

dc\_254\_11

**MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**A valós idejű PCR alkalmazása a klinikai genetikai gyakorlatban**

**Dr. Nagy Bálint, Ph.D.**

**Budapest**

**2014**

dc\_254\_11

**MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**A valósidejű PCR alkalmazása a klinikai genetikai gyakorlatban**

**Dr. Nagy Bálint, Ph.D.**

**Budapest**

**2014**

## Tartalomjegyzék

<b>Rövidítések jegyzéke</b>	5
<b>1. BEVEZETÉS</b>	6
<b>1.1. A mikrobiális genom kimutatása</b>	6
<b>1.2. Egynukleotidos polimorfizmusok (SNP) kimutatása</b>	6
1.2.1. A 21-es kromoszóma triszómiájának meghatározása	6
1.2.2. A <i>VEGF G+405C, C-2578A, C-460T</i> polimorfizmus meghatározása	
HELLP szindrómás terhesek mintáiban	7
<b>1.3. Deléció kimutatása, a cisztás fibrózist okozó <math>\Delta F508</math></b>	7
<b>1.4. Génexpresszió kimutatása</b>	7
<b>1.5. Magzati „szabad” DNS kimutatása anyai szérumból</b>	8
<b>2. CÉLKITŰZÉSEK</b>	9
<b>2.1. Mikrobiális genom kimutatása, <i>Toxoplasma gondii</i></b>	9
<b>2.2. Egynukleotidos polimorfizmusok kimutatása</b>	9
2.2.1. A 21-es kromoszóma triszómiájának meghatározása	9
2.2.2. A <i>VEGF G+405C, C-2578A, C-460T</i> polimorfizmus meghatározása	
HELLP szindrómás várandósok mintáiban	9
<b>2.3. Deléció kimutatása, a <math>\Delta F508</math> meghatározása</b>	9
<b>2.4. Génexpresszió kimutatása, a <i>CD24</i> meghatározása</b>	9
<b>2.5. Magzati „szabad” DNS kimutatása anyai szérumból</b>	10
<b>3. BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>	11
<b>3.1. Mikrobiális genom kimutatása, <i>Toxoplasma gondii</i></b>	11
<b>3.2. SNP kimutatása</b>	11
3.2.1. A 21-es kromoszóma triszómiájának kimutatása SNP felhasználásával	11
3.2.2. A <i>VEGF</i> egynukleotidos polimorfizmus meghatározása HELLP	
szindrómában	12
<b>3.3. Deléció kimutatása, <math>\Delta F508</math></b>	13
<b>3.4. Génexpresszió meghatározása</b>	13
3.4.1. Préeklampsziás és egészséges várandósok placenta mintáinak <i>CD24</i> expressziója	13

3.4.2. Prostatata tumoros és benignus prostatata hiperpláziás minták CD24 expressziója	13
<b>3.5. „Szabad” nukleinsav meghatározások, nem, és RhD</b>	14
<b>4. A TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK RÖVID ÖSSZEFOGLALÁSA</b>	15
<b>4.1. Mikrobiális genom kimutatása</b>	15
<b>4.2. Egynukleotidos polimorfizmus meghatározások</b>	15
4.2.1. A 21-es kromoszóma triszómiájának kimutatása	15
4.2.2. A VEGF egynukleotidos polimorfizmusa HELLP szindrómában	15
<b>4.3. Deléció kimutatása, <i>ΔF508</i></b>	15
<b>4.4. Génexpresszió meghatározása</b>	17
4.4.1. <i>CD24</i> expresszió préeklampsziás és egészséges terhesek placenta mintáiban	17
4.4.2. <i>CD24</i> expresszió prostatata tumoros és benignus prostatata hiperpláziás mintákban	17
<b>4.5. „Szabad” DNS meghatározások</b>	17
<b>5. A TÉZISEK LEGFONTOSABB MEGÁLLAPÍTÁSAI</b>	18
<b>6. AZ ÉRTEKEZÉST MEGALAPOZÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA</b>	21
<b>a. Idegen nyelvű közlemények jegyzéke</b>	21
<b>b. Magyar nyelvű közlemények jegyzéke</b>	26
<b>c. Az értekezést megalapozó könyvek, könyvfejezetek jegyzéke</b>	28
<b>7. A FŐBB SCIENTOMETRIAI ADATOK ÖSSZEFOGLALÁSA</b>	29
<b>8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS</b>	30

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

aCGH: arraycomparatív genom hibridizáció  
ALT: alanin-aminotranszferáz  
AST: aszpartát-aminotranszferáz  
bp: bázispár  
CVS: chorionboholy-minta  
cDNA: komplementer DNS  
CGH: komparatív genom hibridizáció  
cRNS: komplementer RNS  
DNS: dezoxiribonukleinsav  
EDTA: etiléndiamin-tetraecetsav  
FDR: hamis találati arány  
hCG: humán chorion gonadotropin  
HELLP szindróma: hemolízis, emelkedett májenzimek, csökkent  
vértelmezkeszám szindróma  
HLA: humán leukocyta antigén  
IDO: indolamin 2,3-dioxigenáz  
IL: interleukin  
IUGR: méhen belüli retardáció  
LDH: laktát-dehidrogenáz  
LEPR: leptin receptor  
MBL: mannóz-kötő leptin  
MHC: fő hisztokompatibilitási komplex  
miRNS: mikroRNS  
MTHFR: metiléntetrahydrofolát-reduktáz enzim  
NK sejt: természetes ölösejt  
PCR: polimeráz láncreakció  
RFLP: restrikciós fragmenthossz-polimorfizmus  
RIN: RNS integritást mutató szám  
RNS: ribonukleinsav  
SNP: egynukleotidos polimorfizmus  
STR: rövid ismétlődő egységek  
VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

## **1. BEVEZETÉS**

### **A valósídejű PCR alkalmazása a klinikai genetikai gyakorlatban**

A PCR módszer bevezetése után rohamosan nyíltak meg az újabb és újabb alkalmazási lehetőségek a kutatásban és a diagnosztikában. A technikai fejlesztés egyik nagy eredménye a valósídejű PCR bevezetése, amit a thermal cycler és a fotométer kombinálása teremtett meg. A módszer kiküszöböli a hagyományos PCR hátrányait, és számos új lehetőséget kínál. Megnöveli a kimutatási érzékenységet, alkalmas a PCR ciklusok monitorizálására és a pontos mennyiségi meghatározásokra. Munkám során a valósídejű PCR-t bevezettem a klinikai genetikai gyakorlatba és a prenatális diagnosztikába a kongenitális toxoplazmózis, a mutációk és polimorfizmusok kimutatására, a génexpressziók meghatározására, valamint egyes polimorfizmusok betegségekkel való összefüggéseinek a vizsgálatára.

#### **1.1. A mikrobiális genom kimutatása**

A valósídejű PCR alkalmas a különböző mikrobák gyors és megbízható kimutatására. A prenatális diagnosztikában nagy jelentősége van a kongenitális toxoplazmózis diagnosztizálásának. Az első lépésként végzett anyai szerológiai vizsgálatok a magzat fertőzöttségéről nem nyújtanak felvilágosítást, viszont a magzati mintákból elvégzett PCR alapú kimutatás alkalmas módszer lehet.

#### **1.2. Egynukleotidos polimorfizmusok (SNP) kimutatása**

Napjainkban az egyes SNP-k kimutatásának egyre fontosabb a szerepe a különböző geno- és fenotípusok meghatározásában, ezek egyes betegségekkel való összefüggésének megállapításában, valamint egyes gyógyszerek hatásának előrejelzésében, valamint egyes betegségek a diagnosztizálásában is. A személyre szabott orvoslás nagy kihívások előtt áll az SNP-k szerepének a meghatározásában.

##### **1.2.1. A 21-es kromoszóma triszómiájának meghatározása**

Az autoszomális triszómiák leggyakoribb formája a 21-es kromoszóma triszómiája (Down szindróma). Előfordulási gyakorisága 1/700, ami a 35 év feletti anyai életkortól exponenciálisan növekszik. A 21-es kromoszóma triszómiája invazív és nem-invazív módszerekkel szűrhető ki. A nem-invazív szűrőmódszerek az ultrahangvizsgálat és a

biokémiai marker meghatározások. A szérumvizsgálatok eredményei alapján csak az előfordulási valószínűséget becsülik meg, míg a citogenetikai, vagy a molekuláris genetikai vizsgálatok diagnosztikus eredményeket adnak. A molekuláris biológiai módszerek nagy előnye a gyorsaság és a kiindulási minta minimális mennyiségigénye. A 21-es kromoszóma triszómiájának diagnosztizálására rutinként alkalmazott fluoreszcens PCR módszernek alternatívája lehet a valósídejű PCR.

### 1.2.2. A *VEGF G+405C, C-2578A, C-460T* polimorfizmus meghatározása HELLP szindrómás terhesek mintáiban

A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) fontos szerepet játszik a vaszkulogenezisben és a vaszkuláris permeabilitásban. A VEGF génen eddig legalább 30 egynukleotidos polimorfizmust (SNP) írtak le. A VEGF termelődésével ezek közül a *G+405C*, *C-2578A* és a *C-460T* is kapcsolatba hozható. Préeklampsziában és HELLP szindrómában a placenta kóros vaszkularizációja figyelhető meg, ezért érdekes lehet az SNP polimorfizmus meghatározása.

### 1.3. Deléció kimutatása, a cisztás fibrózist okozó *ΔF508*

A valósídejű PCR alkalmas deléciók kimutatására is, így a cisztás fibrózist okozó *ΔF508* meghatározására. A cisztás fibrózis (CF) a kaukázusi populációban a leggyakoribb autoszomális, recesszív módon öröklődő genetikai betegség. Előfordulási gyakorisága és a betegséget okozó mutációk nagy földrajzi és etnikai különbségeket mutatnak. A betegség kialakulásáért a 27 exonból álló cisztikus fibrózis transzmembrán regulátor gén (*CFTR*) a felelős, ezen eddig közel 1400 féle mutációt, deléciót találtak. Magyarországon az esetek közel 60%-át a *ΔF508* (3 bp deléciója) okozza (előfordulási gyakorisága 1/25). Kimutatására a hagyományos PCR-t, a fluoreszcens PCR-t és az érzékenyebb és gyorsabb valósídejű PCR módszert alkalmazzák.

### 1.4. Génexpresszió kimutatása

A valósídejű PCR módszer alkalmas a génexpresszió mérésére is. Egyik legfontosabb felhasználási területe a microarray vizsgálatok során érdekesnek mutató gének expressziójában lévő eltérések igazolása. A microarray eredmények jelzik, hogy mennyire tér

el a vizsgált gén a kontroll mintákhoz viszonyítva (alul, v. felül expresszált), míg a valósidejű PCR pontos koncentrációt ad meg.

A CD24 egy erősen glikolizált glykozilfoszfatidil inozitol sejt felszíni protein, amely több tumor esetén nagyobb mértékben expresszált (hólyagtumor, vese, epitéliális ovárium karcinóma, prosztatata karcinóma), az utóbbi időben prognosztikus markerként is alkalmazzák. A CD24 a tumorsejtekben megnöveli a metasztatikus képességet is.

A klinikai vizsgálatok szerint préeklampsziában jellemző a rossz vaszkularizáció, ez a patomechanizmus egyik lényeges pontja. Ilyen betegektől származó mintákban érdekesnek tűnt a *CD24* expressziójának a meghatározása.

### **1.5. Magzati „szabad” DNS kimutatása anyai szérumból**

A prenatális diagnosztikával foglalkozó szakembereket régóta foglalkoztatja a nem-invazív diagnosztika bevezetése. Az anyától levett vérmintából a magzat genetikai betegségének kimutatása nagy kihívás. Az invazív magzati mintavételi eljárások kapcsán 1-3% körüli a magzati veszteség (vetelés) kockázata, továbbá a chorionboholy-, és magzatvíz-mintavétel pszichésen is nagy megterhelést jelent a várandósoknak. Ennek elkerülésére nyújt lehetőséget az anyai vérmintákból izolált magzati sejtek és “szabad” nukleinsavak felhasználása diagnosztikai célból.



## 2. CÉLKITŰZÉSEK

### 2.1. A mikrobiális genom kimutatása

A kongenitális toxoplazmózis kimutatására alkalmas PCR amplifikációs eljárások optimalizálása, az egyes módszerek összehasonlítása, valamint a diagnosztikai tesztek klinikai gyakorlatba való bevezethetőségének vizsgálata.

### 2.2. Egynukleotidos polimorfizmusok (SNP) kimutatása

#### 2.2.1. A 21-es kromoszóma triszómiájának meghatározása

Két 21-es kromoszómán elhelyezkedő SNP marker (WIAF 899 és WIAF 2643) PCR körülményeinek optimalizálása, és a meghatározások alkalmasságának tesztelése a 21-es kromoszóma triszómiájának kimutatására.

#### 2.2.2. A *VEGF* *G+405C*, *C-2578A*, *C-460T* polimorfizmus meghatározása HELLP szindrómás várandósok mintáiban

A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) termelődésével összefüggést mutató három SNP, a *G+405C*, a *C-2578A* és a *C-460T* meghatározására alkalmas valósídejű PCR módszer kifejlesztése, és ezen SNP-k előfordulási gyakoriságának meghatározása HELLP szindrómában szenvedő és egészséges normotóniás várandósok mintáiban.

### 2.3. Deléció kimutatása, a *ΔF508* meghatározása

A fluoreszcens PCR és valósídejű PCR módszer alkalmazhatóságának vizsgálata a cisztás fibrózist okozó *ΔF508* kimutatására, tanulmányozása a különböző szövetekből izolált DNS minták felhasználási lehetőségének.

### 2.4. Génexpresszió kimutatása, a *CD24* meghatározása

A *CD24* kimutatására alkalmas primer-próba rendszer optimalizálása és a *CD24* koncentráció meghatározása préeklampsziában szenvedő és egészséges normotóniás

várandósok, valamint prosztata karcinomás és benignus prosztata hiperpláziások túbiopsziával nyert mintáin.

## **2.5. Magzati „szabad” DNS kimutatása anyai szérumból**

Anyai szérumból izolált „szabad” DNS felhasználásával a nem- és az RhD meghatározására alkalmas valósídejű PCR alapú módszer kifejlesztése, ezen eljárások megbízhatóságának klinikai mintákon való összehasonlítása.

### 3. BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Mikrobiális genom kimutatása, *Toxoplasma gondii*

Kongenitális toxoplazmózis jelenlétére merült fel gyanú klinikánkon 74 terhes esetében az 1998 és 2006 közötti időszakban. Az amniocentesis során 4-5 ml magzatvizet vettünk le. A terhesek életkora 20 és 38 év között volt, az amniocentesist a 15. és 34. terhességi hét között végeztük el. A vizsgálatkérés oka anyai fertőzésre utaló szerológiai lelet volt, ezek közül 58 esetben IgM, 2 esetben IgG pozitívitás, egy esetben pedig az ultrahang vizsgálat során mutatkozott eltérés. A többi esetben egyéb ok, foglalkozás, ill. háziállatok tartása miatt történt meghatározás.

Az izolált DNS mintákból 1,0 µl-t használtam fel a PCR-hoz. A valósidejű PCR rendszerben a primerek és a próbák szekvenciái a következők voltak: forward 5'-GGA GGA CTG GCA ACC TGG TGT CG-3' (0,5 µM), reverse 5'-TTG TTT CAC CCG GAC CGT TTA G-3' (0,5 µM), próba1 LC-red640-ACG GGC GAG TAG CAC CTG AGG AGA T-foszfát (0,25 µM), próba2 5'-CGG AAA TAG AAA GCC ATG AGG CAC TCC-fluoreszcein (0,25 µM). A reakció elegy 1.0 µl LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes PCR puffer keveréket és 2,5 µM MgCl<sub>2</sub>-ot tartalmazott 10 µl végtérfogatra kiegészítve desztillált vízzel. Kezdeti 5 perces 95 °C-on történő denaturálás után 40 ciklusban, denaturációs (95 °C; 5 sec), annealing (60 °C; 10 sec) és extenziós (72 °C; 15 sec) lépések következtek (3). Minden vizsgálandó mintát kétszer, egy negatív, egy pozitív kontroll mintát és egy desztillált víz mintát párhuzamosan futtattam. Pozitív kontroll mintaként intraperitoneálisan fertőzött egerekből izolált *T. gondii* RH törzs DNS izolátuma szolgált (OKI, Budapest).

#### 3.2. SNP kimutatás

##### 3.2.1. A 21-es kromoszóma triszómiájának kimutatása SNP felhasználásával

Klinikánkon 1998 és 2004 közötti időszakban kariotipizálással és fluoreszcens PCR módszerrel egyaránt kimutatott 67 db 21-es triszómiás és 62 db normál egészséges DNS mintát választottam ki. Kvantitatív valósidejű PCR-t és olvadási görbe analízist végeztem LightCycler készülék segítségével (Roche, Penzberg, Németország). A DNS-t 1,5 ml magzatvíz mintából nyertem. A magzatvizet a 16-18. terhességi héten vették le, a terhesek átlagos életkora 38,5 év volt. A DNS izoláláshoz szilika adszorpciós módszert alkalmaztam.

A valósidejű PCR során a 21-es kromoszómán elhelyezkedő WIAF 899 és WIAF 2643 SNP markerekre megtervezett primereket és próbákat (TIB Molbiol, Berlin, Németország) használtam fel. A PCR keverékbe egy mikroliter DNS-t mértem be, valamint

0,5  $\mu\text{M}$  forward és reverse primert, 0,2  $\mu\text{M}$  próbákat, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ -t és egy  $\mu\text{l}$  LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes-t (Roche, Penzendorf, Németország) 10  $\mu\text{l}$  végtérfogatba. A PCR során a kezdeti 5 perces 95 °C-on történő denaturálás után 36 ciklusban, denaturációs (95 °C; 30 sec), annealing (55 °C; 45 sec) és extenziós (72 °C; 45 sec) lépések következtek, majd a PCR elegyet 10 percig 72 °C-on, végül 4 °C-on inkubáltam. Az amplifikációt olvadási görbe analízis követte. Az olvadási görbe alatti területeket a LightCycler Data Analysis software 3.5 segítségével határoztam meg, majd az olvadási görbét a fluoreszcencia negatív értékű derivált görbéjévé alakítottam át a készülék programjával (-dF/dT). A primerek és a próbák bekapcsolódásakor heterozigóta minta esetén a WIAF 898 és WIAF 2643 két allélja  $T_m$ -jének 5 °C fokos különbsége miatt jól elkülöníthető. Diallélikus mintáknál kiszámítottam a területek arányát. Statisztikai analízisre t-tesztet és Kruskal-Wallis tesztet használtam az SPSS 11.0 Windows programjából.

### 3.2.2. A VEGF egynukleotidos polimorfizmus meghatározása HELLP szindrómában

A *VEGF C-2578A*, *C-460T*, *G+405C* polimorfizmus HELLP szindrómás terhesekben

A vizsgálatokba bevont várandósokat a klinikai paraméterek alapján egészséges terhes (n=83) és HELLP szindrómás (n=75) csoportokba soroltam. A HELLP szindróma diagnózisa a jellemző laboratóriumi eltérések alapján, az Amerikai Szülészeti és Nőgyógyászati Kollégium ajánlása szerint állítottam fel.

A DNS izolálása után a három SNP meghatározásakor a PCR keverék tartalmazott 1  $\mu\text{L}$  DNS-t, 5  $\mu\text{M}$  primereket és próbákat, 1  $\mu\text{L}$  LightCycler FastStart DNA Master HybProbe keveréket (Roche) és 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ -t. A kezdeti 10 perces denaturációt 95 °C-on 35 ciklus követte – denaturáció (95 °C; 10 sec), annealing (52–56–60 °C; 15 sec) és extenzió (72 °C; 10 sec) – LightCycler készüléken (Roche, Penzberg, Germany) [9]. Minden PCR-t olvadási görbe analízis követett, és a termékek olvadási pontját ( $T_m$ ) leolvastam. Statisztikai analízist STATISTICA (version 7.1; StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) és Arlequin (version 3.0; CMPG, University of Bern, Svájc) programok alkalmazásával végeztem. Minden statisztikai analízishez a szignifikancia szintje  $p \leq 0,05$ -ben lett meghatározva. Logisztikus regressziós analízis is történt az anyai életkorral és a primiparitással korrigálva.

### 3.3. Deléción kimutatása, *ΔF508*

Klinikánk genetikai tanácsadását felkereső 94 beteg (33 férfi, 61 nő; átlagos életkor 25,6 év) DNS mintáját vizsgáltam meg. A minták 8 esetben amniocentesisből (18. terhességi hét), 16 esetben chorionboholó mintavételből (12. terhességi hét) és 70 esetben perifériás vérvételből származtak.

A vizsgálatok során használt primerekből és próbákból 5 pmol mennyiségeket használtam fel a PCR mix elkészítéséhez, valamint 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>-ot és 1.0 mikroliter master mixet (FastStart DNA Master Hybridization Probes kit, Roche) mértem össze 10 mikroliter végtérfogathoz, egy mikroliter DNS mintával.

A kezdeti 10 perces 95 °C-on történő denaturálás után 35 ciklusban, denaturációs (95 °C; 0 sec), annealing (63 °C; 25 sec) és extenziós (72 °C; 5 sec) lépések következtek. Ezután olvadási görbe analízist végeztem, meghatároztam a keletkezett termékek olvadáspontját (T<sub>m</sub>), a diagnózist ezek alapján állítottam fel. Minden futtatáshoz kontroll mintákat (normál egészséges, heterozigóta, víz) iktattam be.

### 3.4. Génexpresszió meghatározása. A *CD24* expressziójának meghatározása

#### 3.4.1. Préeklampsziás és egészséges várandósok placenta mintáinak *CD24* expressziója

Tizenhat egészséges és 16 préeklampsziás beteg méhlepényéből gyűjtöttem mintát (átlagos életkor 27,9±3,7 vs. 27,8±4,5 év, átlagos terhességi hét 38,1±1,9 vs. 34,3±3,7). A placentákból trepánnal kimetszett szövetekből RNS-t izoláltam.

#### 3.4.2. Prostatata tumoros és benignus prostatata hiperpláziás minták *CD24* expressziója

Ultrahang vezérelt prostatata tübiopsziával nyert kezeletlen 21 prostatata tumoros (PCA) és 10 benignus prostatata hiperpláziás (BPH) beteg prostatata mintája került levételre. A beteg szelekció a pozitív rektális tapintáson és a magas PSA koncentráció leletén alapult. A betegek átlagos életkora 72,0±8,8 év, ill. 64,3±12,1 év volt. A mintákból RNS-t izoláltam.

DNase-I kezelést követően First Stand cDNA Synthesis kit (Roche) segítségével cDNS-t szintetizáltam. A *CD24* expresszióját primer és próba rendszerrel határoztam meg. A háztartási gének közül a hypoxanthin foszforiboziltranszferázt mértem le az eredmények normalizálásához préeklampsziások esetén, a prostatata mintáknál a foszfolipáz-2A gént használtam. A pontos koncentrációkat a beta-globin standardok beiktatásával számítottam ki.

A statisztikai kiértékeléshez t-tesztet alkalmaztam, a szignifikancia szintje  $p < 0,05$ -ben lett meghatározva 95%-os konfidencia intervallummal (SPSS).

### **3.5. „Szabad” nukleinsav meghatározások**

Genetikai amniocentesisre kerülő 80 terhes nőtől történt vérvétel (átlagos életkor  $36,9 \pm 4,7$  év, az átlagos terhességi kor  $16,9 \pm 1,8$  hét). A mintákat először 2500-as fordulatszámmal 10 percig, majd a leszívott plazmákat 14.500-as fordulatszámmal ugyancsak 10 percig centrifugáltam. A sejtmentes plazmákat  $-84\text{ C}^\circ$ -on tároltam a DNS izolálásig. A DNS izolálást követően valósídejű PCR-t végeztem a mintákból *SRY* és *RhD* primer próba rendszer felhasználásával.

## 4. A TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK RÖVID ÖSSZEFOGLALÁSA

### 4.1. Mikrobiális genom kimutatása

A *T. gondii* B1 génjére tervezett primerekkel és próbákkal optimalizáltam a polimeráz láncreakció paramétereit. Összesen 74 magzatvíz mintát vizsgáltam meg, amelyek közül hat bizonyult fertőzöttnek. A parazita DNS izolátumából hígítási sorozatot készítettem, így lehetséges volt a kimutatás érzékenységének meghatározása mellett a paraziták számának a kiszámítása is a fertőzött mintákban.

Hatvan terhesnél az immunológiai teszt (TORCH) pozitív eredményt mutatott (58 esetben az IgM, két esetben az IgG), egy betegnél az ultrahang vizsgálat során figyeltek meg eltérést, ezért kerültek vizsgálatra. Az alkalmazott molekuláris genetikai vizsgálatok közül a hagyományos PCR, a fluoreszcens PCR és a valós idejű PCR két rendszerével hat pozitív esetet mutattam ki. A *T.g.* pozitív terhesek közül 5 IgM pozitív volt, egy esetben pedig az ultrahang vizsgálat mutatott eltérést, ezek a terhesek antibiotikum kezelésben részesültek.

A pozitív kontroll mintákból tízszeres hígításokat végeztem, és összehasonlítottam az alkalmazható PCR módszereket. A valós idejű PCR hibridizációs próbákat felhasználó teszt tűnik a legjobb módszernek, érzékenysége kb. 1-10 parazita. Az intraassay koefficiens variációja 1,9 %, az interassay koefficiens variációja 6,7 % volt.

### 4.2. Egynukleotidos polimorfizmus meghatározások

#### 4.2.1. A 21-es kromoszóma triszómiájának kimutatása

A WIAF 899 és WIAF 2643 SNP allél mennyiségének a meghatározását kvantitatív valós idejű PCR és olvadási görbe analízis kombinálásával végeztem el. Az egyes allélok  $T_m$ -je jól elkülöníthető különbséget mutatott. Az olvadási görbék alatti területeket a LightCycler Data Analysis software segítségével határoztam meg. A WIAF 899 41,86%-ban, a WIAF 2643 48,83%-ban volt informatív a vizsgált 127 mintában. Az olvadási görbe analízissel nyert területek arányai szignifikánsan különböztek a 21-es triszómiás és a diallélikus minták között (WIAF 899 esetében ez triszómiás mintákban  $0,5246 \pm 0,2498$  és diallélikus mintákban  $0,8347 \pm 0,5234$ ;  $p < 0,001$ ). A WIAF 899-es marker informatív volt 27 (40,2 %) esetben a triszómiás és 27 (43,5 %) esetben a diallélikus mintáknál. Ez az SNP marker 41,86 % -ban bizonyult informatívnak az összes minta viszonylatában.

A WIAF 2643 két csúcsot adott 29 (43,2%) triszómiás mintában és 34 (54,8%) diallélikus mintában. A területi arányok  $0,4594 \pm 0,1594$  és  $0,4567 \pm 0,1012$  ( $p < 0,615$ ) voltak. Tehát ez az SNP nem alkalmas a két csoport elkülönítésére az alkalmazott körülmények között.

#### 4.2.2. A VEGF egynukleotidos polimorfizmusa HELLP szindrómában

A *VEGF C-2578A*, *C-460T* és a *G+405C* SNP esetében meghatároztam az előfordulási gyakoriságot. Szignifikáns különbséget észleltem a *VEGF C-460T* allél és genotípus eloszlásában a HELLP szindrómás és a kontroll csoport között. A *T* allél 71,1%-ban volt jelen HELLP szindrómában, míg csak 53,8%-ban a kontroll csoportban ( $p=0,0014$ ). A *TT* genotípus 45,1%-ban volt kimutatható a HELLP szindrómás csoportban és 21,5%-ban a kontroll csoportban ( $p=0,0011$ ). Logisztikus regressziós analízissel az anyai életkorra és a primiparitásra korrigálva ez a genotípus független rizikó faktort jelentett a betegség előfordulásában (OR=3.03, 95%; CI=1.51–6.08;  $p=0,002$ ).

Habár a *VEGF G+405C* allél és genotípus eloszlás nem különbözött lényegesen, a *CC* genotípus szintén független rizikó faktornak mutatkozott (OR=3.67, 95% CI=1.05–12.75;  $p=0,041$ ) a kórkép kialakulásában.

A *VEGF C-2578A* SNP polimorfizmusának vizsgálata során nem találtam különbséget a vizsgált két csoportban.

#### 4.3. Deléció kimutatása, $\Delta F508$

A PCR reakció paramétereit optimalizáltam egy előzőleg kimutatott  $\Delta F508$  heterozigóta, egy normál egészséges kontroll és egy desztillált víz templát segítségével. A  $\Delta F508$  deléciót tartalmazó PCR termék olvadáspontja 49 °C, az egészséges egyénekre jellemző PCR termék olvadáspontja 60 °C. A vizsgálandó mintákból DNS izolálást követően kvantitatív valósídejű PCR-t és olvadási görbe analízist végeztem.

A vizsgált 94 mintából 52 normál, 36 heterozigóta, 5  $\Delta F508$  homozigóta és egy  $\Delta F508C$  homozigóta eredményt állapítottam meg. Az eredmények megegyeznek a fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis során nyert eredményekkel, kivéve a  $\Delta F508C$  eredményt, amelynek kimutatására az F-PCR módszer nem alkalmas.



#### 4.4. Génexpresszió meghatározása

##### 4.4.1. *CD24* expresszió préeklampsziás és egészséges terhesek placenta mintáiban

A *CD24* meghatározására a primer-próba rendszert optimalizáltam, beállítottam a megfelelő primer, próba,  $MgCl_2$  koncentrációkat és hőmérsékleteket.

RNS-t izoláltam 16 PE és 16 egészséges kontroll placentából, majd a cDNS-t megszintetizáltam, és a *CD24* expressziót kvantitatív valósídejű PCR-rel határoztam meg. A *CD24* koncentráció a PE csoportban  $18,94 \pm 26,86$  ng/ $\mu$ l, az egészséges kontroll csoportban  $53,58 \pm 92,05$  ng/ $\mu$ l volt, a különbség statisztikailag szignifikáns ( $p=0,03$ )

##### 4.4.2. *CD24* expresszió prosztata tumoros és benignus prosztata hiperpláziás mintákban

Tübiopsziás módszerrel nyert prosztákból izolált RNS mintákból elvégeztem a meghatározásokat. A prosztata tumoros betegek ( $n=21$ ) csoportjában  $33,65 \pm 47,39$  ng/ $\mu$ l, a BPH-s ( $n=10$ ) csoportban  $4,00 \pm 4,25$  ng/ $\mu$ l volt a *CD24* koncentrációja ( $p=0.014$ ). A PSA szintekben is szignifikáns különbség mutatkozott  $252,37 \pm 308,33$  ng/ml vs.  $3,50 \pm 2,14$  ng/ml ( $p=0,001$ ) a két vizsgált csoportban.

#### 4.5. „Szabad” DNS meghatározások

Az *SRY* (primer és próba) és az *RhD* (TaqMan) valósídejű PCR rendszert sikerült optimalizálni és az érzékenységet úgy beállítani, hogy alkalmas legyen minimális mennyiségű kiindulási DNS-ből is kimutatni a vizsgált markereket. Fiú magzatot mutattam ki 80 terhesből 38 esetben, az eredmények megegyeztek a kariotipizálással kapott adatokkal. Az *RhD* meghatározások során két olyan minta akadt, ahol az anya és az apa is *RhD* negatív volt, így a magzatok is negatívak lettek.

## 5. A TÉZISEK LEGFONTOSABB MEGÁLLAPÍTÁSAI

A valósídejű PCR módszeren alapuló eljárásokat bevezettem a klinikai genetikai gyakorlatba, alkalmaztam a napi rutinvizsgálatok során, és egyes betegségek genetikai hátterének felderítésében is használtam.

1. Valósídejű PCR módszert vezettem be a *Toxoplasma gondii* genom kimutatására, optimalizáltam a PCR paramétereit SYBRGreen I alapú rendszerre.

2. Kidolgoztam a FRET próbás valósídejű PCR rendszert a kongenitális toxoplazmózis kimutatására.

3. Négy PCR alapú eljárást hasonlítottam össze a *T. gondii* kimutatására. Megvizsgáltam a hagyományos, a fluoreszcens PCR és két valósídejű PCR, a SYBRGreen I és a FRET próbás módszerek kimutatási érzékenységét és megbízhatóságát. Mind a négy módszer alkalmas a *T. gondii* kimutatására, azonban a legérzékenyebbnek a FRET próbás rendszer bizonyult, amellyel akár egyetlen parazita kimutatása is lehetséges. Az alkalmazandó eljárás kiválasztásakor az egyszerű kivitelezhetőséget, a vizsgálatához szükséges időt, a felhasznált vegyszerek környezetre való hatását is mind figyelembe vettem.

4. Magyarországon először alkalmaztam a *WIAF 899* SNP és a *WIAF 2643* SNP-k kimutatására a kvantitatív valósídejű PCR és olvadási görbe analízis módszert. A primerek és próbák, a  $MgCl_2$  koncentrációit és a PCR futtatási körülményeit optimalizáltam.

5. Megvizsgáltam a *WIAF 899* és a *WIAF 2643* SNP-k felhasználhatóságát a 21-es kromoszóma triszómiájának kimutatására 67 db 21-es triszómiás és 62 db normál diallélikus mintán.

Az eredmények alapján a *WIAF 899* SNP marker 41,86%-ban bizonyult informatívnak, a *WIAF 2643* marker viszont nem adott megfelelő területi arányokat. A 21-es triszómia biztonságos szűrésére a kromoszómán elhelyezkedő további SNP markerek bevonása és multiplex PCR végzése szükséges. Ehhez olyan SNP-ket kell kiválasztani, amelyekre a populáció nagy arányban heterozigóta. A megfelelő kombinációk összeállításával a 21. kromoszóma triszómája kimutatható.

6. Elsőként dolgoztam ki és írtam le a valósídejű PCR-t és olvadási görbe analízist a *VEGF C-460T*, *C-2578A* és *G+405C* SNP polimorfizmusának a meghatározására, optimalizáltam a PCR körülményeit.

7. HELLP szindrómában szenvedő és egészséges terhesek DNS mintáiban a világon elsőként állapítottam meg a *VEGF C-460T*, *C-2578A* és *G+405C* egynukleotidos polimorfizmusokat. Kimutattam az allélok és a genotípusok előfordulási gyakoriságát HELLP szindrómában szenvedő betegek csoportjában és összehasonlítottam az egészséges kontroll populációval.

Eredményeim azt mutatják, hogy a *VEGF* gén *C-460T* és a *G+405C* egynukleotidos polimorfizmusa kapcsolatba hozható a HELLP szindróma megjelenésével. Kimutattam, hogy a *VEGF T-460T* és a *C+405C* genotípusok nagyobb rizikót jelentenek a HELLP szindróma kialakulására.

8. A valósídejű PCR alkalmas deléciók kimutatására is, a primer-próba rendszer megfelelő megtervezése után, a PCR-t követő olvadási görbe analízis során a két allél nagy biztonsággal elkülöníthető. A  $\Delta F508$  kimutatására 116 DNS mintát vizsgáltam meg. Kimutattam 67 normál, 43  $\Delta F508$  heterozigóta, 5  $\Delta F508$  homozigóta mintát, viszont egy mintánál  $\Delta F508C$  homozigóta eredményt találtam. Ez utóbbit a F-PCR és DNS fragmens analízis módszer nem jelzi. A beállított primer és próba rendszer négy további mutáció diagnosztizálását teszi lehetővé ebben a régióban. A módszerrel vérből, a chorionból és a magzatvízsejtekből izolált DNS minták gyorsan és megbízhatóan meghatározhatók, a minták kontaminálásának valószínűsége a zárt rendszer miatt minimális.

9. Magyarországon elsőként állítottam be a *CD24* expresszió kimutatására a valósídejű PCR-t.

10. A világon elsőként határoztam meg a *CD24* szintjét préeklampsziás terhesek placenta mintáiban. Megállapítottam, hogy a *CD24* szintje a préeklampsziások mintáiban az egészséges normotóniás terhesekhez viszonyítva szignifikánsan alacsonyabb. Ezt a megállapítást 2013-ban egy amerikai kutatócsoport vizsgálati eredményei is megerősítették.

11. Túbiopsziával nyert prosztata tumoros és prosztata hiperpláziás betegek mintái között lényeges különbséget találtam a *CD24* expressziójában. Felmerül a diagnosztikus markerként való alkalmazás lehetősége.

## dc\_254\_11

12. Valósídejű PCR alapű módszert állítottam be a nem meghatározására. A „szabad” nukleinsavak meghatározása lehetőséget nyűjt a nem-invazív módon nyert mintákból a nemhez kötött genetikai betegségek kizárására.

13. Valósídejű PCR TaqMan típusű kimutatási módszert vezettem be a magzat RhD csoportjának meghatározására.

14. A magzati nem és RhD kimutatására kidolgozott módszerek megbízhatóságát 80 klinikai mintán vizsgáltam meg és alkalmasnak találtam a meghatározások elvégzésére.

**6. AZ ÉRTEKEZÉST MEGALAPOZÓ KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA:****a. Idegen nyelvű közlemények jegyzéke:**

1. Aalto Y, El-Rifai W, Vilpo L, Ollila J, **Nagy B**, Vihinen M, Vilpo J, Knuutila S.: Distinct gene expression profiling in chronic lymphocytic leukemia with 11q23 deletion. *Leukemia* 15;1721-1728,2001 ***Impakt factor: 4,293***
2. Larramendy M, Niini T, Elonen E, **Nagy B**, Ollila J, Vihinen M, Knuutila S.: Overexpression of translocation-associated fusion genes of *FGFR1*, *MYC*, *NPM1*, and *DEK*, but absence of the translocations in acute myeloid leukemia. A microarray analysis. *Haematologica* 87;569-577,2002 ***Impakt factor: 3,226***
3. Zhu Y, Hollmen J, Raty R, Aalto Y, **Nagy B**, Elonen E, Kere J, Mannila H, Fransila K, Knuutila S.: Investigatory and analytical approaches to differential gene expression profiling in mantle cell lymphoma. *British J Haematology* 119;905-915,2002 ***Impakt factor: 3,052***
4. Niini T, Vettenranta K, Hollmen J, Larramendy ML, Aalto Y, Wikman H. **Nagy B**, Seppänen JK, Salvador FA, Mannila H, Saarinen-Pihkala UM, Knuutila S.: Expression of myeloid-specific genes in childhood acute lymphoblastic leukemia – a cDNA array study. *Leukemia* 16;2213-2221,2002 ***Impakt factor: 4,693***
5. Savli H, Aalto Y, **Nagy B**, Knuutila S, Pakkala S.: Gene expression analysis of 1,25 - (OH)<sub>2</sub> dependent differentiation of HL-60 cells: a cDNA array study. *British J Haematology* 118;1065-1070,2002 ***Impakt factor: 3,052***
6. **Nagy B**, Lundan T, Larramendy ML, Aalto Y, Zhu Y, Niini T, Edgren H, Ferrer A, Vilpo J, Elonen E, Vettenranta K, Franssila K, Knuutila S.: Abnormal expression of apoptosis related genes in haematologic malignancies- overexpression of MYC is poor prognostic sign in mantle cell lymphoma. *British J Haematology* 120;434-441,2003 ***Impakt factor: 3,267***
7. **Nagy B**, Ferrer A, Larramendy LL, Galimberti S, Aalto Y, Casas S, Vilpo J, Ruutu T, Vettenranta K, Franssila K, Knuutila S.: Lymphotoxin beta expression is high in chronic lymphocytic leukemia but low in small lymphocytic lymphoma: quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis. *Haematologica* 88;654-658,2003 ***Impakt factor: 3,453***
8. Casas S, **Nagy B**, Elonen E, Aventín A, Larramendy LM, Sierra J, Ruutu T, Knuutila S.: Aberrant expression of *HOXA9*, *DEK*, *CBL* and *CSF1R* in acute myeloid leukemia. *Leukemia and Lymphoma* 44;1935-1941,2003 ***Impakt factor: 1,163***
9. Xie Y, Törnkvist M, Aalto Y, Nilsson G, Girnita L, **Nagy B**, Knuutila S, Larsson O.: Gene expression profile by blocking the *SYT-SSX* fusion gene in synovial sarcoma cells. Identification of *XRCC4* as a putative *SYT-SSX* target gene. *Oncogene* 22;7628-7631,2003 ***Impakt factor: 6,495***

10. Savli H, Sirma S, **Nagy B**, Aktan M, Dincol G, Ozbek U.: Real-time PCR analysis of the apoptosis related genes in ATRA treated APL t(15;17) patients.  
Experimental Molecular Medicine 2003;**35**:454-459. **Impakt factor: 1,373**
11. Savli H, **Nagy B**.: 1,25(OH)2D3 incubation up-regulates *HOX A9* gene in HL-60 cells.  
Turk J Haematol 2003;**20**:217-220.
12. Cerisano V, Aalto Y, Perdichizzi S, Bernard G, Manara CM, Benini S, Cenacchi G, Preda P, Lattanzi G, **Nagy B**, Knuutila S, Colombo PM, Bernard A, Picci P, Scotlandi K.: Molecular mechanisms of CD-99-induced caspase-independent cell death and cell-cell adhesion in Ewing's sarcoma cells: actin and zyxin as key intracellular mediators.  
Oncogene 2004;**23**:5664-5674. **Impakt factor: 6,318**
13. Savli H, Sirma S, **Nagy B**, Aktan M, Dincol G, Salcioglu Z, Özbek U.: Expression analysis of *DEK*, *AF4* and *FLI* genes in ALL-trans-retinoic acid (ATRA) treated acute promyelocytic leukaemia t(15;17) patients by quantitative real-time PCR.  
Turk J Med Sciences 2004;**34**:1-5.
14. Varis A, Zaika A, Puolakkainen P, **Nagy B**, Madrigal I, Kokkola A, Väyrynen A, Kärkkäinen P, Moskaluk C, El-Rifai W, Knuutila S.: Coamplified and overexpressed genes at *ERBB2* locus in gastric cancer.  
Int J Cancer 109;548-553,2004 **Impakt factor: 4,416**
15. Myllykangas S, Monni O, **Nagy B**, Rautelin H, Knuutila S.: *Helicobacter pylori* infection activates *FOS* and stress response genes and alters expression of genes in gastric cancer-specific loci.  
Genes Chromosomes and Cancer 40;334-341,2004 **Impakt factor: 4,276**
16. Wikman H, Seppanen J.K, Sarhadi VK, Kettunen E, Salmenkivi K, Kuosma E, Vainio-Siukola K, **Nagy B**, Karjalainen A, Sioris T, Salo J, Holmen J, Knuutila S, Anttila S.: Caveolins as tumor markers in lung cancer detected by combined use of cDNA and tissue microarrays.  
Journal of Pathology 203;584-593,2004 **Impakt factor: 5,333**
17. Ferrer A, Ollila J, Tobin G, **Nagy B**, Thunberg U, Aalto Y, Vihinen M, Vilpo J, Rosenquist R, Knuutila S.: Different gene expression in immunoglobulin-mutated and immunoglobulin-unmutated forms of chronic lymphocytic leukemia.  
Cancer Genetics Cytogenetics 153;69-72,2004 **Impakt factor: 1,577**
18. Savli H, Sirma S, **Nagy B**, Aktan M, Dincol G, Salcioglu Z, Sarper N, Ozbek U.: Real-time PCR analysis of *af4* and *dek* genes expression in acute promyelocytic leukemia t (15;17) patients.  
Experimental Molecular Medicine 36;279-282,2004 **Impakt factor: 1,712**

19. Kettunen E, Nicholson AG, **Nagy B**, Wikman H, Seppänen JK, Stjernvall T, Ollikainen T, Kinnula V, Nordling S, Hollmen J, Anttila S, Knuutila S.: *LICAM, INP10, P-cadherin, tPA and ITGB4* overexpression in malignant pleural mesotheliomas revealed by combined use of cDNA and tissue microarray.  
*Carcinogenesis* 26;17-25,2005 *Impakt factor: 5,108*
20. Leivo I, Jee JJ, Heikinheimo K, Laine M, Ollila J, **Nagy B**, Knuutila S.: Characterization of gene expression in major types of salivary gland carcinomas with epithelial differentiation.  
*Cancer Genet Cytogenet* 156;104-113,2005 *Impakt factor:1,640*
21. Koistinen H, Seppälä M, **Nagy B**, Tapper J, Knuutila S, Koistinen R.: Glycodelin transfection down-regulates epithelial membrane antigen and anti-apoptotic BCL-X<sub>L</sub>, and reduces proliferation of endometrial adenocarcinoma cells.  
*Am J Obstet Gynec* 193;1955-1960,2005 *Impakt factor: 3,083*
22. **Nagy B**, Bán Z, Lázár L, Nagy GR, Papp C, Tóth-Pál E, Papp Z.: Rapid determination of trisomy 21 from amniotic fluid cells using single-nucleotide polymorphic loci.  
*Prenatal Diagnosis* 25;1138-1141,2005 *Impakt factor:1,640*
23. **Nagy B**, Bán Z, Beke A, Nagy GR, Lázár L, Papp C, Tóth-Pál E, Papp Z.: Detection of *Toxoplasma gondii* from amniotic fluid, a comparison of four different molecular biological methods.  
*Clinica Chimica Acta* 368;131-137,2006 *Impakt factor:2,328*
24. Lazar L, Harmath AG, Ban Z, **Nagy B**, Papp C, Rigo J Jr, Papp Z.: Detection of maternal deoxyribonucleic acid in peripheral blood of premature and mature newborn infants.  
*Prenatal Diagnosis* 26;168-170,2006 *Impakt factor:1,514*
25. Lazar L, **Nagy B**, Ban Z, Nagy GR, Papp Z.: Presence of Cell-Free Fetal DNA in plasma of women with ectopic pregnancies.  
*Clinical Chemistry* 52;1599-1601,2006 *Impakt factor: 5,454*
26. Huang DJ, Nelson RM, Zimmermann B, Dudarewicz L, Wenzel F, Spiegel R, **Nagy B**, Holzgreve W, Hahn S.: Reliable Detection of trisomy 21 using MALDI-TOF masspectrometry.  
*Genetics in Medicine* 8;728-734,2006 *Impakt factor: 3,427*
27. Nagy GR, Györffy B, Galamb O, Molnár B. **Nagy B**, Papp Z.: Use of routinely collected amniotic fluid for whole-genome expression analysis of polygenic disorders.  
*Clinical Chemistry* 52:2013-2020,2006 *Impakt factor: 5,454*
28. **Nagy B**, Lazar L, Nagy G.R., Ban Z., Papp Z.: Detection of deltaF508del using quantitative real-time PCR, comparison of the results obtained by fluorescent PCR.  
*Fetal DiagnosisTherapy* 22;63-67,2007 *Impakt factor: 0,844*

29. **Nagy B**, Hupuczi P, Papp Z.: High frequency of C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation in Hungarian HELLP syndrome patients determined by quantitative real-time PCR.  
J Hum Hypertension 21;154-158,2007 *Impakt factor: 2,244*
30. **Nagy B**, Galimberti S, Benedetti E, Caracciolo F, Pacini S, Vilpo J, Ferrer A, Elonen E, Franssila K, Knuutila S, Petrini M.: RAF-1 over-expression does condition survival of patients affected by aggressive mantle cell lymphoma.  
Leukemia Research. 31:1595-1597,2007 *Impakt Factor: 2,561*
31. **Nagy B**, Berkes E, Rigo B, Ban Z, Papp Z., Hupuczi P.: Underexpression of CD24 in pre-eclamptic placenta tissues determined by quantitative real-time RT-PCR.  
Fetal Diagnosis Therapy 23;263-266,2008 *Impakt factor: 1,184*
32. **Nagy B**, Savli H. Molvarec A, Várkonyi T. Rigó B, Hupuczi P, Rigó J Jr.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) polymorphisms in HELLP syndrome patients determined by quantitative real-time PCR and melting curve analyses.  
Clinica Chimica Acta 389;126-131,2008 *Impakt factor: 2,960*
33. Savli H, Szendrői A, Romics I, **Nagy B.**: Gene network and canonical pathway analysis in prostate cancer: a microarray study.  
Experimental Molecular Medicine 40;176-185,2008 *Impakt factor: 2,376*
34. Than NG, Abdul Rahman O, Magenheimer R, **Nagy B**, Fule T, Hargitai B, Sammar M, Hupuczi P, Tarca AL, Szabo G, Kovalszky I, Meiri H, Sziller I, Rigo J. Jr, Romero R, Papp Z.: Placental protein 13 (galectin-13) has decreased placental expression but increased shedding and maternal serum concentrations in patients presenting with preterm pre-eclampsia and HELLP syndrome.  
Virchows Archiv 453;387-401,2008 *Impakt factor: 2,082*
35. **Nagy B**, Szendrői A, Romics I.: Overexpression of CD24, c-myc and Phospholipase 2A in Prostate Cancer Tissue Samples Obtained by Needle Biopsy.  
Pathology Oncology Research 15;279-283,2009 *Impakt factor: 1,260*
36. Lazar L, Rigó J Jr, **Nagy B**, Balogh K, Makó V, Cervenak L, Mézes M, Prohászka Z, Molvarec A.: Relationship of circulating cell-free DNA levels to cell-free fetal DNA levels, clinical characteristics and laboratory parameters in preeclampsia.  
BMC Med Genet. 2009 Nov 21;10:120.PMID: 19930583 *Impakt factor: 2,439*
37. Galimberti S, **Nagy B**, Benedetti E, Pacini S, Brizzi S, Caracciolo F, Papneschi F, Ciabatti E, Guerrini F, Fazzi R, Canestrato M, Petrini M.: Evaluation of the MDR1, ABCG2, topoisomerases II $\alpha$  and GST $\pi$  gene expression in patients affected by aggressive mantle cell lymphoma treated by the R-hyper-CVAD regimen.  
Leukemia and Lymphoma 48;1502-1509,2007 *Impakt factor: 1,512*
38. Galimberti S, **Nagy B**, Palumbo AG, Ciancia E, Buda G, Orciuolo E, Melosi A, Lambelet P, Ronca F, Petrini M.: Vascular endothelial growth factor polymorphisms in mantle cell lymphoma.  
Acta Haematologica 123;91-95,2010 *Impakt factor: 1,191*



39. Várkonyi T, Lázár L, Molvarec A, Than NG, Rigó J Jr, **Nagy B.**: Leptin receptor (LEPR) SNP polymorphisms in HELLP syndrome patients determined by quantitative real-time PCR and melting curve analysis.  
BMC Med Genet 11;11:25,2010 PMID: 20149225 **Impakt factor: 2,762**
40. Galimberti S, **Nagy B**, Ciancia Caracciolo F, Benedetti E, Pelosini M, Focosi D, Petrini M.: Outcome of patients with mantle cell lymphoma is not influenced by vascular endothelial growth factor polymorphisms. (letter)  
Leukemia Lymphoma 52:142-144,2011
41. Várkonyi T, **Nagy B**, Füle T, Tarca AL, Karászi K, Schönleber J, Hupuczi P, Mihalik N, Kovalszky I, Rigó J Jr, Meiri H, Papp Z, Romero R, Than NG.: Microarray profiling reveals that placental transcriptomes of early-onset HELLP syndrome and preeclampsia are similar.  
Placenta 32:S21-S29,2011 **Impakt factor: 2,767**
42. Lázár L, **Nagy B**, Molvarec A, Szarka A, Rigó J Jr.: Role of hsa-miR-325 in the pathology of preeclampsia.  
Mol Med Reports 6:597-600,2012 **Impakt factor: 1,170**
43. Cine N, Limtrakul P, Sunnetzi D, **Nagy B**, Savli H.: Effects of curcumin on global gene expression profile in the highly invasive human breast carcinoma cell line MDA-MB 231: A gene network-based microarray analysis.  
Experimental and Therapeutic Medicine 5:23-27,2013. **Impakt factor: 0,344**
44. **Nagy B.**: Application of real-time polymerase chain reaction in the clinical genetic practice.  
Journal of Pediatric Genetics 2:1-8,2013

**Az értekezést megalapozó idegen nyelvű közlemények összesített impakt faktora:**  
**112,398**

**a. Magyar nyelvű közlemények jegyzéke:**

1. Lázár L, Bán Z, Szakács O, **Nagy B**, Beke A, Oroszné NJ, Rigó J, Papp Z.: Szabad magzati DNS kimutatása a magzati Y-kromoszóma igazolásával anyai vérplazmából.  
Orvosi Hetilap 144;2405-2409,2003
2. **Nagy B**, Laitinen T, Bán Z, Andrásófszky Zs, Papp Gy, Lázár L, Nékám K, Papp Z, Réthy L.: Molekuláris genetikai vizsgálatokra alkalmas "szabad" DNS izolálása archivált vérsavó mintákból.  
Orvosi Hetilap 47;2375-2378:2004
3. **Nagy B**, Bán Z, Beke A, Csaba Á, Joó J, Váradi J, Tóth-Pál E, Papp C, Papp Z.: *Toxoplasma gondii* kimutatása magzatvízből fluorescens-PCR és DNS fragmens analízissel.  
Magyar Nőorvosok Lapja 68;95-100,2005
4. **Nagy B**, Bán Z, Lázár L, Nagy GyR, Papp Cs, Tóth-Pál E, Papp Z.: A 21-es chromosoma trisomiájának kimutatása egynukleotidos polymorphismus (SNP) marker felhasználásával.  
Magyar Nőorvosok Lapja 68;315-318,2005
5. Nagy GyR, **Nagy B**, Papp Z.: Praenatalis genetikai diagnosztika az anyai vérkeringésbe kerülő magzati sejtekből – helyzetkép az eddigi eredményekről.  
Magyar Nőorvosok Lapja 69;41-48,2006
6. **Nagy B**, Bán Z, Lázár L, Nagy GR, Papp Z.: A cisztás fibrózist okozó F508 deléció kimutatása kvantitatív real-time PCR módszerrel.  
Orvosi Hetilap 147;1119-1123,2006
7. **Nagy B**, Szendrői A, Papp Z, Romics I.: CD24 mRNS expresszió meghatározása kvantitatív real-time PCR módszerrel tűbiopsziával nyert prosztata mintákból.  
UroOnkológia III.61-54,2006
8. **Nagy B**.: Molekuláris genetikai diagnosztika.  
Orvosképzés LXXXI. 262-263,2006
9. **Nagy B**, Szendrői A, Papp Z, Romics I.: c-myc mRNS expresszió meghatározása kvantitatív real-time PCR módszerrel tűbiopsziával nyert prosztata mintákból.  
UroOnkológia IV.12-15.2007.
10. Lázár L, **Nagy B**, Bán Z, Nagy GyR, Beke A, Papp Z.: Noninvazív magzati Rh-meghatározás real-time PCR-módszerrel.  
Orvosi Hetilap 148;497-500,2007
11. **Nagy B**, Lázár L, Nagy GR, Bán Z, Papp Z.: *Toxoplasma gondii* kimutatása magzatvízből kvantitatív valósídejű PCR módszerrel.  
Orvosi Hetilap 148;935-938,2007

12. **Nagy B**, Hupuczi P, Szabó G, Rigó B, Papp Z.: A metiléntetrahidrofolát-reduktáz(MTHFR) C677T mutáció kimutatása kvantitatív valósídejű PCR módszer alkalmazásával HELLP szindrómás betegek mintáiban.  
Magyar Nőorvosok Lapja 70;171-175,2007
13. Lázár L, Harmath Á, **Nagy B**, Bán Z, GyR, Nagy, Papp Z.: Anyai eredetű DNS kimutatása kora- és érett újszülöttek perifériás keringésében.  
Magyar Nőorvosok Lapja 70;97-100,2007
14. Lázár L, **Nagy B**, Molvarec A, Rigó J Jr.: A vérplazma összes szabad DNS, valamint szabad magzati DNS mennyisége praeclampsiával szövődött és szövődménymentes terhességek esetében.  
Orvosi Hetilap 251;784-787,2010
15. Várkonyi T, Than NG, Rigó J. Jr, **Nagy B.**: Leptin receptor (LEPR) egynukleotidos polimorfizmusának meghatározása HELLP szindrómával szövődött terhességekben.  
Magyar Nőorvosok Lapja 73;219-224,2010
16. **Nagy B**, Molvarec A, Hupuczi P, Rigó J Jr.: Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) egynukleotidos polimorfizmusának meghatározása HELLP szindrómával szövődött terhességekben.  
Magyar Nőorvosok Lapja 74;2-6,2011
17. **Nagy B**, Szendrői A, Romics I.: A c-myc mRNS expresszió meghatározása kvantitatív valósídejű PCR-módszerrel tübiopsziával nyert prosztatamintákból.  
UroOnkológia IX:5-8,2012
18. Lázár L, Nagy GyR, Rigó J Jr, **Nagy B.**: Magzati aneuploidiák szabad nukleinsav-alapú, nem invazív diagnosztikája.  
Orvosi Hetilap 153:1687-1691,2012

## c. Az értekezést megalapozó könyvek, könyvfejezetek jegyzéke:

1. Lázár L, Bán Z, **Nagy B**, Beke A, Rigó J, Papp Z.: Sex determination by the detection of SRY region with real time PCR in maternal plasma. In: Papp Z, Rodeck C (szerk.) Recent Advances in Prenatal Genetic Diagnosis: Collection of works presented at the 12th International Congress on Prenatal Diagnosis and Therapy. Bologna: Medimond Monduzzi Editore, ISBN:88-7587-061-6; 2004. p 51-54.
2. Bán Z, **Nagy B**, Papp Cs, Lázár L, Beke A, Nagy GyR, Szigeti Zs, Papp Z.: Detection of fetal aneuploidies by amino-PCR. In: Kurjak A, Chervenak FA (szerk.) Proceedings of the 7th World Congress of Perinatal Medicine: Zagreb, Croatia, September 21-24, 2005. Bologna: Medimond Monduzzi Editore, ISBN:88-7587-179-5, 2005. p 233-236.
3. Nagy Gy R, Lázár L, **Nagy B**, Rigó J. Jr.: Amniotic fluid is a suitable source for whole genome microarray analysis: In: Nagy B, Lázár L, Hahn S, Rigó J Jr (szerk.) 1st Central-Eastern European Symposium on Free Nucleic Acids in Non-Invasive Prenatal Diagnosis. Program and Proceedings, Budapest, Semmelweis Egyetem, ISBN: 978-963-9129-73-3, 2010. p 57-63.
4. Lázár L, Nagy GyR, **Nagy B**, Rigó J. Jr.: Other applications of cell free nucleic acids analysis in obstetrical and gynecological diagnostics: In: Nagy B, Lázár L, Hahn S, Rigó J Jr (szerk.), 1st Central-Eastern European Symposium on Free Nucleic Acids in Non-Invasive Prenatal Diagnosis. Program and Proceedings, Budapest, Semmelweis Egyetem,. ISBN: 978-963-9129-73-3, 2010, p 51-56.
5. **Nagy B**, Lázár L, Hahn S, Rigó J. Jr. (szerk.), 1<sup>st</sup> Central-Eastern European Symposium on Free Nucleic Acids in Non-Invasive Prenatal Diagnosis. Program and Proceedings, Budapest, Semmelweis Egyetem, ISBN: 978-963-9129-73-3, 2010
6. **Nagy B**, Lázár L, Rigó J. Jr.(Szerkesztők): Prenatális molekuláris genetika. Budapest, Semmelweis Kiadó, ISBN 978-963-3311-53-0, 2011
7. **Nagy B**, Lázár L, Bán Z.: A PCR módszeren alapuló molekuláris genetikai vizsgálatok a leggyakoribb kromoszóma rendellenességek kimutatására. In: Nagy B, Lázár L, Rigó J. Jr.(Szerkesztők): Prenatális molekuláris genetika. Budapest, Semmelweis Kiadó, ISBN 978-963-3311-53-0, 2011, p 43-48.
8. **Nagy B**, Harmath Á, Lázár L, Bán Z, Rigó J. Jr.: A cisztás fibrózis és kimutatása In: Nagy B, Lázár L, Rigó J. Jr.(Szerkesztők): Prenatális molekuláris genetika. Budapest, Semmelweis Kiadó, ISBN 978-963-3311-53-0, 2011, p 49-55.
9. Lázár L, **Nagy B**, Nagy Gy R, Rigó J. Jr.: A nem-invazív prenatális diagnosztika lehetőségei. In: Nagy B, Lázár L, Rigó J. Jr.(Szerkesztők): Prenatális molekuláris genetika. Budapest, Semmelweis Kiadó, ISBN 978-963-3311-53-0, 2011, 158-174.
10. Bán Z, Lázár L, **Nagy B**.: Preimplantációs genetikai diagnosztika. In: Nagy B, Lázár L, Rigó J. Jr.(Szerkesztők): Prenatális molekuláris genetika. Budapest, Semmelweis Kiadó, ISBN 978-963-3311-53-0, 2011, 150-157.

**7. A FŐBB SCIENTOMETRIAI ADATOK ÖSSZEFOGLALÁSA**

<b>Folyóiratcikkek száma:</b>	<b>163</b>
<b>Az összes folyóiratcikk kumulatív impakt faktora (<math>\Sigma</math>IF):</b>	<b>235,1</b>
<b>A PhD fokozat megszerzését követően megjelent közlemények impakt faktora (<math>\Sigma</math>IF):</b>	<b>201,3</b>
<b>Az értekezést megalapozó <i>in extenso</i> közlemények impakt faktora:</b>	<b>112,398</b>
<b>Az elsőszerzős közlemények száma:</b>	<b>42</b>
<b>Az utolsó szerzős közlemények száma:</b>	<b>18</b>
<b>Az összes hivatkozások száma:</b>	<b>1850</b>
<b>Független hivatkozások száma:</b>	<b>1565</b>
<b>Hirsch index:</b>	<b>23</b>
<b>Szerkesztett könyvek száma:</b>	<b>2</b>
<b>Könyvfejezetek száma:</b>	<b>9</b>

## 8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönetemet fejezem ki Prof. Rigó Jánosnak, a Semmelweis Egyetem I.Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika igazgatójának munkámhoz nyújtott támogatásáért.

Köszönettel tartozom a klinika előző igazgatójának, Prof. Papp Zoltánnak, aki a klinikán bevezette a prenatális genetikát, a genetikai vizsgálatokhoz és kutatásokhoz szükséges tárgyi feltételeket megteremtette.

A klinikára való felvételem idején Prof. Csömör Sándor volt a klinika igazgatója és Gimes Rezső egyetemi docens vezette az akkor induló szervezeten kívüli megtermékenyítés programot. Mindkettőjüknek köszönöm, hogy bevezettek az egyetemi életbe és a klinikai kutatásba.

A Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika igazgatójának, Prof. Karádi Istvánnak, az MTA levelező tagjának a lipoproteinekkel kapcsolatos közös munkáink során nyújtott támogatásáért köszönettel tartozom. A Semmelweis Egyetem Urológiai Klinika volt igazgatójának, Prof. Romics Imrének köszönöm a prosztata tumorok genetikai vizsgálata során nyújtott hatékony segítségét.

Köszönet illeti az I.Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Genetikai Laboratóriumának és Genetikai Tanácsadásának minden volt és jelenlegi munkatársát, valamint a klinika összes munkatársát a munkámhoz bármilyen formában nyújtott segítségéért. Kiemelem Dr. Papp Csaba, Dr. Tóth-Pál Ernő, Dr. Beke Artúr, Dr. Bán Zoltán, Dr. Lázár Levente és Dr. Nagy Gyula Richárd kollegáimat, akikkel szoros kapcsolat alakult ki az együtt töltött időszak alatt. Köszönöm a Terhességi Hipertónia Munkacsoportból Dr. Molvarec Attila és Dr. Szabó Gábor együttműködését.

Köszönöm Dr. Becságh Péternek és Vizi Tímeának, a Roche Magyarország Kft. munkatársainak a technikai segítségét.

Köszönet illeti Prof. Csákó Györgyöt és Prof. Roland Elin-t, az amerikai National Institutes of Health, Clinical Center, Department of Clinical Pathology munkatársait (Bethesda, MD, USA), akik bevezettek a molekuláris genetikába és a modern műszerek világába.

A Helsinki Egyetemen eltöltött időszak alatt Prof. Sakari Knuutila és munkatársai biztosították a valós idejű PCR, a microarray és az összehasonlító gén vizsgálatok (CGH), valamint a klinikai molekuláris onkológiai vizsgálatok elvégzéséhez szükséges feltételeket.

A "szabad" nukleinsav vizsgálatok és a Közép-Kelet Európai Társaság munkájában és kongresszusainak megszervezésében sokat segítettek a következő kutatók: Prof. Sinuhe Hahn (University of Basel), Prof. Gordan Lauc (University of Zagreb), Prof. Jirzy Santavy, Prof. Ishraq Dhaifallah (Palacky University, Olomouc), Prof. Jan Danko (Comenius University, Martin), Prof. Pavol Zubor (Comenius University, Martin), Prof. Eva Brojer (National Blood Institute, Warsaw).

Köszönöm Prof. Hakan Savli-nak, a Kocaeli Egyetem Orvosi Genetikai Intézet igazgatójának barátságát és a tízéves gyümölcsöző együttműködésünket.

Minden tudományos és klinikai érdeklődés és lehetőség kevés lett volna családom nélkül. Szüleim támogattak, lehetővé tették a továbbtanulásomat. Feleségemnek nemcsak a nyugodt családi háttért, valamint Bálint és Balázs fiaimat köszönhetem, hanem az elmúlt 30 év alatt türelemmel és lelkiismeretesen átolvasta, nyelvileg lektorálta magyar és angol nyelvű kézirataimat.