490924 TT genotípus	2 (2,1%)	5 (10,4%)	7 (12,3%)

A tesztelt genotípus kombinációk esélyhányadosa kettős vad típussal szemben	
CFH Y402H CC genotípus LOC387715 rs10490924 GT genotípus	Korai esetek EH: 4,8 (95% CI: 1,0-24,1, p=0,057) Késői esetek EH: 15,0 (95% CI: 3,2-71,0, p=0,001) Össz eset EH: 9,3 (95% CI: 2,4-35,8, p=0,001)
CFH Y402H CT genotípus LOC387715 rs10490924 TT genotípus	Korai esetek EH: 8,0 (95% CI: 1,2-54,7, p=0,03) Késői esetek EH: 14,0 (95% CI: 2,1-95,1, p=0,007) Össz eset EH: 10,7 (95% CI: 1,9-58,7, p=0,007)

31. táblázat. Genotípus kombinációk által jelentett kockázat. Rövidítés: EH (esélyhányados). Forrás: doi: 10.1111/j.1755-3768.2009.01687.x.

A *LOC387715* gén polimorfizmus kockázati allél homozigótasága (TT genotípus) egy *CFH* kockázati alléllal (CT genotípus) kombinációban 10,7-szeres kockázatot (95%CI: 1,9-58,7; p=0,007) jelentett, amennyiben a dupla vad típusú egyénekkel hasonlítjuk össze. Ez a kombináció a korai AMD-re 8-szoros (95%CI: 1,2-54,7; p=0,03), a későire 14-szeres (95%CI: 2,1-95,1; p=0,007) kockázatot jelentett. Összesen 6 beteg és egyetlen kontroll sem hordozta mindkét polimorfizmus minor (kockázati) allélját homozigóta formában. Ezeket a genotípus kombinációkat és az általuk jelentett kockázatokat foglaltam össze a 31. táblázatban. Az *ApoE* allélek esetében a kontroll és beteg csoportokban nem volt kimutatható szignifikáns különbség, és mivel egyik potenciális zavaró tényező sem mutatott asszociációt *ApoE* genotípussal, a korrekciójukra nem volt szükség. A dohányzás nem módosította a polimorfizmusok hatását. A vizsgált egyéb nem genetikai tényezők összefüggése sem volt kimutatható. A vizsgált genetikai tényezők által jelentett kockázat a 32. táblázatban kerül bemutatásra.

	Esélyhányados (95% CI)		
	összes beteg	korai alcsoport	késői alcsoport
<i>CFH</i> Y402H CC vs. TT	7,3 (2,8-18,7) p<0,001	4,9 (1,7-14,2) p=0,003	10,7 (3,7-31,0) p<0,001
<i>CFH</i> Y402H CC + TC vs. TT	1,8 (1,0-3,3) p=0,046	1,3 (0,6-2,6) p=0,515	2,6 (0,2-5,6) p=0,013
<i>CFH</i> Y402H TC vs. TT	1,0 (0,5-2,0) p=0,898	0,7 (0,3-1,7) p=0,480	1,5 (0,6-3,3) p=0,366
<i>LOC387715</i> rs10490924 TT vs. GG	9,1 (2,9-28,8) p<0,001	7,4 (2,1-26,2) p=0,002	11,3 (3,2-40,4) p<0,001
<i>LOC387715</i> rs10490924 TT + GT vs. GG	2,0 (1,1-3,6) p=0,02	1,4 (0,7-3,0) p=0,314	2,7 (0,3-5,6) p=0,009
<i>LOC387715</i> rs10490924 GT vs. GG	1,4 (0,8-2,6) p=0,282	1,0 (0,4-2,1) p=0,913	2,0 (0,9-4,3) p=0,083
<i>HTRA1</i> rs11200638 AA vs. GG	11,6 (3,2-42,3) p<0,001	10,1 (2,5-40,8) p=0,001	13,5 (3,3-55,4) p<0,001
<i>HTRA1</i> rs11200638 AA + GA vs. GG	2,2 (1,2-4,0) p=0,009	1,6 (0,8-3,4) p=0,196	2,9 (1,4-6,1) p=0,004
<i>HTRA1</i> rs11200638 GA vs. GG	1,6 (0,9-3,0) p=0,126	1,1 (0,5-2,4) p=0,831	2,2 (1,1-4,8) p=0,037

32. táblázat. A vizsgált polimorfizmusok által jelentett kockázat. Forrás: doi: 10.1111/j.1755-3768.2009.01687.x.

Vizsgálataink egyik fő motivációja az volt, hogy megállapítsuk a magyar populációban a fent említett polimorfizmusok előfordulását, mert különböző populációk rendkívül nagy különbségeket mutatnak ezeknek a genetikai tényezőknek a frekvenciáját illetően, és ezáltal az aktuális általuk jelentett kockázat is elképzelhető, hogy különböző populációkban, különböző lesz. Ezért választottunk egy klinikailag jól karakterizált AMD csoportot, amelyet vizsgáltunk a fent említett polimorfizmusok kockázati tényezői meghatározására. Kifejlesztettünk olyan genetikai diagnosztikai módszert, amely könnyen használható bármilyen alapvető metodológiai háttérrel rendelkező molekuláris genetikai laboratóriumban. Semmilyen *ApoE* allél összefüggését AMD-vel nem tudtuk igazolni. Elképzelhető, hogy a mi tanulmányunkban a relatíve kicsi kohorsz méret nem tette lehetővé ennek az alacsony kockázatnak a pontos megmérését, de az is lehet, hogy valódi földrajzi különbségek vannak az *ApoE* allélekben és ez a különböző etnikai háttérű populációban valóban különböző kockázatot jelent. A *CFH*-t illetően nem feltétlenül csak az AMD kialakulás kockázata, ami a *CFH* minor allél befolyásolhat, hanem a betegség progressziója is kapcsolatban állhat a *CFH* genotípussal. Az egyik eredeti tanulmány (391) szerint az esélyhányados a homozigóta egyénekben 3,33-ról 5,57-re nőtt akkor, ha csak a neovasculáris AMD alcsoportot vizsgálta meg, ami arra utal, hogy az exudatív formára nagyobb a kockázat, erősebb az összefüggés mint a non-exudatív formára. Ezzel ellentétben egy izlandi kohorszban legalább egy kockázati tényező geográfikus atrófia, mind a neovasculáris AMD-re hasonló kockázatot jelentett (585). Más

tanulmányok is hasonló kockázatról számolnak be (586, 587). Ezek arra utalnak, hogy a CFH mind a száraz, mind a nedves forma kialakulásában hasonló szerepet játszik, de nyilvánvalóan más genetikai és környezeti faktorok is szükségeltetnek mindkettő betegség fenotípusos tüneteinek kifejeződéséhez. A két kapcsoltn öröklődő polimorfizmus esetén általunk kapott egyértelmű kockáztnövekedés hasonló a szakirodalomban megjelentekhez. Azt találtuk, hogy ezek a polimorfizmusok nagyobb kockázattal bírnak a késői AMD kialakulásában a koraival szemben. Úgy gondoljuk, hogy kifejezettebb hatásuk van a későbbi pathogenezis folyamatokat összehasonlítva a korai stádiummal, azaz nem csak a betegség kialakulásában, hanem - hasonlóan más irodalmi adatokhoz - a betegség progressziójában is szerepet játszhatnak (588). Eredményeink szerint 3%-ban nem teljesül a teljes kapcsoltság a *HTRA1* és a *LOC387715* közt. Egyetlen egy kontroll sem hordozta homozigóta formában a *CFH*-t és a *LOC387715* vagy *HTRA1* mutációt, de a betegek 5,7%-a homozigóta formában hordozta mindkét mutációt, ami egy rendkívül nagy kockázatot jelenthet ebben a genotípus kombinációban. A dohányzásnak a potenciális módosító hatását nem sikerült igazolnunk.

Összefoglalásképpen megállapítható, hogy a *CFH* és a *LOC387715/HTRA1* génben levő polimorfizmusok Magyarországon markáns kockázati tényezőként szerepelnek AMD kialakulására, különösen a késői formára. A kockázat a későbbi betegség stádiumokban és akkor jelentősebb, hogy ha az adott polimorfizmus homozigóta formában van jelen. Az AMD munkák klinikai koordinálója Dr. Losonczy Gergely volt.

4.15. A Gas6 c.834+7G>A polimorfizmus szerepe az AMD kialakulásában

Összesen 280 beteget és 106 kontrollt tartalmazott ez a tanulmány. A vizsgált populációk alapvető tulajdonságait a 33. táblázatban mutatom be.

	Száraz AMD alcsoporth (n=67)	Nedves AMD alcsoporth (n=213)	Kontrollok (n=106)	p
Nők (%)	34 (50,7)	125 (58,7)	53 (50,0)	0,2569
Férfiak (%)	33 (49,3)	88 (41,3)	53 (50,0)	0,2569
Átlagéletkor (év, SD)	75,4 (11,5)	76 (7,3)	79,1 (6,1)	0,0047
Dohányzás (átlag csomagév, SD)	12 (20,1)	11,2 (19,8)	11,4 (21,9)	0,7601
BMI (SD)	27,3 (4,5)	27,3 (4,4)	27,6 (4,7)	0,8306
Hypertonia (%)	45 (67,2)	159 (75,0)	81 (79,4)	0,2135
MVT (%)	7 (10,4)	15 (7,1)	15 (14,9)	0,0928
AMI (%)	6 (9,0)	19 (9,0)	7 (7,4)	0,9054
Kültéri munka (%)	22 (32,8)	39 (18,5)	38 (38,4)	0,0004
Cataracta műtét (%)	21 (31,3)	48 (22,6)	73 (70,2)	0,0000

33. táblázat. Az eset-kontroll tanulmányban vizsgált populációk. Rövidítések: BMI (body mass index), MVT (mély vénás thrombosis), AMI (acut myocardialis infarctus). Forrás: doi:10.1371/journal.pone.0050181.t001

A betegeket két alcsoportra osztottuk: 213 beteg a nedves és 67 beteg a száraz AMD alcsoportba került. Nem volt szignifikáns különbség a száraz és nedves alcsoportokban a betegek korát illetően, a kontrollok szignifikánsan idősebbek voltak mint a betegek, de ez a beválasztási kritériumoknak megfelelően szándékosan történt így. Nem volt statisztikailag kimutatható különbség a betegek és kontrollok között a magas vérnyomás, a mélyvénás thrombosis, a myocardialis infarctus, a dohányzás és a BMI tekintetében sem. A kültéri munkavégzés gyakoribb volt a kontrollokban mint a betegekben.

A kontrollokban és a betegekben a vizsgált polimorfizmusok genotípus megoszlását az 34. táblázat tartalmazza.

	genotípus	száraz AMD alcsoport		nedves AMD alcsoport		Összes AMD eset		Kontrollok	
		n	frekvencia	n	frekvencia	n	frekvencia	n	frekvencia
<i>ApoE</i>	3/3	49	0,73	148	0,70	197	0,71	71	0,67
	3/4 + 4/4	11	0,16	34	0,16	45	0,16	16	0,15
	2/3 + 2/2	7	0,10	24	0,11	31	0,11	17	0,16
	2/4	0	0	4	0,01	4	0,01	2	0,02
	összesen	67		210		277		106	
<i>CFH</i> p.Y402H rs1061170	TT	23	0,34	35	0,17	58	0,21	42	0,40
	TC	24	0,36	89	0,44	113	0,42	51	0,49
	CC	20	0,30	80	0,39	100	0,37	11	0,11
	összesen	67		204		271		104	
<i>LOC387715</i> p.A69S rs10490924	GG	25	0,37	45	0,21	70	0,25	49	0,47
	GT	31	0,46	95	0,45	126	0,45	50	0,48
	TT	11	0,16	71	0,34	82	0,29	5	0,05
	összesen	67		211		278		104	
<i>HTRA1</i> rs11200638	TT	25	0,38	47	0,22	72	0,26	50	0,48
	TC	31	0,47	94	0,44	125	0,45	50	0,48
	CC	10	0,15	69	0,33	79	0,29	4	0,04
	összesen	66		210		276		104	
<i>C3</i> p.R102G rs2230199	CC	34	0,52	118	0,56	152	0,55	66	0,62
	CG	28	0,42	81	0,39	109	0,40	37	0,35
	GG	4	0,06	10	0,05	14	0,05	3	0,03
	összesen	66		209		275		106	
<i>CFI</i> rs10033900	CC	16	0,25	45	0,21	61	0,22	19	0,18
	CT	32	0,49	110	0,52	142	0,51	56	0,53
	TT	17	0,26	56	0,27	73	0,26	31	0,29
	összesen	65		211		276		106	
<i>FXIII</i> p.Val34Leu rs5985	GG	39	0,58	118	0,56	157	0,56	48	0,45
	GT	25	0,37	73	0,35	98	0,35	47	0,44
	TT	3	0,04	20	0,09	23	0,08	11	0,10
	összesen	67		211		278		106	
<i>Gas6</i> c.834+7G>A rs8191974	GG	27	0,42	96	0,47	123	0,45	36	0,35
	GA	28	0,43	89	0,43	117	0,43	55	0,53
	AA	10	0,15	21	0,1	31	0,11	13	0,12
	összesen	65		206		271		104	
<i>Mertk</i> IIa rs86016	GG	25	0,39	76	0,37	101	0,37	37	0,36
	GA	30	0,47	97	0,47	127	0,47	51	0,49
	AA	9	0,14	33	0,16	42	0,16	16	0,15
	összesen	64		206		270		104	
<i>Mertk</i> IIb rs17835605	CC	40	0,62	129	0,62	169	0,62	60	0,57
	CT	15	0,23	65	0,31	80	0,29	39	0,37
	TT	10	0,15	15	0,07	25	0,09	6	0,06
	összesen	65		209		274		105	
<i>Mertk</i> IIc rs10496440	AA	60	0,92	179	0,85	239	0,87	91	0,87
	AC	5	0,08	31	0,15	36	0,13	14	0,13
	CC	0	0,00	1	0,00	1	0,00	0	0,00
	összesen	65		211		276		105	
<i>Mertk</i> 14 rs7573344	AA	45	0,70	149	0,71	194	0,71	69	0,66
	AG	19	0,30	56	0,27	75	0,27	33	0,31
	GG	0	0,00	4	0,02	4	0,01	3	0,03
	összesen	64		209		273		105	

34. táblázat. A vizsgált polimorfizmusok genotípus megoszlása.

Forrás: doi:10.1371/journal.pone.0050181.t001

A kontroll csoport esetén a vizsgált polimorfizmusokban nem volt eltérés a Hardy-Weinberg egyensúlytól. A minor allélek az ismert AMD génekben gyakoribbak voltak a betegekben. A *Mertk* receptor polimorfizmusok (kivéve az rs86016) rendkívül alacsony minor allél frekvenciát mutattak és nem volt kimutatható különbség betegek és kontrollok között. Az *ApoE* esetében E3 allél enyhén magasabb frekvenciával fordult elő a betegekben mint a kontrollokban, míg a potenciális kockázati tényező E2 allél a betegekben alacsonyabb frekvenciával fordul elő a kontrollokhoz képest. Az *ApoE* E4 allél hasonló frekvenciával fordul elő mindkét csoportban. A nem korrigált esélyhányadosok (EH) a p értékekkel minden genotípus összehasonlításban a 35. táblázatban kerülnek bemutatásra.

Polimorfizmus	Genotípusok	Szárász AMD alcsoport		Nedves AMD alcsoport	
		EH	p	EH	p
<i>CFH</i> rs1061170	TC+CC vs. TT	1,30	0,43	3,27	<0,0001
	TC vs. TT	0,86	0,67	2,09	0,0104
	CC vs. TC	3,86	0,003	4,17	0,0001
	CC vs. TT	3,32	0,01	8,73	<0,0001
	CC vs. TT+TC	3,60	0,002	5,45	<0,0001
<i>LOC387715</i> rs10490924	GT+TT vs. GG	1,50	0,2	3,29	<0,0001
	GT vs. GG	1,22	0,56	2,07	0,01
	TT vs. GT	3,55	0,03	7,47	<0,0001
	TT vs. GG	4,31	0,01	15,5	<0,0001
	TT vs. GG+GT	3,89	0,01	10,0	<0,0001
<i>HTRA1</i> rs11200638	TC+CC vs. TT	1,52	0,19	3,21	<0,0001
	TC vs. CC	1,24	0,52	2,00	0,01
	CC vs. TC	4,03	0,03	9,18	<0,0001
	CC vs. TT	5,00	0,01	18,4	<0,0001
	CC vs. TT+TC	4,46	0,01	12,2	<0,0001
<i>Gas6</i> rs8191974	AA vs. GA	1,51	0,39	1,00	0,99
	AA vs. GG	1,03	0,96	0,61	0,21
	AA vs. GG+GA	1,27	0,6	0,79	0,54
	GA vs. GG	0,68	0,26	0,61	0,05
	GA+AA vs. GG	0,75	0,37	0,61	0,04
<i>C3</i> rs2230199	CG+GG vs. CC	1,55	0,17	1,27	0,3237
	CG vs. CC	1,47	0,24	1,22	0,4198
	GG vs. CG	1,76	0,48	1,52	0,5409
	GG vs. CC	2,59	0,23	1,86	0,3568
	GG vs. CC+GC	2,22	0,31	1,73	0,41
<i>CFI</i> rs10033900	CC vs. TC	1,47	0,34	1,21	0,55
	CC vs. TT	1,54	0,34	1,31	0,44
	TC vs. TT	1,04	0,91	1,09	0,76
<i>FXIII</i> rs5985	GT+TT vs. GG	0,59	0,1	0,66	0,08
	GT vs. GG	0,65	0,2	0,64	0,08
	TT vs. GT	0,51	0,34	1,15	0,73
	TT vs. GG	0,34	0,11	0,74	0,46
	TT vs. GG+GT	0,40	0,18	0,90	0,78
<i>Apo E</i>	3/4+4 vs. 2+2/3	1,67	0,3897	1,51	0,3512
	3/4+4 vs. 3/3	1,00	0,9929	1,02	0,9543
	2+2/3 vs. 3/3	0,60	0,2879	0,68	0,2632
<i>Mertk</i> I1a	AA vs. GA	0,96	0,9251	1,08	0,8171
	AA vs. GG	0,83	0,7086	1,00	0,991
	GA vs. GG	0,87	0,6891	0,93	0,7714
<i>Mertk</i> I1b	CT vs. CC	0,58	0,1329	0,76	0,2919
	TT vs. CC	2,50	0,0989	1,16	0,7664
	TT vs. CT	4,33	0,0144	1,52	0,4218
<i>Mertk</i> I1c	AC vs. AA	0,54	0,2623	1,13	0,7328
<i>Mertk</i> I4	AG vs. AA	0,88	0,7186	0,79	0,3602
	GG vs. AA	*	*	0,62	0,5352
	GG vs. AG	*	*	0,79	0,7615

35. táblázat. A vizsgált polimorfizmusok által jelentett kockázat. Rövidítés: EH (esélyhányados).

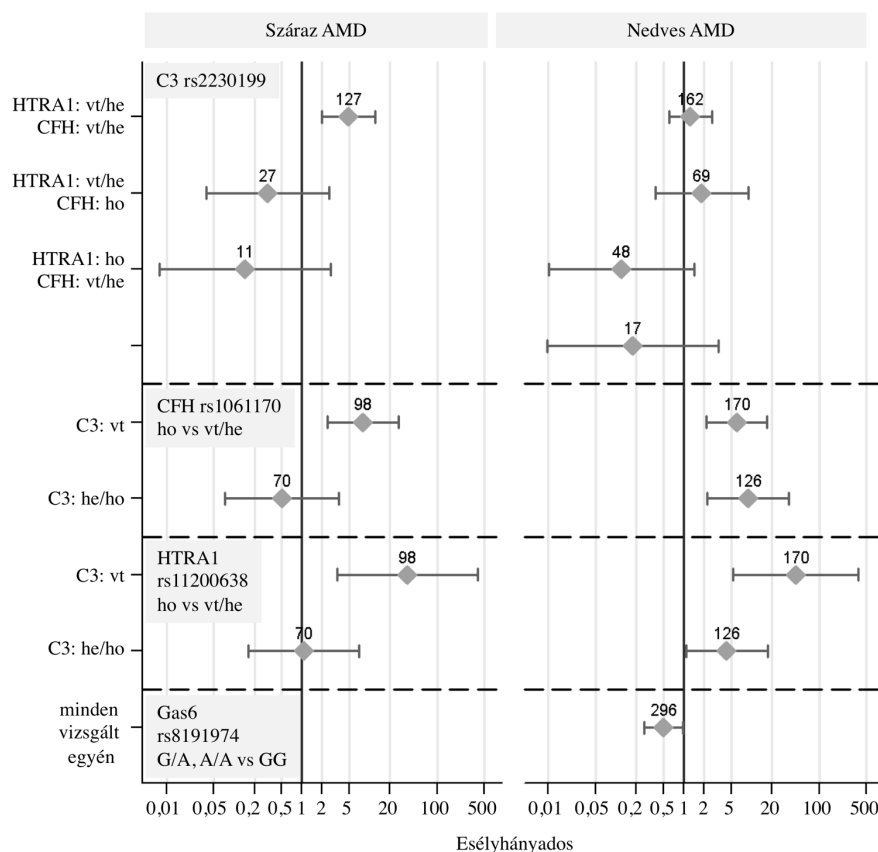
Forrás: doi:10.1371/journal.pone.0050181.t001

A *CFH* és *HTRA1* génekben levő homozigóta polimorfizmusok által jelentett korrigált kockázat igen nagyra adódott. Az esélyhányados az AMD-re nézve a *CFH* esetében EH=5,3 (95%CI: 2,5-11,5, p <0,0001) és a *HTRA1* esetében OR=9,8 (95%CI: 3,3-29,5, p <0,0001). Szignifikáns interakció a változóknak nem volt megfigyelhető. A vizsgált faktorok közötti szignifikáns kapcsolatok a 36. táblázatban és a 41. ábrában kerülnek bemutatásra.

Polimorfizmus	Összehasonlított genotípusok	Az elemzésben résztvevők genotípusa	EH	95% CI	p
Szárász AMD					
<i>C3</i> rs2230199	CG+GG vs. CC	<i>HTRA1</i> : TT+TC <i>CFH</i> : TT+TC	4,93	1,98–12,25	0,0006
<i>CFH</i> rs1061170	CC vs. TT+TC	<i>C3</i> : CC	7,96	2,39–26,50	0,0007
<i>HTRA1</i> rs11200638	TC+CC vs. TT	<i>C3</i> : CC	36,02	3,30–393,02	0,0033
Nedves AMD					
<i>CFH</i> rs1061170	CC vs. TT+TC	<i>C3</i> : CC	6,08	2,17–17,04	0,0006
		<i>C3</i> : CT+TT	8,96	2,24–35,79	0,002
<i>HTRA1</i> rs11200638	TC+CC vs. TT	<i>C3</i> : CC	45,04	5,30–382,83	0,0005
	TC vs. CC	<i>C3</i> : CT+TT	4,34	1,09–17,28	0,04
<i>Gas6</i> rs8191974	GA+AA vs. GG	na	0,50	0,26–0,97	0,04

36. táblázat. A szárász és nedves AMD-vel kapcsolatot mutató polimorfizmusok (többszörös logisztikus regresszió).
Forrás: doi:10.1371/journal.pone.0050181.t001

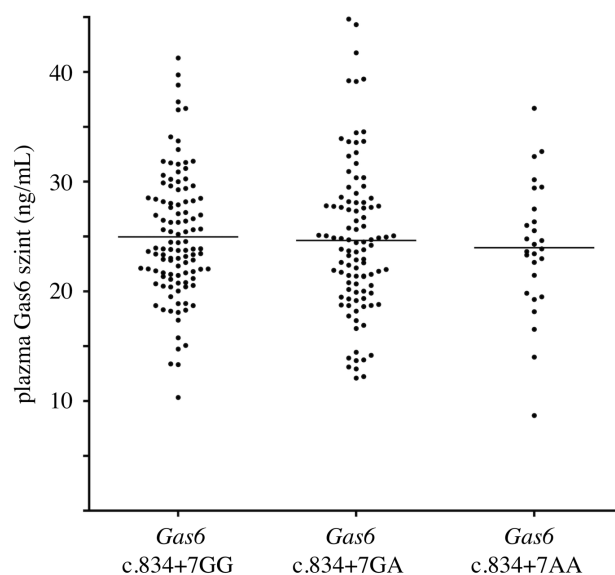
Ezek a gének a *C3* a *CFH* és a *HTRA1*. Interakció mind a *C3* és *CFH* mind a *C3* és *HTRA1* esetében megfigyelhető volt. A *C3* heterozigóta/homozigóta genotípusa szignifikáns kockázatot jelentett vad típusal szemben, de csak akkor, ha a homozigóta *CFH* vagy *HTRA1* polimorfizmus nem volt jelen. Ebben az esetben egy majdnem 5-szörös kockázat volt az esélyhányadosban a szárász típusú AMD esetében (EH: 4,93 (95%CI: 1,98-12,25, p=0,0006). A *CFH* és *HTRA1* mutáció jelenléte a *C3* vad típus esetében mind szárász, mind nedves AMD-re jelentős kockázatot jelentett, amely kockázat eltűnt a *C3* polimorfizmust nézve hetero illetve homozigóta genotípusok esetében a szárász típusú AMD-ben, de megmaradt a szignifikáns kockázat a nedves típusú AMD-ben. Különösen figyelemre méltó összefüggése volt a nedves típusú AMD-vel a *Gas6*, *CHF* és *HTRA1* géneknek (36. táblázat, 41. ábra).



41. ábra. A Gas6 c.834+7G>A polimorfizmus és a genetikai interakciók hatása az AMD kockázatára.
Forrás: doi:10.1371/journal.pone.0050181.t001

A *Gas6* rs8191974 polimorfizmus protektívnek adódott teljesen függetlenül attól, hogy milyenek voltak az egyéb genotípusok ($p=0,04$), felére csökkentve a nedves típusú AMD kialakulásának kockázatát. Voltak jelei annak, hogy a *HTRA1* hatás módosításra kerül a *C3* genotípus által, a *HTRA1*-ben a homozigóta vs. vad típusú vagy heterozigóta genotípus csoport összehasonlítása során, a kalkulált esélyhányadosok EH: 55,04 (95%CI: 5,30-382,83, $p=0,0005$) a *C3* vad típus esetén míg EH: 4,34 (95%CI: 1,09-17,28, $p=0,04$) a *C3* hetero/homozigóta genotípus esetén. A homozigóta *CFH* polimorfizmus jelentős kockázati tényező a nedves típusú AMD-re, a 6-9-szeres kockázatot jelentve attól függően, hogy a *C3*-ban van-e mutáció vagy nincs. A *C3* genotípus érdemleges hatással a *CFH* által jelentett kockázatra - ellentétben a *HTRA1*-el - nincs.

A genotípus szerinti megoszlások alapján megállapítottuk, hogy a *Gas6* c.834+7G>A polimorfizmus a *Gas6* szintre nincs hatással (42. ábra).



42. ábra. A *Gas6* c.834+7G>A polimorfizmus nincs hatással a keringő *Gas6* koncentrációjára (nem publikált adat).

A C3 központi szerepet játszik az alternatív útban, és mind experimentális, mind epidemiológiai bizonyíték van arra, hogy részt vesz az AMD pathogenezisében. A C3 p.Arg102Gly polimorfizmusnak szignifikáns hatása a nedves típusú AMD kialakulására nézve a mi kohorszunkban nem volt kimutatható. Egy meta-analízis alapján a homozigóta C3 rs2230199 polimorfizmus enyhe kockázatot jelent a vad típusú egyénnel szemben (EH: 1,88, 95% CI: 1,59-2,23) (589). A száraz típusú AMD kialakulására kifejtett *CFH* és *C3* polimorfizmusok összefüggő hatása általunk került elsőként közlésre, de a *CFH*-nak markáns hatása van a neovasculáris AMD-re nézve is, függetlenül a *C3* státusztól. Mivel ez a két fehérje ugyanazon a biológiai útvonalon fekszik, elképzelhető, hogy az erősebb hatás elmosza a gyengébb hatást. Összességében úgy tűnik, hogy a *C3*-nak fontos szerepe van a száraz AMD kialakulásában, valamint a *CFH* és a *HTRA1* genotípusok lehetnek hatással a *C3* p.Arg102Gly polimorfizmus által kifejtett kockázatra a komplement szabályozó aktivitáson keresztül. A *CFI* AMD-vel való kapcsolatát is vizsgálták többen, az eredmények nem konklúzívak. Az rs10033900 polimorfizmus összefüggését AMD-vel mi nem tudtuk igazolni. Az ApoE-t illetően az E2 kockázati allél és az E4 protektív szerepét vetik fel (590, 591). A mi eredményeink ezt - hasonlóan a korábbi munkánkhoz - ismételten nem támasztották alá.

Az általunk választott jelölt gén megközelítést a FXIII, *Gas6* és az egyik *Gas6* receptor MerTK esetében az alábbiak miatt alakítottuk ki:

(1) a véralvadás XIII-as faktora plazma transzglutamináz, amelynek legfontosabb szerepe a fibrin láncok keresztkötése a véralvadás kaszkád folyamatának utolsó lépésében. Ismert az, hogy FXIII a sebgyógyulásban és az embrió implantációjában is szerepet játszik (592). Mivel az angiogenezis

fontos szerepet játszik a neovascularis AMD-ben, úgy gondoltuk, hogy érdemes megvizsgálni a polimorfizmusnak az AMD-vel való kapcsolatát. Nem találtunk semmilyen asszociációt, így látjuk igazolva, hogy a FXIII p.Val34Leu polimorfizmus neutrális mind a száraz, mind a nedves AMD kifejlődésére nézve.

(2) A Gas6 amely a protein S strukturális homológja, kapcsolatba hozható a sejt migrációval, angiogenezissel, proliferációval. Gyakori polimorfizmusa a c.834+7G>A, csökkent kockázatot is jelenthet cardiovascularis betegségekre nézve. Az egyik receptora a MerTK. Ezek a funkciók mindenképpen a Gas6-et és a receptorait fontos kandidáns génnek jelenthetik AMD esetén. A csoportosított, összesített korai és késői AMD populációban a Gas6 polimorfizmus nem mutatott statisztikailag kimutatható összefüggést AMD-vel. Amikor a száraz és nedves alcsoportokat külön analizáltuk, a száraz alcsoportban nem sikerült kimutatni összefüggést, viszont egy protektív védő hatást sikerült kimutatni a nedves AMD alcsoportban ($p=0,04$). Mivel az angiogenezis a nedves típusú AMD-nek tipikus sajátossága, ezért lehetséges az, hogy a Gas6-nek ezen funkciója értelmezhető a betegség kontextusában. A Gas6 képes gátolni a VEGF szignalizációt Axl aktiváción keresztül (577) és a metasztázis-indukált angiogenezis gátlásában is szerepe van (593). Elképzelhető, hogy a Gas6-nek van egy fontos negatív szabályzó szerepe a patológiás angiogenezisben, így lehet hatása a nedves típusú AMD kialakulására nézve.

Összességében az eset kontroll tanulmányunkban sikerült igazolnunk a korábbi megfigyeléseket az AMD és a különböző *CFH*, *LOC387715* és *HTRA1* polimorfizmusok összefüggése tekintetében, míg nem sikerült a CFI és az ApoE esetében. Ennél sokkal fontosabb, hogy sikerült igazolnunk genetikai epistasist a *CFH* *HTRA1* és *C3* génekben, bemutatva azt, hogy a *C3* polimorfizmus a száraz AMD egy fontos kockázati tényezője, de csak más polimorfizmusoknak a hiányában, viszont a nedves AMD-re nincsen hatása. Ez arra utal, hogy a *C3* inkább a száraz, mint a neovascularis AMD pathogenezisében játszik szerepet, és a hatása egyértelműen felülírható más, erősebb kockázati tényezők által. Kimutattunk egy protektív hatást a *Gas6* c.834+7G>A polimorfizmus esetében a nedves AMD-t illetően, viszont a polimorfizmus nincs hatással a keringő Gas6 koncentrációjára, azaz valószínűleg nem befolyásolja a Gas6 splicing folyamatát. Ezek az eredmények megnyithatják az utat más jelölt gén asszociációk vizsgálatára, az AMD pathogenezisének illetően is új információkkal szolgálhatnak.

4.16. mikroRNS vizsgálatok férfi infertilitásban

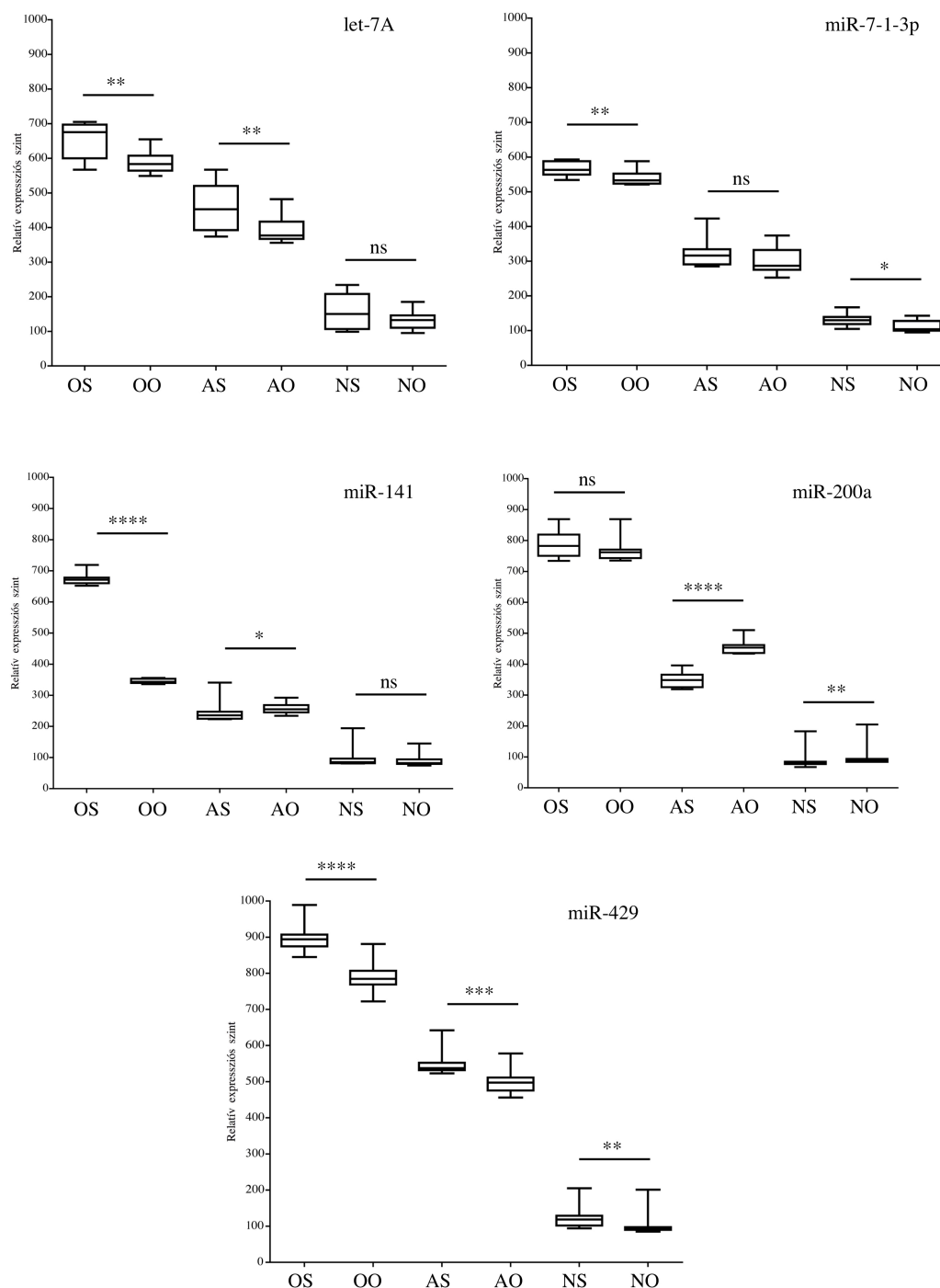
Ebben a tanulmányban 11 spermatogenezissel kapcsolatba hozható miRNS (let-7a, miR-7-1-3p, miR-15b, miR-16, miR-34b, miR-122, miR-141, miR-181a, miR-200a, miR-429, miR-449a) szintjét határoztuk meg spermium sejtekben és ondóban, mind infertilis férfiakban, mind egészséges kontrollokban.

A vizsgált csoportok andrológiai tulajdonságait a 37. táblázat mutatja.

	oligozoo- spermiások (n=10)	asthenozoo- spermiások (n=10)	normozoo- spermiások (n=10)
Életkor (év)	30,0 ± 2,3	29,0 ± 1,9	31,0 ± 2,5
Spermium koncentráció (millió/mL)	9,7 ± 4,4	57,5 ± 32,5	85,7 ± 45,1
Ejakulátum térfogat (mL)	3,2 ± 1,4	3,6 ± 1,8	4,2 ± 2,0
Motilitás (%)	66,0 ± 17,2	18,0 ± 9,3	85,0 ± 21,2
Normál spermium morfológia (%)	19,8 ± 5,4	19,6 ± 8,7	19,8 ± 8,9
Vitalitás (%)	73,0 ± 18,3	62,0 ± 16,4	89,0 ± 18,5
Infertilitás időtartama (hó)	13,2 ± 1,6	12,6 ± 1,4	-

37. táblázat. A vizsgált csoportok andrológiai paraméterei. Forrás: doi.org/10.1080/14647273.2018.1562241

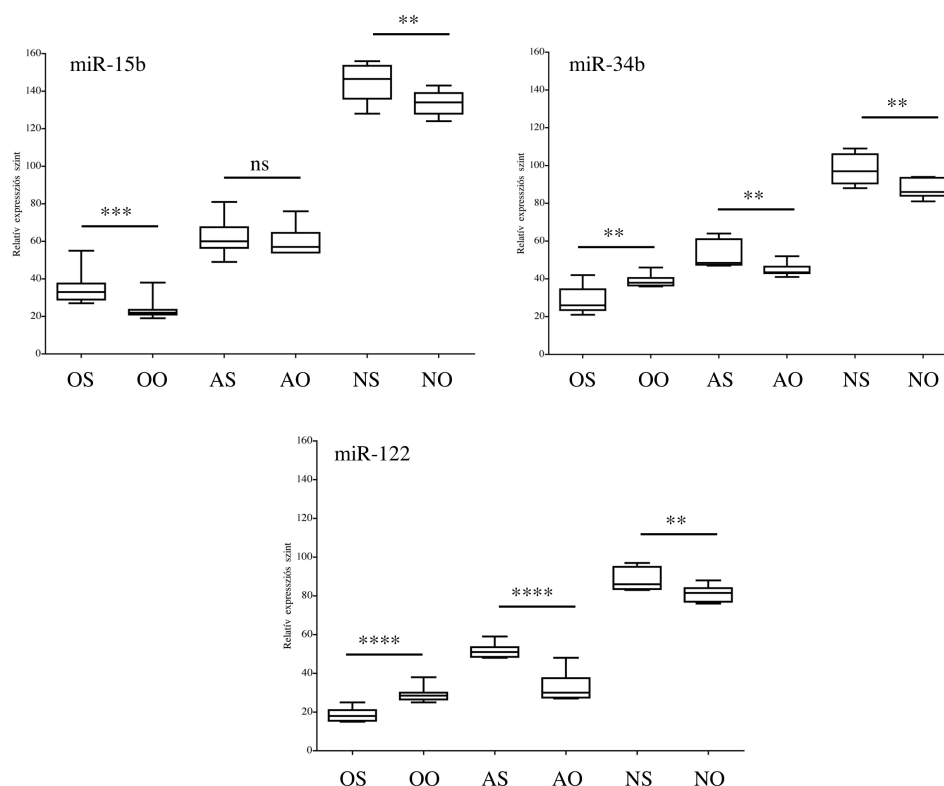
A miRNS szintekben a legtöbb esetben az ondó folyadékban alacsonyabbnak találtuk a miRNS relatív expressziót a spermium sejthez viszonyítva. Ez azonban nem volt így a miR-141, miR-181a, miR-200a (asthenozoospermiás csoportban) esetében, és a miR-34 és miR-122 oligozoospermiás csoport expressziós mintázatában. Öt miRNS esetében statisztikailag kimutatható expresszió növekedés volt az infertilis oligozoospermiás és asthenozoospermiás egyénekben a normozoospermiás kontroll csoporthoz viszonyítva (43. ábra).



43. ábra. Az oligozoospermiában és asthenozoospermiában felülszabályozott miRNS-ek és azok relatív expressziós szintje. Ábramagyarázat: OS (oligozoospermia, spermium sejt), OO (oligozoospermia, ondó folyadék), AS (asthenozoospermia, spermium sejt), AO (asthenozoospermia, ondó folyadék), NS (normozoospermia, spermium sejt), NO (normozoospermia, ondó folyadék). ns: nem szignifikáns, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$. Forrás: DOI: 10.1080/14647273.2018.1562241.

Robosztusan felülszabályozott miRNS-ek voltak a let-7a, miR-7-1-3p, miR-141, miR-200a és a miR-429 ($p < 0.0001$). A miR-15b, miR-34b és miR-122 esetében alacsonyabb expressziós szintet

figyeltünk meg az infertilis egyénekből a normál kontrollhoz viszonyítva mind a spermium sejtekben, mind az ondó folyadékban (44. ábra).



44. ábra. Az oligozoospermiában és asthenozoospermiában alulszabályozott miRNS-ek és azok relatív expressziós szintje. Ábramagyarázat: OS (oligozoospermia, spermium sejt), OO (oligozoospermia, ondó folyadék), AS (asthenozoospermia, spermium sejt), AO (asthenozoospermia, ondó folyadék), NS (normozoospermia, spermium sejt), NO (normozoospermia, ondó folyadék). ns: nem szignifikáns, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$.

Forrás: DOI: 10.1080/14647273.2018.1562241.

A miR-16, miR-181a és miR-449a esetében nem volt a három csoport között statisztikailag kimutatható különbség. Az ondó folyadékban statisztikailag kimutatható különbséget találtunk az oligozoospermiás és normozoospermiás csoportok között: a miR-181a esetében felül szabályozást, míg a miR-16 és 449a esetében alul szabályozást.

Statisztikailag szignifikáns negatív korrelációt találtunk a spermium koncentráció és 6 miRNS expresszió szintje (let-7a, miR-7-1-3p, miR-141, miR-181a, miR-200a és miR-429) között mind a spermium sejtekben, mind az ondó folyadékban. Egy esettől eltekintve (miR-16) pozitív korrelációt mutattunk ki a spermium koncentráció és 4 miRNS (miR-15b, miR-34b, miR-122 és miR-449) esetében spermiumokban (38. táblázat). Szignifikáns pozitív korrelációt mutattunk ki a spermium koncentráció és a miR-15, miR-16b és miR-34b expressziós szintjében az ondó folyadékban.

mikroRNS	Mintatípus	Spearman r	p
let-7a	spermium	-0,7405	p<0,0001
	ondó folyadék	-0,7459	p<0,0001
miR-7-1-3p	spermium	-0,7607	p<0,0001
	ondó folyadék	-0,7587	p<0,0001
miR-141	spermium	-0,7563	p<0,0001
	ondó folyadék	-0,7863	p<0,0001
miR-181a	spermium	-0,6134	p<0,0001
	ondó folyadék	-0,3813	p<0,05
miR-200a	spermium	-0,7578	p<0,0001
	ondó folyadék	-0,7820	p<0,0001
miR-429	spermium	-0,7889	p<0,0001
	ondó folyadék	0,8089	p<0,0001
miR-15b	spermium	0,7808	p<0,0001
	ondó folyadék	0,8084	p<0,0001
miR-16	spermium	0,3024	ns
	ondó folyadék	0,6490	p<0,0001
mir-34b	spermium	0,8224	p<0,0001
	ondó folyadék	0,6421	p<0,0001
miR-122	spermium	0,7603	p<0,0001
	ondó folyadék	0,5193	p<0,001
miR-449	spermium	0,4496	p<0,05
	ondó folyadék	0,4393	p<0,05

38. táblázat. A spermium koncentráció, a spermium és ondó folyadék miRNS expressziós szintek közötti korreláció.

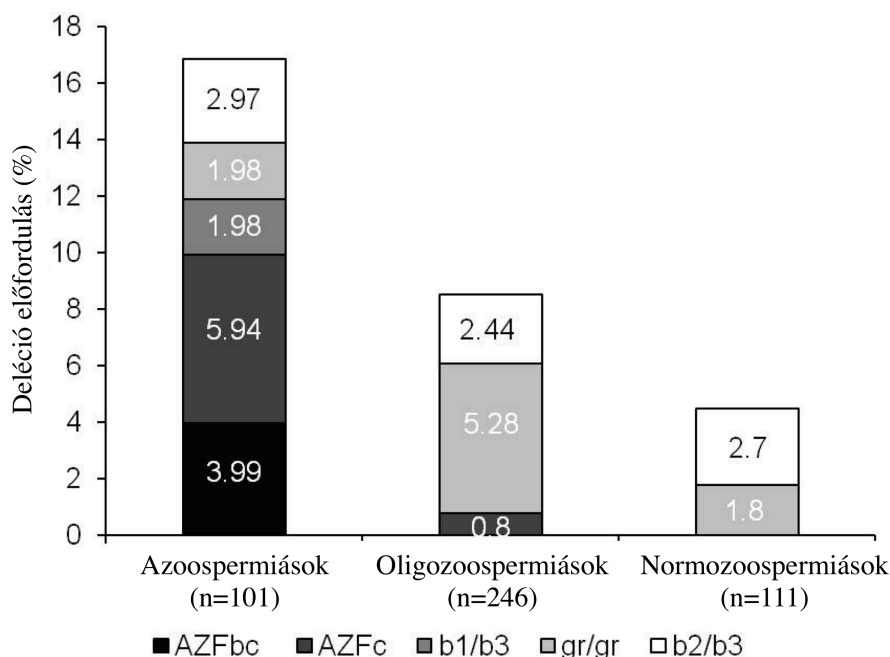
Forrás: DOI: 10.1080/14647273.2018.1562241.

A miRNS-eknek fontos szerepe van a spermatogenezisben (594, 595). Számos testis specifikus miRNS-t sikerült már identifikálni és a spermatogenezisben ezek nagy mennyiségben expresszálódnak (596-600). Méréseinkben az ondó folyadék és a spermium sejtek közötti különbségtételt azért tartottuk szükségesnek, mert az ondófolyadék miRNS-ei csak részlegesen származhatnak a spermiumból, ugyanis a plazma 90%-a az urogenitális traktus mirigyeiből szekretálódik (442). A let-7 miRNS esetében az egyik szabályozott mRNS az *FNDC3* génjéé, mely fehérjeterméke a spermatidok és Sertoli sejtek adhéziójához szükséges (601), azaz a fehérjék hiánya vagy nem megfelelő szabályozottsága hozzájárulhat a férfi infertilitás kialakulásához. A miR-7-1-3p cél génjei a *PIK3R3* és az *RBI* (602). Mindkét gén expresszálódik a testisben és részt vesz a spermatogenezisben (603, 604). A miR-15b egyik szabályozott mRNS-e az *IDH3A*, melynek alacsony expressziója hátrányosan érinti a spermium motilitását annak energia metabolismusában betöltött szerepénél fogva (605). A miR-16 tumor progresszióban betöltött szerepét korábban már igazolták. A miR-34 családnak szerepe lehet az apoptózisban (598, 606, 607). A testisben expresszálódó miR-34b azonos szervi célgénje a *NOTCH1* (608). A miR-122a testis specifikus fehérjét szabályoz (TNP2), amely részt vesz a spermatogenezisben (600). A miR-141 cél génjei a *CBI* és a *TGFB2* (602). A *CBI* a reproduktív rendszerben expresszálódik, míg a

TGFB2-nek széles körű szöveti expressziója van és nemrégiben kimutatták, hogy a miR-141 felülszabályozott olyan betegekben, akik nem megfelelő spermatogenezissel rendelkeztek (441). A miR-181a sejtciklus szabályozásban vehet részt, míg a miR-200a a retinsav függő spermatogenezis szabályzó molekulája lehet (609). A miR-429 a különböző hereszövetekben különbözőképpen expresszálódik és a spermatogenezis késői fázisában nagy mértékű expresszió növekedést mutat (441), azaz részt vehet ezeknek a sejteknek az érésében. A miR-449a célpontja a *CASP2* (610), a *BCL2* (611), amelyek apoptózissal kapcsolatba hozható gének, illetve a *NOTCH1* (612), valamint inhibin beta B (*INHBB*), melyek a spermatogenezisben és a testikuláris funkcióban játszanak szerepet (608, 613). A mi tanulmányunk az első, amely különbséget mutat ki a spermium és az ondó folyadék miRNS expressziós szintje között, valamint korrelációt állít fel a spermium sejt koncentráció és a miRNS expressziók között. Úgy gondoljuk, hogy mivel a miRNS-ek az érett spermiumban illetve az ondó folyadékban is előfordulnak és az expressziós szintjük egyértelműen különbséget mutat a spermatogenezis problémával szenvedő betegekben, ezért úgy gondoljuk, hogy potenciális biomarkerekként foghatjuk fel a férfi infertilitás diagnózisa és klasszifikációja során. Összefoglalva, ez a 8 felül- vagy alulszabályozott miRNS noninvazív biomarkernek tekinthető.

4.17. Y kromoszóma mikrodeléciók Kelet-magyarországi infertilis férfiakban

A 101 azoospermiás férfiből 10 esetben detektáltunk Y kromoszóma mikrodeléciót (9,9%). AZFbc 4 esetben (3,99%), AZFc deléció 6 esetben (5,94%) volt kimutatható. A 246 oligozoospermiás esetben két teljes AZFc mikrodeléciót mutattunk ki (0,8%). A normozoospermiás kontrollok között mikrodeléciót nem detektáltunk. Az AZFbc deléció csak azoospermiás betegekben fordult elő, az AZFc deléció pedig szignifikánsan gyakrabban fordult elő azoospermiás férfiakban oligozoospermiásokkal összehasonlítva, ($p < 0,01$) (45. ábra).



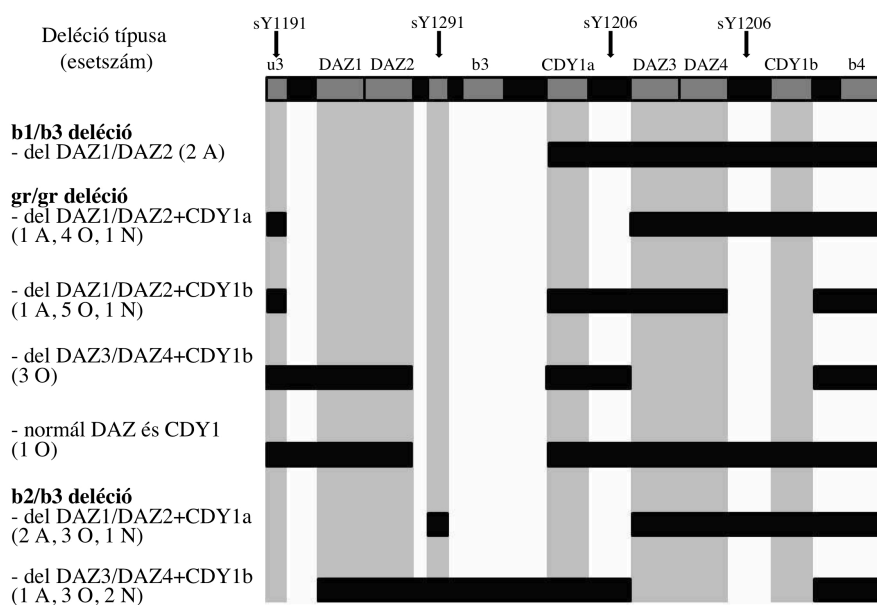
45. ábra. Az Y kromoszóma mikrodeléciók és AZFc parciális deléciók előfordulási gyakorisága. AZFbc és AZFc mikrodeléció azoospermikus és súlyos oligozoospermikus betegek esetében volt kimutatható, míg b1/b3 csak azoospermia esetén. A gr/gr deléció szignifikánsan gyakoribb oligozoospermia esetében, ugyanakkor a b2/b3 deléció mindhárom betegcsoportban előfordul. Forrás: DOI: 10.4103/jhrs.JHRS_12_18.

A következő részleges AZFc deléciókat mutattuk ki: gr/gr (17/458, 3,7%), b2/b3 (12/458, 2,62%), b1/b3 (2/458, 0,44%). A gr/gr és a b2/b3 deléció mind az infertilis mind a normozoospermikus csoportban előfordult, különböző gyakorisággal. A gr/gr előfordulása az oligozoospermikus csoportban a normozoospermikusokkal összehasonlítva magasabb volt (13/246 (5,3%) vs. 2/111 (1,8%), $p < 0,01$). Az azoospermikus és normozoospermikus gr/gr deléció előfordulásokban nem volt szignifikáns különbség. A gr/gr deléció az oligozoospermikus csoportban gyakrabban fordult elő mint az azoospermikus csoportban ($P < 0,05$). A b2/b3 deléció előfordulása nem különbözött, az azoospermikus csoportban 3/101 (2,97%), az oligozoospermikus csoportban 6/246 (2,44%) és a normozoospermikus csoportban 3/111 (2,7%) volt. A b1/b3 deléciót csak az azoospermikus csoportban tudtuk kimutatni (2/101, 1,98%).

A *DAZ* és *CDY1* gének vizsgálatával lehetséges volt részleges duplikációk vizsgálata az AZFc régióban. Detektáltunk 6 kópiás *DAZ*-t és 3 kópiás *CDY1*-et is. A részleges duplikációk előfordulása 2,4% volt (11/458). 2,97% (3/101) volt az azoospermikus csoportban, 1,63% (4/246) az oligozoospermikus csoportban és 3,6% (4/111) a normozoospermikus csoportban, mely különbségek nem voltak statisztikailag kimutathatóak.

Az AZFc régió pontos karakterizálása során meghatároztuk a deletált *DAZ* és *CDY1* génkópiákat (46. ábra). A gr/gr deléciós csoportban 3 deléciós mintázatot találtunk a *DAZ1/DAZ2+CDY1a* $n=6$, 35.3% *DAZ1/DAZ2+CDY1b* $n=7$, 41.2% és *DAZ3/DAZ4+CDY1b* $n=3$, 17.65%. A b2/b3 deléciós

csoportban két deléció típus mintázatot találtunk *DAZ1/DAZ2+CDY1a* $n=6.50\%$, *DAZ3/DAZ4+CDY1b* $n=6.50\%$. A két b1/b3 deléciós esetben *DAZ1/DAZ2* deléciót mutattunk ki úgy, hogy a *CDY* kópiák jelen voltak. Az összes AZFc deléciós esetben a *DAZ* és *CDY* egy gének kópiák számának felét detektáltuk, míg egy esetben gr/gr mintázat normál *DAZ* és *CDY1* mennyiséggel, azaz egy deléció, amit egy duplikáció követ mutattunk ki.



46. ábra. AZFc deléciós mintázatok. A deléciók megoszlása (esetszám) zárójelben található. A sötét vonalak a gének és markerek meglétét jelölik. Forrás: DOI: 10.4103/jhrs.JHRS_12_18.

Az infertilis, azoospermiás és oligozoospermiás férfiakban és a normozoospermiás csoportban hasonló Y haplocsoport előfordulást figyeltünk meg. A P haplocsoport volt a leggyakoribb ($>40\%$). A gr/gr delécióval bíró betegek esetében P ($n=9$, 53%), E ($n=3$, $17,65\%$), J ($n=3$, $17,65\%$) és K ($n=2$, $11,76\%$) haplocsoportok voltak. A b2/b3 deletált betegekben az Y kromoszóma haplocsoport megoszlás a következő volt: E ($n=5$, $41,7\%$), P ($n=4$, $33,3\%$), K ($n=2$, $16,7\%$) és J ($n=1$, $8,3\%$). A b2/b3 deléció esetében az E haplocsoport volt a leggyakoribb, ezt csak a normozoospermiás csoportban találtuk. Az azoospermiás betegekben a b1/b3 deléciók a P haplotípussal voltak társíthatók.

Az AZFa deléciók esetén a megfigyelt fenotípus a Sertoli cell-only szindrómától (SCOS) az azoospermiáig terjed (433, 614-616). Ezekben az esetekben lehetetlen biopsziás anyagból spermatozoát nyerni a betegből. Az AZFb és AZFbc teljes deléciók SCOS-t vagy spermatogenezis hibáit okozzák, aminek ugyanígy azoospermia lesz a vége és hasonlóan az AZFa régió delécióhoz, nem lehet biopsziát végezni, spermatozoa nem nyerhető (433). Az AZFc régió deléciók esetén a klinikai fenotípus rendkívül variábilis (617), de ezekben az esetekben 50%-os valószínűséggel

lehet spermatozooát találni testicularis spermium extrakcióval. Irodalmi adatoknak megfelelően AZFbc és AZFc deléciókat kizárólag azoospermiás és súlyosan oligozoospermiás betegekben definiáltuk. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az Y kromoszóma mikrodéléciók vizsgálata a testicularis spermium extrakció előtt mindenképpen ajánlott, a szükségtelen, hiszen nyilvánvalóan eredménytelen módszer kivitelezésének elkerülése céljából. A részleges AZFc deléciók esetén a genotípus/fenotípus korrelációk lényegesen komplexebbek a teljes AZFc delécióhoz képest. A gr/gr és b2/b3 deléciók kimutathatók normozoospermiás egyéneknél, ami arra utal, hogy nincs meghatározó szerepük a spermatogenezisben, de tény, hogy a gr/gr deléciót hordozó egyének esetében magasabb az oligozoospermia kockázata (431). A mi vizsgálati kohorszunkban a gr/gr deléció szignifikánsan magasabb frekvenciával fordult elő az oligozoospermiás csoportban a kontroll csoporthoz képest. A gr/gr deléció és a spermium koncentráció közötti kapcsolat nem egyértelmű. Az Y haplocsoportok specifikus földrajzi eloszlást mutatnak (618). A gr/gr deléciókat a D2 és Q1 míg a b2/b3 deléciókat az N haplocsoporttal együtt lehetett kimutatni (434, 619-621). Ezzel ellentétben a mi vizsgálati csoportunkban a leggyakoribb haplocsoport gr/gr delécióval együtt a P haplocsoport volt. Ezeknek a vizsgálatoknak a jelentősége abban állhat, hogy elképzelhető, hogy bizonyos haplocsoportok képesek kompenzálni a spermatogenezis hibáit, amely esetekben a részleges deléciók is közreműködnek ezen anomáliák kialakításában. Nincsen sok adatunk a részleges AZFc duplikáció genotípus/fenotípus összefüggéseinek felállításához. Ami általánosságban elfogadottnak tekinthető, hogy sem a részleges, sem a teljes AZFc duplikációk a nem okoznak spermatogenezis hibát (473, 622). Az AZFc duplikációval rendelkező férfiaknak kvalitatív és kvantitatív spermatogenezis eltérésük nem mutatható ki (473, 623). Bizonyos deléciós mintázatok patogénebbek lehetnek mint mások, pl a *CDY1a* kópia deléció és a *DAZ1/DAZ2* deléció magasabb frekvenciával fordul elő az oligozoospermiás betegekben a normozoospermiás egyénekhez képest (475). A mi tanulmányunkban *DAZ1/DAZ2+CDY1a* deléció mellett a *DAZ1/DAZ2+CDY1b* deléció volt nagyobb frekvenciával kimutatható az oligozoospermiás csoportban, összhangban korábbi adatokkal (473, 624, 625). A klinikai genetikai tanácsadás szempontjából fontos tény, hogy a részleges AZFa, AZFb és AZFc deléciók örökíthetők (626, 627). Jelentősége abban áll, hogy potenciális kockázat az utódok esetében a Turner szindróma, mert bizonyos AZFa deléciók jelenléte a teljes Y kromoszóma instabilitásával járhat, amely Y kromoszóma vesztéssel a 45, X sejt vonal kialakulását is eredményezheti.

Az Y kromoszómán számos olyan gén van, amely a testis fejlődéséhez és megfelelő funkcionalitásához elengedhetetlen. Az infertilis esetekben elvégzendő genetikai vizsgálatok a kariotípuson túl az Y kromoszóma AZF mikrodélécióknak a vizsgálatát is magukban foglalják. A

mikrodeléciók vizsgálata az $5 \times 10^6/\text{mL}$ spermiumkoncentráció alatt ajánlott, ezeknek a vizsgálatoknak mind diagnosztikus, mind prognosztikus jelentőségük lehet, és a megfelelő spermium kinyerési eljárások meghatározásában is szerepük van. Az infertilitással kapcsolatos méréseket Dr. Mokánszki Attila végezte.

5. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. Egyedi klinikai kérdésekre kerestünk választ genetikai módszerekkel. Öröklött faktor V hiányos betegnél a FV deficienciát két olvasási keret eltolódást okozó mutáció összetett heterozigóta *transz* szegregációja okozta. Eredményeink lehetőséget nyújtottak célzott prenatális diagnosztikára. Sikeresen tártuk fel NPC betegség molekuláris hátterét. A genetikai diagnózis személyre szabott kezelést eredményezett. Három glükóz metabolizmust érintő gén mutációt és következményüket vizsgáltuk. A *HNF1A*-MODY esetében a genetikai vizsgálat az inzulin kezelés elhagyását eredményezte, a hyperinsulinismus esetében a genetikai eredmény a fokális formát valószínűsítette, míg eredményeink szerint a sulfonilureák inzulin alternatívaként szerepelhetnek a *KCNJ11* mutációt hordozó neonatális diabeteses várandós nők esetében. Új misszensz mutációt írtunk le dystrophinopathiában.

2. Klinikai laboratóriumi genetikai módszerfejlesztést és evaluációt végeztünk. Megvizsgáltuk a leggyakrabban használt molekuláris genetikai diagnosztikai módszerek érzékenységét anyai sejt kontaminációra, ami kritikus fontosságú az invazív mintavételt követő prenatális diagnosztika során. Megállapítottuk egy új generációs DNS szekvenálási rendszer, a pirosekválás homopolimerek detektálását illető analitikai teljesítőképességét.

3. Különböző módszereket használva felmértük magyar CF kohorszok mutáció spektrumát. Két, a magyar populációban korábban nem vizsgált mutáció meglepően magas frekvenciával fordult elő. Eredményeink alapján lehetővé válik mutáció vizsgálati panel kialakítása, kidolgozható molekuláris genetikai diagnosztikai stratégia újszülöttkori szűrőprogram és genotípus alapú mutáció-specifikus kezelés esetén.

4. Felmértük a magyar SLO betegek mutáció spektrumát. Kimutattuk, hogy az SLO esetében a nonszensz-mediálta mRNS lebomlás jelenségét fehérvérsejtekből izolált mRNS-ben is lehet igazolni. Biomarkerek segítségével genotípus-fenotípus összefüggéseket állítottunk fel, és eredményeink alapján 9 esetben végeztünk célzott prenatális diagnosztikát. Nemzetközi kollaborációban kimutattuk kis molekulásúlyú anyagok 7-DHC szintre kifejtett hatását. Kimutattuk, hogy az aripirazole és trazodone kezelés szignifikánsan megemeli a 7-DHC szintet heterozigóta fibroblasztokban, azaz e gyógyszerek valamelyikét szedő várandós heterozigóta nők potenciálisan veszélyeztetettek, mert esetükben a 7-DHC szint toxikus tartományba emelkedhet.

5. 36 betegből álló ARPKD kohorsz vizsgálatát végeztük el, 27 beteg esetén biallélikus *PKHD1* mutációt, 8 beteg esetén fenokópiát mutattunk ki. Indirekt genetikai diagnosztikát végeztünk 6 obligát heterozigóta pár esetén.

6. Az első hazai nagy, 26 betegből álló Marfan genetikai kohorsz genetikai analízisét végeztük el. 7 új mutációt írtunk le. Megállapítottuk, hogy egy kivételtől eltekintve a magyar betegekben mutációs forró pont nincs, így mindenkor a teljes gén vizsgálat indokolt. Eredményeink hozzájárulnak a megfelelő interpretációs protokoll kialakításához az egyre inkább teret nyerő exom/genom szekvenálási alapú klinikai laboratóriumi genetikai diagnosztika esetében, ugyanis a Marfan szindróma részét képezi az exom/genom szekvenálás során kötelezően vizsgálandó véletlen találati listának.

7. Elsőként mutattuk ki a Gas6 jelenlétét humán vérplazmában bárium citrát precipitáció, immunblotting és tömegspektrometria használatával. ELISA módszert fejlesztettünk a Gas6 mennyiségi meghatározására. Felállítottuk a plazma Gas6 referencia tartományát. Kimutattuk, hogy Gas6 nincs jelen a humán thrombocytaiban biológiailag értelmezhető mennyiségben. Megállapítottuk, hogy - hasonlóan több K-vitamin függő fehérjéhez - a plazma Gas6 koncentráció csökken tartós antikoaguláció esetén és magasabb INR nagyobb mértékű csökkenéssel jár.

8. Megállapítottuk, hogy a *CFH*, *LOC387715* és *HTRA1* gének polimorfizmusai erős kockázati tényezők a magyar AMD betegekben, míg az *apoE* allélek nem. Az általuk jelentett kockázatnövekedés elsősorban a polimorfizmusok homozigóta formájában jelentkeznek és erőteljesebb a betegség késői stádiumaiban. Genetikai interakciót igazoltunk a *CFH*, *HTRA1* és *C3* génekben, kimutattuk, hogy a *C3* rs2230199 polimorfizmus a száraz AMD egy fontos kockázati tényezője, de csak más polimorfizmusoknak a hiányában, viszont a nedves AMD-re nincs hatása. Kimutattunk egy protektív hatást a *Gas6* c.834+7G>A polimorfizmus esetében a nedves AMD-t illetően, viszont a polimorfizmus nincs hatással a keringő Gas6 koncentrációjára.

9. Férfi infertilitást vizsgáltunk szerkezeti és funkcionális szempontból. Y kromoszóma mikrodélációkat mutattunk ki azoospermiás férfiakban. Különbséget mutattunk ki a spermium és az ondó folyadék miRNS expressziós szintje között, valamint korrelációt állítottunk fel a spermium sejt koncentráció és bizonyos miRNS expressziók között.

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Pályámon Muszbek László akadémikus indított el, nagyon köszönöm neki. Külön hálás vagyok azért, mert segítette azt, hogy megtaláljam saját utamat. Köszönöm Kappelmayer János professzornak a folyamatos támogatást, a jó munkahelyi légkört, de leginkább a végtelen emberségességét. Köszönöm Björn Dahlbäck professzornak azt a két évet, amit Svédországban tölthettem, felejthetetlen tapasztalatként. Köszönettel tartozom a külföldi kollaborátoroknak, Mirnics Károly, Ned Porter, Milan Macek, Margarida Amaral, Zeljka Korade, Maurizio Scarpa professzoroknak a gyümölcsöző együttműködésekért.

Nagy szerencsém, hogy munkámat kiváló klinikus kollégákkal végezhetem. A betegekhez való odafordulásuk, alázatuk, a velük való mindig stimuláló eszmecsere, az évek során kivívott tisztelet és nem egy esetben barátság folyamatos motivációt eredményez. A teljesség igénye nélkül, köszönöm ezt Dr. Gaál Zsoltnak, Dr. Pfliegler Györgynek, Dr. P. Szabó Gabriellának, Dr. Szabó Tamásnak, Dr. Szakszon Katalinnak, Dr. Török Olgának és Dr. Tory Kálmánnak. Köszönöm azoknak, akik engem választottak diplomamunka vagy TDK témavezetőjüknek, Dr. Fekete Ágnesnek, Dr. Ivády Gergelynek, Dr. Losonczy Gergelynek. Különösen azoknak, akik velem maradtak, Dr. Koczok Katalinnak, Madar Lászlónak a sok közös munkát, a jó ötleteket, az alaposágot, a pontosságot. Köszönöm a segítséget a disszertációhoz laboratóriumi munkával vagy adminisztratív segítséggel hozzájárulóknak, Dzsudzsák Erikának, Gombos Évának, Páldeák Dorkának, Kópis Ildikónak és az évek során velem dolgozó valamennyi asszisztensnek, analitikusnak. Köszönöm a belső kollaborátoroknak, jelenlegi és korábbi munkacsoporttagoknak, Dr. Bessenyei Beátának, Dr. Mokánszki Attilának, Dr. Nagy Bélának, Dr. Oláh Annának, Dr. Orosz Orsolyának, Dr. Ujfalusi Anikónak, Szűcs Zsuzsannának. Nem juthattam volna el ide Dr. Ajzner Éva szerető támogatása nélkül, köszönöm. Köszönöm a barátaimnak, Dr. Bereczki Gézának, Bogár Jánosnak, Kovács Istvánnak, Olajos Péternek, hogy ott voltak, amikor szükségem volt rájuk. Sokat jelentett nekem az évek során Dr. Kern József bizalma, az emlékezetes beszélgetések. Végül azoknak köszönöm, akik azzá tettek és tesznek, aki vagyok. A szüleimnek, a testvéremnek, a fiaimnak és a feleségemnek. Soha nem tudom ezt meghálálni.

7. REFERENCIÁK

1. Monkovic DD, Tracy PB. Activation of human factor V by factor Xa and thrombin. *Biochemistry*. 1990;29(5):1118-28.
2. Rosing J, Tans G, Govers-Riemslog JW, Zwaal RF, Hemker HC. The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J Biol Chem*. 1980;255(1):274-83.
3. Kalafatis M, Rand MD, Mann KG. The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C. *J Biol Chem*. 1994;269(50):31869-80.
4. Nicolaes GA, Tans G, Thomassen MC, Hemker HC, Pabinger I, Varadi K, et al. Peptide bond cleavages and loss of functional activity during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C. *J Biol Chem*. 1995;270(36):21158-66.
5. Tracy PB, Eide LL, Bowie EJ, Mann KG. Radioimmunoassay of factor V in human plasma and platelets. *Blood*. 1982;60(1):59-63.
6. Bouchard BA, Williams JL, Meisler NT, Long MW, Tracy PB. Endocytosis of plasma-derived factor V by megakaryocytes occurs via a clathrin-dependent, specific membrane binding event. *J Thromb Haemost*. 2005;3(3):541-51.
7. Bouchard BA, Meisler NT, Nesheim ME, Liu CX, Strickland DK, Tracy PB. A unique function for LRP-1: a component of a two-receptor system mediating specific endocytosis of plasma-derived factor V by megakaryocytes. *J Thromb Haemost*. 2008;6(4):638-44.
8. Castoldi E, Duckers C, Radu C, Spiezia L, Rossetto V, Tagariello G, et al. Homozygous F5 deep-intronic splicing mutation resulting in severe factor V deficiency and undetectable thrombin generation in platelet-rich plasma. *J Thromb Haemost*. 2011;9(5):959-68.
9. Duckers C, Simioni P, Spiezia L, Radu C, Dabrilili P, Gavasso S, et al. Residual platelet factor V ensures thrombin generation in patients with severe congenital factor V deficiency and mild bleeding symptoms. *Blood*. 2010;115(4):879-86.
10. Owren PA. Parahaemophilia; haemorrhagic diathesis due to absence of a previously unknown clotting factor. *Lancet*. 1947;1(6449):446-8.
11. Zhang B. Recent developments in the understanding of the combined deficiency of FV and FVIII. *Br J Haematol*. 2009;145(1):15-23.
12. Camire RM. A new look at blood coagulation factor V. *Curr Opin Hematol*. 2011;18(5):338-42.
13. Huang JN, Koerper MA. Factor V deficiency: a concise review. *Haemophilia*. 2008;14(6):1164-9.
14. Duckers C, Simioni P, Rosing J, Castoldi E. Advances in understanding the bleeding diathesis in factor V deficiency. *Br J Haematol*. 2009;146(1):17-26.
15. Lak M, Sharifian R, Peyvandi F, Mannucci PM. Symptoms of inherited factor V deficiency in 35 Iranian patients. *Br J Haematol*. 1998;103(4):1067-9.
16. Mannucci PM, Duga S, Peyvandi F. Recessively inherited coagulation disorders. *Blood*. 2004;104(5):1243-52.
17. Acharya SS, Coughlin A, Dimichele DM, North American Rare Bleeding Disorder Study G. Rare Bleeding Disorder Registry: deficiencies of factors II, V, VII, X, XIII, fibrinogen and dysfibrinogenemias. *J Thromb Haemost*. 2004;2(2):248-56.
18. Naderi M, Tabibian S, Alizadeh S, Hosseini S, Zaker F, Bamedi T, et al. Congenital factor V deficiency: comparison of the severity of clinical presentations among patients with rare bleeding disorders. *Acta Haematol*. 2015;133(2):148-54.
19. Alavi SER, Jalalvand M, Assadollahi V, Tabibian S, Dorgalaleh A. Intracranial Hemorrhage: A Devastating Outcome of Congenital Bleeding Disorders-Prevalence, Diagnosis, and Management, with a Special Focus on Congenital Factor XIII Deficiency. *Semin Thromb Hemost*. 2018;44(3):267-75.
20. Cui J, O'Shea KS, Purkayastha A, Saunders TL, Ginsburg D. Fatal haemorrhage and incomplete block to embryogenesis in mice lacking coagulation factor V. *Nature*. 1996;384(6604):66-8.
21. Yang TL, Cui J, Taylor JM, Yang A, Gruber SB, Ginsburg D. Rescue of fatal neonatal hemorrhage in factor V deficient mice by low level transgene expression. *Thromb Haemost*. 2000;83(1):70-7.
22. Mann KG. How much factor V is enough? *Thromb Haemost*. 2000;83(1):3-4.
23. Lunghi B, Pinotti M, Maestri I, Batorova A, Bernardi F. Evaluation of factor V mRNA to define the residual factor V expression levels in severe factor V deficiency. *Haematologica*. 2008;93(3):477-8.

24. Duga S, Asselta R, Tenchini ML. Coagulation factor V. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(8):1393-9.
25. Segers K, Dahlback B, Nicolaes GA. Coagulation factor V and thrombophilia: background and mechanisms. *Thromb Haemost.* 2007;98(3):530-42.
26. Hirbawi J, Vaughn JL, Bukys MA, Vos HL, Kalafatis M. Contribution of amino acid region 659-663 of Factor Va heavy chain to the activity of factor Xa within prothrombinase. *Biochemistry.* 2010;49(39):8520-34.
27. Tabibian S, Shiravand Y, Shams M, Safa M, Gholami MS, Heydari F, et al. A Comprehensive Overview of Coagulation Factor V and Congenital Factor V Deficiency. *Semin Thromb Hemost.* 2019;45(5):523-43.
28. Mann KG, Kalafatis M. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. *Blood.* 2003;101(1):20-30.
29. Peyvandi F, Garagiola I, Mortarino M. Prenatal diagnosis and preimplantation genetic diagnosis: novel technologies and state of the art of PGD in different regions of the world. *Haemophilia.* 2011;17 Suppl 1:14-7.
30. Lippi G, Favaloro EJ, Montagnana M, Manzato F, Guidi GC, Franchini M. Inherited and acquired factor V deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2011;22(3):160-6.
31. Chen J, Wang J, Lin XY, Xu YW, He ZH, Li HY, et al. Genetic diagnosis in Hemophilia A from southern China: five novel mutations and one preimplantation genetic analysis. *Int J Lab Hematol.* 2017;39(2):191-201.
32. Fernandez RM, Pecina A, Sanchez B, Lozano-Arana MD, Garcia-Lozano JC, Perez-Garrido R, et al. Experience of Preimplantation Genetic Diagnosis for Hemophilia at the University Hospital Virgen Del Rocio in Spain: Technical and Clinical Overview. *Biomed Res Int.* 2015;2015:406096.
33. Vanier MT, Duthel S, Rodriguez-Lafrasse C, Pentchev P, Carstea ED. Genetic heterogeneity in Niemann-Pick C disease: a study using somatic cell hybridization and linkage analysis. *Am J Hum Genet.* 1996;58(1):118-25.
34. Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, Loftus SK, Zhang D, Cummings C, et al. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science.* 1997;277(5323):228-31.
35. Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H, Fensom A, Vanier MT, Wattiaux R, et al. Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science.* 2000;290(5500):2298-301.
36. Neufeld EB, Wastney M, Patel S, Suresh S, Cooney AM, Dwyer NK, et al. The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. *J Biol Chem.* 1999;274(14):9627-35.
37. Friedland N, Liou HL, Lobel P, Stock AM. Structure of a cholesterol-binding protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(5):2512-7.
38. Ko DC, Binkley J, Sidow A, Scott MP. The integrity of a cholesterol-binding pocket in Niemann-Pick C2 protein is necessary to control lysosome cholesterol levels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(5):2518-25.
39. Infante RE, Wang ML, Radhakrishnan A, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL. NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(40):15287-92.
40. Kwon HJ, Abi-Mosleh L, Wang ML, Deisenhofer J, Goldstein JL, Brown MS, et al. Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell.* 2009;137(7):1213-24.
41. Higaki K, Almanzar-Paramio D, Sturley SL. Metazoan and microbial models of Niemann-Pick Type C disease. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1685(1-3):38-47.
42. Lopez ME, Scott MP. Genetic dissection of a cell-autonomous neurodegenerative disorder: lessons learned from mouse models of Niemann-Pick disease type C. *Dis Model Mech.* 2013;6(5):1089-100.
43. Walkley SU, Vanier MT. Secondary lipid accumulation in lysosomal disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793(4):726-36.
44. Vanier MT. Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5:16.
45. Geberhiwot T, Moro A, Dardis A, Ramaswami U, Sirrs S, Marfa MP, et al. Consensus clinical management guidelines for Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis.* 2018;13(1):50.

46. Wassif CA, Cross JL, Iben J, Sanchez-Pulido L, Cougnoux A, Platt FM, et al. High incidence of unrecognized visceral/neurological late-onset Niemann-Pick disease, type C1, predicted by analysis of massively parallel sequencing data sets. *Genet Med*. 2016;18(1):41-8.
47. Patterson MC, Mengel E, Wijburg FA, Muller A, Schwierin B, Drevon H, et al. Disease and patient characteristics in NP-C patients: findings from an international disease registry. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8:12.
48. Abela L, Plecko B, Palla A, Burda P, Nuoffer JM, Ballhausen D, et al. Early co-occurrence of a neurologic-psychiatric disease pattern in Niemann-Pick type C disease: a retrospective Swiss cohort study. *Orphanet J Rare Dis*. 2014;9:176.
49. Trendelenburg G, Vanier MT, Maza S, Millat G, Böhner G, Munz DL, et al. Niemann-Pick type C disease in a 68-year-old patient. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;77(8):997-8.
50. Walterfang M, Abel LA, Desmond P, Fahey MC, Bowman EA, Velakoulis D. Cerebellar volume correlates with saccadic gain and ataxia in adult Niemann-Pick type C. *Mol Genet Metab*. 2013;108(1):85-9.
51. Walterfang M, Fahey M, Abel L, Fietz M, Wood A, Bowman E, et al. Size and shape of the corpus callosum in adult Niemann-Pick type C reflects state and trait illness variables. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2011;32(7):1340-6.
52. Chiba Y, Komori H, Takei S, Hasegawa-Ishii S, Kawamura N, Adachi K, et al. Niemann-Pick disease type C1 predominantly involving the frontotemporal region, with cortical and brainstem Lewy bodies: an autopsy case. *Neuropathology*. 2014;34(1):49-57.
53. Platt FM, Neises GR, Dwek RA, Butters TD. N-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. *J Biol Chem*. 1994;269(11):8362-5.
54. Pineda M, Walterfang M, Patterson MC. Miglustat in Niemann-Pick disease type C patients: a review. *Orphanet J Rare Dis*. 2018;13(1):140.
55. Patterson MC, Vecchio D, Prady H, Abel L, Wraith JE. Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. *Lancet Neurol*. 2007;6(9):765-72.
56. Wraith JE, Vecchio D, Jacklin E, Abel L, Chadha-Boreham H, Luzy C, et al. Miglustat in adult and juvenile patients with Niemann-Pick disease type C: long-term data from a clinical trial. *Mol Genet Metab*. 2010;99(4):351-7.
57. Patterson MC, Vecchio D, Jacklin E, Abel L, Chadha-Boreham H, Luzy C, et al. Long-term miglustat therapy in children with Niemann-Pick disease type C. *J Child Neurol*. 2010;25(3):300-5.
58. Pineda M, Jurickova K, Karimzadeh P, Kolnikova M, Malinova V, Insua JL, et al. Disease characteristics, prognosis and miglustat treatment effects on disease progression in patients with Niemann-Pick disease Type C: an international, multicenter, retrospective chart review. *Orphanet J Rare Dis*. 2019;14(1):32.
59. Wraith JE, Guffon N, Rohrbach M, Hwu WL, Korenke GC, Bembi B, et al. Natural history of Niemann-Pick disease type C in a multicentre observational retrospective cohort study. *Mol Genet Metab*. 2009;98(3):250-4.
60. Hammond N, Munkacsy AB, Sturley SL. The complexity of a monogenic neurodegenerative disease: More than two decades of therapeutic driven research into Niemann-Pick type C disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2019;1864(8):1109-23.
61. Patterson MC, Hendriksz CJ, Walterfang M, Sedel F, Vanier MT, Wijburg F, et al. Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: an update. *Mol Genet Metab*. 2012;106(3):330-44.
62. Vanier MT, Latour P. Laboratory diagnosis of Niemann-Pick disease type C: the filipin staining test. *Methods Cell Biol*. 2015;126:357-75.
63. Stampfer M, Theiss S, Amraoui Y, Jiang X, Keller S, Ory DS, et al. Niemann-Pick disease type C clinical database: cognitive and coordination deficits are early disease indicators. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8:35.
64. Pineda M, Perez-Poyato MS, O'Callaghan M, Vilaseca MA, Pocovi M, Domingo R, et al. Clinical experience with miglustat therapy in pediatric patients with Niemann-Pick disease type C: a case series. *Mol Genet Metab*. 2010;99(4):358-66.
65. Yanjanin NM, Velez JI, Gropman A, King K, Bianconi SE, Conley SK, et al. Linear clinical progression, independent of age of onset, in Niemann-Pick disease, type C. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2010;153B(1):132-40.

66. Welford RW, Garzotti M, Marques Lourenco C, Mengel E, Marquardt T, Reunert J, et al. Plasma lysosphingomyelin demonstrates great potential as a diagnostic biomarker for Niemann-Pick disease type C in a retrospective study. *PLoS One*. 2014;9(12):e114669.
67. Millat G, Marçais C, Rafi MA, Yamamoto T, Morris JA, Pentchev PG, et al. Niemann-Pick C1 disease: the I1061T substitution is a frequent mutant allele in patients of Western European descent and correlates with a classic juvenile phenotype. *Am J Hum Genet*. 1999;65(5):1321-9.
68. Gelsthorpe ME, Baumann N, Millard E, Gale SE, Langmade SJ, Schaffer JE, et al. Niemann-Pick type C1 I1061T mutant encodes a functional protein that is selected for endoplasmic reticulum-associated degradation due to protein misfolding. *J Biol Chem*. 2008;283(13):8229-36.
69. Imrie J, Heptinstall L, Knight S, Strong K. Observational cohort study of the natural history of Niemann-Pick disease type C in the UK: a 5-year update from the UK clinical database. *BMC Neurol*. 2015;15:257.
70. Millat G, Marçais C, Tomasetto C, Chikh K, Fensom AH, Harzer K, et al. Niemann-Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop. *Am J Hum Genet*. 2001;68(6):1373-85.
71. Moat SJ, Bradley DM, Salmon R, Clarke A, Hartley L. Newborn bloodspot screening for Duchenne muscular dystrophy: 21 years experience in Wales (UK). *Eur J Hum Genet*. 2013;21(10):1049-53.
72. Ryder S, Leadley RM, Armstrong N, Westwood M, de Kock S, Butt T, et al. The burden, epidemiology, costs and treatment for Duchenne muscular dystrophy: an evidence review. *Orphanet J Rare Dis*. 2017;12(1):79.
73. Mendell JR, Shilling C, Leslie ND, Flanigan KM, al-Dahhak R, Gastier-Foster J, et al. Evidence-based path to newborn screening for Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 2012;71(3):304-13.
74. Yiu EM, Kornberg AJ. Duchenne muscular dystrophy. *J Paediatr Child Health*. 2015;51(8):759-64.
75. Smith AD, Koreska J, Moseley CF. Progression of scoliosis in Duchenne muscular dystrophy. *J Bone Joint Surg Am*. 1989;71(7):1066-74.
76. Ciafaloni E, Fox DJ, Pandya S, Westfield CP, Puzhankara S, Romitti PA, et al. Delayed diagnosis in duchenne muscular dystrophy: data from the Muscular Dystrophy Surveillance, Tracking, and Research Network (MD STARnet). *J Pediatr*. 2009;155(3):380-5.
77. Mercuri E, Muntoni F. Muscular dystrophies. *Lancet*. 2013;381(9869):845-60.
78. Carter JC, Sheehan DW, Prochoroff A, Birnkrant DJ. Muscular Dystrophies. *Clin Chest Med*. 2018;39(2):377-89.
79. Pichavant C, Aartsma-Rus A, Clemens PR, Davies KE, Dickson G, Takeda S, et al. Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. *Mol Ther*. 2011;19(5):830-40.
80. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*. 2007;447(7140):87-91.
81. Bushby K, Finkel R, Wong B, Barohn R, Campbell C, Comi GP, et al. Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle Nerve*. 2014;50(4):477-87.
82. Mendell JR, Rodino-Klapac LR, Sahenk Z, Roush K, Bird L, Lowes LP, et al. Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 2013;74(5):637-47.
83. Voit T, Topaloglu H, Straub V, Muntoni F, Deconinck N, Campion G, et al. Safety and efficacy of drisapersen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy (DEMAND II): an exploratory, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Neurol*. 2014;13(10):987-96.
84. Mendell JR, Goemans N, Lowes LP, Alfano LN, Berry K, Shao J, et al. Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 2016;79(2):257-71.
85. Deconinck N, Dan B. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr Neurol*. 2007;36(1):1-7.
86. Murray JM, Davies KE, Harper PS, Meredith L, Mueller CR, Williamson R. Linkage relationship of a cloned DNA sequence on the short arm of the X chromosome to Duchenne muscular dystrophy. *Nature*. 1982;300(5887):69-71.
87. Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol*. 2003;2(12):731-40.
88. Aartsma-Rus A, Ginjaar IB, Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet*. 2016;53(3):145-51.

89. Henderson DM, Lee A, Ervasti JM. Disease-causing missense mutations in actin binding domain 1 of dystrophin induce thermodynamic instability and protein aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(21):9632-7.
90. Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, Apkon SD, Blackwell A, Brumbaugh D, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. *Lancet Neurol*. 2018;17(3):251-67.
91. Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH, Johnson M, Medori R, Loike JD, et al. Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N Engl J Med*. 1988;318(21):1363-8.
92. Newborn screening: toward a uniform screening panel and system. *Genet Med*. 2006;8 Suppl 1:1S-252S.
93. Iafusco D, Massa O, Pasquino B, Colombo C, Iughetti L, Bizzarri C, et al. Minimal incidence of neonatal/infancy onset diabetes in Italy is 1:90,000 live births. *Acta Diabetol*. 2012;49(5):405-8.
94. Shield JP. Neonatal diabetes: new insights into aetiology and implications. *Horm Res*. 2000;53 Suppl 1:7-11.
95. Hattersley AT, Patel KA. Precision diabetes: learning from monogenic diabetes. *Diabetologia*. 2017;60(5):769-77.
96. Molnar Z, Balogh L, Kappelmayer J, Madar L, Gombos E, Balogh I. Congenital Hyperinsulinism Caused by a De Novo Mutation in the ABCC8 Gene - A Case Report. *EJIFCC*. 2017;28(1):85-91.
97. Gloyn AL, Pearson ER, Antcliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS, et al. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N Engl J Med*. 2004;350(18):1838-49.
98. Gloyn AL, Diatloff-Zito C, Edghill EL, Bellanne-Chantelot C, Nivot S, Coutant R, et al. KCNJ11 activating mutations are associated with developmental delay, epilepsy and neonatal diabetes syndrome and other neurological features. *Eur J Hum Genet*. 2006;14(7):824-30.
99. Hattersley AT, Ashcroft FM. Activating mutations in Kir6.2 and neonatal diabetes: new clinical syndromes, new scientific insights, and new therapy. *Diabetes*. 2005;54(9):2503-13.
100. Babenko AP, Polak M, Cave H, Busiah K, Czernichow P, Scharfmann R, et al. Activating mutations in the ABCC8 gene in neonatal diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2006;355(5):456-66.
101. Proks P, Arnold AL, Bruining J, Girard C, Flanagan SE, Larkin B, et al. A heterozygous activating mutation in the sulphonylurea receptor SUR1 (ABCC8) causes neonatal diabetes. *Hum Mol Genet*. 2006;15(11):1793-800.
102. De Franco E, Flanagan SE, Houghton JA, Lango Allen H, Mackay DJ, Temple IK, et al. The effect of early, comprehensive genomic testing on clinical care in neonatal diabetes: an international cohort study. *Lancet*. 2015;386(9997):957-63.
103. Edghill EL, Flanagan SE, Patch AM, Boustred C, Parrish A, Shields B, et al. Insulin mutation screening in 1,044 patients with diabetes: mutations in the INS gene are a common cause of neonatal diabetes but a rare cause of diabetes diagnosed in childhood or adulthood. *Diabetes*. 2008;57(4):1034-42.
104. Pearson ER, Flechtner I, Njolstad PR, Malecki MT, Flanagan SE, Larkin B, et al. Switching from insulin to oral sulfonylureas in patients with diabetes due to Kir6.2 mutations. *N Engl J Med*. 2006;355(5):467-77.
105. American Diabetes A. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. *Diabetes Care*. 2019;42(Suppl 1):S13-S28.
106. Hattersley AT, Greeley SAW, Polak M, Rubio-Cabezas O, Njolstad PR, Mlynarski W, et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2018;19 Suppl 27:47-63.
107. Fajans SS, Conn JW. Tolbutamide-induced improvement in carbohydrate tolerance of young people with mild diabetes mellitus. *Diabetes*. 1960;9:83-8.
108. Tattersall RB. Mild familial diabetes with dominant inheritance. *Q J Med*. 1974;43(170):339-57.
109. Shields BM, Hicks S, Shepherd MH, Colclough K, Hattersley AT, Ellard S. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing? *Diabetologia*. 2010;53(12):2504-8.
110. Thanabalasingham G, Pal A, Selwood MP, Dudley C, Fisher K, Bingley PJ, et al. Systematic assessment of etiology in adults with a clinical diagnosis of young-onset type 2 diabetes is a successful strategy for identifying maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Care*. 2012;35(6):1206-12.

111. Shepherd MH, Shields BM, Hudson M, Pearson ER, Hyde C, Ellard S, et al. A UK nationwide prospective study of treatment change in MODY: genetic subtype and clinical characteristics predict optimal glycaemic control after discontinuing insulin and metformin. *Diabetologia*. 2018;61(12):2520-7.
112. Gaal Z, Balogh I. Monogenic Forms of Diabetes Mellitus. *Exp Suppl*. 2019;111:385-416.
113. Gjessing AP, Rui G, Lauenborg J, Have CT, Hollensted M, Andersson E, et al. High Prevalence of Diabetes-Predisposing Variants in MODY Genes Among Danish Women With Gestational Diabetes Mellitus. *J Endocr Soc*. 2017;1(6):681-90.
114. Bansal V, Gassenhuber J, Phillips T, Oliveira G, Harbaugh R, Villarasa N, et al. Spectrum of mutations in monogenic diabetes genes identified from high-throughput DNA sequencing of 6888 individuals. *BMC Med*. 2017;15(1):213.
115. Shepherd M, Shields B, Hammersley S, Hudson M, McDonald TJ, Colclough K, et al. Systematic Population Screening, Using Biomarkers and Genetic Testing, Identifies 2.5% of the U.K. Pediatric Diabetes Population With Monogenic Diabetes. *Diabetes Care*. 2016;39(11):1879-88.
116. Pihoker C, Gilliam LK, Ellard S, Dabelea D, Davis C, Dolan LM, et al. Prevalence, characteristics and clinical diagnosis of maturity onset diabetes of the young due to mutations in HNF1A, HNF4A, and glucokinase: results from the SEARCH for Diabetes in Youth. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(10):4055-62.
117. Irgens HU, Molnes J, Johansson BB, Ringdal M, Skriverhaug T, Undlien DE, et al. Prevalence of monogenic diabetes in the population-based Norwegian Childhood Diabetes Registry. *Diabetologia*. 2013;56(7):1512-9.
118. Johansson BB, Irgens HU, Molnes J, Sztromwasser P, Aukrust I, Juliusson PB, et al. Targeted next-generation sequencing reveals MODY in up to 6.5% of antibody-negative diabetes cases listed in the Norwegian Childhood Diabetes Registry. *Diabetologia*. 2017;60(4):625-35.
119. Delvecchio M, Mozzillo E, Salzano G, Iafusco D, Frontino G, Patera PI, et al. Monogenic Diabetes Accounts for 6.3% of Cases Referred to 15 Italian Pediatric Diabetes Centers During 2007 to 2012. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(6):1826-34.
120. Shields BM, McDonald TJ, Ellard S, Campbell MJ, Hyde C, Hattersley AT. The development and validation of a clinical prediction model to determine the probability of MODY in patients with young-onset diabetes. *Diabetologia*. 2012;55(5):1265-72.
121. Yamagata K. Regulation of pancreatic beta-cell function by the HNF transcription network: lessons from maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Endocr J*. 2003;50(5):491-9.
122. Thomas H, Jaschke K, Bulman M, Frayling TM, Mitchell SM, Roosen S, et al. A distant upstream promoter of the HNF-4alpha gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mol Genet*. 2001;10(19):2089-97.
123. Lausen J, Thomas H, Lemm I, Bulman M, Borgschulze M, Lingott A, et al. Naturally occurring mutations in the human HNF4alpha gene impair the function of the transcription factor to a varying degree. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(2):430-7.
124. Ferrer J. A genetic switch in pancreatic beta-cells: implications for differentiation and haploinsufficiency. *Diabetes*. 2002;51(8):2355-62.
125. Pearson ER, Boj SF, Steele AM, Barrett T, Stals K, Shield JP, et al. Macrosomia and hyperinsulinaemic hypoglycaemia in patients with heterozygous mutations in the HNF4A gene. *PLoS Med*. 2007;4(4):e118.
126. Johansson S, Irgens H, Chudasama KK, Molnes J, Aerts J, Roque FS, et al. Exome sequencing and genetic testing for MODY. *PLoS One*. 2012;7(5):e38050.
127. Brahm AJ, Wang G, Wang J, McIntyre AD, Cao H, Ban MR, et al. Genetic Confirmation Rate in Clinically Suspected Maturity-Onset Diabetes of the Young. *Can J Diabetes*. 2016;40(6):555-60.
128. Doddabelavangala Mruthyunjaya M, Chapla A, Hesarghatta Shyamasunder A, Varghese D, Varshney M, Paul J, et al. Comprehensive Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) Gene Screening in Pregnant Women with Diabetes in India. *PLoS One*. 2017;12(1):e0168656.
129. Piccini B, Artuso R, Lenzi L, Guasti M, Braccisi G, Barni F, et al. Clinical and molecular characterization of a novel INS mutation identified in patients with MODY phenotype. *Eur J Med Genet*. 2016;59(11):590-5.
130. Bonnefond A, Philippe J, Durand E, Dechaume A, Huyvaert M, Montagne L, et al. Whole-exome sequencing and high throughput genotyping identified KCNJ11 as the thirteenth MODY gene. *PLoS One*. 2012;7(6):e37423.

131. Johnson SR, Leo PJ, McInerney-Leo AM, Anderson LK, Marshall M, McGown I, et al. Whole-exome sequencing for mutation detection in pediatric disorders of insulin secretion: Maturity onset diabetes of the young and congenital hyperinsulinism. *Pediatr Diabetes*. 2018;19(4):656-62.
132. Kwak SH, Jung CH, Ahn CH, Park J, Chae J, Jung HS, et al. Clinical whole exome sequencing in early onset diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2016;122:71-7.
133. Prudente S, Jungtrakoon P, Marucci A, Ludovico O, Buranasupkajorn P, Mazza T, et al. Loss-of-Function Mutations in APPL1 in Familial Diabetes Mellitus. *Am J Hum Genet*. 2015;97(1):177-85.
134. Yan J, Jiang F, Zhang R, Xu T, Zhou Z, Ren W, et al. Whole-exome sequencing identifies a novel INS mutation causative of maturity-onset diabetes of the young 10. *J Mol Cell Biol*. 2017;9(5):376-83.
135. Dickens LT, Naylor RN. Clinical Management of Women with Monogenic Diabetes During Pregnancy. *Curr Diab Rep*. 2018;18(3):12.
136. De Franco E, Caswell R, Houghton JA, Iotova V, Hattersley AT, Ellard S. Analysis of cell-free fetal DNA for non-invasive prenatal diagnosis in a family with neonatal diabetes. *Diabet Med*. 2017;34(4):582-5.
137. Aynsley-Green A, Hussain K, Hall J, Saudubray JM, Nihoul-Fekete C, De Lonlay-Debeney P, et al. Practical management of hyperinsulinism in infancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2000;82(2):F98-F107.
138. Meintjes M, Endozo R, Dickson J, Erlandsson K, Hussain K, Townsend C, et al. 18F-DOPA PET and enhanced CT imaging for congenital hyperinsulinism: initial UK experience from a technologist's perspective. *Nucl Med Commun*. 2013;34(6):601-8.
139. Ismail D, Hussain K. Role of 18F-DOPA PET/CT imaging in congenital hyperinsulinism. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010;11(3):165-9.
140. Kapoor RR, Flanagan SE, James C, Shield J, Ellard S, Hussain K. Hyperinsulinaemic hypoglycaemia. *Arch Dis Child*. 2009;94(6):450-7.
141. Hussain K, Aynsley-Green A. Management of hyperinsulinism in infancy and childhood. *Ann Med*. 2000;32(8):544-51.
142. James C, Kapoor RR, Ismail D, Hussain K. The genetic basis of congenital hyperinsulinism. *J Med Genet*. 2009;46(5):289-99.
143. Sempoux C, Capito C, Bellanne-Chantelot C, Verkarre V, de Lonlay P, Aigrain Y, et al. Morphological mosaicism of the pancreatic islets: a novel anatomopathological form of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(12):3785-93.
144. Shah P, Rahman SA, Demirbilek H, Guemes M, Hussain K. Hyperinsulinaemic hypoglycaemia in children and adults. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017;5(9):729-42.
145. Verkarre V, Fournet JC, de Lonlay P, Gross-Morand MS, Devillers M, Rahier J, et al. Paternal mutation of the sulfonyleurea receptor (SUR1) gene and maternal loss of 11p15 imprinted genes lead to persistent hyperinsulinism in focal adenomatous hyperplasia. *J Clin Invest*. 1998;102(7):1286-91.
146. Garg PK, Lokitz SJ, Truong L, Putegnati B, Reynolds C, Rodriguez L, et al. Pancreatic uptake and radiation dosimetry of 6-[18F]fluoro-L-DOPA from PET imaging studies in infants with congenital hyperinsulinism. *PLoS One*. 2017;12(11):e0186340.
147. Hardy OT, Hernandez-Pampaloni M, Saffer JR, Scheuermann JS, Ernst LM, Freifelder R, et al. Accuracy of [18F]fluorodopa positron emission tomography for diagnosing and localizing focal congenital hyperinsulinism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(12):4706-11.
148. Demirbilek H, Hussain K. Congenital Hyperinsulinism: Diagnosis and Treatment Update. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2017;9(Suppl 2):69-87.
149. Senniappan S, Shanti B, James C, Hussain K. Hyperinsulinaemic hypoglycaemia: genetic mechanisms, diagnosis and management. *J Inherit Metab Dis*. 2012;35(4):589-601.
150. Hussain K. Diagnosis and management of hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy. *Horm Res*. 2008;69(1):2-13.
151. Welters A, Lerch C, Kummer S, Marquard J, Salgin B, Mayatepek E, et al. Long-term medical treatment in congenital hyperinsulinism: a descriptive analysis in a large cohort of patients from different clinical centers. *Orphanet J Rare Dis*. 2015;10:150.
152. Nebesio TD, Hoover WC, Caldwell RL, Nitu ME, Eugster EA. Development of pulmonary hypertension in an infant treated with diazoxide. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2007;20(8):939-44.
153. Yildizdas D, Erdem S, Kucukosmanoglu O, Yilmaz M, Yuksel B. Pulmonary hypertension, heart failure and neutropenia due to diazoxide therapy. *Adv Ther*. 2008;25(5):515-9.

154. Timlin MR, Black AB, Delaney HM, Matos RI, Percival CS. Development of Pulmonary Hypertension During Treatment with Diazoxide: A Case Series and Literature Review. *Pediatr Cardiol.* 2017;38(6):1247-50.
155. Katz MD, Erstad BL. Octreotide, a new somatostatin analogue. *Clin Pharm.* 1989;8(4):255-73.
156. Kapoor RR, Flanagan SE, Arya VB, Shield JP, Ellard S, Hussain K. Clinical and molecular characterisation of 300 patients with congenital hyperinsulinism. *Eur J Endocrinol.* 2013;168(4):557-64.
157. Kapoor RR, Heslegrave A, Hussain K. Congenital hyperinsulinism due to mutations in HNF4A and HADH. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010;11(3):185-91.
158. Flanagan SE, Kapoor RR, Hussain K. Genetics of congenital hyperinsulinemic hypoglycemia. *Semin Pediatr Surg.* 2011;20(1):13-7.
159. Cabezas OR, Flanagan SE, Stanescu H, Garcia-Martinez E, Caswell R, Lango-Allen H, et al. Polycystic Kidney Disease with Hyperinsulinemic Hypoglycemia Caused by a Promoter Mutation in Phosphomannomutase 2. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(8):2529-39.
160. Pinney SE, Ganapathy K, Bradfield J, Stokes D, Sasson A, Mackiewicz K, et al. Dominant form of congenital hyperinsulinism maps to HK1 region on 10q. *Horm Res Paediatr.* 2013;80(1):18-27.
161. Tegtmeier LC, Rust S, van Scherpenzeel M, Ng BG, Losfeld ME, Timal S, et al. Multiple phenotypes in phosphoglucomutase 1 deficiency. *N Engl J Med.* 2014;370(6):533-42.
162. Thomas PM, Cote GJ, Wohllk N, Haddad B, Mathew PM, Rabl W, et al. Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science.* 1995;268(5209):426-9.
163. Thomas P, Ye Y, Lightner E. Mutation of the pancreatic islet inward rectifier Kir6.2 also leads to familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Hum Mol Genet.* 1996;5(11):1809-12.
164. Gutgold A, Gross DJ, Glaser B, Szalat A. Diagnosis of ABCC8 Congenital Hyperinsulinism of Infancy in a 20-Year-Old Man Evaluated for Factitious Hypoglycemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(2):345-9.
165. Lord K, Dzata E, Snider KE, Gallagher PR, De Leon DD. Clinical presentation and management of children with diffuse and focal hyperinsulinism: a review of 223 cases. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(11):E1786-9.
166. Snider KE, Becker S, Boyajian L, Shyng SL, MacMullen C, Hughes N, et al. Genotype and phenotype correlations in 417 children with congenital hyperinsulinism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(2):E355-63.
167. Pinney SE, MacMullen C, Becker S, Lin YW, Hanna C, Thornton P, et al. Clinical characteristics and biochemical mechanisms of congenital hyperinsulinism associated with dominant KATP channel mutations. *J Clin Invest.* 2008;118(8):2877-86.
168. Arya VB, Guemes M, Nessa A, Alam S, Shah P, Gilbert C, et al. Clinical and histological heterogeneity of congenital hyperinsulinism due to paternally inherited heterozygous ABCC8/KCNJ11 mutations. *Eur J Endocrinol.* 2014;171(6):685-95.
169. Rozenkova K, Nessa A, Obermannova B, Elblova L, Dusatkova P, Sumnik Z, et al. Could a combination of heterozygous ABCC8 and KCNJ11 mutations cause congenital hyperinsulinism? *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2017;30(12):1311-5.
170. Allyse M, Minear MA, Berson E, Sridhar S, Rote M, Hung A, et al. Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges. *Int J Womens Health.* 2015;7:113-26.
171. Schrijver I, Cherny SC, Zehnder JL. Testing for maternal cell contamination in prenatal samples: a comprehensive survey of current diagnostic practices in 35 molecular diagnostic laboratories. *J Mol Diagn.* 2007;9(3):394-400.
172. Massalska D, Zimowski JG, Bijok J, Pawelec M, Czubak-Barlik M, Jakiel G, et al. First trimester pregnancy loss: Clinical implications of genetic testing. *J Obstet Gynaecol Res.* 2017;43(1):23-9.
173. Ward BE, Gersen SL, Carelli MP, McGuire NM, Dackowski WR, Weinstein M, et al. Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: clinical experience with 4,500 specimens. *Am J Hum Genet.* 1993;52(5):854-65.
174. Mann K, Petek E, Pertl B. Prenatal Detection of Chromosome Aneuploidy by Quantitative Fluorescence PCR. *Methods Mol Biol.* 2019;1885:139-60.
175. Stojilkovic-Mikic T, Mann K, Docherty Z, Mackie Ogilvie C. Maternal cell contamination of prenatal samples assessed by QF-PCR genotyping. *Prenat Diagn.* 2005;25(1):79-83.

176. Mann K, Kabba M, Donaghue C, Hills A, Ogilvie CM. Analysis of a chromosomally mosaic placenta to assess the cell populations in dissociated chorionic villi: implications for QF-PCR aneuploidy testing. *Prenat Diagn.* 2007;27(3):287-9.
177. Liao C, Yang X, Li FT, Li J, Li DZ. The detection of aneuploidy and maternal contamination by QF-PCR in samples undergoing prenatal diagnosis for thalassemia in Southern China. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009;144(2):149-52.
178. Saura R, Roux D, Taine L, Maugey B, Laulon D, Laplace JP, et al. Early amniocentesis versus chorionic villus sampling for fetal karyotyping. *Lancet.* 1994;344(8925):825-6.
179. Mulcahy MT, Jenkyn J. Maternal cell contamination: a problem in amniocentesis. *Hum Genet.* 1976;34(1):115-6.
180. Benn PA, Hsu LY. Maternal cell contamination of amniotic fluid cell cultures: results of a U.S. nationwide survey. *Am J Med Genet.* 1983;15(2):297-305.
181. Weida J, Patil AS, Schubert FP, Vance G, Drendel H, Reese A, et al. Prevalence of maternal cell contamination in amniotic fluid samples. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017;30(17):2133-7.
182. Nagan N, Faulkner NE, Curtis C, Schrijver I, Committee MCCGWGotAfMPCP. Laboratory guidelines for detection, interpretation, and reporting of maternal cell contamination in prenatal analyses a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn.* 2011;13(1):7-11.
183. Winsor EJ, Silver MP, Theve R, Wright M, Ward BE. Maternal cell contamination in uncultured amniotic fluid. *Prenat Diagn.* 1996;16(1):49-54.
184. Welch RA, Salem-Elgharib S, Wiktor AE, Van Dyke DL, Blessed WB. Operator experience and sample quality in genetic amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194(1):189-91.
185. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(23):11141-56.
186. Lamb AN, Rosenfeld JA, Coppinger J, Dodge ET, Dabell MP, Torchia BS, et al. Defining the impact of maternal cell contamination on the interpretation of prenatal microarray analysis. *Genet Med.* 2012;14(11):914-21.
187. Templeton AR, Clark AG, Weiss KM, Nickerson DA, Boerwinkle E, Sing CF. Recombinational and mutational hotspots within the human lipoprotein lipase gene. *Am J Hum Genet.* 2000;66(1):69-83.
188. Brahmachari SK, Sarkar PS, Raghavan S, Narayan M, Maiti AK. Polypurine/polypyrimidine sequences as cis-acting transcriptional regulators. *Gene.* 1997;190(1):17-26.
189. Denver DR, Morris K, Lynch M, Vassilieva LL, Thomas WK. High direct estimate of the mutation rate in the mitochondrial genome of *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 2000;289(5488):2342-4.
190. Kunkel TA. The mutational specificity of DNA polymerases- α and - γ during in vitro DNA synthesis. *J Biol Chem.* 1985;260(23):12866-74.
191. Tran HT, Keen JD, Krickler M, Resnick MA, Gordenin DA. Hypermutability of homonucleotide runs in mismatch repair and DNA polymerase proofreading yeast mutants. *Mol Cell Biol.* 1997;17(5):2859-65.
192. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010;11(1):31-46.
193. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature.* 2011;475(7356):348-52.
194. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol.* 2008;26(10):1135-45.
195. Balzer S, Malde K, Jonassen I. Systematic exploration of error sources in pyrosequencing flowgram data. *Bioinformatics.* 2011;27(13):i304-9.
196. Huse SM, Huber JA, Morrison HG, Sogin ML, Welch DM. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biol.* 2007;8(7):R143.
197. Seneca S, Vancampenhout K, Van Coster R, Smet J, Lissens W, Vanlander A, et al. Analysis of the whole mitochondrial genome: translation of the Ion Torrent Personal Genome Machine system to the diagnostic bench? *Eur J Hum Genet.* 2015;23(1):41-8.
198. Quince C, Lanzen A, Davenport RJ, Turnbaugh PJ. Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinformatics.* 2011;12:38.
199. Bragg L, Stone G, Imelfort M, Hugenholtz P, Tyson GW. Fast, accurate error-correction of amplicon pyrosequences using Acacia. *Nat Methods.* 2012;9(5):425-6.
200. Wirawan A, Harris RS, Liu Y, Schmidt B, Schroder J. HECTOR: a parallel multistage homopolymer spectrum based error corrector for 454 sequencing data. *BMC Bioinformatics.* 2014;15:131.
201. Gaspar JM, Thomas WK. FlowClus: efficiently filtering and denoising pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinformatics.* 2015;16:105.

202. Mysara M, Leys N, Raes J, Monsieurs P. NoDe: a fast error-correction algorithm for pyrosequencing amplicon reads. *BMC Bioinformatics*. 2015;16:88.
203. Zeng F, Jiang R, Chen T. PyroHMMsnp: an SNP caller for Ion Torrent and 454 sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(13):e136.
204. Feliubadalo L, Lopez-Doriga A, Castellsague E, del Valle J, Menendez M, Tornero E, et al. Next-generation sequencing meets genetic diagnostics: development of a comprehensive workflow for the analysis of BRCA1 and BRCA2 genes. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(8):864-70.
205. Wilson JM, Jungner YG. [Principles and practice of mass screening for disease]. *Bol Oficina Sanit Panam*. 1968;65(4):281-393.
206. De Boeck K, Amaral MD. Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med*. 2016;4(8):662-74.
207. Dodge JA, Lewis PA, Stanton M, Wilsher J. Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947-2003. *Eur Respir J*. 2007;29(3):522-6.
208. Riordan JR. CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem*. 2008;77:701-26.
209. Shamsuddin AK, Quinton PM. Native small airways secrete bicarbonate. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;50(4):796-804.
210. De Boeck K, Zolin A, Cuppens H, Olesen HV, Viviani L. The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2014;13(4):403-9.
211. Amaral MD. Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. *J Intern Med*. 2015;277(2):155-66.
212. Bell SC, De Boeck K, Amaral MD. New pharmacological approaches for cystic fibrosis: promises, progress, pitfalls. *Pharmacol Ther*. 2015;145:19-34.
213. Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, et al. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*. 1990;63(4):827-34.
214. Dork T, Macek M, Jr., Mekus F, Tummeler B, Tzountzouris J, Casals T, et al. Characterization of a novel 21-kb deletion, CFTRdele2,3(21 kb), in the CFTR gene: a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. *Hum Genet*. 2000;106(3):259-68.
215. Hudock KM, Clancy JP. An update on new and emerging therapies for cystic fibrosis. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2017;22(4):331-46.
216. Clancy JP, Cotton CU, Donaldson SH, Solomon GM, VanDevanter DR, Boyle MP, et al. CFTR modulator theratyping: Current status, gaps and future directions. *J Cyst Fibros*. 2019;18(1):22-34.
217. Rock MJ, Hoffman G, Laessig RH, Kopish GJ, Litsheim TJ, Farrell PM. Newborn screening for cystic fibrosis in Wisconsin: nine-year experience with routine trypsinogen/DNA testing. *J Pediatr*. 2005;147(3 Suppl):S73-7.
218. Sommerburg O, Hammermann J, Lindner M, Stahl M, Muckenthaler M, Kohlmüller D, et al. Five years of experience with biochemical cystic fibrosis newborn screening based on IRT/PAP in Germany. *Pediatr Pulmonol*. 2015;50(7):655-64.
219. Smith DW, Lemli L, Opitz JM. A Newly Recognized Syndrome of Multiple Congenital Anomalies. *J Pediatr*. 1964;64:210-7.
220. Irons M, Elias ER, Salen G, Tint GS, Batta AK. Defective cholesterol biosynthesis in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Lancet*. 1993;341(8857):1414.
221. Irons M, Elias ER, Tint GS, Salen G, Frieden R, Buie TM, et al. Abnormal cholesterol metabolism in the Smith-Lemli-Opitz syndrome: report of clinical and biochemical findings in four patients and treatment in one patient. *Am J Med Genet*. 1994;50(4):347-52.
222. Honda A, Tint GS, Salen G, Batta AK, Chen TS, Shefer S. Defective conversion of 7-dehydrocholesterol to cholesterol in cultured skin fibroblasts from Smith-Lemli-Opitz syndrome homozygotes. *J Lipid Res*. 1995;36(7):1595-601.
223. Fitzky BU, Witsch-Baumgartner M, Erdel M, Lee JN, Paik YK, Glossmann H, et al. Mutations in the Delta7-sterol reductase gene in patients with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(14):8181-6.
224. Moebius FF, Fitzky BU, Lee JN, Paik YK, Glossmann H. Molecular cloning and expression of the human delta7-sterol reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(4):1899-902.
225. Wassif CA, Maslen C, Kachilele-Linjewile S, Lin D, Linck LM, Connor WE, et al. Mutations in the human sterol delta7-reductase gene at 11q12-13 cause Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Hum Genet*. 1998;63(1):55-62.

226. Waterham HR, Wijburg FA, Hennekam RC, Vreken P, Poll-The BT, Dorland L, et al. Smith-Lemli-Opitz syndrome is caused by mutations in the 7-dehydrocholesterol reductase gene. *Am J Hum Genet.* 1998;63(2):329-38.
227. Waterham HR, Wanders RJ. Biochemical and genetic aspects of 7-dehydrocholesterol reductase and Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1529(1-3):340-56.
228. Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol.* 2001;12(2):105-12.
229. Porter FD. Smith-Lemli-Opitz syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. *Eur J Hum Genet.* 2008;16(5):535-41.
230. Keller RK, Arnold TP, Fliesler SJ. Formation of 7-dehydrocholesterol-containing membrane rafts in vitro and in vivo, with relevance to the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Lipid Res.* 2004;45(2):347-55.
231. Ren G, Jacob RF, Kaulin Y, Dimuzio P, Xie Y, Mason RP, et al. Alterations in membrane caveolae and BKCa channel activity in skin fibroblasts in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Mol Genet Metab.* 2011;104(3):346-55.
232. Wassif CA, Vied D, Tsokos M, Connor WE, Steiner RD, Porter FD. Cholesterol storage defect in RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome fibroblasts. *Mol Genet Metab.* 2002;75(4):325-34.
233. Fitzky BU, Moebius FF, Asaoka H, Waage-Baudet H, Xu L, Xu G, et al. 7-Dehydrocholesterol-dependent proteolysis of HMG-CoA reductase suppresses sterol biosynthesis in a mouse model of Smith-Lemli-Opitz/RSH syndrome. *J Clin Invest.* 2001;108(6):905-15.
234. Xu L, Davis TA, Porter NA. Rate constants for peroxidation of polyunsaturated fatty acids and sterols in solution and in liposomes. *J Am Chem Soc.* 2009;131(36):13037-44.
235. Xu L, Korade Z, Porter NA. Oxysterols from free radical chain oxidation of 7-dehydrocholesterol: product and mechanistic studies. *J Am Chem Soc.* 2010;132(7):2222-32.
236. Korade Z, Xu L, Shelton R, Porter NA. Biological activities of 7-dehydrocholesterol-derived oxysterols: implications for Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Lipid Res.* 2010;51(11):3259-69.
237. Nowaczyk MJ, Irons MB. Smith-Lemli-Opitz syndrome: phenotype, natural history, and epidemiology. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2012;160C(4):250-62.
238. Battaile KP, Maslen CL, Wassif CA, Krakowiak P, Porter FD, Steiner RD. A simple PCR-based assay allows detection of a common mutation, IVS8-1G-->C, in DHCR7 in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Genet Test.* 1999;3(4):361-3.
239. Cross JL, Iben J, Simpson CL, Thurm A, Swedo S, Tierney E, et al. Determination of the allelic frequency in Smith-Lemli-Opitz syndrome by analysis of massively parallel sequencing data sets. *Clin Genet.* 2015;87(6):570-5.
240. Jezela-Stanek A, Ciara E, Malunowicz E, Chrzanowska K, Latos-Bielenska A, Krajewska-Walasek M, et al. Differences between predicted and established diagnoses of Smith-Lemli-Opitz syndrome in the Polish population: underdiagnosis or loss of affected fetuses? *J Inherit Metab Dis.* 2010;33 Suppl 3:S241-8.
241. Nowaczyk MJ, Waye JS, Douketis JD. DHCR7 mutation carrier rates and prevalence of the RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome: where are the patients? *Am J Med Genet A.* 2006;140(19):2057-62.
242. Jira PE, Waterham HR, Wanders RJ, Smeitink JA, Sengers RC, Wevers RA. Smith-Lemli-Opitz syndrome and the DHCR7 gene. *Ann Hum Genet.* 2003;67(Pt 3):269-80.
243. Bialer MG, Penchaszadeh VB, Kahn E, Libes R, Krigsman G, Lesser ML. Female external genitalia and mullerian duct derivatives in a 46,XY infant with the smith-lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet.* 1987;28(3):723-31.
244. Kelley RI, Hennekam RC. The Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Genet.* 2000;37(5):321-35.
245. Bukelis I, Porter FD, Zimmerman AW, Tierney E. Smith-Lemli-Opitz syndrome and autism spectrum disorder. *Am J Psychiatry.* 2007;164(11):1655-61.
246. Zarowski M, Vendrame M, Irons M, Kothare SV. Prevalence of sleep problems in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet A.* 2011;155A(7):1558-62.
247. Honda A, Batta AK, Salen G, Tint GS, Chen TS, Shefer S. Screening for abnormal cholesterol biosynthesis in the Smith-Lemli-Opitz syndrome: rapid determination of plasma 7-dehydrocholesterol by ultraviolet spectrometry. *Am J Med Genet.* 1997;68(3):288-93.
248. Amaral C, Gallardo E, Rodrigues R, Pinto Leite R, Quelhas D, Tomaz C, et al. Quantitative analysis of five sterols in amniotic fluid by GC-MS: application to the diagnosis of cholesterol biosynthesis defects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010;878(23):2130-6.

249. Witsch-Baumgartner M, Ciara E, Löffler J, Menzel HJ, Seedorf U, Burn J, et al. Frequency gradients of DHCR7 mutations in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome in Europe: evidence for different origins of common mutations. *Eur J Hum Genet.* 2001;9(1):45-50.
250. Rossiter JP, Hofman KJ, Kelley RI. Smith-Lemli-Opitz syndrome: prenatal diagnosis by quantification of cholesterol precursors in amniotic fluid. *Am J Med Genet.* 1995;56(3):272-5.
251. Steiner RD, Linck LM, Flavell DP, Lin DS, Connor WE. Sterol balance in the Smith-Lemli-Opitz syndrome. Reduction in whole body cholesterol synthesis and normal bile acid production. *J Lipid Res.* 2000;41(9):1437-47.
252. Svoboda MD, Christie JM, Eroglu Y, Freeman KA, Steiner RD. Treatment of Smith-Lemli-Opitz syndrome and other sterol disorders. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2012;160C(4):285-94.
253. Tierney E, Conley SK, Goodwin H, Porter FD. Analysis of short-term behavioral effects of dietary cholesterol supplementation in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet A.* 2010;152A(1):91-5.
254. Sikora DM, Ruggiero M, Petit-Kekel K, Merckens LS, Connor WE, Steiner RD. Cholesterol supplementation does not improve developmental progress in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Pediatr.* 2004;144(6):783-91.
255. Korade Z, Xu L, Harrison FE, Ahsen R, Hart SE, Folkes OM, et al. Antioxidant supplementation ameliorates molecular deficits in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Biol Psychiatry.* 2014;75(3):215-22.
256. Kelley RI. Diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome by gas chromatography/mass spectrometry of 7-dehydrocholesterol in plasma, amniotic fluid and cultured skin fibroblasts. *Clin Chim Acta.* 1995;236(1):45-58.
257. Liu W, Xu L, Lamberson C, Haas D, Korade Z, Porter NA. A highly sensitive method for analysis of 7-dehydrocholesterol for the study of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Lipid Res.* 2014;55(2):329-37.
258. Korade Z, Liu W, Warren EB, Armstrong K, Porter NA, Konradi C. Effect of psychotropic drug treatment on sterol metabolism. *Schizophr Res.* 2017;187:74-81.
259. Hall P, Michels V, Gavrilov D, Matern D, Oglesbee D, Raymond K, et al. Aripiprazole and trazodone cause elevations of 7-dehydrocholesterol in the absence of Smith-Lemli-Opitz Syndrome. *Mol Genet Metab.* 2013;110(1-2):176-8.
260. Devlin LA, Sayer JA. Renal ciliopathies. *Curr Opin Genet Dev.* 2019;56:49-60.
261. Srivastava S, Molinari E, Raman S, Sayer JA. Many Genes-One Disease? Genetics of Nephronophthisis (NPHP) and NPHP-Associated Disorders. *Front Pediatr.* 2017;5:287.
262. Mochizuki T, Makabe S, Aoyama Y, Kataoka H, Nitta K. New Insights into Cystic Kidney Diseases. *Contrib Nephrol.* 2018;195:31-41.
263. Bergmann C, Guay-Woodford LM, Harris PC, Horie S, Peters DJM, Torres VE. Polycystic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2018;4(1):50.
264. Bergmann C. Genetics of Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease and Its Differential Diagnoses. *Front Pediatr.* 2017;5:221.
265. Dalgaard OZ. Bilateral polycystic disease of the kidneys; a follow-up of two hundred and eighty-four patients and their families. *Acta Med Scand Suppl.* 1957;328:1-255.
266. Iglesias CG, Torres VE, Offord KP, Holley KE, Beard CM, Kurland LT. Epidemiology of adult polycystic kidney disease, Olmsted County, Minnesota: 1935-1980. *Am J Kidney Dis.* 1983;2(6):630-9.
267. Mochizuki T, Tsuchiya K, Nitta K. Autosomal dominant polycystic kidney disease: recent advances in pathogenesis and potential therapies. *Clin Exp Nephrol.* 2013;17(3):317-26.
268. Lu H, Galeano MCR, Ott E, Kaeslin G, Kausalya PJ, Kramer C, et al. Mutations in DZIP1L, which encodes a ciliary-transition-zone protein, cause autosomal recessive polycystic kidney disease. *Nat Genet.* 2017;49(7):1025-34.
269. Onuchic LF, Furu L, Nagasawa Y, Hou X, Eggermann T, Ren Z, et al. PKHD1, the polycystic kidney and hepatic disease 1 gene, encodes a novel large protein containing multiple immunoglobulin-like plexin-transcription-factor domains and parallel beta-helix 1 repeats. *Am J Hum Genet.* 2002;70(5):1305-17.
270. Folliot JA, Li L, Vucica Y, Pazour GJ. The cytoplasmic tail of fibrocystin contains a ciliary targeting sequence. *J Cell Biol.* 2010;188(1):21-8.
271. Hiesberger T, Gourley E, Erickson A, Koulen P, Ward CJ, Masyuk TV, et al. Proteolytic cleavage and nuclear translocation of fibrocystin is regulated by intracellular Ca²⁺ and activation of protein kinase C. *J Biol Chem.* 2006;281(45):34357-64.
272. Alzarka B, Morizono H, Bollman JW, Kim D, Guay-Woodford LM. Design and Implementation of the Hepatorenal Fibrocystic Disease Core Center Clinical Database: A Centralized Resource for

Characterizing Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease and Other Hepatorenal Fibrocystic Diseases. *Front Pediatr.* 2017;5:80.

273. Kaariainen H. Polycystic kidney disease in children: a genetic and epidemiological study of 82 Finnish patients. *J Med Genet.* 1987;24(8):474-81.

274. Guay-Woodford LM, Desmond RA. Autosomal recessive polycystic kidney disease: the clinical experience in North America. *Pediatrics.* 2003;111(5 Pt 1):1072-80.

275. Bergmann C, Senderek J, Schneider F, Dornia C, Kupper F, Eggermann T, et al. PKHD1 mutations in families requesting prenatal diagnosis for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Hum Mutat.* 2004;23(5):487-95.

276. Gimpel C, Avni FE, Bergmann C, Cetiner M, Habbig S, Haffner D, et al. Perinatal Diagnosis, Management, and Follow-up of Cystic Renal Diseases: A Clinical Practice Recommendation With Systematic Literature Reviews. *JAMA Pediatr.* 2018;172(1):74-86.

277. Bergmann C, Senderek J, Windelen E, Kupper F, Middeldorf I, Schneider F, et al. Clinical consequences of PKHD1 mutations in 164 patients with autosomal-recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Kidney Int.* 2005;67(3):829-48.

278. Bergmann C, Senderek J, Sedlacek B, Pegiazoglou I, Puglia P, Eggermann T, et al. Spectrum of mutations in the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD/PKHD1). *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(1):76-89.

279. Groopman EE, Marasa M, Cameron-Christie S, Petrovski S, Aggarwal VS, Milo-Rasouly H, et al. Diagnostic Utility of Exome Sequencing for Kidney Disease. *N Engl J Med.* 2019;380(2):142-51.

280. Trujillano D, Bullich G, Ossowski S, Ballarin J, Torra R, Estivill X, et al. Diagnosis of autosomal dominant polycystic kidney disease using efficient PKD1 and PKD2 targeted next-generation sequencing. *Mol Genet Genomic Med.* 2014;2(5):412-21.

281. Eisenberger T, Decker C, Hiersche M, Hamann RC, Decker E, Neuber S, et al. An efficient and comprehensive strategy for genetic diagnostics of polycystic kidney disease. *PLoS One.* 2015;10(2):e0116680.

282. Mallawaarachchi AC, Hort Y, Cowley MJ, McCabe MJ, Minoche A, Dinger ME, et al. Whole-genome sequencing overcomes pseudogene homology to diagnose autosomal dominant polycystic kidney disease. *Eur J Hum Genet.* 2016;24(11):1584-90.

283. Bergmann C. ARPKD and early manifestations of ADPKD: the original polycystic kidney disease and phenocopies. *Pediatr Nephrol.* 2015;30(1):15-30.

284. Krall P, Pineda C, Ruiz P, Ejarque L, Vendrell T, Camacho JA, et al. Cost-effective PKHD1 genetic testing for autosomal recessive polycystic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2014;29(2):223-34.

285. Bergmann C, Frank V, Kupper F, Schmidt C, Senderek J, Zerres K. Functional analysis of PKHD1 splicing in autosomal recessive polycystic kidney disease. *J Hum Genet.* 2006;51(9):788-93.

286. Bergmann C, Senderek J, Kupper F, Schneider F, Dornia C, Windelen E, et al. PKHD1 mutations in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Hum Mutat.* 2004;23(5):453-63.

287. Liu L, Li K, Fu X, Chung C, Zhang K. A Forward Look At Noninvasive Prenatal Testing. *Trends Mol Med.* 2016;22(11):958-68.

288. Luo F, Tao YH. Nephronophthisis: A review of genotype-phenotype correlation. *Nephrology (Carlton).* 2018;23(10):904-11.

289. Gee HY, Otto EA, Hurd TW, Ashraf S, Chaki M, Cluckey A, et al. Whole-exome resequencing distinguishes cystic kidney diseases from phenocopies in renal ciliopathies. *Kidney Int.* 2014;85(4):880-7.

290. Ulinski T, Lescure S, Beaufils S, Guigonis V, Decramer S, Morin D, et al. Renal phenotypes related to hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) mutations in a pediatric cohort. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(2):497-503.

291. Szabo T, Orosz P, Balogh E, Javorszky E, Mattyus I, Bereczki C, et al. Comprehensive genetic testing in children with a clinical diagnosis of ARPKD identifies phenocopies. *Pediatr Nephrol.* 2018;33(10):1713-21.

292. Brownstein AJ, Kostiuik V, Ziganshin BA, Zafar MA, Kuivaniemi H, Body SC, et al. Genes Associated with Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection: 2018 Update and Clinical Implications. *Aorta (Stamford).* 2018;6(1):13-20.

293. Pape LA, Awais M, Woznicki EM, Suzuki T, Trimarchi S, Evangelista A, et al. Presentation, Diagnosis, and Outcomes of Acute Aortic Dissection: 17-Year Trends From the International Registry of Acute Aortic Dissection. *J Am Coll Cardiol.* 2015;66(4):350-8.

294. Demo E, Rigelsky C, Rideout AL, Graf M, Pariani M, Regalado E, et al. Genetics and Precision Medicine: Heritable Thoracic Aortic Disease. *Med Clin North Am.* 2019;103(6):1005-19.
295. Rybczynski M, Mir TS, Sheikhzadeh S, Bernhardt AM, Schad C, Treede H, et al. Frequency and age-related course of mitral valve dysfunction in the Marfan syndrome. *Am J Cardiol.* 2010;106(7):1048-53.
296. Loeys BL, Dietz HC, Braverman AC, Callewaert BL, De Backer J, Devereux RB, et al. The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *J Med Genet.* 2010;47(7):476-85.
297. Nielsen C, Ratiu I, Esfandiarei M, Chen A, Selamet Tierney ES. A Review of Psychosocial Factors of Marfan Syndrome: Adolescents, Adults, Families, and Providers. *J Pediatr Genet.* 2019;8(3):109-22.
298. Faivre L, Collod-Beroud G, Loeys BL, Child A, Binquet C, Gautier E, et al. Effect of mutation type and location on clinical outcome in 1,013 probands with Marfan syndrome or related phenotypes and FBN1 mutations: an international study. *Am J Hum Genet.* 2007;81(3):454-66.
299. Wagner AH, Zaradzki M, Arif R, Remes A, Muller OJ, Kallenbach K. Marfan syndrome: A therapeutic challenge for long-term care. *Biochem Pharmacol.* 2019;164:53-63.
300. Salik I, Rawla P. Marfan Syndrome. *StatPearls.* Treasure Island (FL)2019.
301. Drolsum L, Rand-Hendriksen S, Paus B, Geiran OR, Semb SO. Ocular findings in 87 adults with Ghent-1 verified Marfan syndrome. *Acta Ophthalmol.* 2015;93(1):46-53.
302. Stark VC, Huemmer M, Olfe J, Mueller GC, Kozlik-Feldmann R, Mir TS. The Pulmonary Artery in Pediatric Patients with Marfan Syndrome: An Underestimated Aspect of the Disease. *Pediatr Cardiol.* 2018;39(6):1194-9.
303. Pyeritz RE. Marfan syndrome: improved clinical history results in expanded natural history. *Genet Med.* 2019;21(8):1683-90.
304. Child AH. Non-cardiac manifestations of Marfan syndrome. *Ann Cardiothorac Surg.* 2017;6(6):599-609.
305. Takeda N, Komuro I. Genetic basis of hereditary thoracic aortic aneurysms and dissections. *J Cardiol.* 2019;74(2):136-43.
306. Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T, et al. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet.* 2005;37(3):275-81.
307. MacCarrick G, Black JH, 3rd, Bowdin S, El-Hamamsy I, Frischmeyer-Guerrerio PA, Guerrerio AL, et al. Loeys-Dietz syndrome: a primer for diagnosis and management. *Genet Med.* 2014;16(8):576-87.
308. Meester JAN, Verstraeten A, Schepers D, Alaerts M, Van Laer L, Loeys BL. Differences in manifestations of Marfan syndrome, Ehlers-Danlos syndrome, and Loeys-Dietz syndrome. *Ann Cardiothorac Surg.* 2017;6(6):582-94.
309. Germain DP. Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Orphanet J Rare Dis.* 2007;2:32.
310. Verstraeten A, Alaerts M, Van Laer L, Loeys B. Marfan Syndrome and Related Disorders: 25 Years of Gene Discovery. *Hum Mutat.* 2016;37(6):524-31.
311. Takeda N, Yagi H, Hara H, Fujiwara T, Fujita D, Nawata K, et al. Pathophysiology and Management of Cardiovascular Manifestations in Marfan and Loeys-Dietz Syndromes. *Int Heart J.* 2016;57(3):271-7.
312. Benke K, Agg B, Szilveszter B, Tarr F, Nagy ZB, Polos M, et al. The role of transforming growth factor-beta in Marfan syndrome. *Cardiol J.* 2013;20(3):227-34.
313. Guo G, Gehle P, Doelken S, Martin-Ventura JL, von Kodolitsch Y, Hetzer R, et al. Induction of macrophage chemotaxis by aortic extracts from patients with Marfan syndrome is related to elastin binding protein. *PLoS One.* 2011;6(5):e20138.
314. Chung AW, Au Yeung K, Sandor GG, Judge DP, Dietz HC, van Breemen C. Loss of elastic fiber integrity and reduction of vascular smooth muscle contraction resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome. *Circ Res.* 2007;101(5):512-22.
315. Hayashi A, Ryu A, Suzuki T, Kawada A, Tajima S. In vitro degradation of tropoelastin by reactive oxygen species. *Arch Dermatol Res.* 1998;290(9):497-500.
316. Dietz H. Marfan Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al., editors. *GeneReviews((R))*. Seattle (WA)1993.
317. Arnaud P, Hanna N, Aubart M, Leheup B, Dupuis-Girod S, Naudion S, et al. Homozygous and compound heterozygous mutations in the FBN1 gene: unexpected findings in molecular diagnosis of Marfan syndrome. *J Med Genet.* 2017;54(2):100-3.

318. De Backer J, Campens L, Muino Mosquera L. Looking for the Missing Links: Challenges in the Search for Genotype-Phenotype Correlation in Marfan Syndrome. *Circ Genom Precis Med*. 2018;11(6):e002185.
319. Sakai LY, Keene DR, Renard M, De Backer J. FBN1: The disease-causing gene for Marfan syndrome and other genetic disorders. *Gene*. 2016;591(1):279-91.
320. Frischmeyer PA, Dietz HC. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet*. 1999;8(10):1893-900.
321. Byers PH. Determination of the molecular basis of Marfan syndrome: a growth industry. *J Clin Invest*. 2004;114(2):161-3.
322. Donnelly RT, Pinto NM, Kocolas I, Yetman AT. The immediate and long-term impact of pregnancy on aortic growth rate and mortality in women with Marfan syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(3):224-9.
323. Pacini L, Digne F, Boumendil A, Muti C, Detaint D, Boileau C, et al. Maternal complication of pregnancy in Marfan syndrome. *Int J Cardiol*. 2009;136(2):156-61.
324. Roman MJ, Pugh NL, Hendershot TP, Devereux RB, Dietz H, Holmes K, et al. Aortic Complications Associated With Pregnancy in Marfan Syndrome: The NHLBI National Registry of Genetically Triggered Thoracic Aortic Aneurysms and Cardiovascular Conditions (GenTAC). *J Am Heart Assoc*. 2016;5(8).
325. Benke K, Agg B, Meienberg J, Kopps AM, Fattorini N, Stengl R, et al. Hungarian Marfan family with large FBN1 deletion calls attention to copy number variation detection in the current NGS era. *J Thorac Dis*. 2018;10(4):2456-60.
326. Kalia SS, Adelman K, Bale SJ, Chung WK, Eng C, Evans JP, et al. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med*. 2017;19(2):249-55.
327. Balogh I, Poka R, Losonczy G, Muszbek L. High frequency of factor V Leiden mutation and prothrombin 20210A variant in Romanies of Eastern Hungary. *Thromb Haemost*. 1999;82(5):1555-6.
328. Balogh I, Poka R, Pfliegler G, Dekany M, Boda Z, Muszbek L. High prevalence of factor V Leiden mutation and 20210A prothrombin variant in Hungary. *Thromb Haemost*. 1999;81(4):660-1.
329. Balogh I, Szoke G, Karpati L, Wartiovaara U, Katona E, Komaromi I, et al. Val34Leu polymorphism of plasma factor XIII: biochemistry and epidemiology in familial thrombophilia. *Blood*. 2000;96(7):2479-86.
330. Wartiovaara U, Mikkola H, Szoke G, Haramura G, Karpati L, Balogh I, et al. Effect of Val34Leu polymorphism on the activation of the coagulation factor XIII-A. *Thromb Haemost*. 2000;84(4):595-600.
331. Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol*. 1993;13(8):4976-85.
332. Nakano T, Higashino K, Kikuchi N, Kishino J, Nomura K, Fujita H, et al. Vascular smooth muscle cell-derived, Gla-containing growth-potentiating factor for Ca(2+)-mobilizing growth factors. *J Biol Chem*. 1995;270(11):5702-5.
333. Avanzi GC, Gallicchio M, Cavalloni G, Gammaitoni L, Leone F, Rosina A, et al. GAS6, the ligand of Axl and Rse receptors, is expressed in hematopoietic tissue but lacks mitogenic activity. *Exp Hematol*. 1997;25(12):1219-26.
334. Bellosta P, Costa M, Lin DA, Basilico C. The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding. *Mol Cell Biol*. 1995;15(2):614-25.
335. Fridell YW, Villa J, Jr., Attar EC, Liu ET. GAS6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1998;273(12):7123-6.
336. Allen MP, Linseman DA, Udo H, Xu M, Schaack JB, Varnum B, et al. Novel mechanism for gonadotropin-releasing hormone neuronal migration involving Gas6/Ark signaling to p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol*. 2002;22(2):599-613.
337. McCloskey P, Fridell YW, Attar E, Villa J, Jin Y, Varnum B, et al. GAS6 mediates adhesion of cells expressing the receptor tyrosine kinase Axl. *J Biol Chem*. 1997;272(37):23285-91.
338. Goruppi S, Ruaro E, Schneider C. Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene*. 1996;12(3):471-80.
339. Fridell YW, Jin Y, Quilliam LA, Burchert A, McCloskey P, Spizz G, et al. Differential activation of the Ras/extracellular-signal-regulated protein kinase pathway is responsible for the biological consequences induced by the Axl receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*. 1996;16(1):135-45.

340. Goruppi S, Ruaro E, Varnum B, Schneider C. Gas6-mediated survival in NIH3T3 cells activates stress signalling cascade and is independent of Ras. *Oncogene*. 1999;18(29):4224-36.
341. Li R, Chen J, Hammonds G, Phillips H, Armanini M, Wood P, et al. Identification of Gas6 as a growth factor for human Schwann cells. *J Neurosci*. 1996;16(6):2012-9.
342. Bellosta P, Zhang Q, Goff SP, Basilico C. Signaling through the ARK tyrosine kinase receptor protects from apoptosis in the absence of growth stimulation. *Oncogene*. 1997;15(20):2387-97.
343. Geng K, Kumar S, Kimani SG, Kholodovych V, Kasikara C, Mizuno K, et al. Requirement of Gamma-Carboxyglutamic Acid Modification and Phosphatidylserine Binding for the Activation of Tyro3, Axl, and Mer Receptors by Growth Arrest-Specific 6. *Front Immunol*. 2017;8:1521.
344. Davra V, Kimani SG, Calianese D, Birge RB. Ligand Activation of TAM Family Receptors-Implications for Tumor Biology and Therapeutic Response. *Cancers (Basel)*. 2016;8(12).
345. Graham DK, DeRyckere D, Davies KD, Earp HS. The TAM family: phosphatidylserine sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(12):769-85.
346. Wu G, Ma Z, Hu W, Wang D, Gong B, Fan C, et al. Molecular insights of Gas6/TAM in cancer development and therapy. *Cell Death Dis*. 2017;8(3):e2700.
347. Nagata K, Ohashi K, Nakano T, Arita H, Zong C, Hanafusa H, et al. Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 1996;271(47):30022-7.
348. Varnum BC, Young C, Elliott G, Garcia A, Bartley TD, Fridell YW, et al. Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6. *Nature*. 1995;373(6515):623-6.
349. Kariolis MS, Miao YR, Jones DS, 2nd, Kapur S, Mathews, II, Giaccia AJ, et al. An engineered Axl 'decoy receptor' effectively silences the Gas6-Axl signaling axis. *Nat Chem Biol*. 2014;10(11):977-83.
350. Tsou WI, Nguyen KQ, Calarese DA, Garforth SJ, Antes AL, Smirnov SV, et al. Receptor tyrosine kinases, TYRO3, AXL, and MER, demonstrate distinct patterns and complex regulation of ligand-induced activation. *J Biol Chem*. 2014;289(37):25750-63.
351. Zagorska A, Traves PG, Lew ED, Dransfield I, Lemke G. Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function. *Nat Immunol*. 2014;15(10):920-8.
352. Kasikara C, Kumar S, Kimani S, Tsou WI, Geng K, Davra V, et al. Phosphatidylserine Sensing by TAM Receptors Regulates AKT-Dependent Chemoresistance and PD-L1 Expression. *Mol Cancer Res*. 2017;15(6):753-64.
353. Lu Q, Gore M, Zhang Q, Camenisch T, Boast S, Casagrande F, et al. Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature*. 1999;398(6729):723-8.
354. Lu Q, Lemke G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science*. 2001;293(5528):306-11.
355. Burstyn-Cohen T, Lew ED, Traves PG, Burrola PG, Hash JC, Lemke G. Genetic dissection of TAM receptor-ligand interaction in retinal pigment epithelial cell phagocytosis. *Neuron*. 2012;76(6):1123-32.
356. Ekman C, Stenhoff J, Dahlback B. Gas6 is complexed to the soluble tyrosine kinase receptor Axl in human blood. *J Thromb Haemost*. 2010;8(4):838-44.
357. Fourcot A, Couchie D, Chobert MN, Zafrani ES, Mavier P, Laperche Y, et al. Gas6 deficiency prevents liver inflammation, steatohepatitis, and fibrosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;300(6):G1043-53.
358. Akitake-Kawano R, Seno H, Nakatsuji M, Kimura Y, Nakanishi Y, Yoshioka T, et al. Inhibitory role of Gas6 in intestinal tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 2013;34(7):1567-74.
359. O'Donnell K, Harkes IC, Dougherty L, Wicks IP. Expression of receptor tyrosine kinase Axl and its ligand Gas6 in rheumatoid arthritis: evidence for a novel endothelial cell survival pathway. *Am J Pathol*. 1999;154(4):1171-80.
360. Yanagita M, Ishimoto Y, Arai H, Nagai K, Ito T, Nakano T, et al. Essential role of Gas6 for glomerular injury in nephrotoxic nephritis. *J Clin Invest*. 2002;110(2):239-46.
361. Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM, Horwitz KB. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2002;277(7):5209-18.
362. Hung YJ, Lee CH, Chu NF, Shieh YS. Plasma protein growth arrest-specific 6 levels are associated with altered glucose tolerance, inflammation, and endothelial dysfunction. *Diabetes Care*. 2010;33(8):1840-4.

363. Lee CH, Chu NF, Shieh YS, Hung YJ. The growth arrest-specific 6 (Gas6) gene polymorphism c.834+7G>A is associated with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012;95(2):201-6.
364. Hsiao FC, Lin YF, Hsieh PS, Chu NF, Shieh YS, Hsieh CH, et al. Circulating growth arrest-specific 6 protein is associated with adiposity, systemic inflammation, and insulin resistance among overweight and obese adolescents. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(2):E267-74.
365. Rothlin CV, Carrera-Silva EA, Bosurgi L, Ghosh S. TAM receptor signaling in immune homeostasis. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:355-91.
366. Lemke G. Biology of the TAM receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(11):a009076.
367. Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK. TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res.* 2008;100:35-83.
368. Rankin EB, Fuh KC, Taylor TE, Krieg AJ, Musser M, Yuan J, et al. AXL is an essential factor and therapeutic target for metastatic ovarian cancer. *Cancer Res.* 2010;70(19):7570-9.
369. Vajkoczy P, Knyazev P, Kunkel A, Capelle HH, Behrndt S, von Tengg-Kobligk H, et al. Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(15):5799-804.
370. Gjerdrum C, Tiron C, Hoiby T, Stefansson I, Haugen H, Sandal T, et al. Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(3):1124-9.
371. Blostein MD, Rajotte I, Rao DP, Holcroft CA, Kahn SR. Elevated plasma gas6 levels are associated with venous thromboembolic disease. *J Thromb Thrombolysis.* 2011;32(3):272-8.
372. Li W, Wang J, Ge L, Shan J, Zhang C, Liu J. Growth arrest-specific protein 6 (Gas6) as a noninvasive biomarker for early detection of diabetic nephropathy. *Clin Exp Hypertens.* 2017;39(4):382-7.
373. Eroglu M, Ozakpinar OB, Turkgeldi L, Sahin S, Herkiloglu D, Durukan B, et al. Plasma levels of growth arrest specific protein 6 are increased in idiopathic recurrent pregnancy loss. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(10):1554-8.
374. Ekman C, Linder A, Akesson P, Dahlback B. Plasma concentrations of Gas6 (growth arrest specific protein 6) and its soluble tyrosine kinase receptor sAxl in sepsis and systemic inflammatory response syndromes. *Crit Care.* 2010;14(4):R158.
375. Ekman C, Jonsen A, Sturfelt G, Bengtsson AA, Dahlback B. Plasma concentrations of Gas6 and sAxl correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* 2011;50(6):1064-9.
376. Recarte-Pelz P, Tassies D, Espinosa G, Hurtado B, Sala N, Cervera R, et al. Vitamin K-dependent proteins GAS6 and Protein S and TAM receptors in patients of systemic lupus erythematosus: correlation with common genetic variants and disease activity. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(2):R41.
377. Law LA, Graham DK, Di Paola J, Branchford BR. GAS6/TAM Pathway Signaling in Hemostasis and Thrombosis. *Front Med (Lausanne).* 2018;5:137.
378. Angelillo-Scherrer A, de Frutos P, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, et al. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat Med.* 2001;7(2):215-21.
379. Cosemans JM, Van Kruchten R, Olieslagers S, Schurgers LJ, Verheyen FK, Munnix IC, et al. Potentiating role of Gas6 and Tyro3, Axl and Mer (TAM) receptors in human and murine platelet activation and thrombus stabilization. *J Thromb Haemost.* 2010;8(8):1797-808.
380. Branchford BR, Stalker TJ, Law L, Acevedo G, Sather S, Brzezinski C, et al. The small-molecule MERTK inhibitor UNC2025 decreases platelet activation and prevents thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2018;16(2):352-63.
381. Jager RD, Mieler WF, Miller JW. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2008;358(24):2606-17.
382. SanGiovanni JP, Chew EY, Clemons TE, Davis MD, Ferris FL, 3rd, Gensler GR, et al. The relationship of dietary lipid intake and age-related macular degeneration in a case-control study: AREDS Report No. 20. *Arch Ophthalmol.* 2007;125(5):671-9.
383. Seddon JM, Ajani UA, Sperduto RD, Hiller R, Blair N, Burton TC, et al. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group. *JAMA.* 1994;272(18):1413-20.
384. Ferris FL, 3rd, Wilkinson CP, Bird A, Chakravarthy U, Chew E, Csaky K, et al. Clinical classification of age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2013;120(4):844-51.

385. Klein BE, Klein R, Lee KE. Incidence of age-related cataract over a 10-year interval: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*. 2002;109(11):2052-7.
386. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CM, Klein R, Cheng CY, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2014;2(2):e106-16.
387. Rosenfeld PJ. Bevacizumab versus ranibizumab for AMD. *N Engl J Med*. 2011;364(20):1966-7.
388. Toomey CB, Johnson LV, Bowes Rickman C. Complement factor H in AMD: Bridging genetic associations and pathobiology. *Prog Retin Eye Res*. 2018;62:38-57.
389. Grassmann F, Fauser S, Weber BH. The genetics of age-related macular degeneration (AMD)--Novel targets for designing treatment options? *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;95(Pt B):194-202.
390. Edwards AO, Ritter R, 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308(5720):421-4.
391. Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P, et al. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308(5720):419-21.
392. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308(5720):385-9.
393. Klein R, Myers CE, Meuer SM, Gangnon RE, Sivakumaran TA, Iyengar SK, et al. Risk alleles in CFH and ARMS2 and the long-term natural history of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *JAMA Ophthalmol*. 2013;131(3):383-92.
394. Fearon DT. Regulation by membrane sialic acid of beta1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(4):1971-5.
395. Mold C, Kingzette M, Gewurz H. C-reactive protein inhibits pneumococcal activation of the alternative pathway by increasing the interaction between factor H and C3b. *J Immunol*. 1984;133(2):882-5.
396. Triebwasser MP, Roberson ED, Yu Y, Schramm EC, Wagner EK, Raychaudhuri S, et al. Rare Variants in the Functional Domains of Complement Factor H Are Associated With Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(11):6873-8.
397. Whitmore SS, Sohn EH, Chirco KR, Drack AV, Stone EM, Tucker BA, et al. Complement activation and choriocapillaris loss in early AMD: implications for pathophysiology and therapy. *Prog Retin Eye Res*. 2015;45:1-29.
398. Fernandez-Godino R, Garland DL, Pierce EA. A local complement response by RPE causes early-stage macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2015;24(19):5555-69.
399. Toomey CB, Kelly U, Saban DR, Bowes Rickman C. Regulation of age-related macular degeneration-like pathology by complement factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(23):E3040-9.
400. Kurihara T, Westenskow PD, Gantner ML, Usui Y, Schultz A, Bravo S, et al. Hypoxia-induced metabolic stress in retinal pigment epithelial cells is sufficient to induce photoreceptor degeneration. *Elife*. 2016;5.
401. Seddon JM, Ajani UA, Mitchell BD. Familial aggregation of age-related maculopathy. *Am J Ophthalmol*. 1997;123(2):199-206.
402. Gold B, Merriam JE, Zernant J, Hancox LS, Taiber AJ, Gehrs K, et al. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2006;38(4):458-62.
403. Yates JR, Sepp T, Matharu BK, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, et al. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2007;357(6):553-61.
404. Dinu V, Miller PL, Zhao H. Evidence for association between multiple complement pathway genes and AMD. *Genet Epidemiol*. 2007;31(3):224-37.
405. Fagerness JA, Maller JB, Neale BM, Reynolds RC, Daly MJ, Seddon JM. Variation near complement factor I is associated with risk of advanced AMD. *Eur J Hum Genet*. 2009;17(1):100-4.
406. Ennis S, Jomary C, Mullins R, Cree A, Chen X, Macleod A, et al. Association between the SERPING1 gene and age-related macular degeneration: a two-stage case-control study. *Lancet*. 2008;372(9652):1828-34.
407. Anderson DH, Radeke MJ, Gallo NB, Chapin EA, Johnson PT, Curletti CR, et al. The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis re-visited. *Prog Retin Eye Res*. 2010;29(2):95-112.

408. Warwick A, Lotery A. Genetics and genetic testing for age-related macular degeneration. *Eye (Lond)*. 2018;32(5):849-57.
409. Johnson PT, Betts KE, Radeke MJ, Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV. Individuals homozygous for the age-related macular degeneration risk-conferring variant of complement factor H have elevated levels of CRP in the choroid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(46):17456-61.
410. Mullins RF, Warwick AN, Sohn EH, Lotery AJ. From compliment to insult: genetics of the complement system in physiology and disease in the human retina. *Hum Mol Genet*. 2017;26(R1):R51-R7.
411. Yang Z, Camp NJ, Sun H, Tong Z, Gibbs D, Cameron DJ, et al. A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science*. 2006;314(5801):992-3.
412. Jakobsdottir J, Conley YP, Weeks DE, Mah TS, Ferrell RE, Gorin MB. Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26. *Am J Hum Genet*. 2005;77(3):389-407.
413. Grassmann F, Heid IM, Weber BH, International AMDGC. Recombinant Haplotypes Narrow the ARMS2/HTRA1 Association Signal for Age-Related Macular Degeneration. *Genetics*. 2017;205(2):919-24.
414. Fritsche LG, Chen W, Schu M, Yaspan BL, Yu Y, Thorleifsson G, et al. Seven new loci associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2013;45(4):433-9, 9e1-2.
415. Yu Y, Bhangale TR, Fagerness J, Ripke S, Thorleifsson G, Tan PL, et al. Common variants near FRK/COL10A1 and VEGFA are associated with advanced age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2011;20(18):3699-709.
416. Fritsche LG, Igl W, Bailey JN, Grassmann F, Sengupta S, Bragg-Gresham JL, et al. A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nat Genet*. 2016;48(2):134-43.
417. Tan PL, Bowes Rickman C, Katsanis N. AMD and the alternative complement pathway: genetics and functional implications. *Hum Genomics*. 2016;10(1):23.
418. Anderson DH, Ozaki S, Nealon M, Neitz J, Mullins RF, Hageman GS, et al. Local cellular sources of apolipoprotein E in the human retina and retinal pigmented epithelium: implications for the process of drusen formation. *Am J Ophthalmol*. 2001;131(6):767-81.
419. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1988;8(1):1-21.
420. Xiying M, Wenbo W, Wangyi F, Qinghuai L. Association of Apolipoprotein E Polymorphisms with Age-related Macular Degeneration Subtypes: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. *Arch Med Res*. 2017;48(4):370-7.
421. Losonczy G, Fekete A, Voko Z, Takacs L, Kaldi I, Ajzner E, et al. Analysis of complement factor H Y402H, LOC387715, HTRA1 polymorphisms and ApoE alleles with susceptibility to age-related macular degeneration in Hungarian patients. *Acta Ophthalmol*. 2011;89(3):255-62.
422. Losonczy G, Vajas A, Takacs L, Dzsudzsak E, Fekete A, Marhoffer E, et al. Effect of the Gas6 c.834+7G>A polymorphism and the interaction of known risk factors on AMD pathogenesis in Hungarian patients. *PLoS One*. 2012;7(11):e50181.
423. Krausz C, Riera-Escamilla A. Monogenic Forms of Male Infertility. *Exp Suppl*. 2019;111:341-66.
424. Tournaye H, Krausz C, Oates RD. Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017;5(7):544-53.
425. Boehm U, Bouloux PM, Dattani MT, de Roux N, Dode C, Dunkel L, et al. Expert consensus document: European Consensus Statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism--pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(9):547-64.
426. Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum Mutat*. 2012;33(5):887-94.
427. Oates RD, Amos JA. The genetic basis of congenital bilateral absence of the vas deferens and cystic fibrosis. *J Androl*. 1994;15(1):1-8.
428. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, et al. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol*. 2012;62(2):324-32.
429. Navarro-Costa P. Sex, rebellion and decadence: the scandalous evolutionary history of the human Y chromosome. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(12):1851-63.
430. Krausz C, Casamonti E. Spermatogenic failure and the Y chromosome. *Hum Genet*. 2017;136(5):637-55.

431. Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tuttelmann F, European Academy of A, European Molecular Genetics Quality N. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology*. 2014;2(1):5-19.
432. Kleiman SE, Yorgev L, Hauser R, Botchan A, Maymon BB, Paz G, et al. Expression profile of AZF genes in testicular biopsies of azoospermic men. *Hum Reprod*. 2007;22(1):151-8.
433. Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum Reprod*. 2003;18(8):1660-5.
434. Repping S, Skaletsky H, Brown L, van Daalen SK, Korver CM, Pyntikova T, et al. Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nat Genet*. 2003;35(3):247-51.
435. Stouffs K, Lissens W, Tournaye H, Haentjens P. What about gr/gr deletions and male infertility? Systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2011;17(2):197-209.
436. Bansal SK, Jaiswal D, Gupta N, Singh K, Dada R, Sankhwar SN, et al. Gr/gr deletions on Y-chromosome correlate with male infertility: an original study, meta-analyses, and trial sequential analyses. *Sci Rep*. 2016;6:19798.
437. Rozen SG, Marszalek JD, Irenze K, Skaletsky H, Brown LG, Oates RD, et al. AZFc deletions and spermatogenic failure: a population-based survey of 20,000 Y chromosomes. *Am J Hum Genet*. 2012;91(5):890-6.
438. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431(7006):350-5.
439. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2):215-33.
440. Castellano L, Stebbing J. Deep sequencing of small RNAs identifies canonical and non-canonical miRNA and endogenous siRNAs in mammalian somatic tissues. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(5):3339-51.
441. Abu-Halima M, Hammadeh M, Schmitt J, Leidinger P, Keller A, Meese E, et al. Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments. *Fertil Steril*. 2013;99(5):1249-55 e16.
442. Barcelo M, Mata A, Bassas L, Larriba S. Exosomal microRNAs in seminal plasma are markers of the origin of azoospermia and can predict the presence of sperm in testicular tissue. *Hum Reprod*. 2018;33(6):1087-98.
443. Krawetz SA, Kruger A, Lalancette C, Tagett R, Anton E, Draghici S, et al. A survey of small RNAs in human sperm. *Hum Reprod*. 2011;26(12):3401-12.
444. Lian J, Zhang X, Tian H, Liang N, Wang Y, Liang C, et al. Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:13.
445. Abu-Halima M, Hammadeh M, Backes C, Fischer U, Leidinger P, Lubbad AM, et al. Panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility. *Fertil Steril*. 2014;102(4):989-97 e1.
446. Ji Z, Lu R, Mou L, Duan YG, Zhang Q, Wang Y, et al. Expressions of miR-15a and its target gene HSPA1B in the spermatozoa of patients with varicocele. *Reproduction*. 2014;147(5):693-701.
447. Mostafa T, Rashed LA, Nabil NI, Osman I, Mostafa R, Farag M. Seminal miRNA Relationship with Apoptotic Markers and Oxidative Stress in Infertile Men with Varicocele. *Biomed Res Int*. 2016;2016:4302754.
448. Wang C, Yang C, Chen X, Yao B, Yang C, Zhu C, et al. Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. *Clin Chem*. 2011;57(12):1722-31.
449. Gaal Z, Klupa T, Kantor I, Mlynarski W, Albert L, Tolloczko J, et al. Sulfonylurea use during entire pregnancy in diabetes because of KCNJ11 mutation: a report of two cases. *Diabetes Care*. 2012;35(6):e40.
450. Ivady G, Madar L, Nagy B, Gonczi F, Ajzner E, Dzsudzsak E, et al. Distribution of CFTR mutations in Eastern Hungarians: relevance to genetic testing and to the introduction of newborn screening for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2011;10(3):217-20.
451. Ivady G, Koczok K, Madar L, Gombos E, Toth I, Gyori K, et al. Molecular Analysis of Cystic Fibrosis Patients in Hungary - An Update to the Mutational Spectrum. *J Med Biochem*. 2015;34(1):46-51.
452. Age-Related Eye Disease Study Research G. The Age-Related Eye Disease Study system for classifying age-related macular degeneration from stereoscopic color fundus photographs: the Age-Related Eye Disease Study Report Number 6. *Am J Ophthalmol*. 2001;132(5):668-81.

453. Ferris FL, Davis MD, Clemons TE, Lee LY, Chew EY, Lindblad AS, et al. A simplified severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 18. *Arch Ophthalmol*. 2005;123(11):1570-4.
454. Mokanszki A, Ujfalusi A, Gombos E, Balogh I. Examination of Y-Chromosomal Microdeletions and Partial Microdeletions in Idiopathic Infertility in East Hungarian Patients. *J Hum Reprod Sci*. 2018;11(4):329-36.
455. Lu JC, Huang YF, Lu NQ. [WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen: its applicability to andrology laboratories in China]. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2010;16(10):867-71.
456. Mokanszki A, Molnar Z, Varga Tothne E, Bodnar B, Jakab A, Balint BL, et al. Altered microRNAs expression levels of sperm and seminal plasma in patients with infertile ejaculates compared with normozoospermic males. *Hum Fertil (Camb)*. 2019:1-10.
457. Kane WH, Davie EW. Cloning of a cDNA coding for human factor V, a blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(18):6800-4.
458. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Caskey CT. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press; 1990. p. 272-80.
459. Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z, Riordan JR, et al. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics*. 1991;10(1):214-28.
460. Tomaiuolo R, Sangiuolo F, Bombieri C, Bonizzato A, Cardillo G, Raia V, et al. Epidemiology and a novel procedure for large scale analysis of CFTR rearrangements in classic and atypical CF patients: a multicentric Italian study. *J Cyst Fibros*. 2008;7(5):347-51.
461. Correa-Cerro LS, Wassif CA, Waye JS, Krakowiak PA, Cozma D, Dobson NR, et al. DHCR7 nonsense mutations and characterisation of mRNA nonsense mediated decay in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Genet*. 2005;42(4):350-7.
462. Losekoot M, Haarloo C, Ruivenkamp C, White SJ, Breuning MH, Peters DJ. Analysis of missense variants in the PKHD1-gene in patients with autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Hum Genet*. 2005;118(2):185-206.
463. Bellanne-Chantelot C, Clauin S, Chauveau D, Collin P, Daumont M, Douillard C, et al. Large genomic rearrangements in the hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) gene are the most frequent cause of maturity-onset diabetes of the young type 5. *Diabetes*. 2005;54(11):3126-32.
464. Javorszky E, Moriniere V, Kerti A, Balogh E, Piko H, Saunier S, et al. QMPSF is sensitive and specific in the detection of NPHP1 heterozygous deletions. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55(6):809-16.
465. Orosz O, Rajta I, Vajas A, Takacs L, Csutak A, Fodor M, et al. Myopia and Late-Onset Progressive Cone Dystrophy Associate to LVAVA/MVAVA Exon 3 Interchange Haplotypes of Opsin Genes on Chromosome X. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58(3):1834-42.
466. Nijbroek G, Sood S, McIntosh I, Francomano CA, Bull E, Pereira L, et al. Fifteen novel FBN1 mutations causing Marfan syndrome detected by heteroduplex analysis of genomic amplicons. *Am J Hum Genet*. 1995;57(1):8-21.
467. Stheneur C, Collod-Beroud G, Faivre L, Buyck JF, Gouya L, Le Parc JM, et al. Identification of the minimal combination of clinical features in probands for efficient mutation detection in the FBN1 gene. *Eur J Hum Genet*. 2009;17(9):1121-8.
468. Ivady G, Madar L, Dzsudzsak E, Koczok K, Kappelmayer J, Krulisova V, et al. Analytical parameters and validation of homopolymer detection in a pyrosequencing-based next generation sequencing system. *BMC Genomics*. 2018;19(1):158.
469. Hoffmann MM, Scharnagl H, Koster W, Winkler K, Wieland H, Marz W. Apolipoprotein E1 Baden (Arg(180)-->Cys). A new apolipoprotein E variant associated with hypertriglyceridemia. *Clin Chim Acta*. 2001;303(1-2):41-8.
470. Shemirani AH, Muszbek L. Rapid detection of the factor XIII Val34Leu (163 G-->T) polymorphism by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer detection and melting curve analysis. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(8):877-9.
471. Hurtado B, Abasolo N, Munoz X, Garcia N, Benavente Y, Rubio F, et al. Association study between polymorphisms in GAS6-TAM genes and carotid atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2010;104(3):592-8.

472. Machev N, Saut N, Longepied G, Terriou P, Navarro A, Levy N, et al. Sequence family variant loss from the AZFc interval of the human Y chromosome, but not gene copy loss, is strongly associated with male infertility. *J Med Genet.* 2004;41(11):814-25.
473. Giachini C, Laface I, Guarducci E, Balercia G, Forti G, Krausz C. Partial AZFc deletions and duplications: clinical correlates in the Italian population. *Hum Genet.* 2008;124(4):399-410.
474. Rosser ZH, Zerjal T, Hurler ME, Adojaan M, Alavantic D, Amorim A, et al. Y-chromosomal diversity in Europe is clinal and influenced primarily by geography, rather than by language. *Am J Hum Genet.* 2000;67(6):1526-43.
475. Giachini C, Guarducci E, Longepied G, Degl'Innocenti S, Becherini L, Forti G, et al. The gr/gr deletion(s): a new genetic test in male infertility? *J Med Genet.* 2005;42(6):497-502.
476. Czimmerer Z, Hulvely J, Simandi Z, Varallyay E, Havelda Z, Szabo E, et al. A versatile method to design stem-loop primer-based quantitative PCR assays for detecting small regulatory RNA molecules. *PLoS One.* 2013;8(1):e55168.
477. Sewry CA, Goebel HH. General pathology of muscle disease. In: Goebel HH, Sewry CA, Weller RO, editors. *Muscle disease: pathology and genetics*. 2nd ed. Chichester, UK: Wiley-Blackwell; 2013. p. 19-38.
478. Brown MA, Stenberg LM, Persson U, Stenflo J. Identification and purification of vitamin K-dependent proteins and peptides with monoclonal antibodies specific for gamma -carboxyglutamyl (Gla) residues. *J Biol Chem.* 2000;275(26):19795-802.
479. Dahlback B. Purification of human vitamin K-dependent protein S and its limited proteolysis by thrombin. *Biochem J.* 1983;209(3):837-46.
480. Stenhoff J, Dahlback B, Hafizi S. Vitamin K-dependent Gas6 activates ERK kinase and stimulates growth of cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;319(3):871-8.
481. Dahlback B, Podack ER. Characterization of human S protein, an inhibitor of the membrane attack complex of complement. Demonstration of a free reactive thiol group. *Biochemistry.* 1985;24(9):2368-74.
482. Steen H, Pandey A, Andersen JS, Mann M. Analysis of tyrosine phosphorylation sites in signaling molecules by a phosphotyrosine-specific immonium ion scanning method. *Sci STKE.* 2002;2002(154):pl16.
483. Muszbek L, Polgar J, Boda Z. Platelet factor XIII becomes active without the release of activation peptide during platelet activation. *Thromb Haemost.* 1993;69(3):282-5.
484. Schwarz HP, Heeb MJ, Wencel-Drake JD, Griffin JH. Identification and quantitation of protein S in human platelets. *Blood.* 1985;66(6):1452-5.
485. Balogh I, Hafizi S, Stenhoff J, Hansson K, Dahlback B. Analysis of Gas6 in human platelets and plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(6):1280-6.
486. Korade Z, Kim HY, Tallman KA, Liu W, Koczok K, Balogh I, et al. The Effect of Small Molecules on Sterol Homeostasis: Measuring 7-Dehydrocholesterol in Dhcr7-Deficient Neuro2a Cells and Human Fibroblasts. *J Med Chem.* 2016;59(3):1102-15.
487. Korade Z, Genaro-Mattos TC, Tallman KA, Liu W, Garbett KA, Koczok K, et al. Vulnerability of DHCR7(+/-) mutation carriers to aripiprazole and trazodone exposure. *J Lipid Res.* 2017;58(11):2139-46.
488. Norwood FL, Sutherland-Smith AJ, Keep NH, Kendrick-Jones J. The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Structure.* 2000;8(5):481-91.
489. Keep NH, Winder SJ, Moores CA, Walke S, Norwood FL, Kendrick-Jones J. Crystal structure of the actin-binding region of utrophin reveals a head-to-tail dimer. *Structure.* 1999;7(12):1539-46.
490. Franzot G, Sjoblom B, Gautel M, Djinovic Carugo K. The crystal structure of the actin binding domain from alpha-actinin in its closed conformation: structural insight into phospholipid regulation of alpha-actinin. *J Mol Biol.* 2005;348(1):151-65.
491. Goldsmith SC, Pokala N, Shen W, Fedorov AA, Matsudaira P, Almo SC. The structure of an actin-crosslinking domain from human fimbrin. *Nat Struct Biol.* 1997;4(9):708-12.
492. Braberg H, Webb BM, Tjioe E, Pieper U, Sali A, Madhusudhan MS. SALIGN: a web server for alignment of multiple protein sequences and structures. *Bioinformatics.* 2012;28(15):2072-3.
493. Drozdetskiy A, Cole C, Procter J, Barton GJ. JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W389-94.
494. Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, Nys R, Rousseau F, Serrano L. The FoldX web server: an online force field. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Web Server issue):W382-8.

495. Worth CL, Preissner R, Blundell TL. SDM--a server for predicting effects of mutations on protein stability and malfunction. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(Web Server issue):W215-22.
496. Zambrano R, Jamroz M, Szczasiuk A, Pujols J, Kmiecik S, Ventura S. AGGRESCAN3D (A3D): server for prediction of aggregation properties of protein structures. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W306-13.
497. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007;23(21):2947-8.
498. Ellard S, Colclough K. Mutations in the genes encoding the transcription factors hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1A) and 4 alpha (HNF4A) in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mutat.* 2006;27(9):854-69.
499. Aguilar-Bryan L, Bryan J. Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocr Rev.* 1999;20(2):101-35.
500. Del Roio Liberatore R, Jr., Ramos PM, Guerra G, Jr., Manna TD, Silva IN, Martinelli CE, Jr. Clinical and molecular data from 61 Brazilian cases of Congenital Hyperinsulinemic Hypoglycemia. *Diabetol Metab Syndr.* 2015;7:5.
501. Bellanne-Chantelot C, Saint-Martin C, Ribeiro MJ, Vaury C, Verkarre V, Arnoux JB, et al. ABCC8 and KCNJ11 molecular spectrum of 109 patients with diazoxide-unresponsive congenital hyperinsulinism. *J Med Genet.* 2010;47(11):752-9.
502. Henquin JC, Nenquin M, Sempoux C, Guiot Y, Bellanne-Chantelot C, Otonkoski T, et al. In vitro insulin secretion by pancreatic tissue from infants with diazoxide-resistant congenital hyperinsulinism deviates from model predictions. *J Clin Invest.* 2011;121(10):3932-42.
503. Mynngheer N, Allegaert K, Hattersley A, McDonald T, Kramer H, Ashcroft FM, et al. Fetal macrosomia and neonatal hyperinsulinemic hypoglycemia associated with transplacental transfer of sulfonylurea in a mother with KCNJ11-related neonatal diabetes. *Diabetes Care.* 2014;37(12):3333-5.
504. Klupa T, Kozek E, Nowak N, Cyganek K, Gach A, Milewicz T, et al. The first case report of sulfonylurea use in a woman with permanent neonatal diabetes mellitus due to KCNJ11 mutation during a high-risk pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(8):3599-604.
505. Banuelos S, Saraste M, Djinovic Carugo K. Structural comparisons of calponin homology domains: implications for actin binding. *Structure.* 1998;6(11):1419-31.
506. Chakravarty D, Chakraborti S, Chakrabarti P. Flexibility in the N-terminal actin-binding domain: clues from in silico mutations and molecular dynamics. *Proteins.* 2015;83(4):696-710.
507. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-24.
508. Singh SM, Kongari N, Cabello-Villegas J, Mallela KM. Missense mutations in dystrophin that trigger muscular dystrophy decrease protein stability and lead to cross-beta aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(34):15069-74.
509. Helderma-van den Enden AT, de Jong R, den Dunnen JT, Houwing-Duistermaat JJ, Kneppers AL, Ginjaar HB, et al. Recurrence risk due to germ line mosaicism: Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Clin Genet.* 2009;75(5):465-72.
510. Greer WL, Dobson MJ, Girouard GS, Byers DM, Riddell DC, Neumann PE. Mutations in NPC1 highlight a conserved NPC1-specific cysteine-rich domain. *Am J Hum Genet.* 1999;65(5):1252-60.
511. Yamamoto T, Nanba E, Ninomiya H, Higaki K, Taniguchi M, Zhang H, et al. NPC1 gene mutations in Japanese patients with Niemann-Pick disease type C. *Hum Genet.* 1999;105(1-2):10-6.
512. Jamuar SS, Lam AT, Kircher M, D'Gama AM, Wang J, Barry BJ, et al. Somatic mutations in cerebral cortical malformations. *N Engl J Med.* 2014;371(8):733-43.
513. Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Yan L, Cantor M, Namgyal C, et al. Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. *J Mol Diagn.* 2005;7(3):413-21.
514. Rohlin A, Wernersson J, Engwall Y, Wiklund L, Bjork J, Nordling M. Parallel sequencing used in detection of mosaic mutations: comparison with four diagnostic DNA screening techniques. *Hum Mutat.* 2009;30(6):1012-20.
515. Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, Hafez MJ, Gocke CD, Eshleman JR, et al. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *J Mol Diagn.* 2010;12(4):425-32.

516. van Veghel-Plandsoen MM, Wouters CH, Kromosoeto JN, den Ridder-Klunnen MC, Halley DJ, van den Ouweland AM. Multiplex ligation-depending probe amplification is not suitable for detection of low-grade mosaicism. *Eur J Hum Genet.* 2011;19(9):1009-12.
517. Pickrell WO, Rees MI, Chung SK. Next generation sequencing methodologies--an overview. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2012;89:1-26.
518. Rizzo JM, Buck MJ. Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila).* 2012;5(7):887-900.
519. Nemeth K, Fekete G, Kiss E, Varadi A, Holics K, Ujhelyi R. Analysis of five CFTR mutations in Hungarian cystic fibrosis patients. *J Inherit Metab Dis.* 1996;19(3):378.
520. Nemeti M, Louie E, Papp Z, Johnson JP. Molecular analysis of cystic fibrosis in the Hungarian population. *Hum Genet.* 1991;87(4):511-2.
521. Nemeti M, Johnson JP, Papp Z, Louie E. The occurrence of various non-delta F508 CFTR gene mutations among Hungarian cystic fibrosis patients. *Hum Genet.* 1992;89(2):245-6.
522. Bobadilla JL, Macek M, Jr., Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat.* 2002;19(6):575-606.
523. Makukh H, Krenkova P, Tyrkus M, Bober L, Hancarova M, Hnateyko O, et al. A high frequency of the Cystic Fibrosis 2184insA mutation in Western Ukraine: genotype-phenotype correlations, relevance for newborn screening and genetic testing. *J Cyst Fibros.* 2010;9(5):371-5.
524. Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, Casals T, Castellani C, Claustres M, et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders--updated European recommendations. *Eur J Hum Genet.* 2009;17(1):51-65.
525. Krenkova P, Piskackova T, Holubova A, Balascakova M, Krulisova V, Camajova J, et al. Distribution of CFTR mutations in the Czech population: positive impact of integrated clinical and laboratory expertise, detection of novel/de novo alleles and relevance for related/derived populations. *J Cyst Fibros.* 2013;12(5):532-7.
526. Zietkiewicz E, Rutkiewicz E, Pogorzelski A, Klimek B, Voelkel K, Witt M. CFTR mutations spectrum and the efficiency of molecular diagnostics in Polish cystic fibrosis patients. *PLoS One.* 2014;9(2):e89094.
527. Ferec C, Casals T, Chuzhanova N, Macek M, Jr., Bienvenu T, Holubova A, et al. Gross genomic rearrangements involving deletions in the CFTR gene: characterization of six new events from a large cohort of hitherto unidentified cystic fibrosis chromosomes and meta-analysis of the underlying mechanisms. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(5):567-76.
528. Kammesheidt A, Kharrazi M, Graham S, Young S, Pearl M, Dunlop C, et al. Comprehensive genetic analysis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from dried blood specimens--implications for newborn screening. *Genet Med.* 2006;8(9):557-62.
529. Castellani C, Southern KW, Brownlee K, Dankert Roelse J, Duff A, Farrell M, et al. European best practice guidelines for cystic fibrosis neonatal screening. *J Cyst Fibros.* 2009;8(3):153-73.
530. Waye JS, Krakowiak PA, Wassif CA, Sterner AL, Eng B, Nakamura LM, et al. Identification of nine novel DHCR7 missense mutations in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome (SLOS). *Hum Mutat.* 2005;26(1):59.
531. Witsch-Baumgartner M, Löffler J, Utermann G. Mutations in the human DHCR7 gene. *Hum Mutat.* 2001;17(3):172-82.
532. Witsch-Baumgartner M, Clayton P, Clusellas N, Haas D, Kelley RI, Krajewska-Walasek M, et al. Identification of 14 novel mutations in DHCR7 causing the Smith-Lemli-Opitz syndrome and delineation of the DHCR7 mutational spectra in Spain and Italy. *Hum Mutat.* 2005;25(4):412.
533. Kozak L, Francova H, Hrabincova E, Prochazkova D, Juttnerova V, Bzduch V, et al. Smith-Lemli-Opitz syndrome: molecular-genetic analysis of ten families. *J Inherit Metab Dis.* 2000;23(4):409-12.
534. Korade Z, Mi Z, Portugal C, Schor NF. Expression and p75 neurotrophin receptor dependence of cholesterol synthetic enzymes in adult mouse brain. *Neurobiol Aging.* 2007;28(10):1522-31.
535. Suzuki S, Kiyosue K, Hazama S, Ogura A, Kashiwara M, Hara T, et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates cholesterol metabolism for synapse development. *J Neurosci.* 2007;27(24):6417-27.
536. Finnell RH. Teratology: general considerations and principles. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;103(2 Pt 2):S337-42.
537. Beckman DA, Brent RL. Mechanisms of teratogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1984;24:483-500.

538. Otto EA, Tory K, Attanasio M, Zhou W, Chaki M, Paruchuri Y, et al. Hypomorphic mutations in meckelin (MKS3/TMEM67) cause nephronophthisis with liver fibrosis (NPHP11). *J Med Genet.* 2009;46(10):663-70.
539. Denamur E, Delezoide AL, Alberti C, Bourillon A, Gubler MC, Bouvier R, et al. Genotype-phenotype correlations in fetuses and neonates with autosomal recessive polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 2010;77(4):350-8.
540. Bergmann C, Kupper F, Schmitt CP, Vester U, Neuhaus TJ, Senderek J, et al. Multi-exon deletions of the PKHD1 gene cause autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *J Med Genet.* 2005;42(10):e63.
541. Sharp AM, Messiaen LM, Page G, Antignac C, Gubler MC, Onuchic LF, et al. Comprehensive genomic analysis of PKHD1 mutations in ARPKD cohorts. *J Med Genet.* 2005;42(4):336-49.
542. Gunay-Aygun M, Tuchman M, Font-Montgomery E, Lukose L, Edwards H, Garcia A, et al. PKHD1 sequence variations in 78 children and adults with autosomal recessive polycystic kidney disease and congenital hepatic fibrosis. *Mol Genet Metab.* 2010;99(2):160-73.
543. Miyazaki J, Ito M, Nishizawa H, Kato T, Minami Y, Inagaki H, et al. Intragenic duplication in the PKHD1 gene in autosomal recessive polycystic kidney disease. *BMC Med Genet.* 2015;16:98.
544. Obeidova L, Seeman T, Elisakova V, Reiterova J, Puchmajerova A, Stekrova J. Molecular genetic analysis of PKHD1 by next-generation sequencing in Czech families with autosomal recessive polycystic kidney disease. *BMC Med Genet.* 2015;16:116.
545. Furu L, Onuchic LF, Gharavi A, Hou X, Esquivel EL, Nagasawa Y, et al. Milder presentation of recessive polycystic kidney disease requires presence of amino acid substitution mutations. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8):2004-14.
546. Rossetti S, Torra R, Coto E, Consugar M, Kubly V, Malaga S, et al. A complete mutation screen of PKHD1 in autosomal-recessive polycystic kidney disease (ARPKD) pedigrees. *Kidney Int.* 2003;64(2):391-403.
547. Wang S, Wu M, Yao G, Zhang J, Zhou J. The cytoplasmic tail of FPC antagonizes the full-length protein in the regulation of mTOR pathway. *PLoS One.* 2014;9(5):e95630.
548. Outeda P, Menezes L, Hartung EA, Bridges S, Zhou F, Zhu X, et al. A novel model of autosomal recessive polycystic kidney questions the role of the fibrocystin C-terminus in disease mechanism. *Kidney Int.* 2017;92(5):1130-44.
549. Comeglio P, Johnson P, Arno G, Brice G, Evans A, Aragon-Martin J, et al. The importance of mutation detection in Marfan syndrome and Marfan-related disorders: report of 193 FBN1 mutations. *Hum Mutat.* 2007;28(9):928.
550. Kilpatrick MW, Lembessis P, Rose E, Tsipouras P. A novel G to A substitution at nucleotide 1734 of the FBN1 gene predicting a C534Y mutation responsible for marfan syndrome. *Hum Hered.* 1999;49(3):176-7.
551. Loeys B, Nuytinck L, Delvaux I, De Bie S, De Paepe A. Genotype and phenotype analysis of 171 patients referred for molecular study of the fibrillin-1 gene FBN1 because of suspected Marfan syndrome. *Arch Intern Med.* 2001;161(20):2447-54.
552. Loeys B, De Backer J, Van Acker P, Wettinck K, Pals G, Nuytinck L, et al. Comprehensive molecular screening of the FBN1 gene favors locus homogeneity of classical Marfan syndrome. *Hum Mutat.* 2004;24(2):140-6.
553. Song SQ, Zhao BJ, Li S, Zhang JQ, Wang H, Jia CW, et al. [Mutation analysis and prenatal diagnosis of FBN1 gene mutations for four patients with Marfan syndrome]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2013;30(5):534-8.
554. Hayward C, Porteous ME, Brock DJ. Mutation screening of all 65 exons of the fibrillin-1 gene in 60 patients with Marfan syndrome: report of 12 novel mutations. *Hum Mutat.* 1997;10(4):280-9.
555. Sui RF, Wei HB, Zhao JL, Hu SY, Wang B, Huang SZ, et al. [Novel mutation of fibrillin 1 gene cause ectopia lentis in a Chinese family]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 2004;40(12):828-31.
556. Rommel K, Karck M, Haverich A, von Kodolitsch Y, Rybczynski M, Muller G, et al. Identification of 29 novel and nine recurrent fibrillin-1 (FBN1) mutations and genotype-phenotype correlations in 76 patients with Marfan syndrome. *Hum Mutat.* 2005;26(6):529-39.
557. Dong J, Bu J, Du W, Li Y, Jia Y, Li J, et al. A new novel mutation in FBN1 causes autosomal dominant Marfan syndrome in a Chinese family. *Mol Vis.* 2012;18:81-6.

558. Li Z, Zhou C, Tan L, Chen P, Cao Y, Li X, et al. A targeted sequencing approach to find novel pathogenic genes associated with sporadic aortic dissection. *Sci China Life Sci.* 2018;61(12):1545-53.
559. Yang H, Luo M, Fu Y, Cao Y, Yin K, Li W, et al. Genetic testing of 248 Chinese aortopathy patients using a panel assay. *Sci Rep.* 2016;6:33002.
560. Tiecke F, Katzke S, Booms P, Robinson PN, Neumann L, Godfrey M, et al. Classic, atypically severe and neonatal Marfan syndrome: twelve mutations and genotype-phenotype correlations in FBN1 exons 24-40. *Eur J Hum Genet.* 2001;9(1):13-21.
561. Robinson PN, Godfrey M. The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrilopathies. *J Med Genet.* 2000;37(1):9-25.
562. Sheikhzadeh S, Kade C, Keyser B, Stuhmann M, Arslan-Kirchner M, Rybczynski M, et al. Analysis of phenotype and genotype information for the diagnosis of Marfan syndrome. *Clin Genet.* 2012;82(3):240-7.
563. Buchan JG, Alvarado DM, Haller GE, Cruchaga C, Harms MB, Zhang T, et al. Rare variants in FBN1 and FBN2 are associated with severe adolescent idiopathic scoliosis. *Hum Mol Genet.* 2014;23(19):5271-82.
564. Biggin A, Holman K, Brett M, Bennetts B, Ades L. Detection of thirty novel FBN1 mutations in patients with Marfan syndrome or a related fibrillinopathy. *Hum Mutat.* 2004;23(1):99.
565. Liu WO, Oefner PJ, Qian C, Odom RS, Francke U. Denaturing HPLC-identified novel FBN1 mutations, polymorphisms, and sequence variants in Marfan syndrome and related connective tissue disorders. *Genet Test.* 1997;1(4):237-42.
566. Baudhuin LM, Kotzer KE, Lagerstedt SA. Increased frequency of FBN1 truncating and splicing variants in Marfan syndrome patients with aortic events. *Genet Med.* 2015;17(3):177-87.
567. Howarth R, Yearwood C, Harvey JF. Application of dHPLC for mutation detection of the fibrillin-1 gene for the diagnosis of Marfan syndrome in a National Health Service Laboratory. *Genet Test.* 2007;11(2):146-52.
568. Arslan-Kirchner M, Arbustini E, Boileau C, Child A, Collod-Beroud G, De Paepe A, et al. Clinical utility gene card for: Marfan syndrome type 1 and related phenotypes [FBN1]. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(9).
569. Liu W, Qian C, Francke U. Silent mutation induces exon skipping of fibrillin-1 gene in Marfan syndrome. *Nat Genet.* 1997;16(4):328-9.
570. Ishimoto Y, Nakano T. Release of a product of growth arrest-specific gene 6 from rat platelets. *FEBS Lett.* 2000;466(1):197-9.
571. Schwarz HP, Heeb MJ, Lammle B, Berrettini M, Griffin JH. Quantitative immunoblotting of plasma and platelet protein S. *Thromb Haemost.* 1986;56(3):382-6.
572. Nakano T, Ishimoto Y, Kishino J, Umeda M, Inoue K, Nagata K, et al. Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem.* 1997;272(47):29411-4.
573. Ishimoto Y, Ohashi K, Mizuno K, Nakano T. Promotion of the uptake of PS liposomes and apoptotic cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6. *J Biochem.* 2000;127(3):411-7.
574. Tanabe K, Nagata K, Ohashi K, Nakano T, Arita H, Mizuno K. Roles of gamma-carboxylation and a sex hormone-binding globulin-like domain in receptor-binding and in biological activities of Gas6. *FEBS Lett.* 1997;408(3):306-10.
575. Nakano T, Kawamoto K, Kishino J, Nomura K, Higashino K, Arita H. Requirement of gamma-carboxyglutamic acid residues for the biological activity of Gas6: contribution of endogenous Gas6 to the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Biochem J.* 1997;323 (Pt 2):387-92.
576. Nagai K, Arai H, Yanagita M, Matsubara T, Kanamori H, Nakano T, et al. Growth arrest-specific gene 6 is involved in glomerular hypertrophy in the early stage of diabetic nephropathy. *J Biol Chem.* 2003;278(20):18229-34.
577. Gallicchio M, Mitola S, Valdembrì D, Fantozzi R, Varnum B, Avanzi GC, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated endothelial cell activation by Axl tyrosine kinase receptor. *Blood.* 2005;105(5):1970-6.
578. Takahashi H, Wada K, Hayashi S, Hanano M, Tatewaki W, Shibata A. Behavior of protein S during long-term oral anticoagulant therapy. *Thromb Res.* 1988;51(3):241-9.
579. Tokunaga F, Wakabayashi S, Koide T. Warfarin causes the degradation of protein C precursor in the endoplasmic reticulum. *Biochemistry.* 1995;34(4):1163-70.

580. Ekman C, Gottsater A, Lindblad B, Dahlback B. Plasma concentrations of Gas6 and soluble Axl correlate with disease and predict mortality in patients with critical limb ischemia. *Clin Biochem.* 2010;43(10-11):873-6.
581. Lindqvist PG, Balogh I, Dahlback B. Umbilical cord plasma levels of growth-arrest specific protein 6 in intrauterine growth restriction. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2010;89(1):22-6.
582. Alciato F, Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Carnieletto S, Avanzi GC. Development and validation of an ELISA method for detection of growth arrest specific 6 (GAS6) protein in human plasma. *J Immunoassay Immunochem.* 2008;29(2):167-80.
583. Clauser S, Peyrard S, Gaussem P, Crespin M, Emmerich J, Aiach M, et al. Development of a novel immunoassay for the assessment of plasma Gas6 concentrations and their variation with hormonal status. *Clin Chem.* 2007;53(10):1808-13.
584. Chen C, Li Q, Darrow AL, Wang Y, Derian CK, Yang J, et al. Mer receptor tyrosine kinase signaling participates in platelet function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(6):1118-23.
585. Magnusson KP, Duan S, Sigurdsson H, Petursson H, Yang Z, Zhao Y, et al. CFH Y402H confers similar risk of soft drusen and both forms of advanced AMD. *PLoS Med.* 2006;3(1):e5.
586. Seddon JM, George S, Rosner B, Klein ML. CFH gene variant, Y402H, and smoking, body mass index, environmental associations with advanced age-related macular degeneration. *Hum Hered.* 2006;61(3):157-65.
587. Sepp T, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Moore AT, et al. Complement factor H variant Y402H is a major risk determinant for geographic atrophy and choroidal neovascularization in smokers and nonsmokers. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(2):536-40.
588. Seddon JM, Francis PJ, George S, Schultz DW, Rosner B, Klein ML. Association of CFH Y402H and LOC387715 A69S with progression of age-related macular degeneration. *JAMA.* 2007;297(16):1793-800.
589. Thakkinstian A, McKay GJ, McEvoy M, Chakravarthy U, Chakrabarti S, Silvestri G, et al. Systematic review and meta-analysis of the association between complement component 3 and age-related macular degeneration: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol.* 2011;173(12):1365-79.
590. McKay GJ, Patterson CC, Chakravarthy U, Dasari S, Klaver CC, Vingerling JR, et al. Evidence of association of APOE with age-related macular degeneration: a pooled analysis of 15 studies. *Hum Mutat.* 2011;32(12):1407-16.
591. Adams MK, Simpson JA, Richardson AJ, English DR, Aung KZ, Makeyeva GA, et al. Apolipoprotein E gene associations in age-related macular degeneration: the Melbourne Collaborative Cohort Study. *Am J Epidemiol.* 2012;175(6):511-8.
592. Inbal A, Dardik R. Role of coagulation factor XIII (FXIII) in angiogenesis and tissue repair. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2006;35(1-2):162-5.
593. Png KJ, Halberg N, Yoshida M, Tavazoie SF. A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells. *Nature.* 2011;481(7380):190-4.
594. McIver SC, Roman SD, Nixon B, McLaughlin EA. miRNA and mammalian male germ cells. *Hum Reprod Update.* 2012;18(1):44-59.
595. Papaioannou MD, Nef S. microRNAs in the testis: building up male fertility. *J Androl.* 2010;31(1):26-33.
596. Bao J, Li D, Wang L, Wu J, Hu Y, Wang Z, et al. MicroRNA-449 and microRNA-34b/c function redundantly in murine testes by targeting E2F transcription factor-retinoblastoma protein (E2F-pRb) pathway. *J Biol Chem.* 2012;287(26):21686-98.
597. Bouhallier F, Allioli N, Lavial F, Chalmel F, Perrard MH, Durand P, et al. Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. *RNA.* 2010;16(4):720-31.
598. Liang X, Zhou D, Wei C, Luo H, Liu J, Fu R, et al. MicroRNA-34c enhances murine male germ cell apoptosis through targeting ATF1. *PLoS One.* 2012;7(3):e33861.
599. Ro S, Park C, Sanders KM, McCarrey JR, Yan W. Cloning and expression profiling of testis-expressed microRNAs. *Dev Biol.* 2007;311(2):592-602.
600. Yu Z, Raabe T, Hecht NB. MicroRNA Mirn122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (Tnp2) messenger RNA (mRNA) by mRNA cleavage. *Biol Reprod.* 2005;73(3):427-33.
601. Obholz KL, Akopyan A, Waymire KG, MacGregor GR. FNDC3A is required for adhesion between spermatids and Sertoli cells. *Dev Biol.* 2006;298(2):498-513.

602. Wu W, Qin Y, Li Z, Dong J, Dai J, Lu C, et al. Genome-wide microRNA expression profiling in idiopathic non-obstructive azoospermia: significant up-regulation of miR-141, miR-429 and miR-7-1-3p. *Hum Reprod.* 2013;28(7):1827-36.
603. Konrad L, Keilani MM, Laible L, Nottelmann U, Hofmann R. Effects of TGF-betas and a specific antagonist on apoptosis of immature rat male germ cells in vitro. *Apoptosis.* 2006;11(5):739-48.
604. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Liang S, Hasegawa K, et al. Integrative genomic analysis of phosphatidylinositol 3'-kinase family identifies PIK3R3 as a potential therapeutic target in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(18 Pt 1):5314-21.
605. Curry E, Safranski TJ, Pratt SL. Differential expression of porcine sperm microRNAs and their association with sperm morphology and motility. *Theriogenology.* 2011;76(8):1532-9.
606. Corney DC, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, Wang W, Nikitin AY. MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res.* 2007;67(18):8433-8.
607. He X, He L, Hannon GJ. The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network. *Cancer Res.* 2007;67(23):11099-101.
608. Yan N, Lu Y, Sun H, Qiu W, Tao D, Liu Y, et al. Microarray profiling of microRNAs expressed in testis tissues of developing primates. *J Assist Reprod Genet.* 2009;26(4):179-86.
609. Kasimanickam VR, Kasimanickam RK, Dernell WS. Dysregulated microRNA clusters in response to retinoic acid and CYP26B1 inhibitor induced testicular function in dogs. *PLoS One.* 2014;9(6):e99433.
610. Zheng S, Turner TT, Lysiak JJ. Caspase 2 activity contributes to the initial wave of germ cell apoptosis during the first round of spermatogenesis. *Biol Reprod.* 2006;74(6):1026-33.
611. Yamamoto CM, Hikim AP, Lue Y, Portugal AM, Guo TB, Hsu SY, et al. Impairment of spermatogenesis in transgenic mice with selective overexpression of Bcl-2 in the somatic cells of the testis. *J Androl.* 2001;22(6):981-91.
612. Hayashi T, Kageyama Y, Ishizaka K, Xia G, Kihara K, Oshima H. Requirement of Notch 1 and its ligand jagged 2 expressions for spermatogenesis in rat and human testes. *J Androl.* 2001;22(6):999-1011.
613. Klingmuller D, Haidl G. Inhibin B in men with normal and disturbed spermatogenesis. *Hum Reprod.* 1997;12(11):2376-8.
614. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet.* 1996;5(7):933-43.
615. Krausz C, Quintana-Murci L, McElreavey K. Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? *Hum Reprod.* 2000;15(7):1431-4.
616. Kleiman SE, Almog R, Yorgev L, Hauser R, Lehavi O, Paz G, et al. Screening for partial AZFa microdeletions in the Y chromosome of infertile men: is it of clinical relevance? *Fertil Steril.* 2012;98(1):43-7.
617. Luetjens CM, Gromoll J, Engelhardt M, Von Eckardstein S, Bergmann M, Nieschlag E, et al. Manifestation of Y-chromosomal deletions in the human testis: a morphometrical and immunohistochemical evaluation. *Hum Reprod.* 2002;17(9):2258-66.
618. Tyler-Smith C. An evolutionary perspective on Y-chromosomal variation and male infertility. *Int J Androl.* 2008;31(4):376-82.
619. Repping S, van Daalen SK, Korver CM, Brown LG, Marszalek JD, Gianotten J, et al. A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region. *Genomics.* 2004;83(6):1046-52.
620. Fernandes S, Paracchini S, Meyer LH, Florida G, Tyler-Smith C, Vogt PH. A large AZFc deletion removes DAZ3/DAZ4 and nearby genes from men in Y haplogroup N. *Am J Hum Genet.* 2004;74(1):180-7.
621. de Carvalho CMB, Zuccherato LW, Fujisawa M, Shirakawa T, Ribeiro-Dos-Santos AKC, Santos SEB, et al. Study of AZFc partial deletion gr/gr in fertile and infertile Japanese males. *J Hum Genet.* 2006;51(9):794-9.
622. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science.* 2004;305(5683):525-8.
623. Krausz C, Giachini C, Xue Y, O'Bryan MK, Gromoll J, Rajpert-de Meyts E, et al. Phenotypic variation within European carriers of the Y-chromosomal gr/gr deletion is independent of Y-chromosomal background. *J Med Genet.* 2009;46(1):21-31.

624. Ferlin A, Tessari A, Ganz F, Marchina E, Barlati S, Garolla A, et al. Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility. *J Med Genet.* 2005;42(3):209-13.
625. Fernandes S, Huellen K, Goncalves J, Dukal H, Zeisler J, Rajpert De Meyts E, et al. High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Mol Hum Reprod.* 2002;8(3):286-98.
626. Krausz C, Degl'Innocenti S, Nuti F, Morelli A, Felici F, Sansone M, et al. Natural transmission of USP9Y gene mutations: a new perspective on the role of AZFa genes in male fertility. *Hum Mol Genet.* 2006;15(18):2673-81.
627. Plotton I, Ducros C, Pugeat M, Morel Y, Lejeune H. Transmissible microdeletion of the Y-chromosome encompassing two DAZ copies, four RBMY1 copies, and both PRY copies. *Fertil Steril.* 2010;94(7):2770 e11-6.

8. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Ajzner E, **Balogh I**, Szabo T, Marosi A, Haramura G, Muszbek L. Severe coagulation factor V deficiency caused by 2 novel frameshift mutations: 2952delT in exon 13 and 5493insG in exon 16 of factor 5 gene. *Blood* 2002;99:702-5. IF: 9,631

2. **Balogh I**, Hafizi S, Stenhoff J, Hansson K, Dahlback B. Analysis of Gas6 in human platelets and plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1280-6. IF: 7,053

3. Ivady G, Madar L, Nagy B, Gonczi F, Ajzner E, Dzsudzsak E, Dvorakova L, Gombos E, Kappelmayer J, Macek M, Jr., **Balogh I**. Distribution of *CFTR* mutations in Eastern Hungarians: relevance to genetic testing and to the introduction of newborn screening for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2011;10:217-20. IF: 3,190

4. Losonczy G, Fekete A, Voko Z, Takacs L, Kaldi I, Ajzner E, Kasza M, Vajas A, Berta A, **Balogh I**. Analysis of complement factor H Y402H, LOC387715, HTRA1 polymorphisms and ApoE alleles with susceptibility to age-related macular degeneration in Hungarian patients. *Acta Ophthalmol* 2011;89:255-62. IF: 2,629

5. Gaal Z, Klupa T, Kantor I, Mlynarski W, Albert L, Tolloczko J, **Balogh I**, Czajkowski K, Malecki MT. Sulfonylurea use during entire pregnancy in diabetes because of KCNJ11 mutation: a report of two cases. *Diabetes Care* 2012;35:e40.

6. **Balogh I**, Koczok K, Szabo GP, Torok O, Hadzsiev K, Csabi G, Balogh L, Dzsudzsak E, Ajzner E, Szabo L, Csakvary V, Olah AV. Mutational spectrum of Smith-Lemli-Opitz syndrome patients in Hungary. *Mol Syndromol* 2012;3:215-22.

7. Losonczy G, Vajas A, Takacs L, Dzsudzsak E, Fekete A, Marhoffer E, Kardos L, Ajzner E, Hurtado B, de Frutos PG, Berta A, **Balogh I**. Effect of the *Gas6* c.834+7G>A polymorphism and the interaction of known risk factors on AMD pathogenesis in Hungarian patients. *PLoS One* 2012;7:e50181. IF: 3,730

8. Olah AV, Szabo GP, Varga J, Balogh L, Csabi G, Csakvary V, Erwa W, **Balogh I**. Relation between biomarkers and clinical severity in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Eur J Pediatr* 2013;172:623-30. IF: 1,983
9. Szakszon K, Szegedi I, Magyar A, Olah E, Andrejkovics M, Balla P, Lengyel A, Berenyi E, **Balogh I**. Complete recovery from psychosis upon miglustat treatment in a juvenile Niemann-Pick C patient. *Eur J Paediatr Neurol* 2014;18:75-8. IF: 2,301
10. Koczok K, V. Olah A, P. Szabo G, Olah E, Torok O, **Balogh I**. A koleszterin-bioszintézis veleszületett zavara: a Smith–Lemli–Opitz-szindróma. *Orv Hetil* 2015;156:1695-702. IF: 0,291
11. Ivady G, Koczok K, Madar L, Gombos E, Toth I, Gyori K, **Balogh I**. Molecular Analysis of Cystic Fibrosis Patients in Hungary - An Update to the Mutational Spectrum. *J Med Biochem* 2015;34:46-51. IF: 0,742
12. Jermendy G, **Balogh I**, Gaal Z. HNF-4- α -mutáció okozta monogénis diabetes mellitus (MODY-1) első hazai esete. *Orv Hetil* 2016;157:469-73. IF: 0,349
13. Korade Z, Kim HY, Tallman KA, Liu W, Koczok K, **Balogh I**, Xu L, Mirnics K, Porter NA. The Effect of Small Molecules on Sterol Homeostasis: Measuring 7-Dehydrocholesterol in Dhcr7-Deficient Neuro2a Cells and Human Fibroblasts. *J Med Chem* 2016;59:1102-15. IF: 6,259
14. Korade Z, Genaro-Mattos TC, Tallman KA, Liu W, Garbett KA, Koczok K, **Balogh I**, Mirnics K, Porter NA. Vulnerability of DHCR7(+/-) mutation carriers to aripiprazole and trazodone exposure. *J Lipid Res* 2017;58:2139-46. IF: 4,505
15. Molnar Z, Balogh L, Kappelmayer J, Madar L, Gombos E, **Balogh I**. Congenital Hyperinsulinism Caused by a De Novo Mutation in the ABCC8 Gene - A Case Report. *EJIFCC* 2017;28:85-91.
16. Koczok K, Mero G, Szabo GP, Madar L, Gombos E, Ajzner E, Motyan JA, Hortobagyi T, **Balogh I**. A novel point mutation affecting Asn76 of dystrophin protein leads to dystrophinopathy. *Neuromuscul Disord* 2018;28:129-36. IF: 2,612

17. Ivady G, Madar L, Dzsudzsak E, Koczok K, Kappelmayer J, Krulisova V, Macek M, Jr., Horvath A, **Balogh I**. Analytical parameters and validation of homopolymer detection in a pyrosequencing-based next generation sequencing system. *BMC Genomics* 2018;19:158.

IF: 3,501

18. Koczok K, Gombos E, Madar L, Torok O, **Balogh I**. Interfering effect of maternal cell contamination on invasive prenatal molecular genetic testing. *Prenat Diagn* 2018;38:713-9.

IF: 2,434

19. Mokanszki A, Ujfalusi A, Gombos E, **Balogh I**. Examination of Y-Chromosomal microdeletions and partial microdeletions in idiopathic infertility in East Hungarian patients. *J Hum Reprod Sci* 2018;11:329-36.

20. Szabo T, Orosz P, Balogh E, Javorszky E, Mattyus I, Bereczki C, Maroti Z, Kalmar T, Szabo AJ, Reusz G, Varkonyi I, Marian E, Gombos E, Orosz O, Madar L, Balla G, Kappelmayer J, Tory K, **Balogh I**. Comprehensive genetic testing in children with a clinical diagnosis of ARPKD identifies phenocopies. *Pediatr Nephrol* 2018;33:1713-21.

IF: 2,816

21. Madar L, Szakszon K, Pfliegler G, Szabo GP, Brugos B, Ronen N, Papp J, Zahuczky K, Szakos E, Fekete G, Olah E, Koczok K, **Balogh I**. FBN1 gene mutations in 26 Hungarian patients with suspected Marfan syndrome or related fibrillinopathies. *J Biotechnol* 2019;301:105-11.

IF: 3,163

22. Mokanszki A, Molnar Z, Varga Tothne E, Bodnar B, Jakab A, Balint BL, **Balogh I**. Altered microRNAs expression levels of sperm and seminal plasma in patients with infertile ejaculates compared with normozoospermic males. *Hum Fertil (Camb)* 2019:1-10.

IF: 1,803

9. AZ ÉRTEKEZÉSBEN NEM TÁRGYALT NEMZETKÖZI ÉS HAZAI KÖZLEMÉNYEK

1. Poka R, Ajzner E, **Balogh I**. Public health approach to activated protein C resistance assay. Am J Obstet Gynecol 1997;177:1271-2.
2. Poka R, **Balogh I**, Ajzner E, Nagy IG. Orális fogamzásgátlás thromboemboliás szövődményeinek megelőzése: módszertani javaslat. Orv Hetil 1998;139:815-8.
3. Regéczy N, Kiss E, **Balogh I**, Kappelmayer J, Muszbek L, Szegedi Gy. Öröklött és szerzett thrombophilia együttes előfordulása egy systemás lupus erythematosusban szenvedő betegben: esetismertetés. Magyar Reumatológia 1998;39:105-8.
4. Szőke G, Bereczky Zs, **Balogh I**, Muszbek L. Homocisztein anyagcsere laboratóriumi vizsgálata és klinikai jelentősége a thrombosis hajlam megítélése szempontjából. I. Homocisztein metabolizmus és a plazma homocisztein szintjének a meghatározása. Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina 1999;26:8-14.
5. Bereczky Zs, **Balogh I**, Szőke G, Muszbek L. Homocisztein anyagcsere laboratóriumi vizsgálata és klinikai jelentősége a thrombosis hajlam megítélése szempontjából. II. Öröklött és szerzett hyperhomocysteinaemiák. Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina 1999;26:54-63.
6. **Balogh I**, Poka R, Losonczy G, Muszbek L. High frequency of factor V Leiden mutation and prothrombin 20210A variant in Romanies of Eastern Hungary. Thromb Haemost 1999;82:1555-6. IF: 4,983
7. **Balogh I**, Poka R, Pfliegler G, Dekany M, Boda Z, Muszbek L. High prevalence of factor V Leiden mutation and 20210A prothrombin variant in Hungary. Thromb Haemost 1999;81:660-1. IF: 4,983
8. Szakony S, **Balogh I**, Muszbek L. The frequency of the haemochromatosis C282Y mutation in the ethnic Hungarian and Romany populations of eastern Hungary. Br J Haematol 1999;107:464-5. IF: 3,204

9. **Balogh I**, Szoke G, Karpati L, Wartiovaara U, Katona E, Komaromi I, Haramura G, Pfliegler G, Mikkola H, Muszbek L. Val34Leu polymorphism of plasma factor XIII: biochemistry and epidemiology in familial thrombophilia. *Blood* 2000;96:2479-86. IF: 8,977
10. Bare SN, Poka R, **Balogh I**, Ajzner E. Factor V Leiden as a risk factor for miscarriage and reduced fertility. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2000;40:186-90. IF: 0,523
11. Karpati L, Penke B, Katona E, **Balogh I**, Vamosi G, Muszbek L. A modified, optimized kinetic photometric assay for the determination of blood coagulation factor XIII activity in plasma. *Clin Chem* 2000;46:1946-55. IF: 4,261
12. Regeczy N, **Balogh I**, Lakos G. Risk for venous thrombosis in autoimmune diseases with antiphospholipid antibodies and factor V Leiden mutation among Hungarian patients. *J Rheumatol* 2000;27:2723-5.
13. Regeczy N, **Balogh I**, Lakos G, Zeher M, Bodolay E, Szucs G, Kiss E, Ajzner E, Szegedi G. Hypercoagulability in various autoimmune diseases: no association with factor V Leiden mutation. *Haematologia (Budap)* 2000;30:35-9. IF: 0,405
14. Regeczy N, Lakos G, **Balogh I**, Ajzner E, Kiss E, Szegedi G. The Leiden mutation of coagulation factor V in Hungarian SLE patients. *Clin Appl Thromb Hemost* 2000;6:41-5. IF: 0,567
15. Regeczy N, Lakos G, **Balogh I**, Kappelmayer J, Kiss E. Membranous glomerulonephritis in a patient with inherited activated protein C resistance. *Clin Nephrol* 2000;53:390-3. IF: 1,638
16. Wartiovaara U, Mikkola H, Szoke G, Haramura G, Karpati L, **Balogh I**, Lassila R, Muszbek L, Palotie A. Effect of Val34Leu polymorphism on the activation of the coagulation factor XIII-A. *Thromb Haemost* 2000;84:595-600. IF: 4,732

17. Póka R, Kiss E, **Balogh I**, Ajzner E. Hormonális fogamzásgátlás, gesztációs események és a Leiden-mutáció előfordulása mélyvénás thrombosis miatt kezelt betegek között. Magyar Nőorvosok Lapja 2001;64:191-5.

18. Hunter M, Heyer E, Austerlitz F, Angelicheva D, Nedkova V, Briones P, Gata A, de Pablo R, Laszlo A, Bosshard N, Gitzelmann R, Tordai A, Kalmar L, Szalai C, **Balogh I**, Lupu C, Corches A, Popa G, Perez-Lezaun A, Kalaydjieva LV. The P28T mutation in the GALK1 gene accounts for galactokinase deficiency in Roma (Gypsy) patients across Europe. Pediatr Res 2002;51:602-6.

IF: 3,382

19. Ajzner E, **Balogh I**, Haramura G, Boda Z, Kalmar K, Pfliegler G, Dahlback B, Muszbek L. Anti-factor V auto-antibody in the plasma and platelets of a patient with repeated gastrointestinal bleeding. J Thromb Haemost 2003;1:943-9.

20. Bors A, Andrikovics H, Kalmar L, Erdei N, Galambos S, Losonczi A, Furedi S, **Balogh I**, Szalai C, Tordai A. Frequencies of two common mutations (c.35delG and c.167delT) of the connexin 26 gene in different populations of Hungary. Int J Mol Med 2004;14:1105-8. IF: 3,190

21. Herman T, Vad Sz, Ajzner É, Balogh I, Boda Z, Pfliegler Gy, Póka R. Terhességi és gyermekágyi thrombosis kockázatát befolyásoló tényezők faktor V Leiden-hordozók körében: Szelektív profilaxis indikációi. Magyar Nőorvosok Lapja 2004;67:299-305.

22. Nagy V, Facsko A, Takacs L, Balazs E, Berta A, **Balogh I**, Edes I, Czuriga I, Pfliegler G. Activated protein C resistance in anterior ischaemic optic neuropathy. Acta Ophthalmol Scand 2004;82:140-3. IF: 0,974

23. Losonczy G, Rosenberg N, Kiss C, Kappelmayer J, Vereb G, Kerenyi A, **Balogh I**, Muszbek L. A novel homozygous mutation (1619delC) in GPIIb gene associated with Glanzmann thrombasthenia, the decay of GPIIb-mRNA and the synthesis of a truncated GPIIb unable to form complex with GPIIIa. Thromb Haemost 2005;93:904-9. IF: 3,056

24. Poka R, Vad S, **Balogh I**, Ajzner E. Variable effect of prothrombotic factors on fetomaternal circulation. Am J Obstet Gynecol 2005;193:2180-1.

25. Egyed B, Furedi S, Angyal M, **Balogh I**, Kalmar L, Padar Z. Analysis of the population heterogeneity in Hungary using fifteen forensically informative STR markers. *Forensic Sci Int* 2006;158:244-9. IF: 1,397

26. Erdos M, Alapi K, **Balogh I**, Oroszlan G, Rakoczi E, Sumegi J, Marodi L. Severe Shwachman-Diamond syndrome phenotype caused by compound heterozygous missense mutations in the SBDS gene. *Exp Hematol* 2006;34:1517-21. IF: 3,408

27. Nagy B, Jr., Csongradi E, Bhattoa HP, **Balogh I**, Blasko G, Paragh G, Kappelmayer J, Kaplar M. Investigation of Thr715Pro P-selectin gene polymorphism and soluble P-selectin levels in type 2 diabetes mellitus. *Thromb Haemost* 2007;98:186-91. IF: 3,501

28. Takacs L, Losonczy G, Matesz K, **Balogh I**, Sohajda Z, Toth K, Fazakas F, Vereb G, Berta A. TGFBI (BIGH3) gene mutations in Hungary--report of the novel F547S mutation associated with polymorphic corneal amyloidosis. *Mol Vis* 2007;13:1976-83. IF: 2,329

29. Jiao H, Toth B, Erdos M, Fransson I, Rakoczi E, **Balogh I**, Magyarics Z, Derfalvi B, Csorba G, Szaflarska A, Megarbane A, Akatcharian C, Dbaiibo G, Rajnavolgyi E, Hammarstrom L, Kere J, Lefranc G, Marodi L. Novel and recurrent STAT3 mutations in hyper-IgE syndrome patients from different ethnic groups. *Mol Immunol* 2008;46:202-6. IF: 3,555

30. Harangi M, **Balogh I**, Harangi J, Paragh G. A koleszterinfelszívódás hatékonyságának genetikai háttere. A Niemann-Pick C1-like-1 receptor és génvariációinak szerepe a lipidanyagcserében. *Orv Hetil* 2010;151:1376-83.

31. Lindqvist PG, **Balogh I**, Dahlback B. Umbilical cord plasma levels of growth-arrest specific protein 6 in intrauterine growth restriction. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2010;89:22-6. IF: 1,860

32. Imre L, **Balogh I**, Kappelmayer J, Szabo M, Melegh B, Wanker E, Szabo G. Detection of mutations by flow cytometric melting point analysis of PCR products. *Cytometry A* 2011;79:720-6. IF: 3,729

33. Pálfüldi R, Szabó T, Somfay A, **Balogh I**. Késői diagnózis? Medicina Thoracalis (Budapest) 2011;64:219-23.
34. Szima GZ, Mihaly E, Ajzner E, **Balogh I**, Vad Sz, Poka R. Az APC rezisztens nők császármetszési szülési vérvesztése kevesebb, mint a vad típusúaké: a Leiden-mutáció populáció genetikai előnyének első közvetlen bizonyítéka. Magyar Nőorvosok Lapja 2011;74:14-8.
35. Balicza P, Bereznai B, Takats A, Klivenyi P, Dibo G, Hidasi E, **Balogh I**, Molnar MJ. Az LRRK2 gyakori G2019S-mutációjának hiánya 120, korai kezdetű magyar Parkinson-beteg esetében. Ideggyogy Sz 2012;65:239-42.
36. Szakszon K, Felszeghy E, Csizy I, Jozsa T, Kaposzta R, Balogh E, Olah E, **Balogh I**, Berenyi E, Knekt AC, Ilyes I. Endocrine and anatomical findings in a case of Solitary Median Maxillary Central Incisor Syndrome. Eur J Med Genet 2012;55:109-11. IF: 1,685
37. Torok O, Toth B, Erdos M, Csorba G, Gyimesi E, **Balogh I**, Toth Z, Marodi L. Molecular Diagnostic Challenges and Complex Management of Consecutive Twin Pregnancies in a Family with CD40 Ligand Deficiency. Scand J Immunol 2012;75:227-30. IF: 2,199
38. Mokánszki A, Ujfalusi A, Balogh E, Sümegi A, **Balogh I**, Bodnár B, Varga A, Oláh É; Tóthné VE. Az Y-kromoszóma mikrodelécióinak és parciális mikrodelécióinak vizsgálata idiopátiás infertilitásban. Magyar Andrológia 2012;17:17-21.
39. Harangi M, Seres I, **Balogh I**, Kobling T, Harangi J, Varga J, Mark L, Paragh G. Effect of apolipoprotein E genotypes on the efficacy of ezetimibe monotherapy in patients with statin induced adverse effects. Int J Clin Pharmacol Ther 2013;51:746-52. IF: 1,044
40. Toth B, Pistar Z, Csorba G, **Balogh I**, Kovacs T, Erdos M, Marodi L. Novel dedicator of cytokinesis 8 mutations identified by multiplex ligation-dependent probe amplification. Eur J Haematol 2013;91:369-75. IF: 2,414

41. **Balogh I**, Bálint BL. DNS-szekvenálás a gén és a genom szintjén. *Gyermekegyógyászat* 2013;64:110-1.

42. Gaál Zs, Bakó B, Gárdus D, Gaál B, Spisák N, **Balogh I**. Neonatalis diabetes hátterének felnőttkori identifikálása. *Diabetologia Hungarica* 2013;21:7-14.

43. Helisalmi S, Immonen I, Losonczy G, Resch MD, Benedek S, **Balogh I**, Papp A, Berta A, Uusitupa M, Hiltunen M, Kaarniranta K. ADAMTS9 locus associates with increased risk of wet AMD. *Acta Ophthalmol* 2014;92:e410. IF: 2,844

44. Kapas I, Katko M, Harangi M, Paragh G, **Balogh I**, Koczi Z, Regelsberger G, Molnar MJ, Kovacs GG. Cerebrotendinous xanthomatosis with the c.379C>T (p.R127W) mutation in the CYP27A1 gene associated with premature age-associated limbic tauopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014;40:345-50. IF: 3,927

45. Szakszon K, Balogh E, Ujfalusi A, Bessenyei B, P. Szabo G, Balogh I, Olah E. Ritka genetikai betegségek klinikai és genetikai diagnosztikájában szerzett tapasztalataink a kelet-magyarországi régióban (2007-2013). *Orv Hetil* 2014;155:348-57.

46. Varga VE, Katko M, Harangi J, **Balogh I**, Kapas I, Madar L, Seres I, Molnar MJ, Paragh G, Kovacs GG, Harangi M. Egy ritka, veleszületett neurodegeneratív betegség: a cerebrotendinosus xanthomatosis laboratóriumi diagnosztikája. *Orv Hetil* 2014;155:811-6.

47. Zsiros N, Bodor M, Varga V, Berta E, **Balogh I**, Seres I, Paragh G, Harangi M. The c.-133A>G polymorphism in NPC1L1 gene influences the efficacy of ezetimibe monotherapy on apolipoprotein A1 in hyperlipidemic patients. *Pharmazie* 2014;69:424-9. IF: 1,052

48. Beke A, Jaeger J, Erős FR, Nagy GyR, Varga P, Berecz B, Kovalszky I, Rácz G, Nagy B, Madar L, Kappelmayer J, Rigó J, **Balogh I**. X-kromoszómához kötött öröklődést mutató ornitin-transzkarbamiláz- (OTC-) hiány kimutatása újszülöttkori súlyos hyperammonaemia hátterében molekuláris genetikai vizsgálattal. *Gyermekegyógyászat* 2014;65:104-9.

49. Bodnár A, Gaál Zs, **Balogh I**, Kántor I, Károlyi H, Karádi Zs, Winkler G. A MODY-kalkulátor értéke a monogénes diabetesformák predictiójában. *Diabetologia Hungarica* 2014;22:33-8.

50. Orosz O, Czegledi M, Kantor I, **Balogh I**, Vajas A, Takacs L, Berta A, Losonczy G. Ophthalmological phenotype associated with homozygous null mutation in the NEUROD1 gene. *Mol Vis* 2015;21:124-30. IF: 2,110

51. V. Oláh A, P. Szabó G, Varga J, Koczok K, **Balogh I**, Harangi J. A veleszületett koleszterinhiány jellemző biomarkerei Smith-Lemli-Opitz-szindrómás betegekben és hordozókban. *Metabolizmus* 2015;13:196-201.

52. Csillik A, Pozsonyi Z, Soos K, **Balogh I**, Bodo I, Aranyi Z. Transthyretin familiáris amyloid polyneuropathia - három magyarországi eset ritka mutációkkal (His88Arg és Phe33Leu) = Transthyretin familial amyloid polyneuropathy – three hungarian cases with rare mutations (His88Arg and Phe33Leu). *Ideggyogy Sz* 2016;69:245-53.

53. Mizzi C, Dalabira E, Kumuthini J, Dzimiri N, **Balogh I**, Basak N, Bohm R, Borg J, Borgiani P, Bozina N, Bruckmueller H, Burzynska B, Carracedo A, Cascorbi I, Deltas C, Dolzan V, Fenech A, Grech G, Kasiulevicius V, Kadasi L, Kucinskas V, Khusnutdinova E, Loukas YL, Macek M, Jr., Makukh H, Mathijssen R, Mitropoulos K, Mitropoulou C, Novelli G, Papantoni I, Pavlovic S, Saglio G, Setric J, Stojiljkovic M, Stubbs AP, Squassina A, Torres M, Turnovec M, van Schaik RH, Voskarides K, Wakil SM, Werk A, Del Zompo M, Zukic B, Katsila T, Lee MT, Motsinger-Rief A, McLeod HL, van der Spek PJ, Patrinos GP. A European Spectrum of Pharmacogenomic Biomarkers: Implications for Clinical Pharmacogenomics. *PLoS One* 2016;11:e0162866.

IF: 2,806

54. Nagy B, Jr., Nagy B, Fila L, Clarke LA, Gonczy F, Bede O, Nagy D, Ujhelyi R, Szabo A, Anghelyi A, Major M, Bene Z, Fejes Z, Antal-Szalmas P, Bhattoa HP, Balla G, Kappelmayer J, Amaral MD, Macek M, Jr., **Balogh I**. Human Epididymis Protein 4: A Novel Serum Inflammatory Biomarker in Cystic Fibrosis. *Chest* 2016;150:661-72. IF: 6,147

55. Iván G, **Balogh I**, Gaál Zs, Mosonyi J, Szajbert T. Három évtizedes inzulinkezelés után diagnosztizált HNF1A-MODY (MODY 3) esete - Hogyan tovább?

Diabetologia Hungarica 2016;24:48-52.

56. Orosz O, Rajta I, Vajas A, Takacs L, Csutak A, Fodor M, Kolozsvári B, Resch M, Senyi K, Lesch B, Szabo V, Berta A, **Balogh I**, Losonczy G. Myopia and Late-Onset Progressive Cone Dystrophy Associate to LVAVA/MVAVA Exon 3 Interchange Haplotypes of Opsin Genes on Chromosome X. Invest Ophthalmol Vis Sci 2017;58:1834-42. IF: 3,388

57. Zadori D, Szpisjak L, Madar L, Varga VE, Csanyi B, Bencsik K, **Balogh I**, Harangi M, Kereszty E, Vecsei L, Klivenyi P. Different phenotypes in identical twins with cerebrotendinous xanthomatosis: case series. Neurol Sci 2017;38:481-3. IF: 2,285

58. Nagy B Jr, Nagy B, Kappelmayer J, **Balogh I**. A humán epididymis protein 4 vizsgálatának labor diagnosztikai jelentősége cystás fibrosisban: kezdeti eredmények. Mucoviscidosis Hungarica 2017;3:99-105.

59. Orosz O, Fodor M, **Balogh I**, Losonczy G. Relative anterior microphthalmos in oculodentodigital dysplasia. Indian J Ophthalmol 2018;66:334-6. IF: 0,977

60. Koczok K, Gurumurthy CB, **Balogh I**, Korade Z, Mirnics K. Subcellular localization of sterol biosynthesis enzymes. J Mol Histol 2019;50:63-73. IF: 2,937

61. Nagy B, Jr., Bene Z, Fejes Z, Heltshe SL, Reid D, Ronan NJ, McCarthy Y, Smith D, Nagy A, Joseloff E, Balla G, Kappelmayer J, Macek M, Jr., Bell SC, Plant BJ, Amaral MD, **Balogh I**. Human epididymis protein 4 (HE4) levels inversely correlate with lung function improvement (delta FEV1) in cystic fibrosis patients receiving ivacaftor treatment. J Cyst Fibros 2019;18:271-7. IF: 4,290

62. Nagy O, Karteszi J, Hartwig M, Bertalan R, Javorszky E, Erhardt E, Patocs A, Tornoczky T, **Balogh I**, Ujfalusi A. The importance of the multiplex ligation-dependent probe amplification in the identification of a novel two-exon deletion of the NR5A1 gene in a patient with 46,XY differences of sex development. Mol Biol Rep 2019;46:5595-601. IF: 2,107

63. Nagy O, Szakszon K, Biro BO, Mogyorosy G, Nagy D, Nagy B, **Balogh I**, Ujfalusi A. Copy number variants detection by microarray and multiplex ligation-dependent probe amplification in congenital heart diseases. J Biotechnol 2019;299:86-95. IF: 3,163

10. FELSŐOKTATÁSI TANKÖNYV RÉSZEK

64. **Balogh I**, Antal-Szalmás P. Anyagcsere rendellenességek molekuláris genetikai diagnosztikája. In: Kappelmayer, János; Muszbek, László (szerk.) Laboratóriumi diagnosztikai gyakorlatok. Debrecen, Magyarország: Debreceni Egyetem, 2010:9-18.

65. **Balogh I**, Antal-Szalmás P. Molecular genetic diagnosis of inherited metabolic disorders. In: Kappelmayer, János; Muszbek, László (ed.) Practicals in laboratory medicine. Debrecen, Magyarország: Debreceni Egyetem, 2010:9-18.

66. **Balogh I**. Farmakogenetika. In: Oláh É (szerk.) Klinikai genetika: egyetemi tankönyv. Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó Zrt, 2015:299-305.

11. KÖNYVFEJEZET, SZAKTANULMÁNY

67. Gaál Zs, **Balogh I**. Monogenic Forms of Diabetes Mellitus. In: Igaz P, Patócs A (ed.) Genetics of Endocrine Diseases and Syndromes. Cham, Svájc: Springer International Publishing, 2019:385-416.

68. **Balogh I**. A cystás fibrosis molekuláris genetikai diagnosztikája. In: Debreczeni L, Kovacs GL (szerk.) Gyakorlati laboratóriumi medicina, Budapest, Magyarország: Literatura Medica Kiadó Kft, 2008:520-1.

12. CSOPORTOS (MULTICENTRIKUS) KÖZLEMÉNYBEN KOLLABORÁCIÓS KÖZREMŰKÖDŐ

69. Heard JM, Bellettato C, van Lingen C, Scarpa M and the MetabERN collaboration group. Research activity and capability in the European reference network MetabERN. Orphanet J Rare Dis 2019; 14:119. IF: 3,68

13. TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK

Balogh István tudományos és oktatási közleményeinek összefoglalása
MTA V. Orvostudományi Osztály (2020.05.14)

Tudományos és oktatási közlemények	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikk²	80	---	---	---
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	46	601	764
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	1	4	4
szakcikk, magyar nyelvű	---	17	8	8
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként ³	---	1	24	42
összefoglaló közlemény	---	3	1	1
rövid közlemény	---	12	104	137
II. Könyv	0	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	5	---	---	---
idegen nyelvű	---	1	1	1
magyar nyelvű	---	1	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	3	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	1	---	0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)	---	3	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV.)	---	83	743	957
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	86	---	743	957
V. További tudományos művek	6	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkek és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkek is	---	2	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	4	8	12
Olthalmak, szabadalmak	---	0	0	0
VI. Hivatkozott absztraktok⁵	1	---	0	1
Összes hivatkozás¹	---	---	751	970
Hirsch index⁶	16	---	---	---
g index⁶	29	---	---	---

Speciális tudománymetriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	6	265
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	21	84
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2000) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	66	564
Az utolsó 10 év (2010 - 2020) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	52	223
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	130	13,4%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben	---	23
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	1	1

