

dc_254_11

MTA Doktora Pályázat

Disszertáció

A valósídejű PCR módszer alkalmazása a klinikai genetikai gyakorlatban

Dr. Nagy Bálint



Budapest

2014

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
1. ELŐZMÉNYEK ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
1.1. Történeti áttekintés	9
1.2. A PCR módszeren alapuló eljárások fejlődése	10
1.2.1. PCR és elektroforézis	10
1.2.2. PCR-RFLP módszer	12
1.2.3. Fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis	12
1.2.4. Valósídejű PCR	14
1.2.4.1. A valósídejű PCR kémiaja	17
1.2.4.1.1. A DNS-hez kapcsolódó festékeken alapuló kimutatás	18
1.2.4.1.2. Szekvencia specifikus oligonukleotid próbák	19
1.2.4.2. Mennyiségi meghatározások	27
1.2.4.3. A valósídejű PCR alkalmazási területei	28
1.2.4.3.1. Klinikai mikrobiológiai alkalmazás	28
1.2.4.3.1.1. A <i>Toxoplasma gondii</i> kimutatása	30
1.2.4.3.1.1.1. A kórokozó	30
1.2.4.3.1.1.2. A kongenitális toxoplazmózis	30
1.2.4.3.1.1.3. A <i>T. gondii</i> diagnosztizálása	32
1.2.4.3.2. SNP meghatározás	34
1.2.4.3.2.1. Számbeli kromoszóma rendellenesség kimutatása	35
1.2.4.3.2.2. Egynukleotidos polimorfizmus és a betegségek kialakulása közötti összefüggés. A VEGF polimorfizmus és a terhességi patológia	37

1.2.4.3.3.	Deléció kimutatása (<i>ΔF508</i>)	38
1.2.4.3.4.	Génexpresszió meghatározás (CD24)	41
1.2.4.3.5.	„Szabad” nukleinsav meghatározás	43
2.	CÉLKITŰZÉSEK	48
2.1.	A mikrobiális genom kimutatása	48
2.2.	Egynukleotidos polimorfizmusok (SNP) kimutatása	48
2.2.1.	A 21-es kromoszóma triszómiájának meghatározása	48
2.2.2.	Egynukleotidos polimorfizmus meghatározása A <i>VEGF</i> <i>G+405C</i> , <i>C-2578A</i> , <i>C-460T</i> polimorfizmus meghatározása HELLP szindrómás terhesek mintáiban	48
2.3.	Deléció kimutatása, a cisztás fibrózist okozó <i>ΔF508</i>	49
2.4.	Génexpresszió kimutatása	49
2.5.	Magzati „szabad” DNS kimutatása anyai szérumból	49
3.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	50
3.1.	A mikrobiális genom kimutatása, <i>Toxoplasma gondii</i>	50
3.1.1.	Beteganyag	50
3.1.2.	Meghatározási módszerek	50
3.1.2.1.	Hagyományos PCR	50
3.1.2.2.	Fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis	51
3.1.2.3.	Valósídejű PCR módszerrel történő kimutatás SYBRGreen I módszerrel	51
3.1.2.4.	Valósídejű PCR módszerrel történő kimutatás primer-próba rendszerrel	52
3.2.	Egynukleotidos polimorfizmus kimutatása	53
3.2.1.	A 21. kromoszóma triszómiájának meghatározása	53
3.2.1.1.	Beteganyag	53

dc_254_11

3.2.1.2.	A WIAF 898 és WIAF 2643 meghatározása valósídejű PCR és olvadási görbe analízissel	53
3.2.1.3.	Statisztikai kiértékelés	55
3.2.2.	<i>VEGF C-2578A, C-460T, G+405C</i> polimorfizmus meghatározása HELLP szindrómás terhesekben	55
3.2.2.1.	Beteganyag	55
3.2.2.2.	DNS izolálás	57
3.2.2.3.	<i>VEGF C-2578A, C-460T, G+405C</i> polimorfizmus meghatározása	57
3.2.2.4.	Statisztikai kiértékelés	57
3.3.	Deléció kimutatása, <i>ΔF508</i>	59
3.3.1.	Beteganyag	59
3.3.2.	Fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis	59
3.3.3.	Valósídejű PCR és olvadási görbe analízis	60
3.4.	Génexpresszió kimutatása, a <i>CD24</i> expresszió meghatározása	61
3.4.1.	Beteganyag és minták	61
3.4.2.	RNS izolálás és cDNS szintézis	62
3.4.3.	A <i>CD24</i> meghatározása valósídejű PCR módszerrel	63
3.4.4.	Statisztikai kiértékelés	65
3.5.	Magzati „szabad” DNS kimutatása anyai szérumból	65
3.5.1.	Beteganyag, minták és DNS izolálások	65
3.5.2.	Az <i>SRY</i> gén meghatározása valósídejű PCR módszerrel	65
3.5.3.	Az <i>RhD</i> gén meghatározása valósídejű PCR módszerrel	66

4.	EREDMÉNYEK	68
4.1	<i>Toxoplasma gondii</i> kimutatási módszereinek összehasonlítása	68
4.1.1.	Hagyományos PCR	68
4.1.2.	Fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis	69
4.1.3.	Valósídejű PCR SYBRGreen I módszerrel	70
4.1.4.	Valósídejű PCR primer-próba rendszerrel	70
4.2	Egynukleotidos polimorfizmus meghatározása valósídejű PCR módszerrel	73
4.2.1.	A 21. kromoszóma triszómiájának meghatározása	73
4.2.2.	A VEGF egynukleotidos polimorfizmusa HELLP szindrómás és egészséges terhesek mintáiban	75
4.3.	Deléció kimutatása ($\Delta F508$)	81
4.3.1.	A $\Delta F508$ kimutatása fluoreszcens PCR-ral és DNS fragmens analízissel	81
4.3.2.	A $\Delta F508$ kimutatása valósídejű PCR-ral	81
4.4.	CD24 expresszió meghatározása	85
4.4.1.	CD24 expresszió meghatározása egészséges és préeklampsziás placentákban	85
4.4.2.	CD24 expresszió meghatározása prosztata tumoros és benignus prosztata hiperpláziás mintákban	86
4.5.	„Szabad” nukleinsav meghatározások	88
4.5.1.	SRY gén meghatározása anyai vérből izolált szabad magzati DNS-ből	88

4.5.2.	RhD gén meghatározása anyai vérből izolált „szabad” magzati DNS-ből	89
5.	MEGBESZÉLÉS	90
5.1.	A <i>T. gondii</i> kimutatása	90
5.2.	Egynukleotidos polimorfizmus kimutatása	94
5.2.1.	A 21. kromoszóma triszómiájának kimutatása	94
5.2.2.	A VEGF C-460T, C-2578A és G+405C polimorfiz- musok meghatározása HELLP szindrómás terhesekben	96
5.3.	Deléció kimutatása valósídejű PCR módszerrel	98
5.4.	Gén expresszió meghatározás	100
5.5.	„Szabad” nukleinsavak kimutatása	103
6.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	109
7.	IRODALOMJEGYZÉK	111
8.	A DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁBAN MEGJELENT SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	134
9.	A FŐBB SCIENTOMETRIAI ADATOK ÖSSZEFOGLALÁSA	144
10.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	145

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

aCGH: arraykomparatív 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

FRET: fluorescens energy resonance transfer

hCG: humán chorion gonadotropin

HELLP szindróma: hemolízis, emelkedett májenzimek, csökkent
vérlemezkeszám szindróma

HLA: humán leukocita 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

dc_254_11

miRNS: mikroRNS

MTHFR: metiléntetrahydrofolát-reduktáz enzim

NK sejt: természetes ölósejt

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. ELŐZMÉNYEK ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Történeti áttekintés

A kémia, a biokémia és a molekuláris biológia legújabb eredményei valamint az egyre korszerűbb laboratóriumi eszközök lehetővé teszik az új diagnosztikai módszerek rohamos elterjedését.

A molekuláris biológia és diagnosztika fejlődésének lendületet adott az 1970-es évektől kezdődően a restrikciós endonukleáz és a reverz transzkriptáz enzimek bevezetése, a Southern blotting, a Northern blotting és a DNS szekvenáló módszerek kidolgozása. A széleskörű alkalmazást a polimeráz láncreakció (PCR) felfedezése és leírása idézte elő [Saiki és mtsai, 1985; Mullis és Faloona 1987]. A felhasználási lehetőségek nagyon tágak, és még napjainkban is folyamatosan bővülnek. A módszer elterjedését a PCR során használt enzimek minőségének javulása, a „hot-start” bevezetése, azaz a polimeráz-enzim ellenanyaggal történő védelme, a thermal cycler készülékek minőségének fejlesztése, és a valósidejű PCR bevezetése tette lehetővé.

A kezdeti diagnosztikai tesztekkel emberi mintákból, elsődlegesen a fehérvérsejtekből és a magzatvízsejtekből izolált DNS-t vizsgálták. Később, főleg a rákkutatásban, a vérmintákat, a citológiai keneteket és a szövetmintákat is felhasználták. A módszerek fejlődésével a vizsgálandó minták köre is folyamatosan nő, a sejtek és szövetek mellett napjainkban már magába foglalja a „szabad” nukleinsavak (DNS, RNS, miRNS), vagy akár egyetlen sejt (vagy blasztomer) vizsgálatát is.

A primerek és próbák rendszerei is folyamatosan változnak. A hagyományos primerek mellett a fluoreszcens festékekkel történő jelölés sokszorosára növelte a kimutatási érzékenységet. A jelölt próbák beillesztése a primerek közé javította specificitást. A felhasznált próbák kémiája egyre bővül, újabb és újabb alkalmazási lehetőségek nyílnak meg.

1.2. A PCR módszeren alapuló eljárások fejlődése

A polimeráz láncreakciót *Kary Müllis* és munkatársai írták le 1985-ben [*Saiki és mtsai*, 1985], ez a módszer forradalmasította a tudományos kutatási és a diagnosztikai eljárásokat. E felfedezés elismeréseként 1993-ban a kutatót Nobel-díjjal tüntették ki.

Az eljárás lényege, hogy bármely nukleinsav szekvencia rész, amely jelen van a kiindulási mintában megsokszorozható a polimeráz enzim segítségével a hőmérséklet megfelelő ciklusos változtatásával.

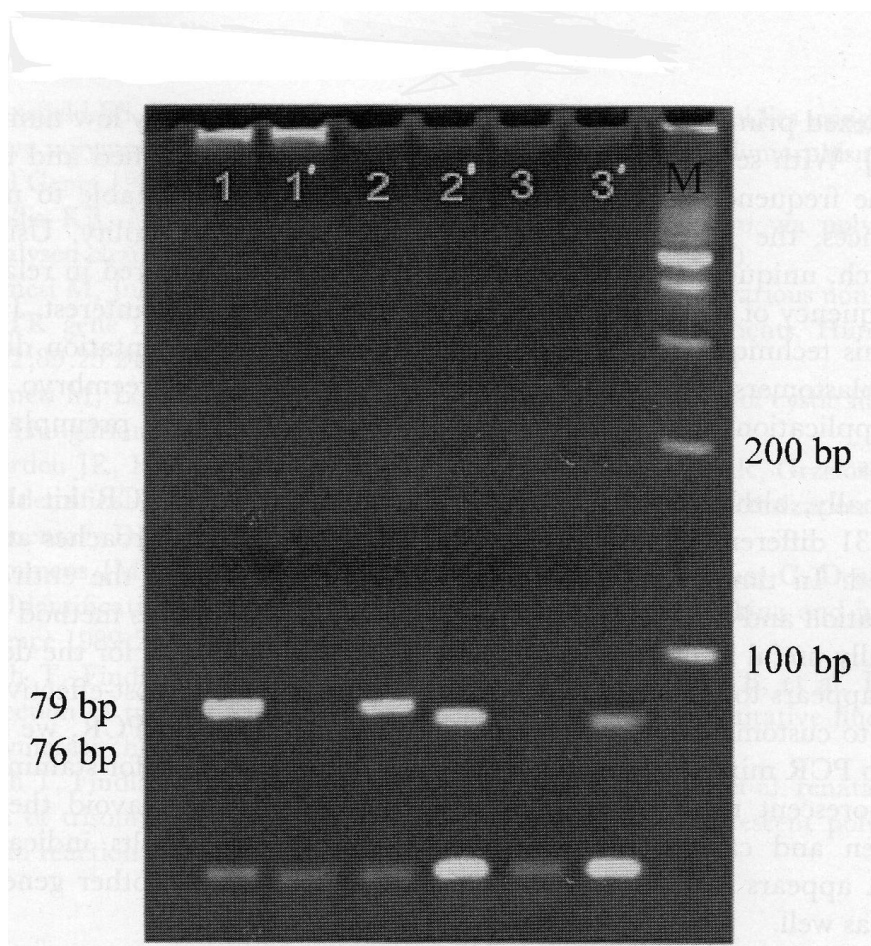
A PCR elvégezhető a DNS molekulán oligonukleotid primerek, dNTP, hőstabil polimeráz és kofaktorok, mint például magnézium vagy mangán ionok jelenlétében a hőmérséklet ciklusos változtatásával. A DNS kettős spirál szétválasztásához magas hőfok szükséges, majd a mintát le kell hűteni a megfelelő bekapcsolódási hőmérsékletre, hogy a primerek kapcsolódni tudjanak a komplementer szekvenciához. Ezt követően a mintát 72 °C-ra melegítve a polimeráz enzim dNTP beépítésével meghosszabbítja a bekapcsolódott primerek után következő szekvenciát.

Az egyes alkalmazások során számos problémát le kellett küzdeni. A tanulmányozandó rész megsokszorozása, majd annak elválasztása a kiindulási mintától az elmúlt húsz év alatt sokat fejlődött.

1.2.1. PCR és elektroforézis

A PCR a leggyakrabban alkalmazott eljárás a molekuláris biológiával foglalkozók körében. A legegyszerűbb módszer a gélelektroforézis, a PCR-t követően a keletkezett termék méret szerint elválasztható a gélen, majd a gél megfestését követően kiértékelhető a mutakozó sávok alapján [*Vogelstein és Gillespie*, 1979]. Előnye az egyszerűsége, hátránya viszont, hogy ezen

felhasználás során nem lehetséges a kiindulási termék mennyiségének a meghatározása, mivel végpont meghatározás történik [Whitman és Dunbar, 2008]. Az 1. sz. képen a $\Delta F508$ kimutatása látható PCR-t követő elektroforézis, majd etidiumbromid festés után.



1. sz. kép

A $\Delta F508$ kimutatása hagyományos PCR módszerrel

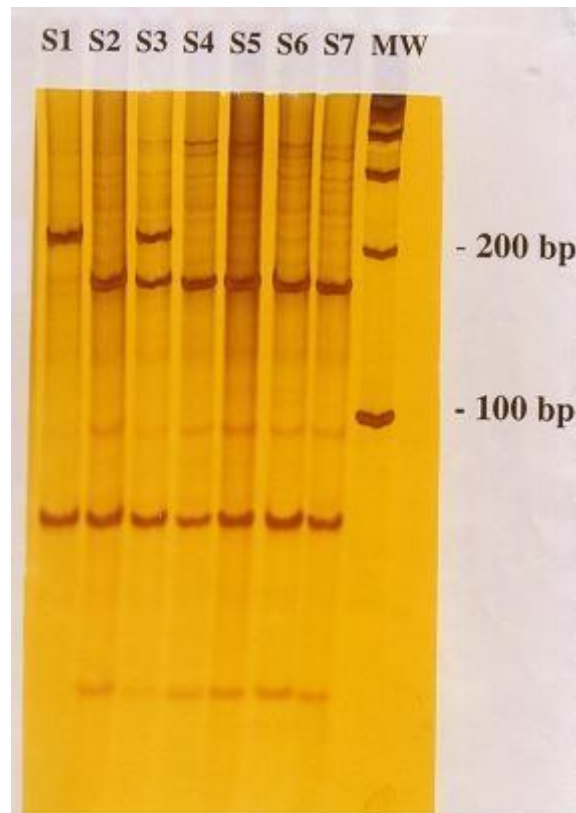
A specifikus primerekkel történő PCR után elektroforézis következett, majd a gél etidiumbromiddal lett megfestve. Az. 1. sz. sávban az egészséges egyedből származó mintából keletkezett PCR termék (79 bp) látható, az 1' sz. sávban nem keletkezett PCR termék. A 2. sz. sávban a heterozigóta mintából származó 79 bp PCR termék és a 2' sz. sávban a 76 bp PCR termék látható. A 3. sz. sávban lévő $\Delta F508$ homozigóta minta esetében nincs amplifikáció, a 79 bp nagyságú PCR fragmentum nem mutatkozik, míg a 3' sávban a 76 bp nagyságú termék jól látható. Az M jelű sávban a molekulásúly marker található. (Nagy B. és mtsai, 1999)

1.2.2. PCR-RFLP

A módszer négy lépésre tagolódik, a PCR során a kívánt részek megsokszorozódnak, ezt követi a szekvencia specifikus restrikciós endonukleáz enzimmel emésztés, majd a keletkezett fragmentumok szétválasztása elektroforézissel, végül festéssel láthatóvá tétele [Felley-Bosco és mtsai, 1991; Pourzand és Cerutti, 1993]. Ezzel a technikával különböző mutációk és polimorfizmusok mutathatók ki. Ez a módszer a 90-es években széles körben elterjedt, napjainkban átveszi szerepét a szekvencia specifikus próbák alkalmazása és a valós idejű PCR. A 2. sz. képen a metiléntetrahidrofolát-reduktáz C677T polimorfizmusának kimutatása látható PCR-RFLP módszerrel.

1.2.3. Fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis

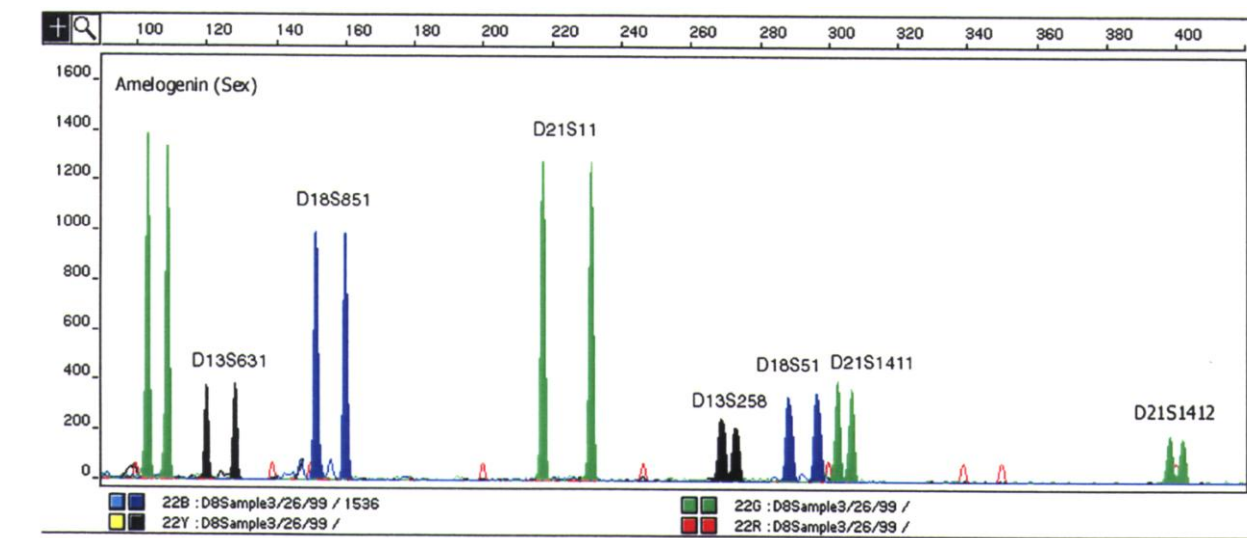
A módszer lényege, hogy a PCR során az alkalmazott primer pár egyik tagját fluoreszcens festékkel jelölik, ez a jelölés nagymértékben megnöveli a kimutatási érzékenységet. Ez a változtatás lehetőséget nyújt a PCR termékek korszerűbb elválasztására is, azaz a PCR-t követően a keletkezett fragmentumokat kapilláris elektroforézissel elválasztják, méret és szín alapján lézer detektorral leolvassák [Mansfield, 1993; Adinolfi és mtsai, 1997; Tóth és mtsai, 1998a;1998b]. Különböző fluoreszcens festékeket használnak, ezek kombinációival lehetővé válik multiplex PCR végzése. A 3. sz. képen a leggyakoribb számbeli kromoszóma rendellenességek kimutatása látható fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis módszerrel.



2. sz. kép

A metiléntetrahidrofolát reduktáz *C677T* polimorfizmus kimutatása PCR-RFLP módszerrel, *HinfI* enzimmel történő emésztéssel

Az S1 jelölésű sávban egy *C677T* homozigóta normál *CC* (198 bp nagyságú fragmentum), az S2, S4, S5, S6 és S7 jelölésű sávban homozigóta *TT* mutáns (175 bp nagyságú fragmentum), az S3 jelölésű sávban egy *CT* heterozigóta minta látható (198 és 175 bp nagyságú fragmentum). A poliakrilamid gélben megfuttatott PCR termékek az elektroforézist követően ezüstnitráttal lettek megfestve. Az MW jelölésű oszlopban a molekulásúly marker látható (Nagy B. és mtsai, 2007a).



3. sz. kép

A leggyakoribb számbeli kromoszóma rendellenességek kimutatása fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízissel

A képen egy egészséges fiú magzat mintájának elektroforetogramja látható. A minta a leggyakoribb számbeli kromoszóma rendellenességek kimutatására alkalmazott STR markerekkel diallélikusnak mutatkozott. Az elektroforetogramon a fragmentumok a molekulasúlyuknak és az alkalmazott fluoreszcens jelölésnek megfelelően választódtak el (Nagy B. és mtsai, 2011b).

1.2.4. Valósídejű PCR

A hagyományos PCR során a keletkező PCR terméket (amplikon) végpont analízissel mérik a reakció sorozat befejezése után, így a kiindulási kópiaszám nem számítható ki, ellentétben a valósídejű PCR-ral, ahol minden egyes ciklus után a keletkező termék meghatározható. A módszer tulajdonképpen a thermal cycler és egy fotométer készülék kombinálása. A keletkezett PCR termék mennyiségét minden egyes PCR ciklus után fluoreszcens festék, vagy próbák felhasználásával lehet meghatározni. A

készülék két részből áll, az egyik a hőmérséklet ciklusos változtatását, a másik pedig a fluoreszcens szignál mérését biztosítja az egyes PCR ciklusokat követően. A kívánt termék megsokszorozása után bizonyos jelölések esetén lehetőség van az olvadási görbe analízis program elvégzésére, amellyel a keletkezett termékek pontosan beazonosíthatók, ez az olvadási hőmérséklet (T_m) mérésével lehetséges [Lee és mtsai, 2010]. Ennek az eljárásnak még az is az előnye, hogy a PCR-t befolyásoló faktorok is nagyon jól tanulmányozhatók (mint a primer, próba és a magnézium koncentrációi, valamint a primer kötődés, az annealing hőmérséklet és az idő hatása), tehát az egyes paraméterek beállítása nyomon követhető, jól látható, hogy az egyes faktorok változtatása mit okoz. Az optimalizálás fontos kritériumai a specificitás, a szenzitivitás, a hatékonyság és a reprodukálhatóság biztosítása [Edwards és Logan, 2009].

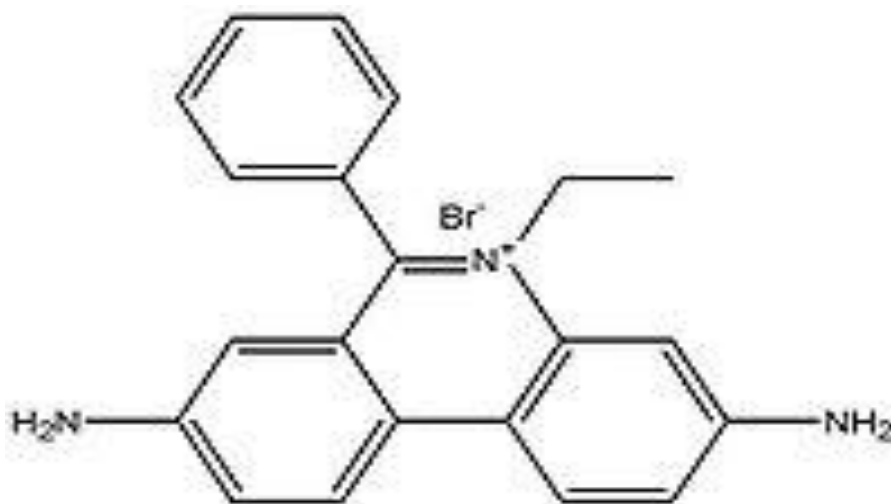
Nagyon sokféle thermal cycler készülék került forgalomba az idők során, és az alkalmazott kémia is sokat változott. A legismertebb készülékek közé tartozik a LightCycler, amelynek első változata 1998-ban került forgalomba. Ezt követték az 1.5 és 2.0 variánsai, valamint a LightCycler 480, de elterjedtek az Applied Biosystems (ABI 7300; 7500; 7900; ABI StepOne), a Bio-Rad (MiniOpticon; MyiQ; Opticron2; Chromo4; IQ5), az Eppendorf (Mastercycler ep realplex), a Stratagene (Mx400; Mx3000p; Mx3005P) készülékei is [Edwards és Logan, 2009].

Az olvadási görbe analízis bevezetése lehetővé teszi a mutációk és a polimorfizmusok elkülönítését a PCR-t követően, a minta további laboratóriumi módszerrel való feldolgozása nélkül.

A PCR-t a számtalanszor idézett *Saiki és mtsai* [1985] által közölt cikket megelőzően, már tulajdonképpen 1971-ben leírták, *Kleppe és mtsai* alkalmazták először a DNS polimerázt és az oligonukleotid primereket a kiindulási szekvencia megsokszorozására [Kleppe és mtsai, 1971].

Saiki és mtsai-nak az automatizált DNS szintetizáló készülékek megjelenésével 1988-ban már könnyebb dolga volt, módszerük elterjedését az oligonukleotid szintézis egyszerűsödése is nagyban segítette. Addig, amíg minden egyes lépés után friss DNS polimerázt kellett a mintákhoz adni, nagyon bonyolult volt az eljárás, 1988-ban a hőstabil enzim megjelenésével a módszer felhasználása hatalmas lendületet kapott [Saiki és mtsai, 1988].

Kezdetben az egyidejű amplifikáció és a specifikus szekvenciák kimutatása etidiumbromid hozzáadásával volt lehetséges. Ez azon alapult, hogy az etidiumbromid a kettősszalú DNS-hez kapcsolódik, és UV fény hatására fluoreszkál [Higuchi és mtsai, 1992, 1993]. A 1. sz. ábrán a molekula szerkezeti képlete látható. A DNS 260 nm, a hozzá kapcsolódott fluoreszcens festék 300 nm illetve 360 nm hullámhossznál rendelkezik elnyelési maximummal, amely a gerjesztés hatására a látható tartományban bocsát ki fényt (590 nm, narancspiros). A fluoreszcens szignál növekedése mutatja a keletkező PCR termékek mennyiségének növekedését.



1. sz. ábra

Az etidiumbromid molekula szerkezete

A gyártók is felismerték a valósídejű PCR módszerben rejlő lehetőségeket, az Applied Biosystems először az ABI Prism 7700 Sequence Detection System készüléket hozta forgalomba. Ezt követte az Idaho Technology LightCycler készüléke, amit a Roche Diagnostics később megvásárolt. A két készülék elviekben is különböző, a LightCycler egy 32 kapilláris befogadására alkalmas karusszelt tartalmaz, amelyben a PCR-hoz szükséges keveréket tartalmazó kapillárisok helyezhetők el. Az üvegkapilláris a gyors hőfelvételt és leadást segíti elő. A készülék a hőmérséklet-változtatást a levegő áramoltatásával valósítja meg.

Az ABI Prism 7700 készülék nagyobb mintaszámot fogad be, egy 96 helyes műanyaglemez helyezhető a készülékbe, amely a hagyományos blokk típusú hőleadással és felvétellel működik.

A két készüléket összehasonlítva megállapítható, hogy a LightCycler rendkívül gyors ciklusokat tesz lehetővé a levegővel történő hűtés-fűtésnek köszönhetően, de alacsonyabb az egyszerre vizsgálható minták száma.

Nem csak a készülékek fejlődtek, bővült a reagensek választéka is. Újabb és újabb enzimek, PCR keverékek és adalékok kerülnek a piacra.

A hagyományos PCR során a keletkezett amplikon méretét egyszerű és biztonságos módszerrel, elektroforézissel történő elválasztás után határozták meg. Azonos méret esetén, vagy egy bázispár különbség kimutatására nem volt lehetőség, ezt a valósídejű PCR teremtette meg. Az olvadási görbe analízissel akár egy bázispár különbség is kimutatható az olvadási pont alapján, a próbák megfelelő megtervezésével.

1.2.4.1. A valósídejű PCR kémiaja

Az egyik kulcskérdés, hogy a valósídejű PCR alkalmazása során megvalósítható a keletkező termékek monitorizálása. Az erre a célra alkalmazható molekulákat két csoportba oszthatjuk, az egyik a DNS-hez

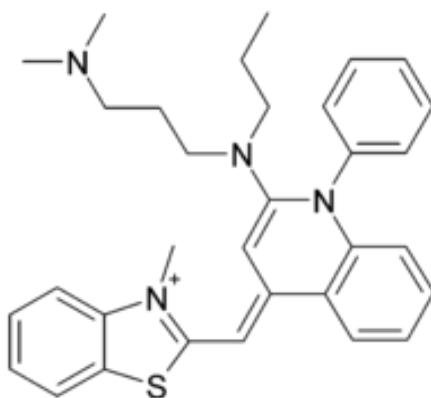
kapcsolódó molekulák, vagy más néven a nem-szekvencia specifikus festékek, a másik a fluoreszcens festékekkel jelölt szekvencia specifikus próbák, vagy szekvenciák és ezek variációi [Kubista és mtsai, 2006; Csako, 2006; Lee és mtsai, 2009].

1.2.4.1.1. A DNS-hez kapcsolódó festékeken alapuló kimutatás

A kezdetben alkalmazott etidiumbromidot felváltották a kedvezőbb adottságú molekulák, mint például a SYBRGreen I, amely szintén nem-specifikusan kapcsolódik a kettősszálú DNS-hez [Becker és mtsai, 1996]. A 2. sz. ábrán a molekula szerkezeti képlete látható. Míg az etidiumbromid az oldatban nagyon magas alapjelet ad, addig a SYBRGreen I molekula nagyon gyenge fluoreszcens szignált bocsát ki, de ez ezerszeresére is megnő, ha a DNS-hez kapcsolódik. Használják még a BEBO nevű festéket, amely kevésbé érzékeny, és a BOXTO festéket is [Mao és mtsai, 2006]. Ismertek még a szintén interkaláló cianin festékek, pl. a YO-PRO1 és a thiazole orange (TO). Újabb az EvaGreen (Biotium) festék, amely nagy reményeket kelt, lúgos körülmények között sokkal stabilabb az előzőekben felsorolt vegyszereknél [Mao és mtsai, 2007], nem gátolja a PCR-t, és környezetbarát molekula. Kevésbé ismert, hogy SYBRGreen I erősen mutagén és genotoxikus vegyület. Lecserélése környezetvédelmi szempontból is tanácsos lenne.

A valósídejű PCR során az elegyből érkező fluoreszcens szignál a jelen lévő DNS mennyiségének függvénye. Az egyszerű festékek használatának előnye az olcsóságuk, a primerek nem igényelnek külön jelölést, viszont hátrányuk, hogy kapcsolódásuk nem specifikus, ezáltal a PCR elegyben nemcsak a kívánt termékhez, hanem az összes nem specifikus fragmentumhoz, az összes DNS-hez kötődnek. Másik hátrányuk, hogy nem lehet multiplex reakciót végezni, mivel a PCR termékek fluoreszcens jele nem különíthető el. Az olvadási görbe analízissel a keletkezett termékek azonosítását tudjuk

elvégezni, továbbá a kívánt termék mellett a nem-specifikus termékek, az esetlegesen keletkező primer-dimerek is megfigyelhetők. Primer-dimerek jelenléte esetén módosítani kell a PCR hatékonyságát befolyásoló faktorokon.



2. sz. ábra

A SYBRGreen I molekula szerkezete

1.2.4.1.2. Szekvencia specifikus oligonukleotid próbák

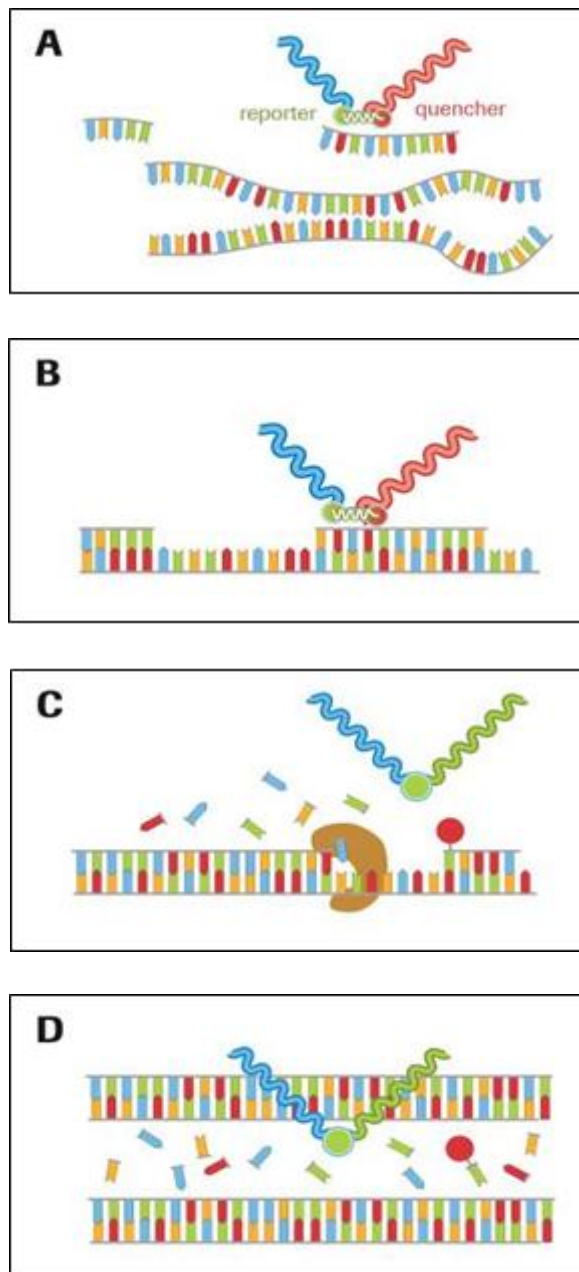
A DNS-hez kapcsolódó festékek mellett a másik nagyobb felhasználási terület a szekvencia-specifikus molekulák, a próbák alkalmazása. A primerek és próbák specifikusan kapcsolódnak a célszekvenciához, tehát a nem-specifikus termékek nem befolyásolják a mennyiségi meghatározást, továbbá több, különböző jelölésű próbával multiplex PCR reakciók is elvégezhetők.

Hidrolízis próba (TaqMan próba)

A hidrolízis próba fluoreszcens festékkel jelölt egyszálú oligonukleotid molekula [Lee és mtsai, 1993; Bassam és mtsai, 1996]. Az első kereskedelmi célból készült valósidejű PCR készülék ezt alkalmazta (Applied Biosystems 7700), talán ezért is terjedt el ilyen jelentős mértékben ez a módszer. A TaqMan próba előnye a magas specificitás és a magas jel-zaj (signal-to-noise) arány, hátránya viszont a magasabb ár. A TaqMan próba kettősen jelölt, az egyik fluoreszcens molekula a próba 5' végén elhelyezkedik „gerjeszthető” (reporter), mellette a párja, a „quencher”, amely blokkolja a „gerjeszthető” jelét. Ezek általában 6 bázispár távolságra találhatók, ez az optimális, ha egymáshoz közelebb kerülnek, az energia átadás nem elég hatékony [Heller és Jablonski, 1987]. A 3. sz. ábrán a TaqMan próbás rendszer működési elve látható.

Ezen alkalmazás során a PCR csak két lépésből áll, a primer bekötődés és a lánchosszabbítás egy hőmérsékleten történik. A TaqMan 5'-nukleáz próba úgy van megtervezve, hogy a Taq polimeráz exonukleáz aktivitása hasítja a próbát, ekkor az enzim 5'-től a 3' irányban szintetizálja meg a komplementer szálát [Holland és mtsai, 1991]. A „gerjeszthető” és a „quencher” így elválik egymástól, ennek eredményeként a fluoreszcencia szignál detektálhatóvá válik, és arányos lesz a mintában lévő amplifikálódott termék mennyiségével. A hasítás következtében a „gerjeszthető” molekula felszabadul a gátló hatás alól, és a ciklusszám növekedésével egyre több fluoreszcens szignál jelenik meg az oldatban. Tehát ez a jelölési rendszer eltér például a FRET-től, hiszen itt a bekapcsolódott TaqMan próba hasítódik a PCR során. Ennél a jelölési rendszernél a reakció végén általában nem lehetséges az olvadási görbe analízis elvégzése.

A TaqMan típusú próbák nagyon széles körben használhatók többek között a különböző mikróbák és allélok meghatározására [Espy és mtsai, 2006].



3. sz. ábra

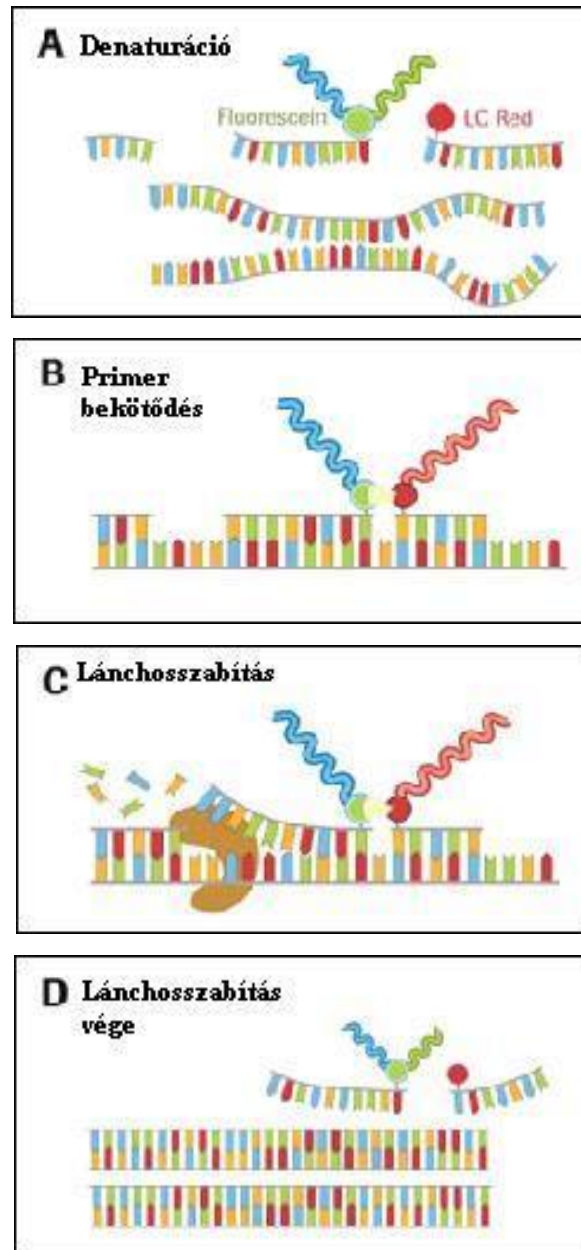
A hidrolízis próbák működési elve

Az ábrán a hidrolízis próbák egymást követő lépései láthatók, A: denaturálás, B: a primer bekötődése, C: lánchosszabbítás, D: a lánchosszabbítás vége. (Roche Magyarország Kft. engedélyével)

Hibridizációs (FRET) próbák

Ez a meghatározási rendszer két specifikus primer mellett még két jelölt oligonukleotid próbát tartalmaz, amelyeket FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) próbáknak, vagy Förster energia transzfernek is neveznek [Cardullo és mtsai, 1988; Clegg 1992; Lee és mtsai, 2009]. A két jelölt próba szekvencia-specifikus bekapcsolódáskor a primer kötődés, az annealing folyamán olyan közel kerül egymáshoz, hogy a fluoreszcens rezonancia energia transzfer a gerjesztettről (donor) a detektáltra (acceptor) végbemehet. A folyamat lényege, hogy a megvilágított donor által a hosszabb hullámhosszon kibocsátott fény a második fluorofor molekula elnyelési tartományába esik, amely gerjesztődik és fényt ad ki, ezt méri a valósidejű PCR készülék fotométere (4. sz. ábra). Ezen a felhasználási területen a PCR reakció három lépésből áll, a lánchosszabbítás lépés végén történik a keletkezett termékek mérése. A PCR során a primerek bekötődésekor a próbák is bekötődnek, annyi, ahány jelölhető termék van jelen, így ciklusról ciklusra növekszik a szekvencia-specifikus jel. Olvadási görbe analízissel lehetőség nyílik a mutációk és polimorfizmusok kimutatására, az 5. sz. ábrán a metiléntetrahidrofolát reduktáz C677T meghatározása látható.

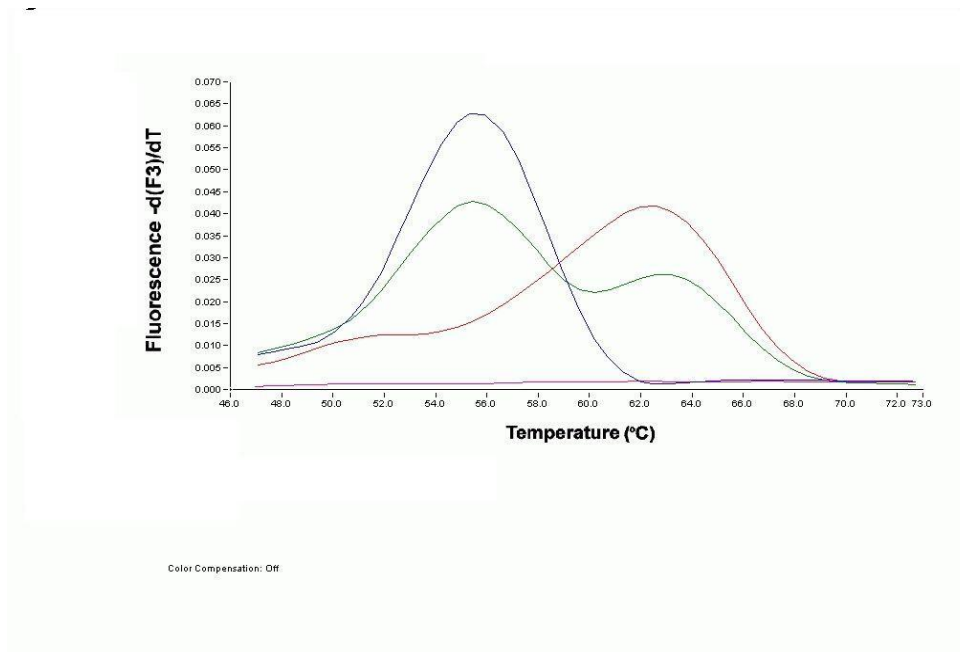
Ez a rendszer alkalmas mennyiségi analízisre, polimorfizmusok, mutációk nagyérzékenységű kimutatására [Kopper és mtsai, 2009; 2011].



4. sz. ábra

A FRET próbák működési elve

Az ábrán a FRET próbák egymást követő lépései láthatók, A: denaturálás, B: primer bekötődés, C: lánchosszabbítás, D: lánchosszabbítás vége (Roche Magyarország Kft. engedélyével).



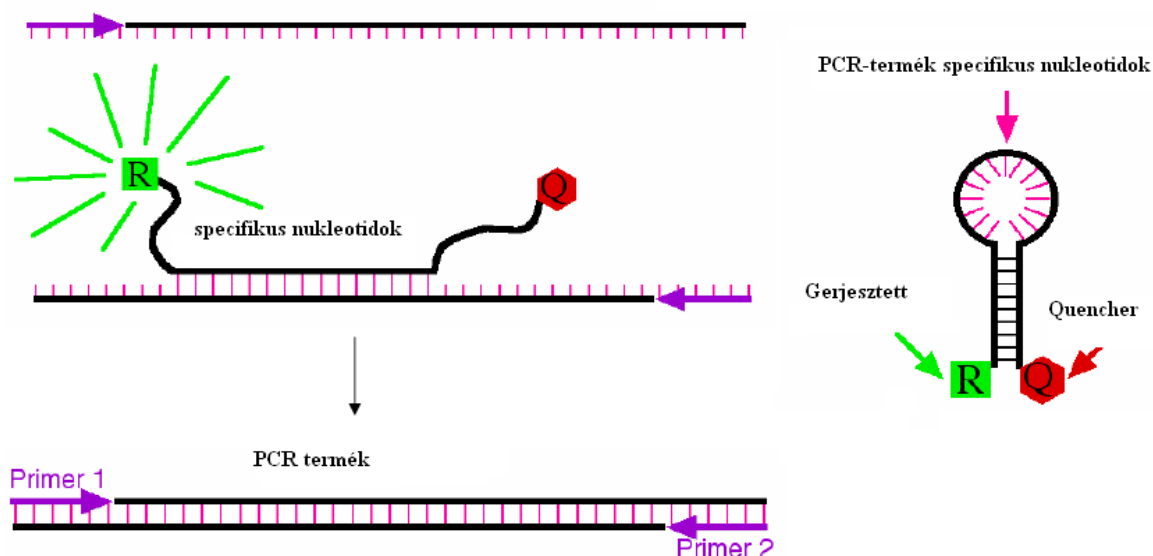
5. sz. ábra

A metiléntetrahidrofolát reduktáz C677T kimutatása primer-próba rendszerrel

Az ábrán egy homozigóta normál (CC)(lila görbe), egy heterozigóta (CT) (zöld görbe) és egy homozigóta mutáns minta (TT) (kék görbe) olvadási görbe analízisének a képe látható [Nagy és mtsai, 2007c].

Molecular Bacon próba

A rendszer a TaqMan próbákhoz hasonló, a „gerjesztett” és párja, a „quencher” fluoreszcens molekulákat tartalmaz, ezek azonban a bekötődés után nem hasítódnak el. Ha a komplementer szekvenciához kapcsolódnak, akkor bekötve kiegyenesednek, így a „quencher” eltávolodik, és a jel kimutatható lesz [Marras és mtsai, 2006]. A 6. sz. ábrán a molecular Bacon típusú próbák működési elve figyelhető meg.



6. sz. ábra

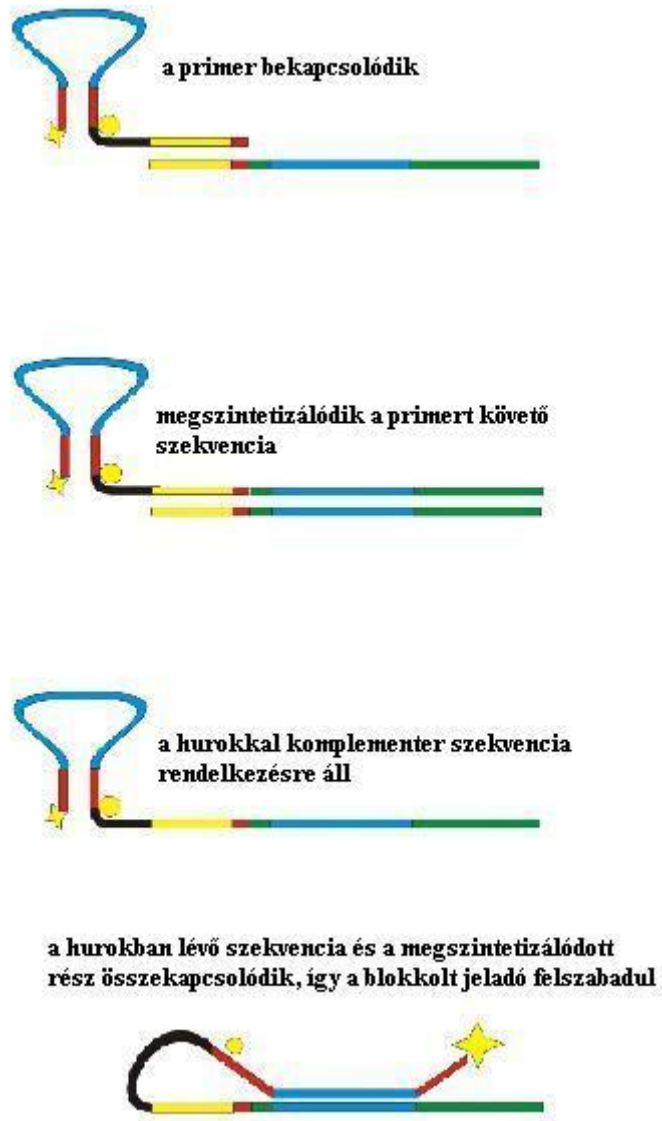
A molecular Bacon típusú próbák működési elve

A „gerjesztett” és a „quencher” egymás mellett helyezkedik el a hurok szárában, a termékspecifikus nukleotidok alkotják a hurkot a komplementer szekvenciához bekapcsolódva, a „gerjesztett” és a „quencher” szétválik, és az előbbi fényt ad ki (Roche Magyarország Kft. engedélyével).

Skorpió próba

Ez a típus az előzőhöz hasonlóan szintén hurkot képez, amely az összetapadt végeivel közrefog egy PCR termékspecifikus szakaszt, és tovább folytatódik egy kovalensen kötött PCR-blokkolón keresztül egy primerrel. Tehát tulajdonképpen egy molecular Bacon és egy primer kombinációja. A primer meghosszabbításakor a másolt szakasz komplementer a hurokban lévő szakasszal, a másolás végén a hurokban lévő szakasz előbújik, és hibridizál a primer meghosszabbított PCR termékére. A blokkoló így eltávolodik a detektálható fluoreszcens molekulától, és jelet ad [Kopper és mtsai, 2009].

A 7. sz. ábrán a skorpió próba működési elve látható. Ezt a próbát K-RAS és EGFR kimutatására alkalmazzák. Az 1. sz. táblázatban a leggyakrabban alkalmazott „reporter” és „quencher” kombinációk figyelhetők meg.



7. sz. ábra

A skorpió próba működési elve

A „gerjesztett” és a „quencher” egymás mellett helyezkedik el a hurok szárában, a termék-specifikus nukleotidok a hurkot alkotják, az meghajolva bekapcsolódik a komplementer szekvenciához, a „gerjesztett” és a „quencher” szétválk, és az előbbi fényt ad ki (Roche Magyarország Kft. engedélyével).

1. sz. táblázat

A leggyakrabban alkalmazott „reporter” és „quencher” kombinációk

Gerjeszthető molekulák	Gátló molekulák
FAM	BHQ1, DABCYL, TAMRA
TET	BHQ1, DABCYL
HEX	BHQ1, BHQ2, DABCYL
TAMRA	BHQ2, DABCYL
Texas Red	BHQ2, BHQ3, DABCYL
ROX	BHQ2, BHQ3, DABCYL
Cy5	BHQ2, BHQ3

1.2.4.2. Mennyiségi meghatározások

A valósídejű PCR abszolút és relatív meghatározásokat tesz lehetővé. A módszer alkalmas a kiindulási és az összes keletkezett termék mérésére.

Abszolút mennyiségi meghatározás

A valósídejű PCR során a mennyiségi meghatározás a ciklusszám és a fluoreszcens szignál mérésével történik, amikor ez utóbbi eléri a ”threshold” szintet, vagy annak második derivatívját. Ez a ciklusszám arányos a mintában lévő eredeti kiindulási kópiaszámmal. Tehát a C_t értékeket összehasonlítva a nukleinsavak mennyisége meghatározható, mivel a C_t érték arányos a mintában található keresett szekvencia mennyiségével. Minél több a kiindulási mintában a célmolekula, annál kisebb a C_t érték.

Egyéb alkalmazási lehetőség például a mintában lévő baktérium, vírus és protozoa számának meghatározása ismert mennyiségű kontrollokhoz viszonyítva.

Relatív mennyiségi meghatározás

Az expressziós arányok összehasonlításával lehetséges a relatív mennyiségi mérés, a meghatározandó gén mellé szükséges egy háztartási gén beillesztése, továbbá ismert kontroll minták beiktatása is. Például, ha tumoros mintában szeretnénk megkapni valamely tumorra jellemző gén expresszióját, akkor ki kell választani egy háztartási gént, amelyhez viszonyítjuk a meghatározandó gén expresszióját. A pontos koncentrációk méréséhez egy ismert DNS tartalmú oldatból készítenek hígításokat, erre a célra leggyakrabban a beta-globin gént használják.

1.2.4.3. A valósídejű PCR alkalmazási lehetőségei

1.2.4.3.1. Klinikai mikrobiológiai alkalmazás

Az első PCR-on alapuló módszerek klinikai mikrobiológiai alkalmazása során a különböző mikróbak kimutatása a PCR-t követő elektroforézissel történt, ami szerény specificitást és szenzitivitást eredményezett. A specificitást Southern blotting módszerrel, szilárd fázisú hibridizációval sikerült megnövelni, amely viszont nagyon idő- és munkaigényes eljárás. A különböző laboratóriumok között a módszer standardizálása is nehézkes volt. Az egész folyamat akár két-három napot is igénybe vett, és nagyobb mennyiségű terméket igényelt.

A PCR-ELISA módszer bevezetése meggyorsította a kimutatást, azonban ez még mindig bonyolult volt, az amplifikált termékekkel való manipuláció megnövelte a PCR-t követő kontamináció lehetőségét, ami a téves pozitív eredmények számában mutatkozott meg. A kvantitatív PCR megteremtése a különböző patogének kimutatását tette lehetővé (2. sz. táblázat).

2. sz. táblázat

Az obligált patogének kimutatása valósídejú PCR módszerrel

Patogének	Irodalom
Gombák	
<i>Melanospóra medusae</i>	<i>Boyle és mtsai, 2005</i>
<i>Synchytrium endobioticum</i>	<i>van den Boogert és mtsai, 2005</i>
Baktériumok	
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Kuoppa és mtsai, 2002</i>
<i>Erlichia species</i>	<i>Doyle és mtsai, 2005</i>
<i>Burkholderia species</i>	<i>Ulrich és mtsai, 2006</i>
<i>Coxiella burnetii</i>	<i>Klee és mtsai, 2006</i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Tobiason és Seifert, 2006</i>
Protozoa	
<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Chabbert és mtsai, 2004</i>

A mikrobiológiai alkalmazásoknál a minőségellenőrzés az egyik kulcskérdés. A megfelelő pozitív és negatív kontrollok beiktatása a vizsgálat elvégzése során rendkívül fontos követelmény. A pozitív kontrollok figyelésével a reprodukálhatóság is nyomon követhető.

A valósidejű PCR bevezetése jelentősen megkönnyítette a fertőzések kimutatását, elősegítette a betegek hatékonyabb kezelését, a kezelés hatékonyságának nyomonkövetését [Espy és mtsai, 2006]. A klinikai genetikai tanácsadásokon gyakran merül fel igény a *Toxoplasma gondii*, a CMV és a rubeola kongenitális fertőzés kimutatására.

1.2.4.3.1.1. A *Toxoplasma gondii* kimutatása

1.2.4.3.1.1.1. A kórokozó

A *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) a protozoonok közé tartozó obligált intracelluláris parazita, amely a toxoplazmózis nevű betegség okozója. Az általa okozott fertőzés gyakran tünetmentes, illetve csak enyhe tüneteket okoz. Rendszertanilag az *Apicomlexa* törzsbe sorolható, melynek tagjaira a polarizált sejt szerkezet a jellemző, a fertőző alakoknál egy ún. apikális komplex figyelhető meg a sejt csúcsi részén, amelynek feladata a gazdaszervezetbe történő behatolás megkönnyebbítése [Dubey és mtsai, 1998; Béládi és Nász, 1993]. Rokonságában több más emberi és állati patogén egysejtű is található, így a *Plasmodium* (malária kórokozója), a *Cryptosporidium* bélparazita, az *Eimeria* (a csirke coccidiózis okozója), vagy a *Sarcocystis*.

1.2.4.3.1.1.2. A kongenitális toxoplazmózis

Terhes nők esetében a parazita a magzatot is megfertőzheti, és súlyos elváltozásokat idézhet elő [Stray-Pedersen, 1993; Wong és Remington, 1994]. Ha az anya a terhessége előtt 4-6 hónappal, vagy még korábban fertőződött meg, akkor az immunrendszer megakadályozza a vertikális transzmissziót [Tenter és mtsai, 2000]. Ezzel szemben, ha a primer fertőzésen a terhessége alatt esik át, a kórokozó a placenta sejtjeit is megfertőzve, majd azokon átjutva a magzatot is megfertőzheti [Wong és Remington, 1994].

Ha a kórokozó a terhesség idején kerül az anya szervezetébe, akkor kb. 40-50% a valószínűsége annak, hogy a kórokozó átjut a méhlepényen. A magzati fertőzés kockázata függ a magzat korától, a 11-14. terhességi héten ez 7,2%, a 31-34. terhességi héten viszont már 67%-ra növekszik [*Vidigal és mtsai*, 2002]. A sejtes és humorális immunitás csak a 9-15. terhességi hét között kezd kialakulni a magzatban, ez a kongenitális toxoplazmózis kialakulását segítheti elő [*Papp*, 1999]. Nehezíti a fertőzés felismerését, hogy a kongenitális fertőzés tünetei legtöbbször nem fedezhetők fel a szüléskor. A szem és az agy érintettsége általában csak a csecsemő-, vagy a gyermekkor idején derül ki. A terhesség folyamán minél későbbi terhességi korban fertőződik az anya, annál nagyobb a magzatra való átvitel valószínűsége. *Remington és Desmonts* [1990] kimutatták, hogy a kórokozó placentán történő átjutásának valószínűsége a terhesség első harmadában kb. 10%, viszont az utolsó két terhességi héten már kb. 90% [*Remington és Desmonts*, 1990; *Desmonts és Couvreur*, 1994].

Ha a fertőzés az első trimeszterben történik, akkor a kongenitális toxoplazmózis súlyos klinikai következményekkel járhat, pl. spontán vetélés, intrauterin elhalás, a központi idegrendszer megbetegedései (microcephalia, hydrocephalus, meszesedések az agyban, chorioretinitis), izolált rendellenességek (süketség, microphthalmia, alacsony intelligencia-hányados), ritka formák közül az agytumor [*Lin és mtsai*, 2000; *Machay*, 1995]. Ha a fertőzés a második trimeszterben, vagy utána következik be, akkor a betegség sok esetben tünetmentes (85%-ban), hatása csak később jelentkezik. Ekkor is elsődleges az idegrendszer érintettsége, chorioretinitis is kialakulhat, de a gyermek akár epilepsziás, vagy mentálisan retardált is lehet.

A klinikai tünetek súlyossága a magzatvíz parazitatartalma alapján is megbecsülhető, minél több parazita mutatható ki a magzatvízből, annál súlyosabb tünetek jelentkezhetnek [*Romand és mtsai*, 2004].

A parazitaszám meghatározásnak ezért nagy jelentősége van a genetikai tanácsadás során. A fertőzött anyák antibiotikummal történő kezelése alapvető fontosságú kongenitális toxoplazmózis esetén.

1.2.4.3.1.1.3. A *T. gondii* diagnosztizálása

Indirekt módszerek

A szerzett és a kongenitális toxoplazmózis diagnosztikájában a szerológiai vizsgálatok jelentik az első lépést.

Az ellenanyag profil változása a fertőzés folyamán

IgM típusú ellenanyagok kimutathatók már a fertőzést követő egy héten belül, szintjük egy hónap múlva éri el maximumát. Ez a típusú ellenanyag nem jut át a méhlepényen, mivel a mérete nagy, a szerkezete pentamer. A köldökzsinórvérből, vagy az újszülött véréből kimutatott IgM titer szintén jelezheti, hogy a kórokozó átjutott a placentán. Bonyolítja a helyzetet, hogy sokszor nem sikerül a fertőzött újszülött savójából az IgM ellenanyagot kimutatni, ez valószínű azért van, mert a magzatba átjutott anyai IgG elnyomja a toxoplazmával szembeni magzati IgM immunválaszt [Guerina és mtsai, 1994].

Az IgG típusú ellenanyagok a fertőzést követő második, harmadik héten jelennek meg, szintjük 2-6 hónap alatt éri el a maximumát. Méretük lehetővé teszi, hogy a méhlepényen is átjussanak. Magzati jelenlétük csupán régi anyai fertőzést igazol.

Az IgA típusú ellenanyagok is kimutathatók, szintén korán, már az első héten, mivel a fertőződés orálisan, a fertőzött étellel lenyelt cisztákkal vagy oocisztákkal következik be, amelyek forrásául szolgálnak a szekretoros IgA termelésének. A parenterális immunizáció vagy infekció szintén kiválthatja ennek az ellenanyagnak a keletkezését [Gross és mtsai, 1992].

3. sz. táblázat

***A Toxoplasma gondii* fertőzés kimutatása szerológiai módszerrel**

Ellenanyag típus	Kimutathatóság	Placentán átjut
IgM	1-4 hét	nem
IgA	2-4 hét	nem
IgG	2-6 hónap	igen

Az IgG típusú ellenanyagok kimutathatók a Sabin-Feldman teszttel [Sabin és Feldman, 1948], indirekt fluoreszcens ellenanyagteszttel [Szénási és mtsai, 1997], indirekt hemagglutinációs teszttel, komplementkötési reakcióval [Csóka, 1976], agglutinációs vizsgálatokkal, enzim-immunoassay-vel [Pinon és mtsai, 1987] és aviditás vizsgálatokkal [Lappalainen és mtsai, 1992].

Az IgM típusú ellenanyagok indirekt fluoreszcens ellenanyagteszttel és ELISA módszerrel, az IgA típusú ellenanyagok pedig enzim-immunoassay módszerrel detektálhatók. A 3. sz. táblázatban a különböző ellenanyagok kimutathatósága látható.

Direkt módszerek

A direkt módszerek a kórokozó közvetlen kimutatásán alapulnak. Ez történhet a különböző testnedvek állatokba való oltásával [Desmonts és mtsai, 1985], vagy azok szövettenyészetbe való keverésével [Shepp és mtsai, 1985], ezek az eljárások azonban idő- és munkaigényesek, így kevésbé elterjedtek.

A kórokozó örökítő anyagának diagnosztizálása az 1990-es évektől kezdődően fokozatosan terjedt el. A parazita gyors és érzékeny detektálását

teszik lehetővé a molekuláris biológiai módszerek, amelyek bevezetésével, így a PCR módszer elterjedésével lehetőség nyílik a toxoplazmózis meghatározására különböző klinikai mintákból (magzatvíz, vér, liquor, szöveti biopszia, stb.) [Pelloux és mtsai, 1998; Bretagne és Costa, 2006].

A PCR során keletkezett termékek kimutatása történhet az elektroforézisen alapuló elválasztást követő festéssel, etidiumbromid felhasználásával. Ez az eljárás a modernebb technikák kidolgozásával háttérbe került, a festék magas karcinogén és mutagén hatása miatt is egyre kevésbé alkalmazott.

Alternatív megoldást jelentett a fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis, mely során az amplifikációhoz használt primer pár egyike fluoreszcens festékkel jelölt, és a keletkezett termék kapilláris elektroforézissel mutatható ki.

További előrelépés mind az érzékenység, mind a megbízhatóság és gyorsaság terén a kvantitatív valósidejű PCR bevezetése a *T. gondii* kimutatására [Bell és Ranford-Cartwright, 2002]. Ennek a módszernek nagy előnye, hogy lehetőséget teremt az eredeti mintában lévő kórokozók számának meghatározására.

1.2.4.3.2. SNP meghatározás

Az egynukleotidos polimorfizmus (SNP) olyan DNS szekvencia variáció, amely egyes egyének között figyelhető meg. Az allél szekvencia variáció akkor tekinthető polimorfizmusnak, ha az emberi populációban egy allél egy lókuszban 1%-nál nagyobb arányban fordul elő. A különböző gén polimorfizmusok összefüggésbe hozhatók betegségekre való érzékenységgel, vagy különböző gyógyszerekre való válasszal is. Több SNP együttes tanulmányozása szintén értékes információkat adhat egyes betegségek kialakulásának tanulmányozásához.

A valósídejű PCR és az azt követű olvadási görbe analízis lehetővé teszi a nagyon kicsi szekvencia különbségek kimutatását, akár egy bázispár különbség is kimutatható a primerek-próbák megfelelő megtervezésével. Az alkalmazott fluoreszcens próbákat úgy kell megtervezni, hogy legalább 5°C különbség mutakozzék az olvadási görbe analízis során a kétfajta termék között, így azok biztonsággal elkülöníthetők. A hibridizációs próbák mellett a Taqman próbákat (hidrolízis próbák) is széleskörűen alkalmazzák.

1.2.4.3.2.1. A számbeli kromoszóma rendellenességek kimutatása (a 21. kromoszóma triszómiája)

A valósídejű PCR módszer alkalmas a kromoszómák számbeli rendellenességeinek a kimutatására SNP markerek felhasználásával. Az autoszomális triszómiák leggyakoribb formája a 21-es triszómia (Down szindróma), amelynek előfordulási gyakorisága 1/700. Az esetek zömében, kb. 95%-ban ez egyszerű triszómia, ami meiotikus non-diszjunkció eredménye és anyai eredetű, a többi transzlokáció (4%) és mozaik (1%) [Schuler, 1968; Papp és mtsai, 1977; Méhes 1966; Dobos és Papp, 1995; Nagy B. és mtsai, 2002; ACOG 2007].

Érdekes megfigyelés, hogy a Down szindróma előfordulási gyakorisága a 35. anyai életévtől kezdődően exponenciálisan nő. A demográfiai adatok összegyűjtése eredményezte, hogy az előfordulási gyakoriságot pontosan meg tudják határozni az egyes populációkban, Penrose már 1934-ben leírta ezt az összefüggést. Az anyai életkort ötéves intervallumokban tüntette fel a Down szindróma előfordulási gyakoriságával. Megállapítása napjainkban is érvényes [Hecht és mtsai, 1996]. Igaz viszont, hogy Collmann és Stoller [1962] tanulmánya előbbre hozta ezt a határt 30-34 év közötti korra. Részletes tanulmányt készítettek Hook és Chambers [1977], és arra a megállapításra jutottak, hogy a 20-30 éves anyai életkor között lineárisan nő a rizikó, viszont 33

éves kortól már exponenciálisan. Ezen tanulmányok eredményei ellenére a mai gyakorlatban is a 35 éves kor maradt a határkö a klinikumban Magyarországon. Más aneuploid esetek is összefüggést mutatnak a magasabb anyai életkorral, mint pl. a 18-as és 13-as kromoszóma triszómiái, a Klinefelter szindróma és a XXX szindróma.

A különböző szűrési módszerek bevezetése segítette a Down szindrómás magzatok kiszűrését főként a 35 év feletti várandósoknál. A Down szindrómás újszülöttek a többszöri ultrahang és biokémiai marker vizsgálatok ellenére inkább a fiatalabb szülőktől származnak.

A pontos emberi kromoszómakészletet 1956-ban határozták meg [*Tijo és Levan*, 1956; *Ford és Hamerton*, 1956]. A citogenetika iránti érdeklődés megnövekedését idézte elő a *Lejeune és mtsai* [1959] által leírt megfigyelés, mely szerint egy konkrét betegség kapcsolatba hozható az eltérő számú kromoszóma szerelvénnel, azaz a Down szindróma kialakulását a 21. kromoszóma triszómiája okozza. Egy évvel később közölték le, hogy a 18. kromoszóma triszómiája az Edwards kórt, és a 13. kromoszóma triszómiája a Patau kórt okozza [*Edwards és mtsai*, 1960; *Patau és mtsai*, 1960; *Méhes és mtsai*, 1971]. Ezek a megfigyelések elősegítették a citogenetikai vizsgálatok gyors elterjedését. A prenatális diagnosztikában való alkalmazás *Steele és Breg* [1966] nevéhez fűződik, akik a magzatvízsejteket tenyésztették, majd azokból kariotipizálást végeztek.

Az eltelt közel 50 év ellenére a kariotipizálás maradt a legelfogadottabb módszer a kromoszóma rendellenességek kimutatására [ACOG, 2007]. Az elkészített kariogram a számbeli és a szerkezeti elváltozásokat is kimutatja. Hátránya, hogy a vizsgálat élő sejteket igényel, fertőzött minta esetén nem alkalmazható, valamint hosszú idő telik el a minta levétele és az eredmény kiadása között. Ezeket a problémákat oldotta meg a fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis (F-PCR), amely a kromoszómákon elhelyezkedő kis ismétlődő egységeket (small tandem repeats, STR) használja fel diagnosztikai

célokra. Ezek lehetnek 2-7 bázispár hosszúságú egységek, amelyek nagy heterogenitást (70-90%) mutatnak a populációban. A PCR során keletkezett fragmentumok területi aránya alapján lehet következtetni a triszómiák jelenlétére. Az elmúlt 15-20 évben a fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis megbízható módszernek bizonyult a leggyakoribb számbeli kromoszóma rendellenességek kimutatására, a bizonytalan kariotipizálási eredmények megerősítésére. Ehhez a meghatározáshoz nem szükséges élő sejt, nem igényel hosszadalmas tenyésztést, így a vizsgálat gyors és ismételhető. A módszert Londonban, Leedsben és Grazban működő csoportok után a Semmelweis Egyetem I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán, a világon negyedikként vezettük be [Tóth és mtsai, 1998a; 1998b; Findlay és mtsai, 1998].

Az egynukleotidos polimorfizmus (SNP) markerek felhasználásával a valósidejű PCR bevezetése újabb lehetőségeket nyitott meg, többek között a számbeli kromoszóma rendellenességek kimutatására is alkalmas. Az olvadási görbe analízis során az egyes SNP-k területi arányát összehasonlítva lehet következtetni a triszómia jelenlétére. Mivel az SNP maximum 50%-os heterogenitást mutathat, jóval több marker használata szükséges az egyes kromoszómákon ahhoz, hogy megbízható eredményt adjanak ki a laboratóriumok. A vizsgálat előnye a gyorsasága és egyszerű ismételhetősége.

1.2.4.3.2.2. Egynukleotidos polimorfizmus és a betegségek kialakulása közötti összefüggés. A VEGF polimorfizmus és a terhességi patológia

Az egynukleotidos polimorfizmus kimutatásának másik alkalmazási lehetősége, hogy egyes betegségek összefüggésbe hozhatók azok előfordulási gyakoriságával. Ezek közül a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) egynukleotidos polimorfizmusa több betegség kialakulásával kapcsolható össze. A VEGF az egyik angiogén faktor, amely elsődleges szabályozója az endotél sejtek proliferációjának [Gargett és Rogers, 2001; Watson és mtsai, 2000; Galazios és mtsai, 2009]. Fontos szerepe van a vaszkulogenezisben és a

vaszkuláris permeabilitásban [*Gargett és Rogers*, 2001]. A VEGF gén egy 14 kb nagyságú molekula, amely 8 exont és 7 intront foglal magába [*Vincenti és mtsai*, 1996]. A VEGF-t számos sejt termeli, többek között a citotrofoblasztok. Termelődése hypoxiával is előidézhető. Bár a hypoxia-indukálta faktor (HIF) – von Hippel-Lindau (VHL) fehérje rendszernek van a legfontosabb szerepe a VEGF-expresszió szabályozásában, az onkogének szintén fokozhatják a VEGF termelődését, ideértve az aktivált epidermális növekedési faktor receptort (EGFR), a RAS-t és az erbB-2/Her2-t [*Ferrara és mtsai*, 2003].

A terhesség során a VEGF jelentős szerepet játszik a trofoblasztok proliferációjában és az embrió vaszkularizációjában. Szövettani tanulmányok a normálistól eltérő angiogenezist írtak le préeklampsziában (PE) és HELLP (**H**emolysis, **E**levated **L**iver enzymes, and **L**ow **P**latelet count) szindrómában szenvedő betegek placentáiban. A placentáris iszkémia, az oxidatív stressz és az anyai-magzati immun-maladaptáció egyaránt szerepet játszik a PE kifejlődésében [*Galazios és mtsai*, 2009; *Redman* 1991]. A sekély endovaszkuláris trofoblaszt invázió a spirális artériákban és az általános endoteliális sejt diszfunkció két kulcsfontosságú szereplő a PE kifejlődésében [*Dekker és Shibai*, 1998]. Ezért került a kutatások fókuszába a VEGF molekula és SNP polimorfizmusainak a tanulmányozása, a vaszkularizációban, illetve egyes betegségek kialakulásában betöltött szerepe [*Renner és mtsai*, 2000]. *Papazoglou és mtsai* [2004] a VEGF C-2578A, a G-634C és a C+936T, míg *Bányász és mtsai* [2006] a C-2578A és a G-405C egynukleotidos polimorfizmusokat (SNP) tanulmányozták PE-ban szenvedő betegek csoportjában.

A VEGF egynukleotidos polimorfizmusát nem vizsgálták HELLP szindrómában szenvedő várandós nők mintáiban.

1.2.4.3.3. Deléció kimutatása (*ΔF508*)

A valósídejű PCR olyan betegségek kimutatására is felhasználható, amelyeket deléció okoz. A megtervezett primer-próba rendszerrel a keletkezett termékek olvadási hőmérséklet (T_m) különbsége alapján kimutatható például a cisztás fibrózist okozó *ΔF508*.

A cisztás fibrózis (v. cisztikus fibrózis, régebbi nevén mucoviscidosis) a leggyakoribb autoszomális recesszív módon öröklődő, halálos kimenetelű genetikai betegség a kaukázusi populációban [*Endreffy és mtsai*, 1992; *Fekete és mtsai*, 1992; *Németi és mtsai*, 1992; *NIH Consensus*, 1997]. A betegségre már a középkorban találunk utalásokat, német népköltészeti alkotásokban olvashatunk a sós ízű verejték és a korai halál kapcsolatáról. A meconiumos ileuszt 1905-ben írta le *Carl Landsteiner* [*Busch R*, 1990]. A diagnózist sokszor ebből állapították meg, amíg korszerűbb módszerek nem álltak rendelkezésre.

A betegség pontos klinikumát és patológiáját az 1930-as évek végén *Guido Fanconi és mtsai* írták le, megfigyelték a cisztás fibrózis és a hasnyálmirigy betegségének kapcsolatát is [1936]. A cisztás fibrózis fő jellemzőit *Andersen* határozta meg 1938-ban [*Andersen*, 1938]. A mucoviscidosis elnevezés *Farber* nevéhez fűződik, aki megállapította, hogy az exocrin mirigyek által termelt kóros váladék felelős a betegség tüneteinek kialakulásáért [*Farber*, 1945]. A cisztás fibrózis leglényegesebb diagnosztikai módszere napjainkban is a verejték klór és nátrium koncentrációjának meghatározása, ami *Di Sant'Agnese* nevéhez fűződik [1953].

A cisztás fibrózis szinte minden szövetet érint. A külső elválasztású mirigyek kivezető csövét szívós nyák zárja el, amelyben a kórokozók könnyen megtelepedhetnek [*NIH Consensus*, 1997]. A mirigyek szövetei cisztikusan degenerálódnak, és funkciójukat nem tudják ellátni. A légutakban lerakódott szívós váladék következtében a krónikus obstruktív tüdőbetegség és a hasnyálmirigy elégtelenség a leggyakoribb. A testnedvekben emelkedett

kloridion koncentráció figyelhető meg. A betegség lefolyása krónikus jellegű, progresszív, több szervet érintő. A cisztás fibrózisban szenvedő betegek sorsát döntően a tüdők állapota határozza meg. Az intrauterin életben a belekben kialakult meconiumból a nyák besűrűsödése miatt meconiumdugasz alakulhat ki.

A cisztás fibrózis kialakulásáért felelős gént a 7-es kromoszómára lokalizálták 1985-ben [*Riordan és mtsai*, 1989]. A betegség kialakulásáért felelős 27 exonból álló cisztikus fibrózis transzmembrán regulátor gént (*CFTR*), amely 230.000 bp hosszú, 1989-ben írták le. A gén egy 1480 aminosavból álló proteint, a cisztás fibrózis transzmembrán regulátor fehérjét kódolja. A cisztás fibrózis kialakulásának leggyakoribb oka a *CFTR* gén 10. exonjában lévő 3 bázispár (*CTT*) deléciója, melynek következtében a fehérje 508. aminosavja, egy fenilalanin kiesik. Ezért nevezik ezt a mutáns gént delta *F508*-nak. Európában ez a mutáció felelős a megbetegedések kb. 60-70%-áért. A magyarországi mutáció vizsgálatok eredményéről 1996-ban jelent meg összefoglaló közlemény, mely alapján a delta *F508* mutáció gyakorisága hazánkban 63,3% [*Németh és mtsai*, 1996].

A *CFTR* génben eddig közel 1400 féle mutációt találtak [*Kerem és mtsai*, 1989; *Riordan és mtsai*, 1989]. A cisztás fibrózis hazai előfordulási gyakorisága kb. 1:2500 élve születés. A génhordozók gyakoriságából következően Magyarországon minden 625. házasságkötés két heterozigóta között történik. A prenatális diagnosztika azokban a családokban lehetséges, ahol ismert a mutáció, így évente kb. 35-40 új beteg megszületésével lehet számolni. A betegség előfordulásának gyakorisága indokoltta tette a szűrővizsgálat bevezetését. A szűrés bevezetése mellett szólt, hogy a korai diagnózis és kezelés javítja a későbbi prognózist.

Újszülöttkori szűréseknél a bevált alkalmazott módszer a széklet fehérje és tripszin koncentrációjának meghatározása, mivel a verejtéktesztet nehéz alkalmazni a klinikai gyakorlatban. A fehérjetartalom magas, a tripszin szintje

viszont alacsony cisztás fibrózis esetében. A betegségben szenvedő újszülöttek 10-15 %-ának a hasnyálmirigye nem működik kórosan, tehát náluk álnegativitás mutatkozik. Az Amerikai Egyesült Államokban az immunoreaktív tripszinogén vérteszt alkalmazása terjedt el az általános szűrésre. A tripszinogént a hasnyálmirigy termeli, szintje a kivezetőmirigy váladékának elvezetési akadályoztatása miatt magas lesz.

A cisztás fibrózis tüneteit már újszülött- és csecsemőkorban szűrések nélkül is diagnosztizálják, az érintett családokban érdemes a kiváltó genetikai eltérést meghatározni és további gyermekvállalás esetén magzati diagnosztikát végezni [Németi és Papp, 1995].

A PCR módszert az 1990-es évek elejétől alkalmazzák a cisztás fibrózist okozó mutációk kimutatására [Doherty és mtsai, 1997; Endreffy és mtsai, 1992; Fekete és mtsai, 1992; Wittwer és mtsai, 1993]. A fluoreszcens-PCR-t néhány évvel később vezették be, mivel ez a módszer egyszerűbb és érzékenyebb kimutatást tesz lehetővé. Magyarországon is már legalább 15 éve alkalmazzuk [Nagy és mtsai, 1999; 2000a]. A valósidejű PCR és olvadási görbe analízist, amely lehetővé teszi a gyors és biztonságos mutáció kimutatást, az utóbbi években alkalmazzák ebből a célból [Gundry 1999; 2001; 2003; Kamory és mtsai, 2004; Nagy B. és mtsai, 2006b; 2007d].

1.2.4.3.4. Génexpresszió meghatározás (CD24)

A valósidejű PCR alkalmas génexpresszió meghatározására is. Ez lehet egy kiválasztott gén, vagy lehetnek olyan gének, amelyek a microarray vizsgálatok során eltérést mutattak, és a kapott eredmények igazolása szükséges.

A CD24 egy kis molekulású, 27 aminosavból álló, erősen glikolizált, mucinhoz hasonló sejtfelszíni fehérje [Kristiansen és mtsai, 2004a; 2004b]. Ezt a molekulát egérben fedezték fel az 1970-es években mint hőstabil antigént. Később emberben is leírták [Kay és mtsai, 1991]. A CD24 magas expresszióját

figyelték meg különböző hematopoetikus sejtpopulációkban, főként a B limfocitákban, neutrofil granulocitákban, keratinocitákban, továbbá a vese tubuláris epitheliumában, különböző tumorokban, így B-sejtes limfómákban, veserákban, hólyagrákban, mellrákban és epitéliális petefészek tumorban. A CD24 a sejtmembránhoz glikozil-foszfatidil-inozitol-horgonnyal kapcsolódik. A CD24 ligandja a P-selectinnek, és segítheti a CD24⁺ tumorsejtek szétszóródását, viszont nem kapcsolódik az E- és az L-szelectinhez. A sejteken belüli jeladásban vesz részt a tirozin kinázokhoz való közvetlen kapcsolódással [*Kristiansen és mtsai*, 2003a; *Montes és mtsai*, 1996]. Legutóbb új prognosztikus markerként írták le számos tumorban [*Kristiansen és mtsai* 2002, 2003a, 2003b, 2004a; 2004b].

Préeklampsziás placentában gyenge a vaszkularizáció és a véráramlás, míg a fejlődő tumorokban pont az ellenkezője a jellemző. Számos kutató a préeklampszia kialakulásának immunológiai eredetében hisz, ezért tűnt érdekesnek a CD24 mRNS expressziójának meghatározása préeklampsziás betegek csoportjában. Legutóbb *McDonald és Wolfe* [2011] figyelt fel arra, hogy a trofoblaszt sejtek membránjában a CD24 és a Siglec 10 jelen van, és a fertőzések során szerepet játszik mint mediátor. Az anyai és magzati felületek találkozásánál ezeknek a fehérjéknek dinamikus immunszabályozási szerepük van.

A CD24 kimutatása a prosztatata tumorok diagnosztikájában is szerepet játszhat a jövőben. A prosztatata tumor a férfiak második leggyakrabban előforduló tumoros megbetegedése. Előfordulási gyakorisága az utóbbi időben nő, de eltérő a földrajzi eredet szerint, ritkább az ázsiai, míg gyakoribb a nyugati populációkban [*Calvo és mtsai*, 2005]. Egyes tanulmányok szerint az étkezési szokások is szerepet játszanak a prosztatata tumor kialakulásában, a zsírban és vörös húsban gazdag táplálkozás növeli, míg a növényi és az E vitaminban gazdag diéta csökkenti a megjelenését. A táplálékban lévő szelén kedvező hatását is kimutatták [*Etmnan és mtsai*, 2005; *Dong és mtsai*, 2005].

A prosztata tumor kialakulásában, fejlődésében és a metasztázisok kialakulásában szerepet játszó molekuláris mechanizmusok a mai napig sem ismertek pontosan.

A korai felismerést segíti a prosztata specifikus antigén (PSA) szérumból történő meghatározása, valamint a rektális digitális vizsgálat [*Calvo és mtsai*, 2005]. Az eddig elfogadott és bevált, hagyományos prognosztikus markerek közé tartozik a PSA-n kívül a tumor kiterjedése (stage), a szövettani beosztás (grade), a beteg életkora és más paraméterek [*Schostak és mtsai*, 2005].

A leginkább elterjedt szűrőmódszer a szérumból történő PSA meghatározás, amely magas érzékenységű, de alacsony specificitású. A klinikumban évek óta alkalmazzák, de tovább folyik a kutatás megbízható markerek bevezetésére.

A microarray és a génexpressziós vizsgálatok bekerültek a prosztata tumor kialakulásának, az esetleges prognosztikus és diagnosztikus markerek felderítésének a módszerei közé [*Ashida és mtsai*, 2004; *Hughes és mtsai*, 2005; *Schostak és mtsai*, 2005]

Néhány nyugati intézetben a *CD24* mRNS mérése már alkalmazott független prognosztikus marker nemcsak a prosztata, hanem a petefészek és a nem-kissejtes tüdő tumorokban is [*Kristiansen és mtsai*, 2004; 2005; *Hughes és mtsai*, 2005].

1.2.4.3.5. „Szabad” nukleinsav meghatározás

A valósidejű PCR módszer a „szabad” nukleinsavak kimutatására is alkalmas. Sokáig tartotta magát az a dogma, hogy a placenta az anya és a magzat között egy átjárhatatlan határt jelent, de már 1893-ban leírták a trophoblast sejtek jelenlétét eklampsziában elhunyt terhes tüdejében [*Schmorl*, 1893]. A magzati „szabad” DNS jelenlétét *Lo és mtsai* bizonyították be 1987-ben. Azóta foglalkoztatja a szülészeket és a molekuláris genetikusokat a nem-invazív

magzati diagnosztika bevezetésének gondolata. A magzat genetikai betegségének kimutatása az anyától levett vérből óriási kihívás. Az invazív magzati mintavételi eljárások (magzatvíz, lepény) kb. 1-3% körüli magzati veszteséggel járnak (vetélés), a várandósoknak pedig pszichésen jelentenek nagy megterhelést.

Kezdetben az anyai vérből izolált magzati sejtek tűntek kiváló célpontnak, felhasználásuk a diagnosztikában ígéretesnek tűnt [*Bianchi és mtsai*, 1990; 1999; *Sekizawa és mtsai*, 2007]. Ezen sejtek száma nagyon alacsony, izolálásuk és dúsításuk rendkívül munkaigényes. Komplikálja a helyzetet, hogy néhány magzati sejt akár évtizedekig is bent maradhat az anyai szervezetben, és zavarhatja a későbbi terhességben végzett diagnosztikát [*Bianchi és mtsai*, 1996], így a kezdeti lelkesedés ezen sejtek kimutatására napjainkra alább hagyott.

A figyelem a sejten kívüli „szabad” nukleinsavakra irányult. Noha *Mandel és Métais* már 1948-ban megfigyelte ezeket a különös molekulákat tumoros betegek mintáiban, több évtizednek kellett eltelnie ahhoz, hogy a „szabad” DNS jelenléte ismét felébressze a tudományos és klinikai érdeklődést [*Mandel és Métais*, 1948]. *Lo és mtsai* 1989-ben mutatták ki az anyai vérben keringő „szabad” magzati DNS-t [*Lo és mtsai*, 1989; 1997].

A lepény mikroszkopikus szerkezete nem teszi lehetővé a DNS-molekulák nagymértékű transzportját a feto-maternális gáton keresztül. A „szabad” DNS anyai keringésbe való bekerülésére több elmélet született, felmerült a magzati hematopoetikus, a lepényi eredet és a direkt magzati transzplacentáris DNS-transzfer lehetősége, de a legelfogadottabb a placentából történő apoptózis [*Tjoa és mtsai*, 2006; *Alberry és mtsai*, 2007].

A „szabad” nukleinsavak napjainkban már a 4. terhességi héttől kezdve kimutathatók anyai vérből [*Illanes és mtsai*, 2007]. A mintákból izolálható nukleinsavak kis mennyisége mellett az is nehézséget okoz, hogy az izolált

„szabad” nukleinsavak kb. 94-97%-a anyai, míg 3-6%-a magzati eredetű [Lo és mtsai, 1998a és 1999]. Kezdetben csak a nem-et és az RhD-t tudták meghatározni, mivel ezek különbözhetek az anyában és a magzatban. A kutatók és klinikusok vágya a triszómiák és más genetikai betegségek kimutatása volt, számtalan sikertelen próbálkozást követően 2011-2012-ben megtörtént az áttörés, és a tömeges paralell szekvenálás bevezetésével, valamint a speciális kiértékelő programmal lehetőség nyílt a triszómiák nem invazív módon történő kimutatására [Palomaki és mtsai, 2012; Norton és mtsai, 2012; Tsui és mtsai, 2012].

A vizsgálatok fókuszába a „szabad” RNS molekulák is bekerültek. Olyan géneket mutattak ki, amelyek placentáris eredetűek [Poon és mtsai, 2000; Wright és Burton 2009], újabban a miRNS is érdekes területnek tűnik [Lázár és mtsai, 2012].

A „szabad” DNS nem-invazív prenatális diagnosztikába történő bevezetését az alacsony DNS koncentráció és az egyes embereken mutatózó különbségek is bonyolítják. Azt is figyelembe kell venni, hogy a magzati eredetű „szabad” DNS csak kb. 3-6%-a az anyainak, továbbá a magzati genom 50%-a anyai eredetű.

A magzati és az anyai eredetű DNS elkülönítésének alapfeltétele a két DNS közti minőségi különbség. A várandós plazmájában fellelhető magzati és anyai eredetű DNS-fragmentumok közti különbségek kiderítése, valamint további magzati markerek meghatározása a „szabad” magzati DNS kutatás egyik központi kérdése volt. A PCR amplifikált DNS-fragmentumok *Southern blot* analízise után a magzati eredetű DNS fragmentumok hossza <300 bp, míg az anyai >1000 bp volt. Mivel a magzati eredetű DNS fragmentumok rövidebbek az anyai DNS fragmentumoknál, ez az eltérés lehetőséget kínál a DNS-szakaszok méret alapján történő szeparálására [Chan és mtsai, 2004]. A klinikai gyakorlatba azonban ez az alkalmazási lehetőség soha nem került be.

Az anyai és a magzati DNS elkülönítésének másik lehetőségeként merült fel a méhlepényből izolált epigenetikai markerek vizsgálata. Ezek közül az onkológiai kutatások során imertté vált *maspin* gén volt az egyik. Terhességben végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a hipometilált *maspin* gén a „szabad” magzati DNS kiürülésének megfelelően a szülést követően eltűnik a keringésből. Más epigenetikai markerek esetében, mint például a *RASSF1A* gén esetében is, megfigyelhető hasonló eltérés [Chan és mtsai, 2006].

A „szabad” magzati DNS koncentrációja kóros terhesség esetén eltérést mutat a szövődménymentes terhességben mért értékektől, azonban az még nem tisztázott, hogy a különböző terhességi korban mért értékek háttérében milyen folyamatok állnak.

A terhesség és a magas vérnyomás összefüggésében kiemelendők a préeklampszia és HELLP szindróma területén végzett vizsgálatok [Sibai és mtsai, 2005; Smid és mtsai, 1999]. Az említett kutatók magasabb „szabad” nukleinsav szinteket mértek a rendellenes magzatot viselő várandósok mintáiban. A 21. kromoszóma triszómiája esetén a várandósok szérumában is eltérő, magasabb szinteket mértek.

A 21. kromoszóma triszómiája esetén több tanulmány számol be a „szabad” magzati DNS koncentrációjának emelkedéséről, míg más tanulmányok eredményei szerint nincs különbség a normál kariotípusú magzatot viselő, illetve a Down-szindrómás magzatot viselő várandósok vérében fellelhető „szabad” magzati DNS koncentráció között. A „szabad” DNS mennyisége 13-as triszómia esetén csökkent, viszont a 18-as triszómia esetén nem változott szignifikánsan [Lee és mtsai, 2002; Leung és mtsai, 1999; Spencer és mtsai, 2003]. Az ellentmondásos eredmények azt sugallják, hogy a „szabad” magzati DNS kvantitatív meghatározása nem mutat egyértelmű összefüggést a magzati aneuploidiaikkal.

A nagy tudományos érdeklődés és a fokozott erőfeszítések következtében 2011-2012-ben áttörés történt, sikerült a Down szindrómát anyai vérből izolált „szabad” DNS-ből kimutatni. Ezt követte a 18. és a 13. kromoszóma triszómiájának kimutatása. Nehézséget okozott, hogy ezeknek a kromoszómáknak magas a GC tartalma. Jelenleg néhány vállalkozás kínál Magyarországon is anyai vérből nem-invazív módon vett mintákból triszómia kimutatást. Sajnos, napjainkban egyetlen állami intézményben sem érhetőek el ezek a vizsgálatok. Nincsenek meg a technikai feltételek a módszer bevezetésére, hiányzik az új generációs szekvenáló készülék és az adatok feldolgozásához a megfelelő számítógépes rendszer.

A csehországi Olomouc-ban 2012-ben megrendezett 2nd Central-Eastern European Symposium on Free Nucleic Acids in Non-Invasive Prenatal Diagnosis nemzetközi kongresszuson a vezető prenatális diagnosztikával foglalkozó szakemberek arra hívták fel a figyelmet (*Dennis Lo, Peter Benn és Howard Cuckle*), hogy a 99.9 %-os szenzitivitással és specificitással bíró masszív paralell szekvenálási módszer hamarosan kiváltja a jelenleg széleskörűen használt biokémiai markerekkel történő szűréseket [*Nagy B., 2012*].

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

A 21-es kromoszómán elhelyezkedő két 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 $\Delta F508$ meghatározása

A fluoreszcens és a valós idejű PCR módszer alkalmazhatóságának vizsgálata a cisztás fibrózist okozó $\Delta F508$ kimutatására, a különböző szövetekből izolált DNS minták felhasználási lehetőségének tanulmányozása.

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 karcinómás és benignus prosztata hiperpláziások tübiopsziával nyert mintáiban.

2.5. Magzati „szabad” DNS kimutatása anyai szérumból

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

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A mikrobiális genom kimutatása, *Toxoplasma gondii*

3.1.1. Beteganyag

Kongenitális toxoplazmózis gyanúja miatt 74 várandósnál végeztek amniocentesist a 18-34. terhességi héten, a beavatkozás során 4-5 ml magzatvíz került leszívásra. A terhesek életkora 20-38 év között volt. A vizsgálatkérést anyai fertőzésre utaló szerológiai leletek indokolták, 58 esetben IgM, 2 esetben IgG pozitivitás, egy esetben pedig az ultrahang vizsgálat során mutatkozott eltérés. A többi esetben egyéb ok, pl. foglalkozás, illetve háziállatok tartása miatt történt meghatározás.

3.1.2. Meghatározási módszerek

3.1.2.1. Hagyományos PCR

A felhasznált primerek szekvenciái a következők: Toxo B22, 5'-AAC ggg CgA gTA gCA CCT gAg gAg A-3', Toxo B23, 5'-Tgg gTC TAC gTC gAT ggC ATg ACA AC-3'. A reakció elegy 2,5 µl PCR puffert, 4,0 µl 10 mM-os dNTP-t, 2,0 µl 25 mM-os MgCl₂-ot, 1,25 E AmpliTaq Gold polimerázt (PE Applied Biosystems, Warrington, WA) tartalmazott 25 µl végtérfogatra kiegészítve desztillált vízzel. Kezdeti 10 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. Ezt követte az elektroforézis submarine típusú elektroforézis készülékkel 1,5%-os agaróz gélen 100 V-on két óra futtatással 0,5X TBE pufferben, majd a géleket etidiumbromiddal festettem meg, és a futtatásokat kiértékeltem.

3.1.2.2. Fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis

A felhasznált primerek szekvenciái a következők: Toxo B22, TET-5'-AAC ggg CgA gTA gCA CCT gAg gAg A-3', Toxo B23, 5'-Tgg gTC TAC gTC gAT ggC ATg ACA AC-3'. A reakció elegy 2,5 µl PCR puffert, 4,0 µl 10 mM dNTP-t, 2,0 µl 25 mM MgCl₂-ot és 1,25 E AmpliTaq Gold polimerázt (Perkin Elmer, USA) tartalmazott 25 µl végtérfogatra kiegészítve desztillált vízzel. 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.

A PCR-t követően a dimetilformamid (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 20 µl-éhez 2 µl PCR elegyet és 0,5 µl TAMRA 500-as molekulasúly markert (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mértem, és 5 perces denaturációt követően a mintákat az ABI 310 Genetic Analyzer-en (Applied Biosystems, USA) POP-4 gélben (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) futtattam meg. Az elektroforetogramokat Genescan Analysis software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével értékeltem ki. Minden meghatározásnál egy negatív és egy pozitív kontroll, valamint desztillált víz mintát párhuzamosan futtattam a meghatározandó mintákkal. Pozitív kontrollként az intraperitoneálisan fertőzött egerekből származó *T. gondii* RH törzsből izolált DNS minta szolgált (Johan Béla OEK, Budapest).

3.1.2.3. Valósídejű PCR módszerrel történő kimutatás SYBRGreen I módszerrel

A PCR LightCycler DNA Master SYBRGreen I (1 µl; Roche, Mannheim, Németország) kit felhasználásával történt Toxo B 5'-ggAggACTggCAACCTggTgTTCg-3' és 5'-TTgTTTCACCCggACCG-TTTTAgCAG-3' primerek 0,5 mM és a MgCl₂ 0,8 mM koncentrációival, egy

mikroliter izolált DNS hozzáadásával. A kezdeti 10 perces 95 °C-on történő denaturálás után 36 ciklusban, denaturációs (95 °C-on 5 sec), annealing (60 °C-on 45 sec) és extenziós (72 °C-on 45 sec) lépések következtek 40 cikluson keresztül, majd a PCR elegyet 10 percig 72 °C-ra, végül 30°C-ra hűtöttem le. Ezután következett az olvadási görbe analízis.

3.1.2.4. Valósídejű PCR módszerrel történő kimutatás primer-próba rendszerrel

A PCR-hoz az izolált DNS mintákból 1,0 µl-t használtam fel. Az alkalmazott primerek és próbák szekvenciái a következők voltak: forward primer 5'-ggA ggA CTg gCA ACC Tgg TgT Cg-3' (0.5 µM), reverse primer 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 MgCl₂-ot tartalmazott, amely 9 µl végtérfogatra lett kiegészítve desztillált vízzel. Ehhez 1 µl DNS-t adtam. A 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. Minden vizsgálandó mintát kétszer, továbbá egy negatív és egy pozitív kontroll mintát, valamint egy desztillált víz mintát párhuzamosan futtattam. Pozitív kontroll mintaként intraperitoneálisan fertőzött egerekből származó *T. gondii* RH törzs DNS izolátuma szolgált (OKI, Budapest).

3.2. Egynukleotidos polimorfizmus kimutatása

3.2.1. A 21. kromoszóma triszómiájának meghatározása

3.2.1.1. Beteganyag

Kariotipizálással és fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis módszerrel egyaránt kimutatott, 67 db 21-es triszómiás és 62 db normál egészséges DNS mintát használtam fel a vizsgálatokhoz. A DNS-t a 16-18. terhességi héten levett 1,5-1,5 ml magzatvíz mintákból nyertem High Pure PCR Template Preparation kit felhasználásával (Roche GmbH, Mannheim, Németország), a terhesek átlagos életkora 38,5 év volt.

3.2.1.2. A WIAF 899 és a WIAF 2643 meghatározása valósídejű PCR és olvadási görbe analízissel

A PCR elvégzésekor a 21-es kromoszómán elhelyezkedő WIAF 899 és WIAF 2643 SNP markerekre megtervezett primereket és próbákat (TIB Molbiol, Berlin, Németország) alkalmaztam. Egy mikroliter vizsgálándó DNS-t mértem be, majd 0,5 μM -t a forward és a reverse primerből, 0,2 μM -t a hibridizációs próbákból, 2 mM-t a MgCl_2 -ből és egy μl -t a LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes PCR puffer keverékből (Roche, Penzendorf, Németország) a 10 μl -es végtérfigatba. A primerek és próbák szekvenciáit a 4. sz. táblázat tartalmazza. 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

dc_254_11

minta esetén a WIAF 898 és a WIAF 2643 két allélja jól elkülöníthető volt az olvadási hőmérséklet különbség miatt.

4. sz. táblázat

A WIAF 899 és WIAF 2643 meghatározásához használt primer és próba szekvenciák

Primer neve	Szekvencia
WIAF899 Forward primer	5'- CAGGCAGGACTTCAGTGTCA -3'
WIAF899 Reverse primer	5'- GTCATCTGGGACAGGTCACC -3'
WIAF899 Próba1	5'-TTCCTGTTCCACGAAGAGGAC -fluoreszcein
WIAF899 Próba2	5'-LC-Red640-TTTTGTTCACAATTGGATCA- CAATGCAGAGGAGTCTGTT-foszfát

WIAF2643 Forward primer	5'-AACCCAGTGTGGGAGGAGAA-3'
WIAF2643 Reverse primer	5'-GTGGTGCTGTGGGGCTAG -3'
WIAF2343 Próba1	5'-CAGAATAAATAGAACAGTAGAATG- fluoreszcein
WIAF2643 Próba2	5'-LC-Red705-TCACAGATGGGTAATTACA- CATGTAAATGAGCTC-foszfát

3.2.1.3. Statisztikai kiértékelés

Diallélikus mintáknál kiszámítottam a területek arányát. Statisztikai analízisre t-tesztet és Kruskal-Wallis tesztet használtam az SPSS 11.0 programjából.

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

3.2.2.1. Beteganyag

A vizsgálatba bevont várandósokat egészséges terhes (n=83) és HELLP szindrómás (n=75) csoportokba soroltam az Amerikai Szülészeti és Nőgyógyászati Kollégium ajánlása szerint [ACOG, 2002]. A HELLP szindróma diagnózisát a jellemző laboratóriumi eltérések alapján állítottam fel. Ezek a következők voltak: hemolysis (microangiopathiás haemolyticus anaemia) igazolásának feltétele az emelkedett laktát dehidrogenáz (LDH) szint > 600 IU/L, emelkedett májenzim értékek, az aszpartát aminotranszferáz (AST) és az alanin aminotranszferáz (ALT) szérum értéke meghaladta a >70 IU/L-t, valamint a trombocitopénia megléte (a trombocitaszám kevesebb volt, mint 150.000 mikroliterenként). A vizsgálatokba bevont várandósok klinikai adatait az 5. sz. táblázat mutatja.

A Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága engedélyezte a vizsgálatokat, a betegek a tájékoztatást követően beleegyező nyilatkozatot írtak alá.

5. sz. táblázat

A tanulmányba bevont két csoport demográfiai és klinikai jellemzői

Vizsgált paraméter	Kontroll csoport (n=93)	HELLP-es csoport (n=71)	Szignifikancia (p)
Anyai életkor (év)	30 (27–33)	29 (26–31)	NS
Primipara	56 (60,2%)	48 (67,6%)	NS
Magas vérnyomás	0 (0,0%)	71 (100%)	0,001
Proteinuria	0 (0,0%)	71 (100%)	0,001
Gesztációs kor (hét)	38 (34–39)	32 (28–34)	0,001
Magzati súly (gramm)	3270 (2970–3680)	1140 (650–1820)	0,001
IUGR	0 (0,0%)	33 (46,5%)	0,001

3.2.2.2. DNS izolálás

A betegektől 3 ml EDTA-s vér levétele után 200 µl vérből DNS-t izoláltam szilika adszorpció módszerrel a gyártó utasításai szerint (High Pure PCR Template Preparation kit, Roche, Mannheim, Németország).

3.2.2.3. A *VEGF C-2578A*, *C-460T*, *G+405C* polimorfizmus meghatározása

A VEGF SNP-k meghatározására valósidejű PCR és olvadási görbe analízis módszert dolgoztam ki. A három SNP meghatározásához használt primerek és próbák szekvenciáit a 6. sz. táblázat mutatja. A PCR keverék tartalmazott 1 µL DNS-t, 5-5 µM-t a primerekből és próbákból, 1 µL-t a LightCycler FastStart DNA Master HybProbe PCR puffer keverékből (Roche, Penzberg, Németország) és 2,5 mM-t a MgCl₂-ből. A kezdeti 95 °C-os 10 perces denaturációt 35 ciklus követte - denaturáció (95 °C; 10 sec), annealing (52-56-60 °C; 15 sec) és extenzió (72 °C; 10 sec) - LightCycler készüléken (Roche). Minden PCR-t olvadási görbe analízis és a termékek olvadási pontjának (T_m) meghatározása követett.

3.2.2.4. Statisztikai kiértékelés

A statisztikai analízist a STATISTICA (version 7.1; StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) és az Arlequin (version 3.0; CPMG, University of Bern, Svájc) programok alkalmazásával (minden statisztikai analízishez a szignifikancia szintje $p \leq 0,05$ -ben lett meghatározva), a logisztikus regressziós analízist az anyai életkorral és a primiparitással korrigálva végeztem el.

6. sz. táblázat

A VEGF egynukleotidos polimorfizmusának meghatározására alkalmazott primer és próba szekvenciák

SNP neve	Primerek és próbák neve	Szekvencia
VEGF C-460T (rs 833061)	Forward	5'-AgA Cgg CAg TCA CTA g-3'
	Reverse	5'-AAT ATT gAA ggg ggC Ag-3'
	Próba1	5'-LC-640-AgC ggg gAg AAg gCC Agg g-3'
	Próba2	5'-TgT ggg g TT gAg ggC gTT-fluoreszcein
VEGF C-2578A (rs699947)	Forward	5'-AgC TgT Agg TCA AgA CCC T-3'
	Reverse	AAA ATT CCT AgC Tgg TTT CT-3'
	Próba1	5'-LC-640-ATC CAC CCA gAT CTT gCC Agg-3'
	Próba2	5'-gTg ggA AgA gTg ggA CCA gTC AgT CTg A-fluoreszcein
VEGF G+405C (rs2010963)	Forward	5'-CCA gAA ACC TgA AAT gAA gg-3'
	Reverse	5'-ggg CTC ggT gAT TTA gC-3'
	Próba1	5'LC-640-Tgg AAT Tgg ATT CgC CAT TTT ATT TTT CTT gC-3'
	Próba2	5'-gAC CCA gCA Cgg TCC CTC-fluoreszcein

3.3. Deléció kimutatása valósidejű PCR-ral, *ΔF508*

3.3.1. Beteganyag

A Semmelweis Egyetem I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Genetikai tanácsadását felkereső 116 személy (39 férfi, 77 nő; átlagos életkor 25,6 év) DNS mintáját vizsgáltam meg. A minták 14 esetben amniocentesisből (16-18. terhességi hét), 18 esetben chorionboholy mintavételből (12. terhességi hét) és 84 esetben perifériás vérvételből származtak. A DNS izolálás High Pure PCR Template Preparation kit (Roche GmbH, Mannheim, Németország) felhasználásával történt.

3.3.2. Fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis

Fluoreszcens PCR-t és DNS fragmens analízist végeztem a következő primerek felhasználásával (CF1 5'-gTT TTC CTg gAT TAT gCC Tgg gAC-3' és FAM-5'-gTT ggC ATg CTT TgA TgA CgC TTC-3'). A reakció elegy 25 µL keverékből állt, amely tartalmazott 1,5 mM MgCl₂-ot, 200 nM dNTP-t, 1,0 U AmpliTaq Gold-ot (PE, ABI, USA) és 3,0 µM-t a primerekből. A kezdeti 10 perces 95 °C -on történő denaturálást 32 ciklus követte, 45 másodperces 95 °C -on, 45 másodperces 58 °C -on és 60 másodperces 72 °C -on, majd egy végső 30 perces 60 °C -on történő inkubálás ABI 9700-as készüléken. Négy mikroliter PCR terméket mértem össze 20 µL formamiddal (Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország) és 0,5 µL Prism Genescan-500 TAMRA molekulásúly markerrel (PE Applied Biosystems, Warrington, UK). A keveréket 95 °C -on 3 percig denaturáltam, majd 4 °C -ra hűtöttem. Az elektroforézist ABI 310 típusú készülékkel végeztem POP4 gél (Perkin Elmer, USA) felhasználásával. Az eredményeket a GeneScan Analysis 2.1 Software segítségével határoztam meg.

3.3.3. Valósídejű PCR és olvadási görbe analízis

A PCR keverék elkészítéséhez a primerekből és a próbákból 5 pmol mennyiségeket, 2,5 mM MgCl₂-ot és 1,0 mikroliter master mixet (FastStart DNA Master Hybridization Probes kit, Roche) használtam fel. A végtérfogat 10 mikroliter volt az egy mikroliter meghatározandó DNS mintával együtt. A primerek és próbák szekvenciáit a 7. sz. táblázat mutatja.

A kezdeti 10 perces 95  C-on történő denaturálás után 35 ciklusban, denaturációs (95  C; 0 sec), annealing (63  C; 25 sec)  s extenziós (72  C; 5 sec) lépések következtek. Ezután olvadási görbe analízist végeztem, és meghatároztam a keletkezett termékek olvadáspontját (T_m). A diagnózist ez alapján állítottam fel. Minden futtatáshoz kontroll mintákat (normál egészséges, heterozigóta, negatív kontroll) iktattam be.

7. sz. táblázat

**A *ΔF508* valósídejű PCR módszerrel történő kimutatásához
alkalmazott primer és próba szekvenciák**

Primer neve	Szekvencia
Primer Forward	5'-ggA ggC AAg TgA ATC CTg Ag-3'
Primer Reverse	5'-ggA ggC AAg TgA ATC CTg Ag-3'
Pr�ba1	5'-TTT TCC Tgg ATT ATg CCT ggCA CCA TTA A-fluoreszcein
Pr�ba2	LC-Red-640-gAA AAT ATC TTT ggT gTT TCC-foszf�t

3.4. Génexpresszió kimutatása, a *CD24* génexpresszió meghatározása

3.4.1. Beteganyag és minták

Egészséges várandósok és préeklampsziás terhesek placenta mintái

Császármetszést követően 8 mm-es trepánnal placenta szövetkorongokat vágtam ki 16 egészséges terhes (átl. életkor $27,9 \pm 3,7$ év; terhességi hét $38,1 \pm 1,9$) és 16 préeklampsziában szenvedő beteg placentáiból (átl. életkor $27,8 \pm 4,5$ év; terhességi hét $34,3 \pm 3,7$ hét). A préeklampsziás csoportba tartozó betegeket az ACOG javaslatai alapján soroltam be [ACOG, 2002]. A szisztolés vérnyomásuk ≥ 160 Hgmm, a diasztolés ≥ 90 Hgmm volt jelentős proteinuriával.

Prostata tumoros és benignus prostata hiperpláziás minták

Ultrahang vezérelt prostata tűbiopsziával nyert kezeletlen 21 prostata tumoros (PCA) és 10 benignus prostata hiperpláziás (BPH) beteg prostata mintája került levételre. A betegszelekció a pozitív rektális tapintáson és a magas PSA koncentráció leletén alapult, amit később a szövettani vizsgálat is igazolt. A BPH-s csoportba a betegek a gyanús rektális tapintási lelet, vagy a totál PSA, free PSA eredmény alapján kerültek. Ebben a csoportban a PSA átlagérték alacsony, a negatív biopsziás lelettel együtt értékelve a jóindulatú hiperplázia valószínűsége nagy. Nem válogattuk be a vizsgálatunkba az olyan beteget, akinek a szövettani lelete negatív, de a PSA szintje magas volt. A betegek átlagos életkora $72,0 \pm 8,8$ év, ill. $64,3 \pm 12,1$ év volt. A tumoros betegeket a Gleason score szerint is besoroltuk. A tanulmányt a Semmelweis Egyetem Orvostikai Bizottsága engedélyezte, a vizsgálatokba bevont betegek részletes tájékoztatót kaptak, beleegyezésüket aláírásukkal igazolták.

A mintákat közvetlenül 0,5 ml RNS/DNS stabilizátort (Roche, Mannheim, Németország) tartalmazó 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe helyeztük, majd -85 °C-on tároltuk az RNS izolálásig.

Szérum prosztata specifikus antigén (PSA) meghatározások

A biopszia előtti PSA szinteket microparticle enzyme immunoassay (MEIA) módszerrel, Abbott IMx készülékkel, PSA kit (Abbott Park, IL, USA) felhasználásával határoztuk meg.

Szövetfeltárás

A placenta szövetkorongokat és a prosztata mintákat jéghideg foszfát pufferrel lemostam, majd 0,3 ml lízis puffert tartalmazó „lysing matrix D” (MP Biomedicals, Illkirch, Franciaország) csövekbe tettem, szétroncsoltam szövetroncsolóval (FastPrep FP120, Bio101, Thermo Savant, Franciaország) és az RNS izolálásig -80 °C-on tároltam.

3.4.2. RNS izolálás és cDNS szintézis

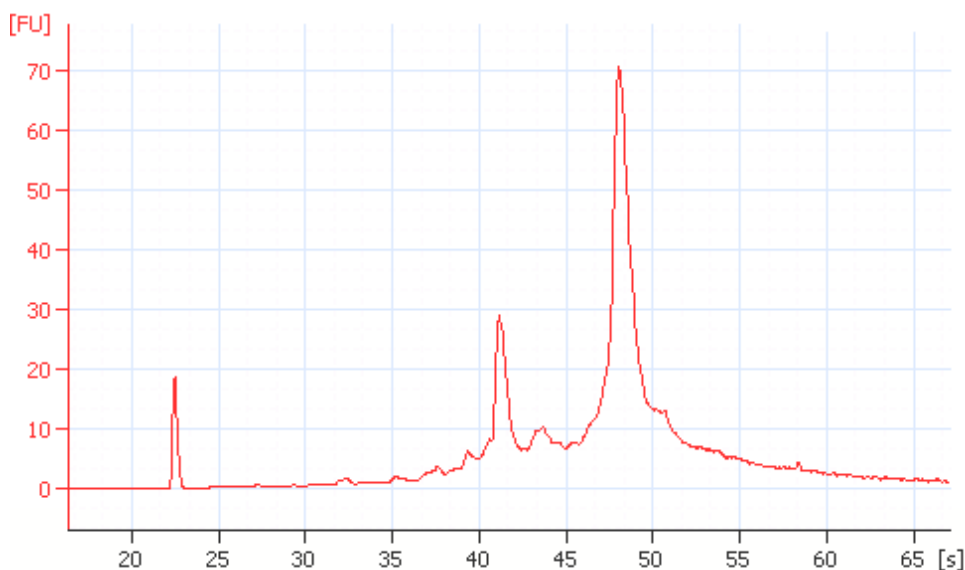
Az RNS-t Perfect RNA Eukaryotic kit (Eppendorf, Hamburg, Németország) segítségével izoláltam a gyártó utasításainak megfelelően.

First Stand cDNA Synthesis kit for RT-PCR (Roche, Penzberg, Németország) felhasználásával cDNS szintézist végeztem az előírások szerint.

A tisztított RNS mennyiségét NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) spektrofotométeren mértem le. Az RNS mintában levő esetleges szennyeződések, fehérjék befolyásolhatják az eredményt.

A minták integritását Agilent 2100 Bioanalyser (Matrix, Norway) műszerrel határoztam meg, amely az izolált RNS-ben levő kis riboszomális RNS (18S) és nagy riboszomális RNS (28S) szedimentációjából számol egy úgynevezett RIN (RNA Integrity Number) értéket, ebből következtethetünk a

mintában található messenger RNS minőségére és arra, hogy mennyire bomlott le a minta RNS tartalma (8. sz. ábra). Minden vizsgált mintánál a RIN szám (RNA integrity number) 7 felett volt, ez elengedhetetlen feltétele a vizsgálatnak.



8. sz. ábra

Az RNS integritásának mérése Agilent 2100 Bioanalyserrel

Az ábrán a megfelelő minőségű RNS mintára jellemző két specifikus csúcs látható.

3.4.3. A CD24 meghatározása valósídejű PCR módszerrel

A kvantitatív valósídejű PCR során a *CD24* expresszióját primerek és próbák segítségével *Schostak* módszerével határoztam meg [*Schostak és mtsai.* 2005]. A primer és próba szekvenciákat a 8. sz. táblázat mutatja. A hipoxantine foszforibozilltranszferázt (HPRT) mint háztartási gént használtam. A gén-expressziós eredmények normalizálásához ennek a génnek az expresszióját alkalmaztam a placenta mintáknál, míg a prosztatánál a foszfolipáz 2A gént. A mennyiségi meghatározásokhoz a β -globin-t (DNA Control kit, Roche,

Penzberg, Németország) iktattam be minden egyes futtatásnál 15 ng/μl; 1,5 ng/μl; 0,15 ng/μl és 0,015 ng/μl koncentrációkban.

A *CD24* és a *HPRT* expresszió meghatározásához összemértem 1 μl FastStart DNA Master mixet (Roche, Mannheim, Penzberg, Németország), 1,2 mM MgCl₂-ot, és 0,25 pM-t a primerekből és a próbákból. Az amplifikációs program a kezdeti 10 perces 95 °C-on történő denaturálás után következett 40 ciklusban, denaturációs (95 °C; 10 sec), annealing (56 és 63 °C; 5 sec) és extenziós (72 °C; 10 sec) lépésekkel. Ezt követően olvadási görbe analízist végeztem, és meghatároztam a keletkezett termékek olvadáspontját (T_m).

8. sz. táblázat

A *CD24* expresszió meghatározásához használt primerek és próbák szekvenciái

Primer/próba neve	Szekvencia
Primer forward	5'-TgA AgA ACA TgT gAg Agg TTT gAC-3'
Primer reverse	5'-gAA AAC TgA ATC TCC ATT CCA CAA-3'
Próba1	5'-ggA TgT TgC CTC TCC TTC ATC TTg TAC ATG-3'-fluoreszcein
Próba2	5'-LC640-AAC TCC AgCA gAT TTA ATA TTg gCA TTC ATC A-foszfát

3.4.4. Statisztikai analízis

Az adatok kiértékeléséhez SPSS statisztikai software programot használtam fel és t-tesztet alkalmaztam, a szignifikancia értéke $p \leq 0.05$ –ben lett meghatározva 95%-os konfidencia intervallummal.

3.5. Magzati „szabad” DNS kimutatása anyai szérumból

3.5.1. Beteganyag, minták és DNS izolálás

Genetikai amniocentesisre került 80 terhes nőtől vettünk vért, átlagos életkoruk $36,9 \pm 4,7$ év, átlagos terhességi koruk $16,9 \pm 1,8$ hét volt.

A DNS vérplazmából történő izolálásához High Pure PCR Template Isolation Kit-et használtam. A levett 16 ml EDTA-s vérmintát 10 percig 2500-as fordulatszámon centrifugáltam (Eppendorf 5810R, Eppendorf, Hamburg, Németország). Ezt követően a plazmát eltávolítottam, újabb csőbe helyezve 10 percig 15.500-as fordulatszámon centrifugáltam. Az így nyert plazmát -80°C -on tároltam a további feldolgozásig. A DNS izolálásához 500 μl vérplazmát használtam, a DNS-t szilárd fázisú DNS-izoláló kit segítségével (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) a használati útmutató szerint nyertem. Az izolált DNS-t 60 μl „elution” pufferben oldottam fel. A mintákat a felhasználásig -80°C -on tároltam.

3.5.2. SRY gén meghatározása valósídejű PCR módszerrel

A meghatározásokhoz az Y kromoszómán elhelyezkedő SRY génre specifikus SRY-forward, SRY-reverse primereket, valamint fluoreszceinnel és LC-Red 640-nel jelölt próbákat használtam (9. sz. táblázat). A reakcióelegyen a következő PCR ciklusokat hajtottam végre: 95°C 10 perc kezdeti denaturáció, majd 55 cikluson keresztül 95°C 5 sec denaturáció, 60°C 10 sec annealing és 72°C

°C 15 sec extenzió, végül tárolás 4 °C-on. Minden futtatás tartalmazott pozitív és negatív kontroll mintákat.

9. sz. táblázat

Az SRY specifikus primerek és próbák szekvenciái

Primer/próba neve	Szekvencia
SRY forward	5'-ggC AAC gTC Cag gAT AgA gTg A
SRY reverse	5'-TgC TgA TCT CTg AgT TTC gCA TT
SRY próba1	CAT gAA CgC ATT CAT CgT gTg gTC TC X
SRY próba2	LC-Red-640 -CgA TCA gAg gCg CAA gAT ggC TCT

3.5.3. *RhD* gén meghatározása valósídejű PCR módszerrel

A DNS izolálást követően valósídejű PCR történt az *RhD* gén 7. exonjára megtervezett TaqMan rendszerrel (10. sz. táblázat). Bemértem a primerekből és a próbákból 0,4-0,4 µM mennyiségeket, 2mM MgCl₂-t, valamint 1 µl LightCycler TaqMan Master (Roche, Mannheim, Németország) keveréket 10 µl végtérfigathoz, amely 1 µl DNS-t tartalmazott. A PCR a következő lépésekből állt: 2 perc 50 °C, majd 10 perc 95 °C, ezt követően 50 ciklusban 15 sec 95 °C és 1 perc 60 °C, majd 4 °C. Minden futtatás tartalmazott pozitív és negatív kontroll mintákat.

10. sz. táblázat

Az *RhD* gén meghatározásához használt primerek és próbák szekvenciái

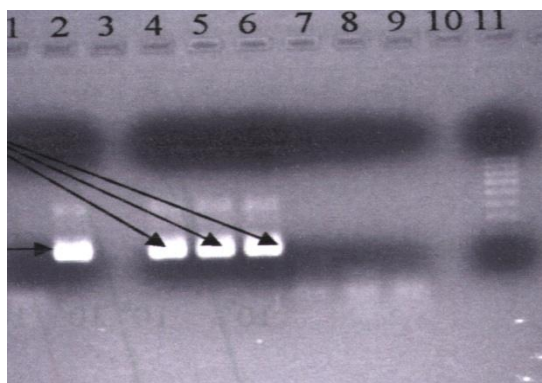
Primer/próba neve	Szekvencia
Forward primer	5'-CTC CAT CAT ggg CTA CAA-3'
Reverse primer	5'-CCg gCT CCg ACg gTA TC-3'
Próba	5'-FAM-AgC AgC ACA ATg Tag ATg ATC TCT CCA-TAMRA

4. EREDMÉNYEK

4.1. A *Toxoplasma gondii* kimutatási módszereinek összehasonlítása

4.1.1. Hagyományos PCR

A *T. gondii* B1 génjére megtervezett primerekkel optimalizáltam a polimeráz láncreakciót. A PCR-t követően kétórás 100 V-on történő elektroforézissel elválasztottam a keletkezett fragmentumokat 0,5XTBE pufferben, majd az etidiumbromid festést követően a gélen kapott mintázatot kiértékeltem. A 9. sz. ábrán a 122 bp nagyságú fragmentum a *T. gondii* genom jelenlétét mutatja. Öt pozitív mintát találtam a 74 vizsgált mintából.



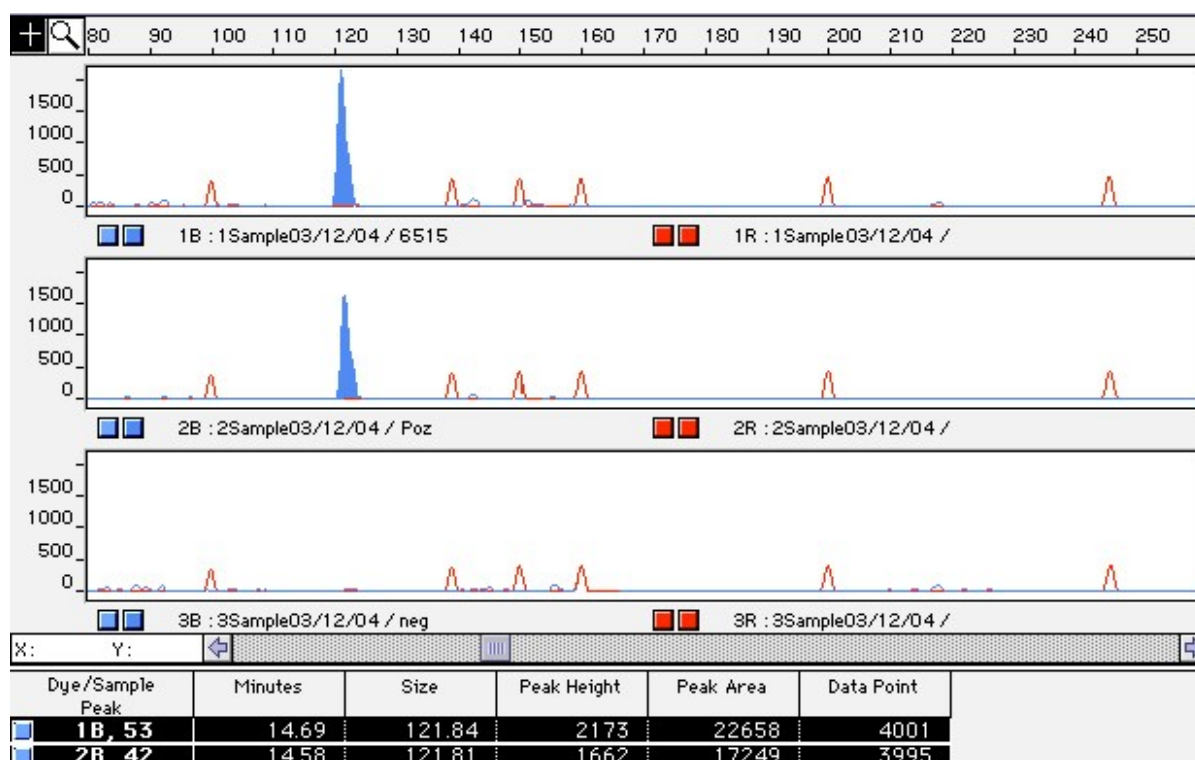
9. sz. ábra

Toxoplasma gondii kimutatása hagyományos PCR módszerrel

Az ábrán a 122 bp nagyságú fragmentum a *T. gondii* genomjának jelenlétét mutatja a mintában. A 2. sz. minta a pozitív kontroll, a 1. sz. minta a negatív kontroll, a 4. 5. és 6. sz. minták pozitív, magzatvízből izolált DNS-t mutatnak. A 3. sz. és a 7-10. sz. minta negatív DNS, a 11. sz. minta a molekulásúly marker DNS. A nyilak jelzik a 122 bp nagyságú PCR terméket.

4.1.2. Fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis

A fluoreszcens PCR és a DNS fragmens analízis paramétereit optimalizáltam. A meghatározások során a PCR termék fragmentumokat ABI 310 készüléken kapilláris elektroforézissel választottam el, a készülék lézerdetektor segítségével olvasta le a fluoreszcens jeleket. A *T. gondii* pozitív mintákban a 122 bp nagyságú PCR fragmentum jelenléte jelezte a fertőzés meglétét. A 10. sz. ábrán egy *T. gondii* fertőzött magzatvíz minta, egy pozitív kontroll minta, és egy nem fertőzött magzatvíz minta elektroforetogramjai láthatók. Öt *T.gondii* pozitív mintát mutattam ki a 74 vizsgált mintából.



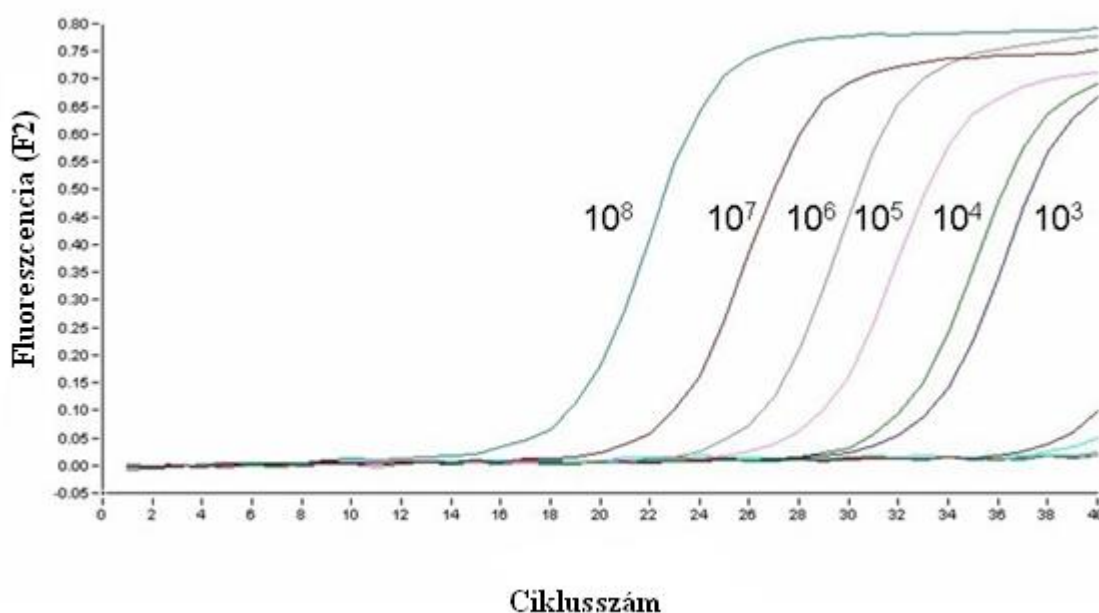
10. sz. ábra

A *Toxoplasma gondii* kimutatása fluoreszcens PCR-ral és DNS fragmens analízissel

Az elektroforetogramon egy *T. gondii* fertőzött minta (felül), egy pozitív kontroll (középen) és egy negatív kontroll minta (lent) képe látható. A 122 bp nagyságú PCR fragmentum a *T.gondii* genom jelenlétét mutatja a mintában.

4.1.3. Valósídejű PCR SYBRGreen I módszerrel

A kvantitatív valósídejű PCR módszer esetében először SYBR Green I festék felhasználásával optimalizáltam a kimutatást. A beállított paraméterekkel a primer-dimerek és az egyéb nem-specifikus termékek jelenlétét a komponensek optimális beállításával sikerült kiküszöbölni. A keletkezett termék azonosítására olvadási görbe analízis követett minden egyes PCR meghatározást. Öt *T. gondii* pozitív mintát mutattam ki a 74 vizsgált mintából. A módszer kimutatási érzékenységét a *T. gondii* törzsoldatból készült hígítási sorból származó minták felhasználásával határoztam meg (11. sz. ábra).



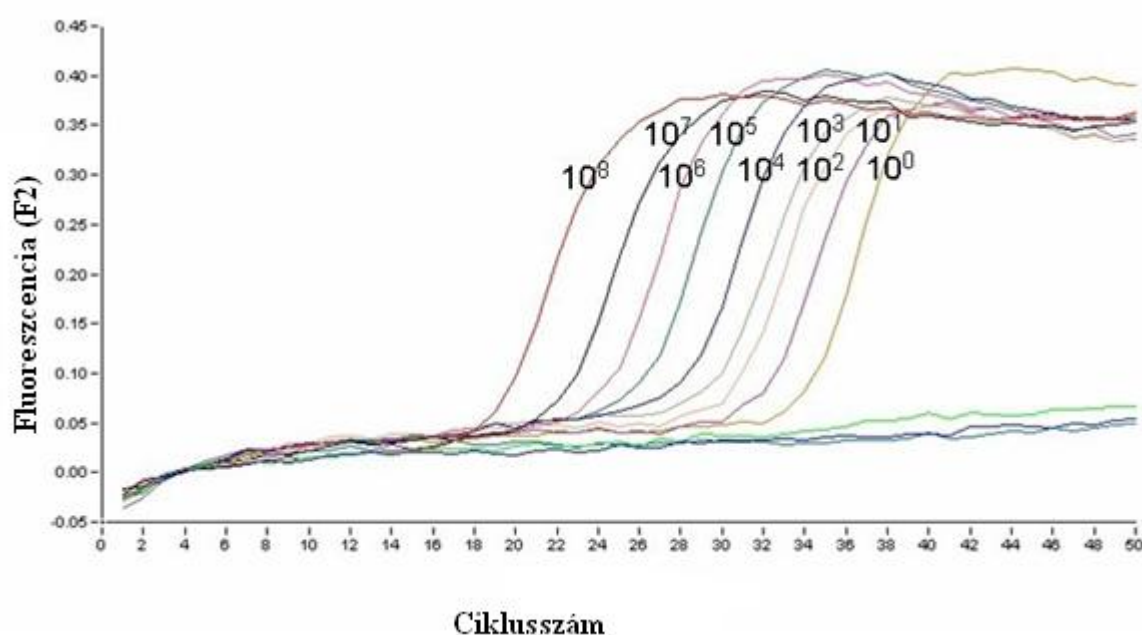
11. sz. ábra

A *Toxoplasma gondii* kimutatása kvantitatív valósídejű PCR módszerrel SYBRGreen I felhasználásával

Az ábra azt mutatja, hogy a *T. gondii* törzsoldatból hígítási sort készítve a koncentráció és az amplifikáció megjelenése arányban állnak egymással, a módszer érzékenysége alapján 10^3 számú parazita mutatható ki a vizsgált mintából.

4.1.4. Valósídejű PCR primer-próba rendszerrel

E módszer beállítása során specifikus próbákat alkalmaztam, és optimalizáltam a PCR futtatási paramétereit. Öt *T. gondii* pozitív mintát mutattam ki a 74 vizsgált mintából. A módszer kimutatási érzékenységét a *T. gondii* törzsoldatból készült hígítási sorból származó minták felhasználásával határoztam meg (12. sz. ábra). A beállított módszerrel a kimutatási érzékenységet egy protozoa mennyiségre sikerült beállítani (12. sz. ábra).



12. sz. ábra

***Toxoplasma gondii* kimutatása kvantitatív valósídejű PCR módszerrel
próbák felhasználásával**

Az ábrán jól látható, hogy a kvantitatív valósídejű PCR módszer esetében is a kiindulási DNS koncentráció befolyásolja az amplifikációt, minél magasabb a koncentráció, annál hamarabb kezd el exponenciálisan növekedni a keletkezett termék mennyisége. A *T. gondii* törzsoldatából hígítási sort készítve 10^0 parazita mutatható ki ezzel a módszerrel.

11. sz. táblázat

***A Toxoplasma gondii* kimutatási módszerek összehasonlítása**

Kimutatási módszer	DNS izolálás	A vizsgálat időigénye	A környezetre veszélyt jelent-e a módszer	Kimutatási érzékenység (parazitaszám)
Hagyományos PCR	1 óra	5-6 óra	igen	1000
Fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis	1 óra	3 óra (első minta +30 perc mintánként)	nem	10-100
Kvantitatív valósídejű PCR SYBRGreen-nel	1 óra	1 óra (32 minta)	igen	1000
Kvantitatív valósídejű PCR próbával	1 óra	1 óra (32 minta)	nem	1-10

A *T. gondii* kimutatási módszerek összehasonlítását a 11. sz. táblázat mutatja. Legkedvezőbbnek a kvantitatív valósídejű PCR primert-próbát alkalmazó rendszer mutatkozott (11. sz. táblázat).

A vizsgált minták közül öt bizonyult *T. gondii* fertőzöttnek. Ötven várandós esetében az immunológiai teszt (TORCH) pozitív eredményt mutatott (48 esetben az IgM, két esetben az IgG). Egy betegnél az ultrahang vizsgálat során figyeltek meg eltérést, ami felvetette a fertőzés lehetőségét. Az öt PCR pozitív *T. gondii* terhes közül 4 volt IgM pozitív, egynél pedig az ultrahang vizsgálaton találtak eltérést, mindannyian antibiotikum kezelésben részesültek.

4.2. Egynukleotidos polimorfizmus meghatározása valósídejű PCR módszerrel

4.2.1. A 21. kromoszóma triszómiájának meghatározása

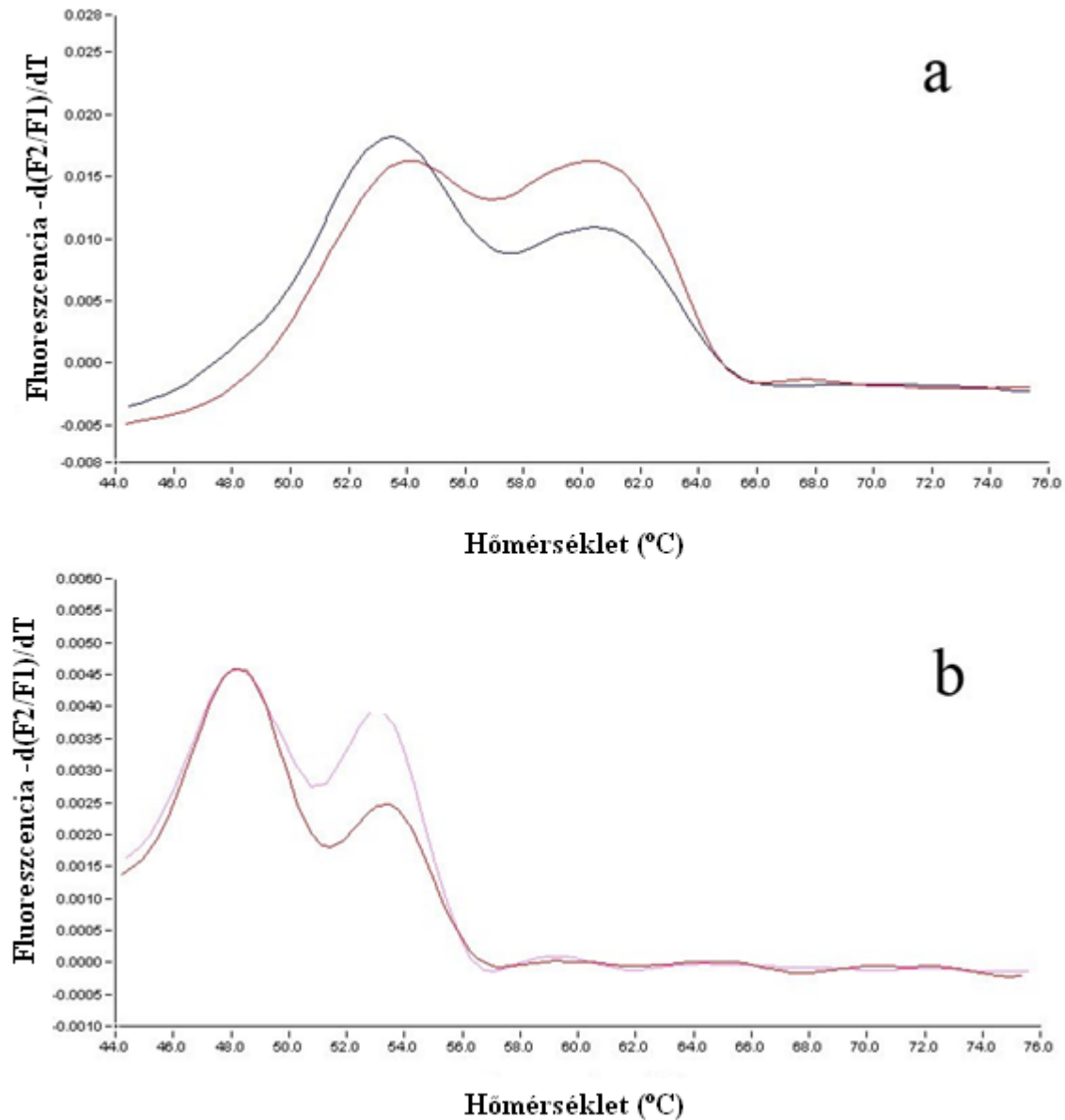
A *WIAF 899* és *WIAF 2643* SNP-t határoztam meg a módszer optimalizálása után 129 magzatvízből izolált DNS mintában. A valósídejű PCR során keletkezett PCR fragmentumok olvadási görbe analízisének elvégzése után a görbe alatti területek adatait kiértékeltem.

Az 13. sz. ábrán a *WIAF 899* és a *WIAF 2643* meghatározás tipikus olvadási görbe analízis képe látható két-két mintával, az egyik 21-es triszómiás, a másik normál diallélikus.

Az olvadási görbe alatti területi arányok szignifikánsan különböztek a két vizsgált csoport között ($0,5246 \pm 0,002498$ a triszómiás és $0,8347 \pm 0,005234$; $p < 0,001$ a *WIAF 899* esetén). Ez a marker 27 (40,2%) esetben volt informatív a triszómiás csoportban és 27 esetben (43,5%) a diallélikus mintáknál.

A *WIAF 2643* esetén 29 (43,2%) triszómiás és 34 (54,8%) diallélikus minta bizonyult informatívnak. A görbe alatti területek nem különböztek lényegesen ($0,4594 \pm 0,001594$ vs. $0,4567 \pm 0,001012$; $p = 0,615$).

dc_254_11



13. sz. ábra

**A 21. kromoszóma triszómiájának kimutatása valósídejű PCR-ral és olvadási görbe
analízissel WIAF 899 és a WIAF 2643 SNP markerek felhasználásával**

Az **a** jelű ábrán a WIAF 899 marker olvadási görbe analízise során nyert triszómiás (kék) és diallélikus (bordó) minta képe látható. A **b** jelű ábrán a WIAF 2643 marker olvadási görbe analízise látható egy triszómiás (bordó) és egy diallélikus (lila) minta esetében.

4.2.2. *VEGF* egynukleotidos polimorfizmusának meghatározása HELLP szindrómás és egészséges normotóniás terhesek mintáiban

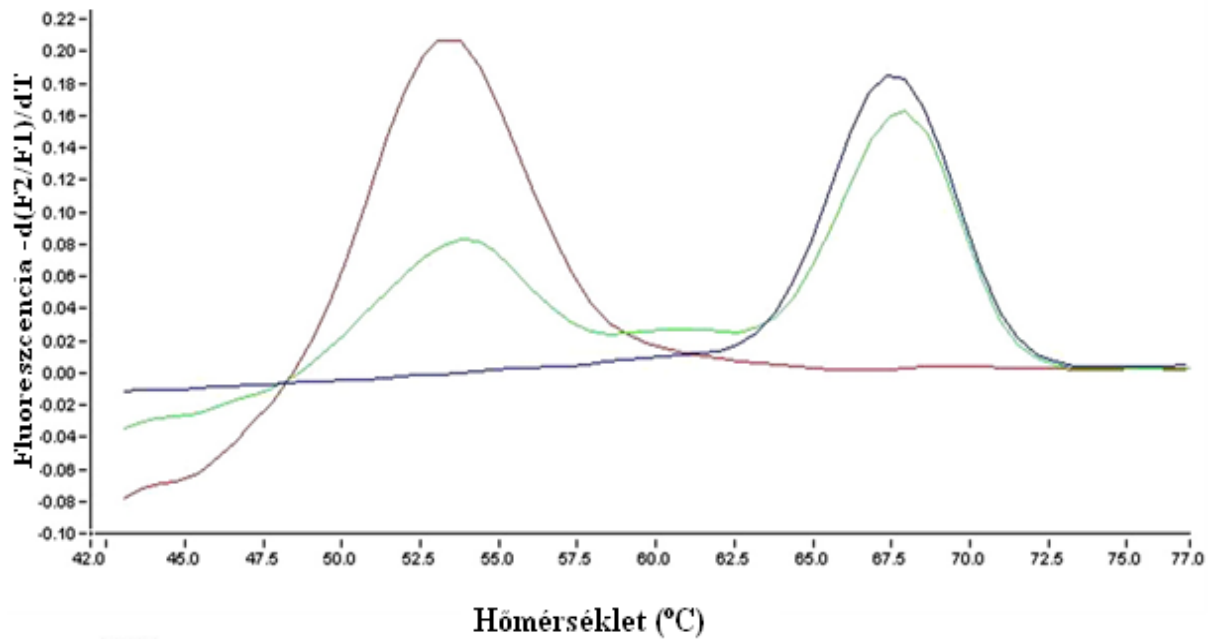
A *VEGF C-2578A*, *C-460T* és a *G+405C* meghatározására valósídejű PCR és olvadási görbe analízis módszert állítottam be, a PCR paramétereit a primer-próba rendszerrel optimalizáltam.

A 5. sz. táblázat mutatja a vizsgálatokba bevont két csoport demográfiai és klinikai paramétereit. A két vizsgált csoport között nem volt lényeges különbség az anyai életkorban és a primiparák arányában. A gesztációs kor és a születési súly szignifikánsan alacsonyabb volt a HELLP szindrómában szenvedő betegek csoportjában, az intrauterin növekedésben visszamaradottak (IUGR) aránya elérte a 46,5%-ot.

A 12. és 13. táblázat mutatja a három vizsgált *VEGF* SNP allél és genotípus előfordulási gyakoriságát. A Hardy-Weinberg törvény érvényesnek bizonyult a *VEGF C-2578A*, *C-460T* és a *G+405C* SNP esetében. Szignifikáns különbség mutatkozott 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 rizikófaktort jelentett a betegség előfordulásában ($OR=3,03$, 95%; $CI=1,51-6,08$; $p=0,002$).

Jóllehet a *VEGF G+405C* allél és genotípus eloszlás nem különbözött lényegesen, a *CC* genotípus független rizikófaktornak mutatkozott ($OR=3,67$, 95% $CI=1,05-12,75$; $p=0,041$) a kórkép kialakulásában.

A *VEGF C-2578A* SNP polimorfizmus vizsgálat során nem találtam különbséget a két csoportban.

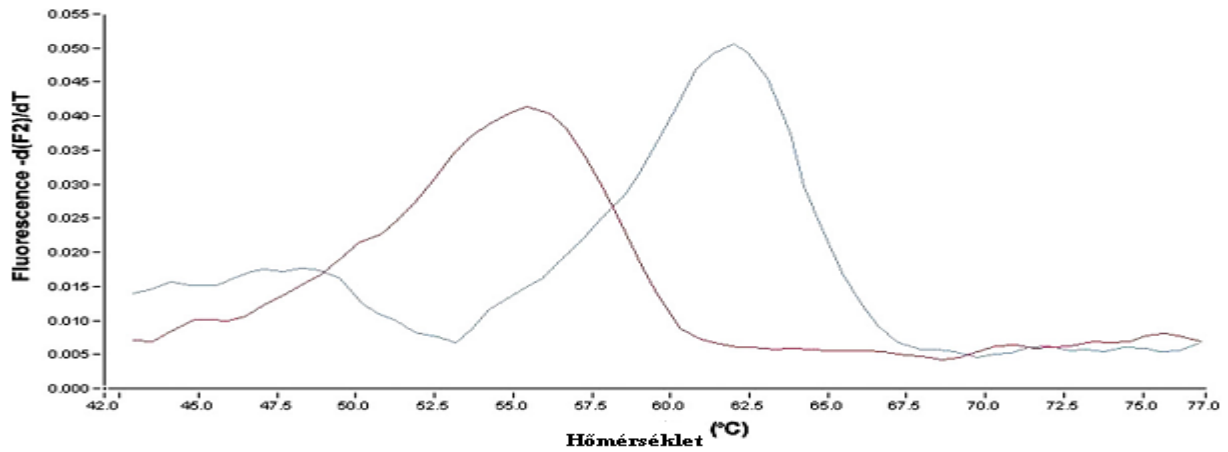


14. sz. ábra

A VEGF C-2578A olvadási görbe analízise

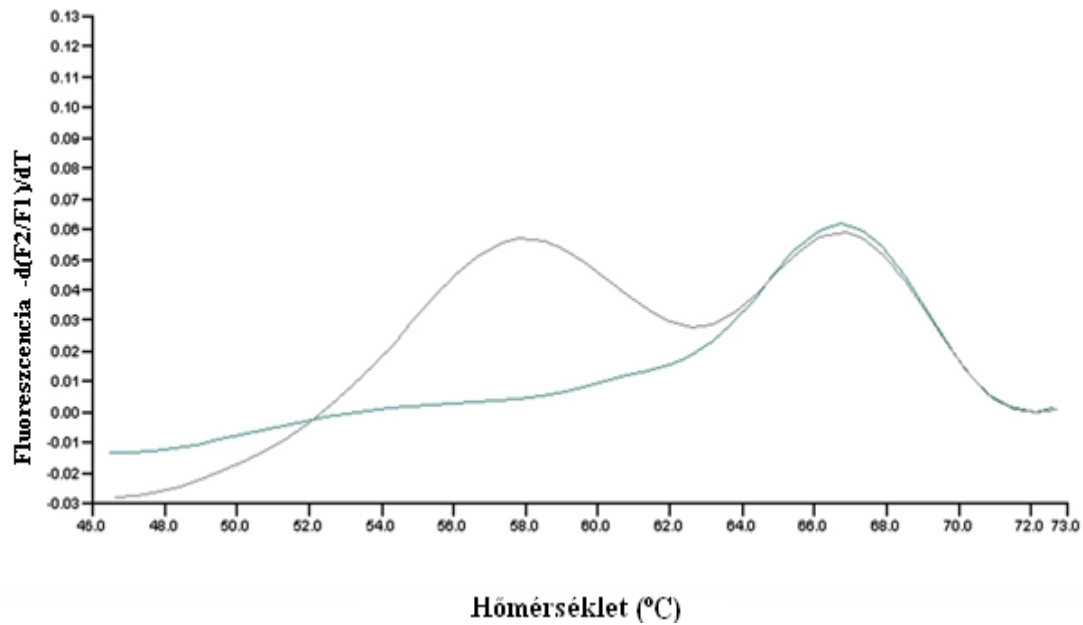
Az ábra mutatja az olvadási görbe analízis során mutatkozó 54 °C olvadási pontot az A, és 67 °C olvadási pontot a C allélok esetében. A kék jelzésű minta homozigóta (*C allél*), a lila és a zöld jelzésű minta heterozigóta (AC).

dc_254_11



15. sz. ábra
A VEGF C-460T olvadási görbe analízise

Az ábra mutatja az olvadási görbe analízis során mutatkozó 55 °C olvadási pontot a T, és a 62 °C olvadási pontot a C allélok esetében. A bordó jelzésű minta homozigóta a T, a kék jelzésű minta homozigóta a C allélra.



16. sz. ábra
A VEGF G+405C olvadási görbe analízise

Az ábra mutatja a VEGF G+405C olvadási görbe analízise során mutatkozó 59 °C olvadási pontot a C, és a 67 °C olvadási pontot a G allélok esetében.

12. sz. táblázat

A vizsgált VEGF SNP allélok előfordulási gyakorisága egészséges terhes és HELLP szindrómás betegek csoportjában

VEGF C-460T

Vizsgált csoport	C allél	T allél
HELLP szindrómás n=71	41 (28,9%)	101 (71,1%)
Kontroll n=93	86 (46,2%)	100 (53,8%)

p=0,0014

VEGF C-2578A

Vizsgált csoport	C allél	A allél
HELLP szindrómás n=71	68 (47,9%)	74 (52,1%)
Kontroll n=93	84 (45,2%)	102 (54,8%)

p=0,62

VEGF G+405C

Vizsgált csoport	G allél	C allél
HELLP szindrómás n=71	109 (76,8%)	33 (23,2%)
Kontroll n=93	150 (80,6%)	36 (19,4%)

p=0,39

13. sz. táblázat

A VEGF SNP genotípusok egészséges terhesek és HELLP szindrómás betegek csoportjában

VEGF C-460T

Vizsgált csoport	Genotípus		
	CC	CT	TT
HELLP szindrómás n=71	2 (2,8%)	37 (52,1%)	32 (45,1%)
Kontroll n=93	13 (14,0%)	60 (64,5%)	20 (21,5%)

p=0,0011

TT vs. CT vagy CC genotípus: odds ratio (OR)=2,99, 95% konfidencia intervallum (CI)=1,52–5,91, p=0,002; adjusztált OR=3,03, 95% CI=1,51–6,08; p=0,002

VEGF C-2578A

Vizsgált csoport	Genotípus		
	CC	CT	TT
HELLP szindrómás n=71	17 (23,9%)	34 (47,9%)	20 (28,2%)
Kontroll n=93	17 (18,3%)	50 (53,8%)	26 (27,9%)

p=0,64

VEGF G+405C

Vizsgált csoport	Genotípus		
	GG	GC	CC
HELLP szindrómás n=71	47 (66,2%)	15 (21,1%)	9 (12,7%)
Kontroll n=93	61 (65,6%)	28 (30,1%)	4 (4,3%)

p=0,091

CC vs. GC vagy GG genotípus: OR=3,23, 95% CI=0,95–10,96, p=0,060;
 adjusztált OR=3,67, 95% CI=1,05–12,75, p=0,041

4.3. Deléció kimutatása ($\Delta F508$)

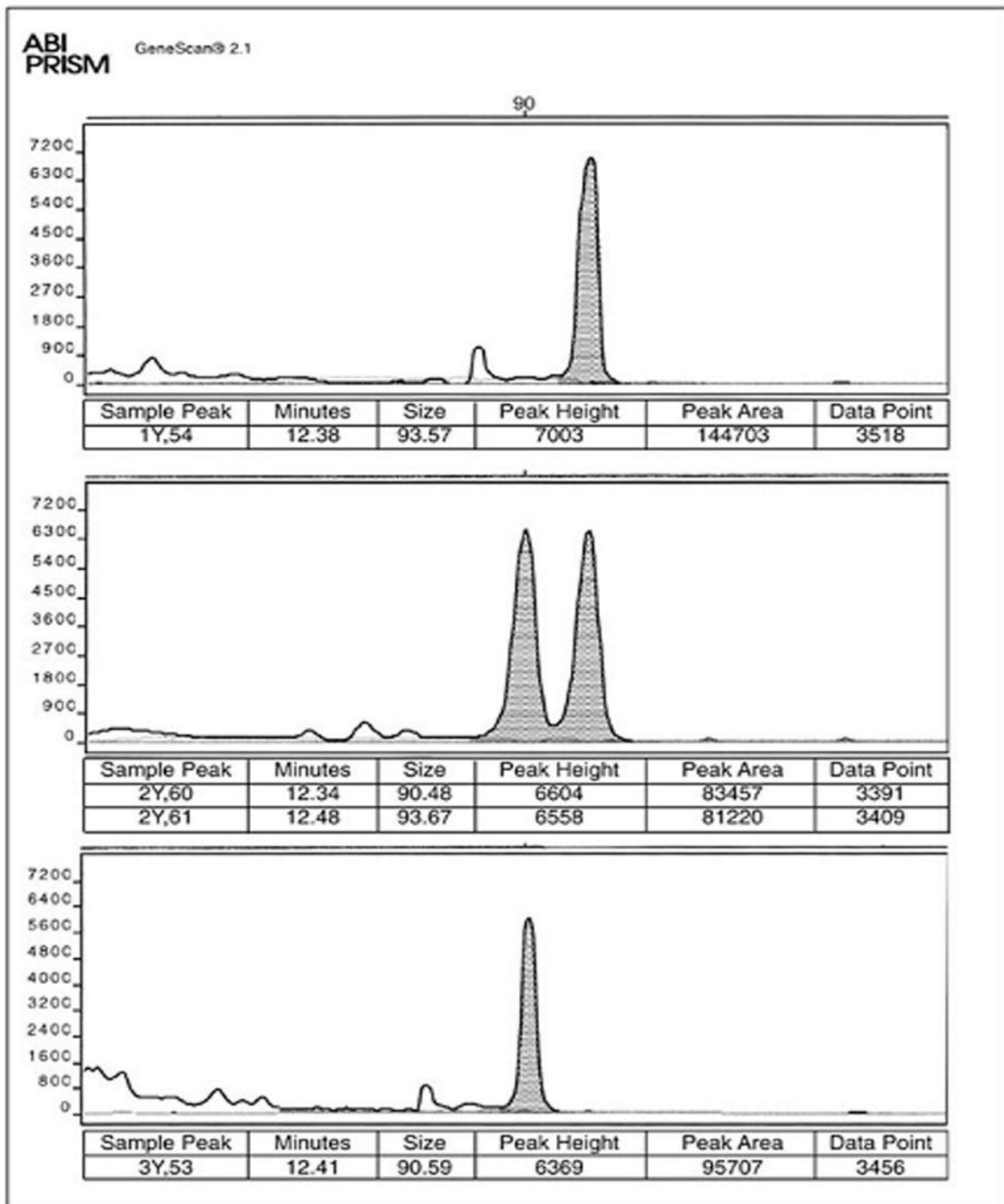
4.3.1. A $\Delta F508$ kimutatása fluoreszcens PCR-ral és DNS fragmens analízissel

A hagyományos PCR-t érzékenyebb kimutatási eljárásokkal váltottam ki. A fluoreszcens PCR és a valósídejű PCR paramétereit optimalizáltam egy előzőleg kimutatott $\Delta F508$ heterozigóta, egy normál egészséges és egy negatív (PCR templát nélküli) kontroll segítségével. A 17. sz. ábra mutatja a minták elektroforetogramját. A fluoreszcens PCR egészséges mintánál 93 bp nagyságú, heterozigóta minta esetében egy 90 bp és egy 93 bp, homozigóta minta (beteg) esetében egy 90 bp nagyságú fragmentumot mutat. A vizsgálat során 67 normál, 44 heterozigóta és 5 $\Delta F508$ homozigóta (19. sz. ábra) eredményt kaptam.

4.3.2. A $\Delta F508$ kimutatása valósídejű PCR módszerrel

Valósídejű PCR esetén a $\Delta F508$ deléciót tartalmazó PCR termék olvadáspontja 49 °C, az egészséges egyénekre jellemző PCR termék olvadáspontja 60 °C. A DNS izolálást követően kvantitatív valósídejű PCR és olvadási görbe analízis segítségével egy óra alatt lehetőség nyílik a meghatározásra.

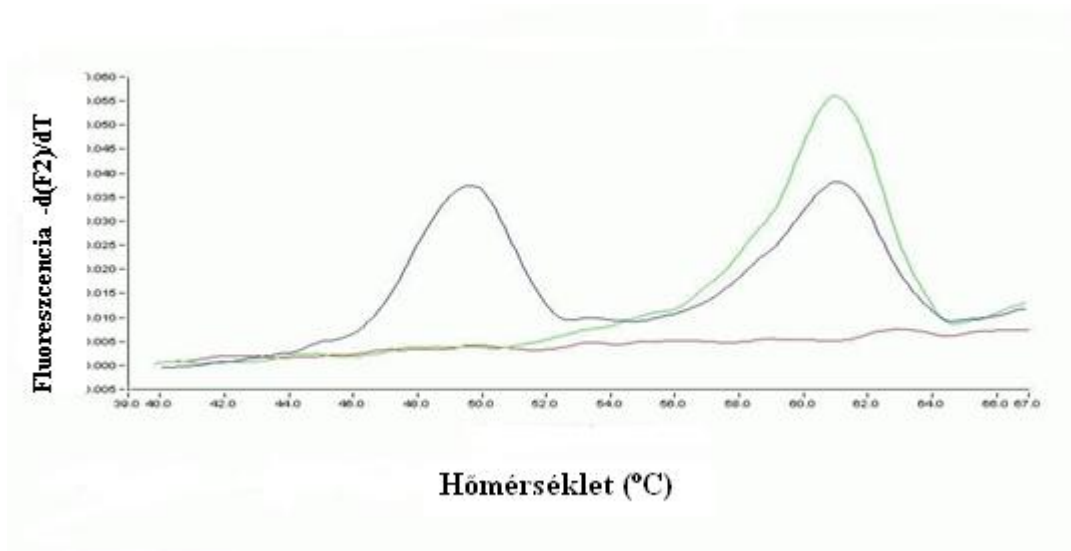
A vizsgált 116 mintából 67 normál, 43 heterozigóta, 5 $\Delta F508$ homozigóta és egy $\Delta F508C$ homozigóta (19. sz. ábra) eredményt kaptam. A 14. sz. táblázat mutatja részletesen a vizsgálati mintákat típus szerint. Az eredmények megegyeznek a fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis során nyert eredményekkel, kivéve a $\Delta F508C$ eredményt, amelynek kimutatására ez a módszer nem alkalmas. A klinikai gyakorlatban leggyakrabban előforduló három szövettípusból izolált DNS felhasználhatóságában nincs különbség.



17. sz. ábra

A *ΔF508* kimutatása fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis segítségével

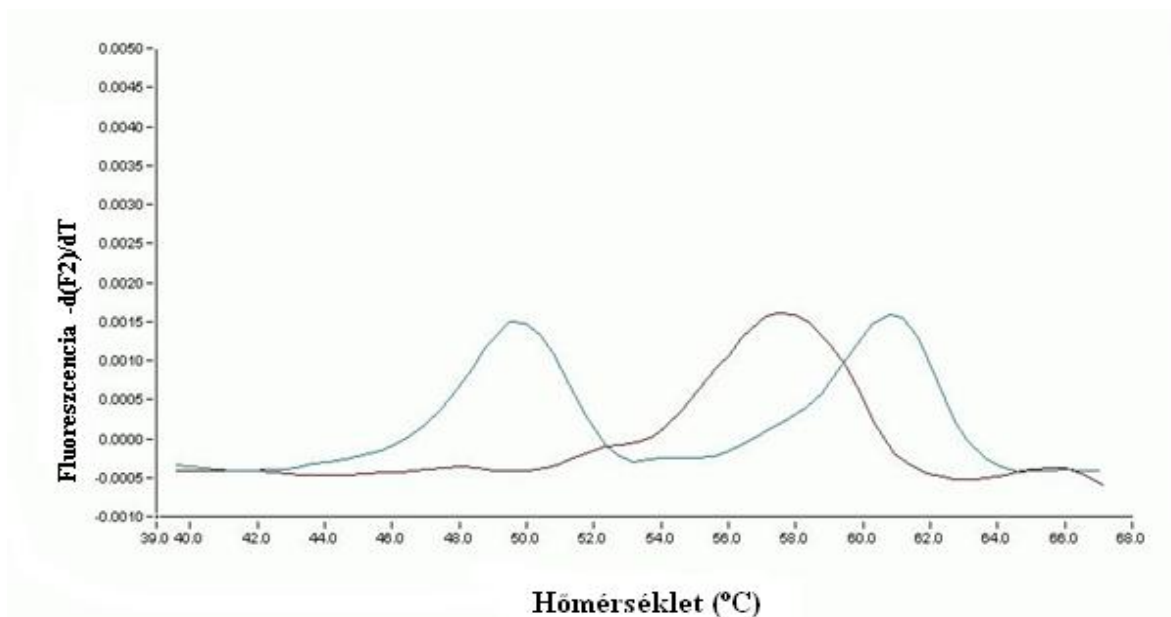
A felső elektroforetogramon egy egészséges (vad, 93 bp fragment méretű), a középsőn egy heterozigóta (90 bp és 93 bp fragment méretű), az alsón egy *ΔF508* homozigóta (90 bp fragment méretű) mintára jellemző fragmentum látható.



18. sz. ábra

A $\Delta F508$ deléció kimutatása kvantitatív valósídejű PCR módszerrel

Az ábrán egy heterozigóta (kék), egy normál egészséges (zöld) és egy negatív kontroll (piros) minta kvantitatív valósídejű PCR-t követő olvadási görbe analízise látható. A $\Delta F508$ -at tartalmazó PCR termék olvadási pontja 49 °C, az egészséges egyénekre jellemző PCR termék olvadáspontja 61°C.



19. sz. ábra

A $\Delta F508$ és $\Delta F508C$ kimutatása kvantitatív valósídejű PCR módszerrel

Az ábrán egy $\Delta F508$ heterozigóta (zöld) és $\Delta F508C$ (barna) homozigóta minta PCR termék olvadási görbe analízise látható. A $\Delta F508$ heterozigóta minta PCR termékének olvadási pontja 49°C és 61°C, míg a $\Delta F508C$ homozigóta minta PCR termékének olvadási pontja 58°C.

14. sz. táblázat

A $\Delta F508$ kimutatására alkalmazott két vizsgálati módszer összehasonlítása

Minta	Detektálási módszer					
	F-PCR			Q-RT-PCR		
	Normál (vad)	Heterozigóta	$\Delta F508$ homozigóta	Normál (vad)	Heterozigóta	$\Delta F508$ homozigóta
Perifériás vér n=84	50	32	2	50	32	3
Chorionboholy n=18	10	5	3*	10	5	3*
Magzatvíz n=14	7	6	1	7	6	1

* Egy minta homozigóta volt $\Delta F508C$ -re.

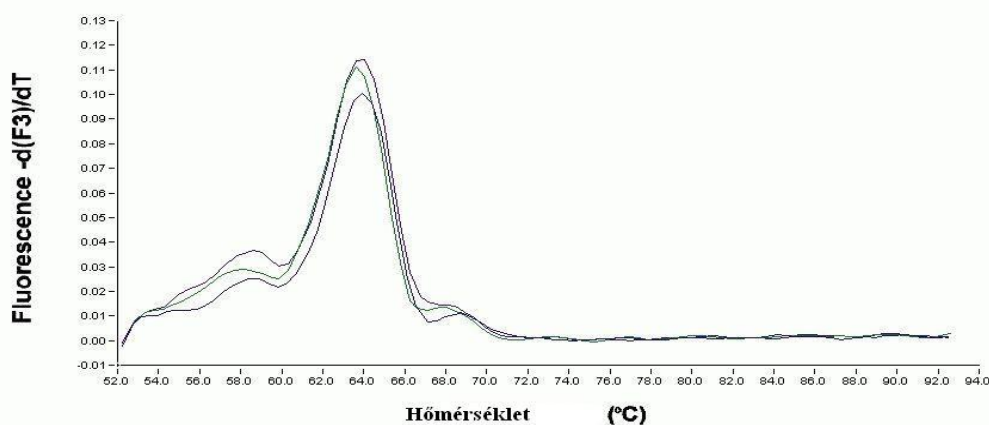
4.4. CD24 expresszió meghatározása

4.4.1. CD24 expresszió meghatározása egészséges és préeklampsziás placentákban

A CD24 meghatározására a primer-próba rendszert optimalizáltam, beállítottam a megfelelő primer, próba, MgCl_2 koncentrációkat és hőmérsékleteket. A 20. sz. ábra mutatja az olvadási görbe analízis tipikus képét.

RNS-t izoláltam 16 PE és 16 egészséges kontroll placentából, majd a cDNS-t megszentetizáltam, és a CD24 expressziót kvantitatív valósídejű PCR-ral határoztam meg. A CD24 koncentráció a PE csoportban $18,94 \pm 26,86 \text{ ng}/\mu\text{l}$, az egészséges kontroll csoportban $53,58 \pm 92,05 \text{ ng}/\mu\text{l}$ volt, a különbség statisztikailag szignifikáns ($p=0,03$) (15. sz. táblázat).

A Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága engedélyezte a vizsgálatokat, a betegek a tájékoztatást követően beleegyező nyilatkozatot írtak alá.



20. sz. ábra

A CD24 olvadási görbe analízise

Az ábrán jól látható, hogy a CD24 jelenlétét mutató PCR termék olvadási pontja 64 °C.

15. sz. táblázat

A CD24 expressziója egészséges és préeklampsziás terhesek placenta mintáiban

Vizsgált csoport	CD24 koncentráció (ng/μl)	A szignifikancia szintje (p)
Préeklampsziás terhes (n=16)	18,94±26,86	0,03
Egészséges terhes (n=16)	53,58±92,05	

4.4.2. CD24 expresszió meghatározása prosztata tumoros és benignus prosztata hiperpláziás mintákban

Schostak és mtsai által közölt CD24 mRNS expresszió meghatározási módszerrel a tűbiopsziával nyert prosztatákból izolált RNS mintákból elvégeztem a meghatározásokat.

A prosztata tumoros betegek (n=21) csoportjában 33,65±47,39 ng/μl, a BPH-s (n=10) csoportban 4,00±4,25 ng/μl volt a CD24 koncentrációja (p=0,014).

A PSA szintekben is szignifikáns különbség mutatkozott - 252,37±308,33 ng/ml vs. 3,50±2,14 ng/ml (p=0,001) - a két vizsgált csoportban.

A Gleason score középértéke $7,6 \pm 1,34$ volt, 7-nél magasabb értéket mutatott 9 PCA-s betegnél. A Gleason score összefüggést mutatott a *CD24* ($p=0,033$), és a PSA értékekkel ($p>0,004$). Az eredményeket a 16. sz. táblázat mutatja. A 20. sz. ábrán a *CD24* expresszió mérése után kapott olvadási görbe analízis látható, a kapott termék olvadási hőmérséklete $64\text{ }^{\circ}\text{C}$ volt.

16. sz. táblázat

A PSA és a *CD24* expresszió a prosztata tumoros és a benignus prosztata hiperpláziás csoportban

Beteg csoport	Átlagos életkor (év)	Proszтата specifikus antigén szint (ng/ml)	<i>CD24</i> szint (ng/ μ l)
Proszтата tumoros (PCA) n=21	$72,0 \pm 8,8$	$252,38 \pm 308,33$	$33,65 \pm 47,39$
Benignus prosztata hiperpláziás (BPH) n=10	$64,3 \pm 12,1$	$3,5 \pm 2,14^*$	$4,0 \pm 4,25^{**}$

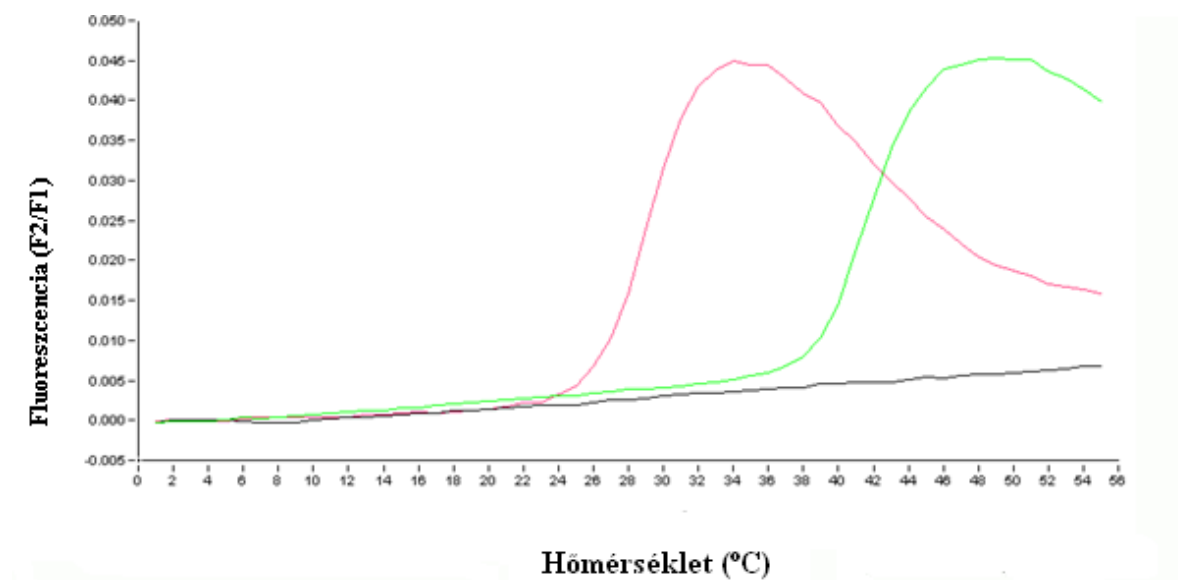
* $p=0,001$

** $p=0,014$

4.5. „Szabad” nukleinsav meghatározások

4.5.1. SRY meghatározás anyai vérből izolált „szabad” magzati DNS-ből

Az anyai vérből izolált „szabad” magzati DNS kimutatására az *SRY* régióra megtervezett primereket és próbákat használtam. A tanulmányba bevont 80 terhesből 38 esetben mutattam ki fiú magzat jelenlétét, ezek az eredmények megegyeztek a kariotipizálás és a fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis eredményeivel. A 21. sz. ábra mutatja a meghatározás tipikus képét. Jól látható, hogy a magzatvízsejtekből jelentősen nagyobb koncentrációban lehet DNS-t izolálni, a „szabad” DNS-nél kb. tízszer nagyobb mennyiségben.



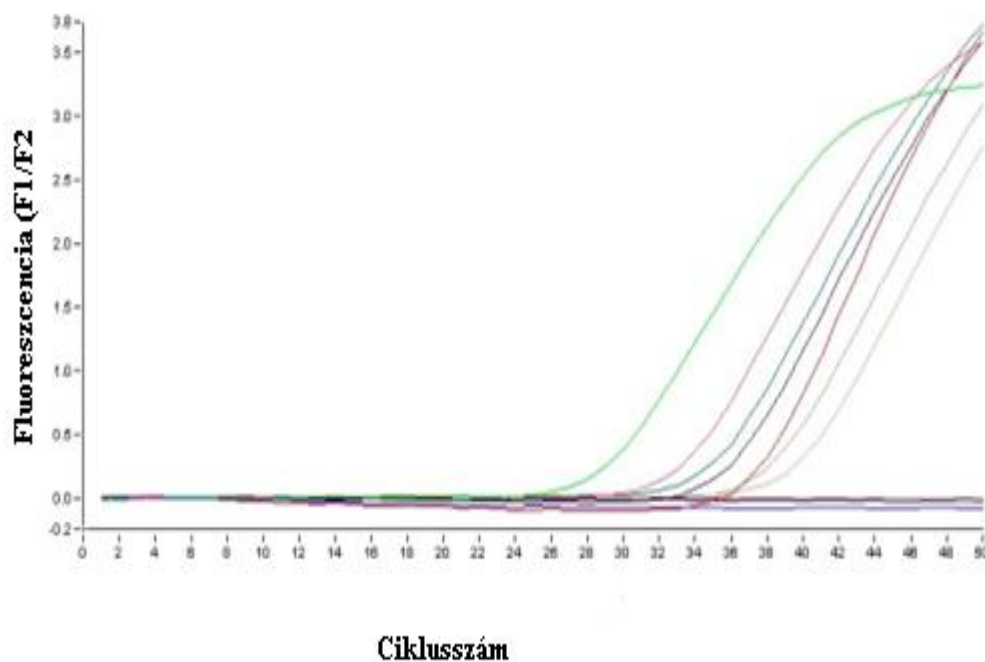
21. sz. ábra

Az *SRY* meghatározása primer-próba rendszerű valósidejű PCR módszerrel

Az ábrán a fekete görbe a negatív kontroll minta, a piros görbe magzatvízből izolált fiú magzat DNS-e ($C_t = 25.87$), a zöld görbe pedig fiú magzat esetén anyai vérből izolált „szabad” DNS ($C_t = 38.50$) felhasználásával tipikus amplifikáció képét mutatja.

4.5.3. *RhD* gén meghatározása anyai vérből izolált „szabad” DNS-ből

A vizsgált 80 mintából két esetben volt *RhD* negatív az apa és az anya, így a magzat is, ezt sikerült kimutatni. Ilyenkor az amplifikáció hiánya mutatja a negativitást. A specifikus PCR termék a többi mintánál jelentkezett. Ezeknél a meghatározásoknál negatív kontroll minta beiktatása elengedhetetlenül szükséges. A 22. sz. ábra mutatja az *RhD* kimutatását valósídejű PCR módszerrel.



22. sz. ábra

Az *RhD* kimutatása TaqMan típusú valósídejű PCR módszerrel

TaqMan típusú primer-próba rendszerrel az *RhD* kimutatása során a PCR termék jelenléte pozitivitást, hiány a negativitást jelzi.

5. MEGBESZÉLÉS

Munkám során az elmúlt 14 évben jelentős szerepet játszott a valósidejű PCR klinikai alkalmazhatóságának vizsgálata, a módszeren alapuló megbízható kimutatási eljárások kidolgozása, bevezetése. A Helsinki Egyetem 2000-ben vette meg Skandináviában elsőként a LightCycler készüléket, ezzel kezdtem el dolgozni, többek között a különböző tumoros mintákon végzett microarray vizsgálatok eredményeit igazoltam, a lényeges eltérést mutató gének expressziójának kimutatására szemikvantitatív meghatározásokat fejlesztettem ki [Aalto és mtsai, 2001; Larramendy és mtsai, 2002, Zhu és mtsai, 2002; Nagy B. és mtsai, 2003a, 2003b; Cerasiano és mtsai, 2004]. Finnországból öt év után visszatérve a Semmelweis Egyetem I.Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Genetikai Laboratóriumában a valósidejű PCR módszert továbbra is előszeretettel alkalmaztam [Nagy B., 2013]. A napi rutinba bevezettem a *ΔF508* és a *T. gondii* kimutatását. Klinikai kutatómunkámban két fő alkalmazási területen kapott nagy szerepet a valósidejű PCR módszer, egyrészt az egyes gének polimorfizmusainak és mutációinak kimutatásában, másrészt a microarray eredmények igazolásában az eltérést mutató génexpressziók pontos meghatározásával.

Disszertációmban példákon keresztül mutatom be az egyes speciális alkalmazási területeket.

5.1. A *T. gondii* kimutatása

A *T. gondii* a protozoák közé tartozó intracelluláris parazita, az általa okozott fertőzés egészséges személyek esetében jelentéktelen tünetekkel jár, míg a várandós nőknél súlyos kongenitális toxoplazmózis kialakulását idézheti elő. Az alkalmazott szerológiai módszerrel az anya immunológiai státuszáról kapunk információt, de azt, hogy a protozoa átjutott-e a placentán, nem tudjuk

megmondani. Ezért van nagy jelentősége a magzati mintákon végzett molekuláris biológiai eljárásoknak.

A kórokozó a placentán átjutva főleg központi idegrendszeri elváltozásokat okoz. A fertőzés különböző súlyosságú lehet a magzat korától függően. A kórokozó kimutatásában a gén amplifikációs eljárások egyre nagyobb szerepet játszanak. Klinikánkon a PCR módszerrel történő direkt *T. gondii* meghatározást magzatvízből már 1996-ban bevezettük. A meghatározási módszerek azonban gyorsan fejlődnek, újabb, korszerűbb eljárásokat fejlesztenek ki, ezek közül bevezettem a fluoreszcens PCR-t és DNS fragmens analízist, majd a protozoa kimutatására a valósídejű PCR-t alkalmaztam [Nagy B. és mtsai, 2005a; 2007b].

Négy különböző molekuláris biológiai módszer használhatóságát vizsgáltam meg a *T. gondii* fertőzés magzatvízből történő diagnosztizálására, ezzel gyakorlatilag a PCR módszer evolúcióját követhetjük végig [Nagy B. és mtsai, 2006a]. A hagyományos PCR-ral szemben nincs szükség az elektroforetikus elválasztást követő etidiumbromidos festésre, ami mutagén és karcinogén. A fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis során a primer fluoreszcens festéssel való jelölése kb. ezerszeresére növeli a kimutatás érzékenységét [Nagy B. és mtsai, 2005a; 2007b]. Ennek a további növelése a valósídejű PCR bevezetésével lehetséges. A vizsgált 64 mintából öt bizonyult fertőzöttnek minden módszerrel. Ez megfelel a Johan Béla OEK által közölt éves kongenitális toxoplazmózis esetek átlagos számával, pl. 1993 és 1997 között 9 esetet említene. Évente országosan 1-2 eset előfordulásával lehet számolni.

Tizenöt laboratórium tapasztalatait összegzik Pelloux és mtsai [1998]. Szerintük az egyik sarkalatos pont a PCR-on alapuló módszereknél a *T. gondii* DNS lebomlásának megakadályozása a mintavételtől a laboratóriumi DNS izolálásig terjedő időszakban. Sok helyen a minta szállítása hosszú időt vesz igénybe. A Semmelweis Egyetem I.Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán az

amniocentesist követően egyből megtörténik a DNS izolálása. További lényeges kérdés az alkalmazott módszer kimutatási érzékenysége és a megfelelő pozitív kontroll minta beállítása. Laboratóriumunkban az OKI által használt *T. gondii* törzs mintát használom pozitív kontrollként [Nagy B. és mtsai, 2006a és 2007b].

Az utóbbi időben két módszert alkalmaznak európai vezető központokban a várandósok, a kongenitálisan fertőzött magzatok és újszülöttek *T. gondii* szűrésére. Az egyik az aviditási teszt, amely lehetőséget nyújt a régi és a jelenlegi fertőzés elkülönítésére toxoplasma-specifikus IgG antitestek funkcionális affinitásának mérésével [Hedman és mtsai, 1989]. A másik a *T. gondii* amplifikációs kimutatása. Burg és mtsai [1989] alkalmazták először a *T. gondii* B1 génjén lévő ismétlődő szekvenciát a kimutatásban, a PCR-t kombinálták a Southern blot módszerrel.

Napjainkban kisebb-nagyobb módosításokkal számos PCR technikát használnak. A B1 gén helyett néhány laboratórium már az AF146527 szekvenciát mutatja ki, amelynek ismétlődése 200-300-szoros a *T. gondii* genomjában, míg a B1 gén csak 35-ször ismétlődik. Ezen a területen Filisetti és mtsai [2003] számoltak be összehasonlító vizsgálataikról, de a két alkalmazott szekvencia között nem mutatkozott lényeges eltérés az eredményekben.

Hohifeld és mtsai [1994] a kongenitális toxoplazmózis diagnosztizálásában a legfontosabb módszernek az ultrahang vizsgálatot és a magzatvíz molekuláris genetikai vizsgálatát tartják. Ők a 18. terhességi hét után végzett magzatvíz vizsgálatot tekintik a legmegbízhatóbbnak.

Antsaklis és mtsai [2002] a toxoplazmózis meghatározását PCR módszerrel magzatvízből 2002-ben közzétették, technikájuk érzékenysége elérte a 97,4%-ot. Néhány óra alatt már néhány parazita jelenléte pozitív eredményt adhat PCR módszerrel magzatvízből izolált DNS felhasználásakor, míg az immunológiai reakció kialakulásához hosszabb idő szükséges, és nem kapunk információt arra vonatkozóan, hogy a placentán átjutott-e a kórokozó. Pozitív

esetekben a terhesek korai antibiotikum kezelésével megelőzhető a súlyosabb komplikáció kialakulása.

A magzatvízben lévő parazitaszám összefüggést mutathat a toxoplazmózis súlyosságával, tehát nagy jelentősége van azoknak az eljárásoknak, amelyek mennyiségi meghatározásokat is lehetővé tesznek [*Romand és mtsai*, 2004].

A toxoplazmózis prenatális diagnosztikájában alkalmazott eljárásoknak gyors és megbízható eredményt kell szolgáltatni, ezeknek a követelményeknek a fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis, valamint a valósídejű PCR is megfelel. A DNS izolálás és a parazita genomjának kimutatása egy napon belül elvégezhető. Diagnosztikai célból a súlyosabb magzati és újszülöttkori rendellenességek kialakulásának megelőzése érdekében az invazív amniocentesis elvégzése indokolt. A magzatvíz PCR módszerrel kimutatott fertőzöttsége a kongenitális toxoplazmózisra hívja fel a figyelmet, az immunológiai vizsgálatok eredményeivel szemben itt biztos és gyors eredményt kapunk. A PCR módszer pozitív eredménye azt jelzi, hogy a protozoa már átjutott a placentán. A várandós nőknél lehetőség nyílik az antibiotikum kezelés megkezdésére, így a súlyos magzati és újszülöttkori komplikációk megelőzhetők. A kvantitatív valósídejű próbákat felhasználó PCR módszer a legérzékenyebb eljárás, a téves pozitív eredmények száma csökkenthető, mivel a PCR-t követő elválasztási eljárásokra nincs szükség. A LightCycler készülékben alkalmazott üvegkapillárisokba egyszeri beméréssel minden PCR komponens és a magzatvízből izolált DNS minta bekerül, mivel a kimutatás is ebben a csőben történik, nincs szükség a PCR-t követő további manipulálásra, csökken a kontamináció lehetősége.

5.2. Egynukleotidos polimorfizmus kimutatása

5.2.1. A 21. kromoszóma triszómiájának kimutatása

A kvantitatív valósídejű PCR és olvadási görbe analízis módszer megbízhatóságát vizsgáltam meg a 21-es kromoszóma triszómiájának kimutatására a *WIAF 899* SNP és a *WIAF 2643* markerek felhasználásával. A vizsgálatokat 67 db 21-es triszómiás és 62 db normál diallélikus mintán végeztem el, amelyek kariotipizálva lettek, és F-PCR-DNS fragmens analízisre is sor került.

A vizsgálatok 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 [Nagy B. és mtsai, 2005b].

A triszómiás és a diallélikus minták olvadási görbe arányainak analízise során szignifikáns különbség mutatkozott a két csoport között a *WIAF 899* esetében. A kapott eredmények a *Pont Kingdon és Lyon* által közölteknek megfelelőek [2003], én több mintát vontam be a tanulmányomba. Az eredmények alapján a módszer alkalmas a 21-es kromoszóma triszómiájának a kimutatására [Nagy B. és mtsai, 2005b]. Előnye a kariotipizálással és a fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízissel szemben a rendkívüli gyorsasága. A valósídejű PCR és DNS olvadási görbe analízis egy óra alatt elkészül, nincs szükség a PCR-t követően további elválasztási eljárásokra (elektroforézis, festés, stb.). A LightCycler készülék a többi thermal cycler-hez képest eltérő elven működik, levegő melegíti és hűti az üvegapillárisokat, így jóval gyorsabbak a ciklusok, továbbá az üvegapilláris lehetővé teszi a pontos on-line extinkció mérést. Szükség esetén a ciklusszám módosítható, az eredetileg eltervezettnél több, ill. kevesebb ciklus is végezhető.

A fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis módszert 1997-ben vezettük be laboratóriumunkban [Tóth és mtsai, 1998a; 1998b; Nagy és mtsai, 2000; 2002]. Az eltelt 15 év alatt több mint 20.000 mintát teszteltünk. A módszer előnye, hogy a magzatvízsejtek nem igényelnek tenyésztést, fertőzött minta esetében is alkalmazható, gyors, egy nap alatt eredményt lehet kiadni. Hátránya, hogy csak a vizsgált markerekről ad felvilágosítást, a szerkezeti eltérések kimutatására nem alkalmas.

Az egynukleotidos polimorfizmus (SNP) a leggyakoribb genetikai variáció a humán genomban [Whitehead Institute, <http://www.genome.wi.mit.edu/SNP/human>]. Előfordulási aránya 1/300-tól 1/1000 bp között váltakozik [The International SNP Map Working Group, 2001]. Az utóbbi időben nagy jelentősége van az SNP analízisnek a betegségekkel kapcsolatos lokuszok meghatározásában, a gyógyszerekre mutató reakciók, mellékhatások kialakulásának előrejelzésében [Lundgren és mtsai, 1998]. Zimmermann és mtsai valósidejű PCR-rel vizsgálták meg az amyloid és a GAPDH gének expresszióját és azok mennyiségét. A 21-es triszómiás és a diallélikus mintákat megbízhatóan el tudták különíteni [Zimmermann és mtsai, 2002].

Később Pont-Kingdon és Lyon [2003] cikke hívta fel a figyelmet a prenatális alkalmazhatóságra. Ők 52 fő 21-es triszómiás és 31 normál mintát analizáltak 6 SNP markerrel, ezeket magas heterozigotációs index-szel választották ki. A WIAF 899-es SNP markert megbízhatónak találták a 21-es triszómia kimutatására. Napjainkban az SNP markerek a kutatások középpontjába kerültek, nagy erővel folyik meghatározásuk és rendszerezésük. Ezen markerek közül számos felelős az egyes betegségekre való fogékonyságért, a már kialakult betegség jellemzőiért és a gyógyszeres kezelés eredményességéért [Lundgren és mtsai, 1998]. A személyre szabott gyógyításban óriási jelentősége van az SNP-k meghatározásának.

Hochberg és mtsai [2003] SNP markereket használtak csontvelő transzplantációt követően a kimérizmus kimutatására, ez a korai közlemény mutatja, hogy a markerek a hematológiai betegek kezelésének monitorizálásában is szerepet játszhatnak.

A kvantitatív valósídejű PCR alternatív molekuláris biológiai módszer lehet a 21. kromoszóma triszómiájának prenatális kimutatására multiplex PCR végzésével, azaz egy reakció elegyben két, vagy több SNP meghatározásával. Az eredmények alapján, legalább három SNP marker kombinációjával a kvantitatív valósídejű PCR módszer megbízhatósága 99%-os.

5.2.2. A *VEGF C-460T*, *C-2578A* és *G+405C* polimorfizmusának meghatározása HELLP szindrómás terhesekben

Elsőként alkalmaztam a valósídejű PCR és olvadási görbe analízis módszert a *VEGF C-460T*, *C-2578A* és *G+405C* egynukleotidos polimorfizmusok meghatározására. Kimutattam az allélok és a genotípusok előfordulási gyakoriságát HELLP szindrómában szenvedő várandósok csoportjában és összehasonlítottam az egészséges kontroll populációval.

Az eredmények azt mutatják, hogy a *VEGF* gén *C-460T* és a *G+405C* egynukleotidos polimorfizmusa összefüggést mutat a HELLP szindróma kialakulásával. Kimutattam, hogy a *VEGF T-460T* és a *C+405C* genotípusok nagyobb rizikót jelentenek [*Nagy B. és mtsai*, 2008a; 2011c].

Az irodalomban a PE előfordulásával kapcsolatban vizsgálták már a *VEGF* egynukleotidos polimorfizmusait. Ellentmondásos eredményekről számolnak be a kutatók, egyesek alacsony, míg mások magas *VEGF* szinteket írtak le PE-ban [*Lyall és mtsai*, 1997; *Levine és mtsai*, 2004; *Hertig és mtsai* 2004; *Kim és mtsai*, 2008]. Ezen ellentmondások okát még nem sikerült kideríteni. A *VEGF* génen eddig 30 SNP-t írtak le, ami a fenotípusok nagy

variációját eredményezheti, ez is magyarázhatja, hogy a pontos hatás nehezen határozható meg.

Eddig csak néhány polimorfizmus esetében figyeltek meg összefüggést a VEGF termelődésével préeklampsziás terhességekben [Papazoglou és mtsai, 2004; Bányász és mtsai, 2006; Shim és mtsai, 2007; Sandrim és mtsai, 2009; Garza-Veloz és mtsai, 2011]. Papazoglou és mtsai a C-2578A, a G-634C és a C+936T SNP-k előfordulási gyakoriságát vizsgálták, és összefüggést találtak ezen egynukleotidos polimorfizmusok, valamint a préeklampszia kialakulása között. Ennek ellenére arra a következtetésre jutottak, hogy az általuk vizsgált polimorfizmusok valószínűleg nem a leglényegesebb faktorok a kórkép kialakulásában [Dekker és Shibai, 1998]. Bányász és mtsai szerint a +405G allélhordozók esetében alacsonyabb a préeklampszia előfordulási gyakorisága, és a betegség progresszióját a -2578A allél befolyásolhatja [Bányász és mtsai, 2006]. Shim és mtsai a +936T allél előfordulása és a préeklampszia kialakulása között találtak összefüggést [2007].

A préeklampszia kialakulása és a placenta kóros fejlődése kapcsolatba hozható, ez patogenezisének egyik kulcseleme. Egy microarray tanulmány kimutatta, hogy az oldékony Fms-like tirozin kináz (sFlt-1) alul expresszált préeklampsziában [Maynard és mtsai, 2003]. E molekula membránhoz kapcsolódott variánsa a VEGF receptora, míg a keringésben lévő variánsa a VEGF és a placentáris növekedési faktor antagonistája (PlGF). Néhány tanulmány magas sFlt-1 és alacsony szabad VEGF és PlGF szinteket talált préeklampsziában [Levine és mtsai, 2004; Hertig és mtsai, 2004]. Zhou és mtsai is kimutatták a VEGF családhhoz tartozó molekulák alacsony expresszióját HELLP szindrómás betegekből származó citotrofoblasztokban [2002]. Préeklampszia esetében a túltermelődött Flt-1 variáns a keringésben lévő VEGF-hez és PlGF-hez kapcsolódik, ezzel megakadályozza, hogy azok a membránhoz kapcsolódjanak. Ez endoteliális diszfunkciót okoz, és olyan

prokoaguláns proteinek termelődését idézi elő mint a von Willebrand faktor, az endotelin, a fibronektin és trombomodulin [Baumwell és Karumanchi, 2007; Karumanchi és mtsai, 2005; Baker és mtsai, 1995; Kupfermanc és mtsai, 1997; Hunter és mtsai, 2000, Zhou és mtsai, 2002]. Ezekben a folyamatokban a VEGF egynukleotidos polimorfizmusának is szerepe lehet, ez nagyobb vizsgálati csoportok eredményeinek az összevetésével további tisztázásra vár.

A nemzetközi irodalmi adatok alapján elsőként vezetem be a VEGF C-460T, a C-2578A és a G+405C egynukleotidos polimorfizmusainak meghatározására alkalmas valósídejű PCR és olvadási görbe analízis módszert. Meghatároztam ezen SNP-k előfordulási gyakoriságát HELLP szindrómás és egészséges kontroll csoportokban. Megállapítottam, hogy a T-460T és a C+405C genotípusok megléte esetén a HELLP szindróma nagyobb valószínűséggel alakul ki. Mivel ezeket a polimorfizmusokat már előzőleg is kapcsolatba hozták a VEGF protein termelődésével, valószínű, hogy más genetikai és környezeti faktorokkal együtt szerepet játszanak a HELLP szindróma kialakulásában [Nagy B. és mtsai, 2008a; 2011c].

5.3. Deléció kimutatása valósídejű PCR módszerrel

A valósídejű PCR egyik fontos prenatális alkalmazási lehetősége a $\Delta F508$ kimutatása. A cisztás fibrózis a kaukázusi populációban a leggyakoribb autoszomális recesszív módon öröklődő, halálos kimenetelű betegség [Endreffy és mtsai, 1992, Fekete és mtsai, 1992; Gundry és mtsai, 2001; Nagy és mtsai, 1999; 2000a; 2006b]. A kialakulásáért felelős gént 1989-ben írták le, napjainkig a CFRT génen meghatározott eltérések száma már 1400 körül van. Ez a magas szám nagyon nehezé teszi a diagnosztikát, szerencsére egyfajta deléció, a $\Delta F508$ okozza az esetek kb. 60%-át, ez a leggyakoribb eltérés Közép-Kelet Európában, ami jelentősen egyszerűsíti a laboratóriumi kimutatást [Németi és mtsai, 1992; 1995].

A betegség felderítésére alkalmazott eljárások gyakorlatilag 1989 óta fokozatosan fejlődnek, a molekuláris szinten történő vizsgálatokra prenatálisan szinte mindig valamilyen PCR-on alapuló eljárást alkalmaztak [Scotet és mtsai, 2010]. A fluoreszcens PCR eljárást 1993-ban dolgozták ki, ami legalább 1000-szeres érzékenységbeli növekedést okozott [Mansfield, 1993], emellett a PCR reakciók multiplex változatban való felhasználását is biztosította [Hattori és mtsai, 1992]. Különböző kitek kerültek forgalomba, amelyek a leggyakoribb genetikai eltéréseket jelzik. Magyarországon a prenatális diagnosztikában főleg a $\Delta F508$ kimutatásával kell számolni. A fluoreszcens PCR és DNS fragmens analízis eljárást 1999-ben állítottam be erre a célra [Nagy B. és mtsai, 1999; 2000a], ezzel az eljárással a keletkezett fragmentumok méretei között akár egy bázispár eltérés is megállapítható. A technológia fejlődése a kvantitatív valósídejű PCR módszer bevezetését is lehetővé tette. E két módszerrel 116 DNS mintát vizsgálva egyező eredményeket kaptam. Kimutattam 67 normál, 43 $\Delta F508$ heterozigóta, 5 $\Delta F508$ homozigóta mintát, egyetlen mintánál volt $\Delta F508C$ homozigóta az eredmény. Ez abból adódik, hogy a beállított primer és próba rendszer négy egyéb mutációt mutathat ki ebben a régióban, ami további nagy előnye a valósídejű PCR-nak [Nagy B. és mtsai, 2006b; 2007d]. A módszer alkalmas vérből, a chorionból és a magzatvízsejtekből izolált DNS mintákból gyors, megbízható meghatározásra. A minták közötti kontamináció minimálisra van visszaszorítva a zárt rendszer miatt. Az egy blasztomerből való kimutatás is lehetővé vált, az eljárás a preembrionális genetikai diagnosztika során is felhasználható.

5.4. Génexpresszió meghatározás

A *CD24* expresszió meghatározása az utóbbi években került a tumorkutatás fókuszába. A *CD24*-et először az 1980-as években írták le mint sejtfelszíni fehérjét, viszont csak később fedezték fel, hogy szerepet játszik a sejt-sejt közötti kapcsolatokban, a sejtproliferáció és adhézió szabályozásában [Kristiansen és mtsai, 2010]. Prognosztikus markerként 2002-ben határozták meg [Kristiansen és mtsai, 2002]. A *CD24* számos tumorban erősen expresszálódik, részt vesz a növekedés szabályozásában és a metasztázisok kialakulásában a P-selectin-hez kapcsolódva [Sagiv és Arber, 2008; Nagy és mtsai, 2009]. Sejten belüli pontos molekuláris mechanizmusa még nem ismert, azonban kísérleti adatok igazolják, hogy az anti-*CD24* monoklonális ellenanyagok jól alkalmazhatók például gasztrointesztinális daganatok kezelésében [Sagiv és Arber, 2008].

A tumorok progressziójához megfelelő vérellátás szükséges, a *CD24* ennek kialakításában is részt vesz. Préeklampszia esetén viszont ellentétes a jelenség, a placentában spirális artériák kóros kialakulása, gyengébb inváziója figyelhető meg. Így merült fel, hogy érdekes lenne meghatározni a terhesek placentáiból izolált RNS mintákban a *CD24*-et. Schostak és mtsai 2006-ban írták le módszerüket, a *CD24* koncentrációjának mérésére valósídejű PCR-t használták prosztatarákos mintákon. Ezt a módszert irodalmi adatok alapján vettem át és vezettem be [Nagy B. és mtsai, 2006c; 2009].

Az irodalmi adatok alapján elsőként határoztam meg a *CD24* koncentrációját 16 egészséges kontroll és 16 préeklampsziás beteg placentáiból izolált RNS mintákban. Érdekes módon szignifikáns különbség mutatkozott a gén expressziójában, alacsony *CD24* koncentrációkat mértem préeklampsziás mintákban [Nagy B. és mtsai, 2008b].

A minták normalizálásához *HPRT* gént használtam a minőségükben mutakozó esetleges különbségek kiküszöbölésére. Előzőleg *Meller és mtsai* [2005] hasonlították össze a génexpressziókat, a TATA box-binding protein (TBP), a szukcinát dehidrogénáz komplex, A alegység (SDHA) és a *HPRT* voltak a placenta szövetben a legmegbízhatóbb háztartási gének. Én a *HPRT*-t használtam, mivel a hipoxia és a növekedési faktorok deregulációja nem befolyásolja ennek a génnek az expresszióját.

Montes és mtsai [1996] írták le először a *CD24* protein expresszióját tenyésztett decíduális stroma sejteken, kísérleteikben immunohisztokémiai és flow citometriai módszereket alkalmaztak. A *CD24* gén expresszióját különböző tumorokban már meghatározták, viszont préeklampsziás betegek placentájából erre még nem került sor.

Aigner és mtsai (1997) hívták fel a figyelmet arra, hogy a tumor sejtek a P-selectinen keresztül a platelethez kapcsolódnak, így kerülnek el az immunrendszert, lehetőséget nyitva különböző szövetekben a tumor elterjedésének és penetrációjának. PE esetében a *CD24* expressziója alacsony, valószínűleg ellenkező hatást fejt ki, és szerepet játszhat a placenta kóros fejlődésében.

Legutóbb *McDonald és Wolfe* [2011] tanulmányozták az interleukinek és a *CD24* szerepét a placenta immunválasz kialakításában. *IL-1 β* , *IL-8* és *CD24* mRNS szinteket határoztak meg valósídejű PCR és ELISA módszerekkel. Immunhisztokémiai vizsgálatokat is végeztek, és az adiponectin pro-inflammatorikus hatását is tanulmányozták. Eredményeik alapján azt a következtetést vonták le, hogy a *CD24*/*Siglec10* szabályozási út fontos az anyai és magzati felületek immunregulációjában. Egy potenciális mechanizmusnak tekintik, amellyel a trofoblaszt sejtek sikeresen irányítják az anyai immunmechanizmust. Legutóbb *Chaiworapongsa és mtsai* [2013] tanulmányozták a korai és késői préeklampsziában szenvedő nők véréből izolált mintákban a génexpressziót. Azt találták, hogy 43 ill. 28 gén volt különböző

módon kifejeződve, ezek közül 20 gén a koagulációban (*SERPINI2*), az immun regulációban (*VSIG4*, *CD24*), az egyedfejlődésben (*H19*) és a fertőzések kialakulásában játszott szerepet (*S100A10*) korai PE-ban. Megállapították, hogy a korai és a késői préeklampszia esetében a génexpressziós profil különbözik, megerősítették a *CD24* szerepét a PE-ban microarray kísérleteikben. Szignifikánsan alacsonyabbnak találták a *CD24* expresszióját, és ezt valósídejű PCR kísérletekkel is megerősítették [*Chaiworapongsa és mtsai*, 2013].

Ezek az eredmények is alátámasztják, hogy fontos a klinikai vizsgálatok kiterjesztése a *CD24* préeklampszia kialakulásában játszott szerepének tanulmányozására. Nehezíti az előrelépést a megfelelő mintavételi és feldolgozási módszerek kidolgozása és azok egységes alkalmazása. Ezt mutatja, hogy nagyon kevés olyan cikk jelenik meg, amely a placentából izolált mRNS expressziókat határozza meg.

A préeklampsziával ellentétes folyamatokra utalnak a prosztata tumoros betegek mintáiból izolált RNS-ből végzett *CD24* mRNS meghatározások. Huszonegy prosztata tumoros és 10 benignus prosztata hiperpláziás mintában a *CD24* szint $33,65 \pm 47,39$ ng/ μ l versus $4,0 \pm 4,25$ ng/ μ l volt, szignifikáns különbség mutatkozott a *CD24* expressziójában a két csoportban ($p=0,014$), a foszfolipáz-2A génhez normalizáltam a mintákat [*Nagy B. és mtsai*, 2006c; 2009]. Érdekes módon a normalizációhoz kiválasztott gén befolyásolhatja az eredményeket ennek megfejtésére további vizsgálatok szükségesek.

A prosztata vizsgálataim eredményei megegyeznek *Schostak és mtsai* [2005] által közöltekkel, akik 102 mintát analizáltak. A *CD24* mRNS meghatározás alkalmas lehet nemcsak szövet, hanem prosztata váladék, vagy vizeletből izolált sejtek vizsgálatára. Felmerül, hogy esetleg „szabad” RNS szinteket mérve alkalmas lenne-e a rendszer nem invazív módon történő diagnosztikára.

A *CD24* mRNS koncentrációjának mérése diagnosztikus markerként a jövőben ígéretes lehet.

5.5. A „szabad” nukleinsavak kimutatása

Sok kutatót és klinikust hozott lázba az a lehetőség, hogy az anyai vérből az invazív beavatkozások, chorionboholy-, vagy magzatvíz-mintavétel nélkül információt lehet nyerni a magzat genetikai állapotáról. A nem-invazív mintavételi eljárás nem jelent kockázatot sem az anya, sem a magzat számára. Az anyai vérből a magzati sejtek vagy „szabad” nukleinsavak izolálhatók és diagnosztikus célokra felhasználhatók.

A nem-invazív módon nyerhető minták közül a kezdeti időszakban a magzati sejteket felhasználó kutatási irány tűnt nagyon ígéretesnek, elterjedését azonban néhány technikai akadály korlátozta. Az egyik az alacsony sejtszám, egy ml anyai vérben kb. egy magzati sejt található, ennek izolálása technikailag nem egyszerű, nagyon munkaigényes eljárás. Az anyai vérkeringésben kimutatható magzati sejtek közül a trophoblast-sejtek, a leukocyták és az erythroblastok alkalmasak diagnosztikai vizsgálatokra [Nagy GyR. és mtsai, 2006; Gardó, 2009]. A trophoblast sejtek jelenlétét az anyában már 1893-ban leírta Schmorl német patológus. Kimutatásuk azonban nehézkes a specifikus monoklonális antitestek hiánya miatt. Mueller és mtsai 6800 lepényszövet elleni antitestből csak 5 olyant találtak, amelyek specifikusak a magzatra [Mueller és mtsai, 1990]. A FISH vizsgálatok kiértékelését komplikálja, hogy ezek a sejtek gyakran többmagvúak.

Ígéretesnek tűnt a magzati fehérvérsejtek felhasználása, ezek jelenlétét az anyai keringésben Walknowska és mtsai már 1969-ben kimutatták. Ezen sejtek izolálása a HLA antigének különbözőségén alapul, de nehezíti a helyzetet, hogy az előző terhességekből is jelen lehetnek leukocyták, mivel 4-5 év a felezési idejük. A másik sejtcsoport, a sejtmaggal rendelkező magzati erythrocyták viszont biztonsággal elválaszthatóak és diagnosztikai célokra is alkalmasak.

Ezen sejtek jelenlétéről már 1957-ben beszámolt *Creger és Steele*. Izolálásukat és felhasználhatóságukat ezt követően több kutatócsoport is megerősítette [*Bianchi és mtsai*, 1996; 1997; 1999; *Bianchi* 1998; *Hahn és mtsai*, 1999; 2000; *Holzgreve és Garritzen*, 1992]. Az erythroblastok már az első trimeszter elején megjelennek, élettartamuk 90 nap. *Bianchi és mtsai* a pozitív sejteket CD71 ellenes antitestek segítségével, FACS-ot alkalmazva választották el, majd a magzati sejteket a morfológiai kép alapján és a Kleihauser-Betke teszttel azonosították [*Bianchi és mtsai*, 1990]. A magzati sejtek kiürülése az anyai szervezetből hosszú időt vesz igénybe, ezért előző terhességekből származó sejtek komplikálhatják a diagnosztikát.

Az alacsony magzati sejtszám, az izolálási módszerek nehézkessége és a sejtek FISH vizsgálat során mutatott eltérő viselkedése miatt a kutatások inkább a szabad nukleinsavak irányába fordultak az utóbbi években.

Laboratóriumunkban mi is követtük a nemzetközi tendenciákat, próbálkoztunk izolált magzati sejtek és „szabad” nukleinsavak felhasználásával. Ebben a témában két Ph.D. disszertáció készült [*Lázár Levente*, 2007; *Nagy Gyula Richárd* 2007]. A kutatások a disszertációk elkészültével is folytatódtak, sőt, a klinika szervezésében 2010-ben megrendeztük az Első Közép-Kelet-Európai Szabad Nukleinsavak a Magzati Diagnosztikában című kongresszust, amely 2012-ben folytatódott a második kongresszussal a csehországi Olomoucban, a harmadik 2014-ben a szlovákiai Martin-ban lesz [*Nagy B. és mtsai* 2010; *Nagy B.* 2012].

Mandel és Métais 1947-ben írták le a „szabad” nukleinsavak jelenlétét tumoros betegek szérumában, azonban a felfedezést követően több évtizednek kellett eltelnie ahhoz, hogy a „szabad” DNS jelenléte ismét felébressze a tudományos és klinikai érdeklődést. Az anyai vérben keringő „szabad” magzati DNS-t elsőként *Lo és mtsai* mutatták ki, ezt 1989-ben közölték le. A „szabad” magzati DNS-t Y kromoszóma specifikus *DYS14* próbával határozták meg 43

terhes esetében a terhesség 12. és 40. hete között [Lo és mtsai, 1989; 1997; 1998a].

A kinyert „szabad” nukleinsavak elenyésző része magzati (3-6%), ez jelentősen kihat a későbbi amplifikációs eredményekre és azok megbízhatóságára. Fontos, hogy minél nagyobb legyen az izolált DNS koncentrációja. A DNS izolálásra napjainkban leginkább a szilika adszorpciós kitéket használják. Laboratóriumunkban két gyártó kitjének a hatását vizsgáltuk meg a kinyert DNS mennyiségére. Megállapítottuk, hogy a kit fajtája nem, inkább a kiindulási anyai szérum mennyisége befolyásolja az izolált DNS mennyiségét. Diplomamunka is készült ebben a témában, eredményeinkről az European Society of Human Genetics 2010. évi nagygyűlésén is beszámoltunk [Kehler és mtsai, 2010; Kehler 2010].

Disszertációmban bemutattam az anyai vérből izolált „szabad” DNS mintából történő nem-, és *RhD* meghatározási eredményeket 80 mintán végzett kísérletek alapján. A vizsgálatok során 38 fiú magzatot és két *RhD* negatív mintát találtam. Az utóbbi esetekben a szülők is *RhD* negatívak voltak. A nem-meghatározás eredményei megegyeztek a kariotipizálásával. A beállított módszerek alkalmasak a minimális mennyiségű kevert (anyai és magzati) „szabad” DNS-ből kvantitatív valósídejű PCR elvégzésére. A nem-meghatározás a nemhez kötött betegségek (haemophilia A és B, Duchenne muscularis dystrophia) diagnosztikájában nyújt segítséget. Az anyai mintában mutatkozó Y kromoszóma-specifikus markerek beiktatásával a kis mennyiségben jelen lévő magzati DNS-ből a magzat neme kimutatható. A következő markereket lehet erre a célra felhasználni: *SRY*, *DYS14*, *DYS1*, *DYZ1*, *DYZ3*, *DAZ*, *ZFY* és az amelogenin [Honda és mtsai, 2001; 2002; Zimmermann és mtsai, 2005; Avent és mtsai 2006; Deng és mtsai, 2006; Stanghellini és mtsai, 2006; Zhou és mtsai, 2005; Lázár és mtsai, 2003; 2004a; 2006a].

Az említett haemophilia és DMD mellett az alkalmazások között szóba jöhet egyéb nemhez kötött genetikai betegség is, pl. az Alport szindróma, az X-kromoszómához kötött mentális retardáció, a retinitis pigmentosa, a Lesch-Nyhan szindróma, a kongenitális adrenális hyperplázia [*Costa és mtsai*, 2002; *Chitty és mtsai*, 2007; *Galbiati és mtsai*, 2005]. Ezen tanulmányok alapján már akár a 7. terhességi héttől 97,2%-os szenzitivitás és 100%-os specificitás érhető el [*Chitty és mtsai*, 2007].

Az *RhD* meghatározás szintén nagy jelentőségű a nem-invazív módszerrel nyert minták feldolgozása során. A magzati vörösvértestek felszínén lévő antigént hordozó sejtek az anyai keringésbe kerülve immunválaszt indítanak be, ami a magzat hemolitikus betegségét okozhatja. Ennek kiküszöbölésére az olyan várandósok esetében, akik *RhD* negatívak, de a magzatuk *RhD* pozitív lehet, preventíven anti-D ellenanyagot adnak be. Ez elég nagy anyagi megterhelést jelent az egészségügyi pénztáraknak. Csökkenteni lehetne a felhasznált oltóanyag mennyiségét, ha az invazív beavatkozások előtt meghatároznák a magzat *RhD* státuszát. A kaukázusi populáció kb. 80%-a *RhD* pozitív, tehát elég jelentős azoknak az eseteknek a száma, ahol az anyák feleslegesen kapnak anti-*RhD* injekciót [*Daniels*, 2005; *Lázár és mtsai*, 2007b; *Lo és mtsai*, 1994; 1998b].

Az általunk is alkalmazott valósídejű PCR módszerrel meghatározható a magzat *RhD* státusza minden olyan esetben, amikor *RhD* negatív anyáknál az alloimmunizáció lehetősége felmerül. Természetesen nemcsak anyagi okok indokolják ezeket a vizsgálatokat, hanem az is, hogy vérkészítmény beadásáról van szó, ami donoroktól származik, így magában hordozza az infekció lehetőségét is [*Lázár és mtsai*, 2004b; 2006a, 2007b].

Minon és mtsai [2008] 563 terhest érintő négyéves tapasztalata alapján az *RhD* genotipizálás elérte a 99.8%-os megbízhatóságot, egyetlen egy fals pozitív esetük volt. *Finning és mtsai* [2008] 1997 előzőleg szenzitizált *RhD* negatív nő vizsgálati eredményeit mutatták be, ők 1% fals és inkonzultív adatot említettek.

Nagy beteganyagon végzett tanulmányok is a valósidejű PCR módszer alkalmazhatóságát erősítik meg, ezek is a minimális DNS koncentrációt és az *RhD* génen megfigyelhető variánsokat említik problémaként. Az etnikai eredetet minden esetben figyelembe kell venni az eredmények értékelésekor [Avent, 1999]. Előfordulhat, hogy szerológiai negatív esetek a génmeghatározásnál pozitív eredményt mutatnak [Singleton és Reid, 2000].

A „szabad” nukleinsav koncentrációk meghatározása már önmagában is számos diagnosztikai felhasználásra nyújthat lehetőséget. Magasabb „szabad” magzati DNS szinteket mértek *Lo és mtsai* a 21. kromoszóma triszómiája esetén. Számos közlemény született ennek a megerősítésére és cáfolására is, de a technikai és standardizálási nehézségek miatt ez az eljárás nem terjedt még el [Lo és mtsai; 1999b; Spencer és mtsai, 2013]. Érdekes megfigyelés volt, hogy a préeklampsziás terhesek szérum mintáiban is magasabb „szabad” DNS szintek mutathatók ki [Lázár és mtsai, 2009; Hahn és mtsai, 2011]. *Papantoniou és mtsai* a *RASSF1A* szintjeit mérve közel 100%-os specificitást és szenzitivitást írtak le a préeklampszia diagnosztizálásánál [2013].

Méhen kívüli terhesség esetén is magasabb „szabad” DNS szinteket talált munkacsoportunk, és felmerült az esetleges alkalmazás a diagnosztikában is, de ehhez további standardizálások és nagyobb beteganyagon végzett vizsgálatok szükségesek [Lázár és mtsai, 2006b]. A mintavételi eljárások pontos kidolgozása, a szintek meghatározásának standardizálása, az egyes laboratóriumok módszereinek összehangolása még mindig várat magára. A BMI és a különböző populációk közötti eltérések feltárása is további részletes vizsgálatokat igényel.

A nem-invazív magzati diagnosztikában nagy áttörést jelentett a tömeges paralell szekvenálás bevezetése, hiszen mindenki szeretne volna a leggyakoribb számbeli kromoszóma rendellenességeket meghatározni az anyai vérből, de 2008-ig erre nem volt megbízható módszer. Több évet vett igénybe az új technológia validálása és klinikai bevezetése. Először *Fan és mtsai* alkalmazták

az aneuploidiák kimutatására, azonban a konkurens csoport is egyből elkezdte használni a módszert, és eredményeiket gyorsan le is közzölték [*Fan és mtsai*, 2008; *Chiu és mtsai*, 2008]. A technológia lényege, hogy sok millió szekvencia-tag darabokat szintetizálnak, így jóval több információt kapnak a digitális PCR-nál. Ennél a módszernél nem szükséges az anyai és a magzati DNS elválasztása, megfelelő számú taggal kis mennyiségű magzati „szabad” DNS-el is elvégezhetők a vizsgálatok [*Mardis*, 2008; *Fan és mtsai* 2008, 2010, 2011].

Napjainkban tulajdonképpen négy eljárás áll rendelkezésre a leggyakoribb számbeli kromoszóma rendellenességek kimutatására (*Sifakis és mtsai*, 2012). Az első a dózis módszer, amely SNP-k alkalmazásával szekvencia specifikus DNS szakaszokat használ fel. Ennek az a hátránya, hogy az egyes populációkban eltérések mutatkoznak, ezt figyelembe kell venni, és esetleg változtatni kell a kialakított rendszeren. A második eljárás, az anyai és a magzati DNS 21-es kromoszóma specifikus szakaszai metiláltsági arányának az összehasonlítása (*Tsaliki és mtsai*, 2012). A harmadik, általánosan használt módszer az mRNS-ből az allél specifikus mRNS arányok összehasonlítása. A negyedik a tömeges paralell szekvenálás az új generációs szekvenálóval, amely nagy lendületet adott a módszer klinikai alkalmazásának.

Az elmúlt év áttörést hozott a nem-invazív módon nyert minták prenatális diagnosztikában való felhasználásában. A tömeges paralell szekvenálással a leggyakoribb számbeli kromoszóma rendellenességek 99,9 %-os specificitással és szenzitivitással határozhatók meg.

A diagnosztikai tesztek árának várható csökkenése ezen vizsgálatok szélesebb körben való elterjedéséhez fog vezetni.

6. Új tudományos eredmények és következtetések

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 vizsgálathoz 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 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 *ΔF508* kimutatására 116 DNS mintát vizsgáltam meg. Kimutattam 67 normál, 43 *ΔF508* heterozigóta, 5 *ΔF508* homozigóta mintát, viszont egy mintánál *ΔF508C* 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. Tübiopsziával nyert prosztata tumoros és prosztata hiperpláziás betegek mintái között lényeges különbséget találtam a *CD24* expressziójában. Felmerül diagnosztikus markerként való alkalmazása.

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

13. Valósídejű PCR TaqMan típusú 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. IRODALOMJEGYZÉK

- 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* 2001;**151**:721-1728.
- ACOG Practice Bulletin: Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. ACOG Practice Bulletin No. 33. *Obstet Gynecol* 2002;**99**:159-167.
- ACOG Practice Bulletin: Screening for fetal chromosomal abnormalities. ACOG Practice Bulletin No. 77. *Obstet Gynecol* 2007;**109**:217-227.
- Adinolfi M, Pertl B, Sherlock J.: Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenat Diagn* 1997;**17**:1299-1311.
- Aigner S, Stthoeger ZM, Fogel M, Weber E, Zarn J, Ruppert M, Zeller Y, Vestweber D, Stahel R, Sammar M, Altevogt P.: CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood* 1997;**89**:3385-3395.
- Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel Fattah S, Avent ND, Soothill PW.: Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn* 2007;**28**:415–418.
- Andersen DH.: Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathology study. *Am J Dis Child* 1938;**56**:344-345.
- Antsaklis A, Daskalakis G, Papantoniou N, Mentis A, Michalis S.: Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Prenat Diagn* 2002;**22**:1107-1111.
- Ashida S, Nakagawa H, Katagiri T, Furihata M, Iizumi M, Anazawa Y, Tsunoda T, Takata R, Kasahara K, Miki T, Fujioka T, Shiun T, Nakamura Y.: Molecular features of the transition from prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) to prostate cancer: genome-wide gene-expression profiles of prostate cancers and PINs. *Cancer Research* 2004;**64**:5963-5972.
- Avent ND.: The rhesus blood group system: Insight from recent advances in molecular biology. *Transfus Med Rev* 1999;**13**:245-266.
- Avent ND, Chitty LS.: Non-invasive diagnosis of fetal sex; utilisation of free fetal DNA in maternal plasma and ultrasound. *Prenat Diagn* 2006;**26**:598–603.
- Baker PN, Krasnow J, Roberts JM, Yeo KT.: Elevated serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1995;**86**:815–821.

- Bányász I, Szabó S, Bokodi G, Vannay A, Vásárhelyi B, Szabó A, Tulassay T, Rigó J Jr.: Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2006;**4**:233–236.
- Bassam BJ, Allen T, Flood S, Stevens J, Wyatt P, Livak K.: Nucleic acid sequence detection systems: revolutionary automation for monitoring and reporting PCR products. *Australas Biotechnol* 1996;**6**:285-294.
- Baumwell S, Karumanchi SA.: Pre-eclampsia: clinical manifestations and molecular mechanisms. *Nephron Clin Pract* 2007;**106**:c72–81.
- Becker A, Reith A, Napiwotzki J, Kadenbach B.: A quantitative method of determining initial amounts of DNA by polymerase chain reaction cycle titration using digital imaging and a novel DNA stain. *Anal Biochem* 1996;**237**:204-207.
- Béládi I, Nász I.: Orvosi mikrobiológia. Eds. Béládi I. és Nász I, Semmelweis Kiadó, Budapest, 1993, p. 265-266.
- Bell AS, Ranford-Cartwright CL.: Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol* 2002;**18**:337-342.
- Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, Knoll JHM, Latt SA.: Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;**87**:3279–3283.
- Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA.: Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**:705–708.
- Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, Hanson FW, Klinger KW, Shuber AP.: PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet* 1997;**61**:822–829.
- Bianchi DW.: Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol* 1999;**105**:574–583.
- Boyle B, Hamelin RC, Seguin A.: In vivo monitoring of obligate biotrophic pathogen growth by kinetic PCR. *Appl Environ Microbiol* 2005;**22**:21-28.
- Bretagne S, Costa J-M.: Towards a nucleic-acid based diagnosis in clinical parasitology and mycology. *Clin Chim Acta* 2006;**363**:221-228.
- Burg JL, Grover CM, Pouletty P, Boothroyd JC.: Direct and sensitive detection of pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1989;**27**:1787-1792.
- Busch R.: On the History of Cystic Fibrosis. *Acta Univ Carol [Med] (Praha)*, 1990;**36**:13-15.

- Calvo A, Gonzalez-Moreno O, Yoon CY, Huh JI, Desai K, Nguyen QT, Green JE.: Prostate cancer and the genomic revolution: Advances using microarray analyses. *Mutat Res* 2005;**576**:66-79.
- Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik RC, Wolf DE.: Detection of nucleic acid hybridization by non-radioactive fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;**85**:8790-8794.
- 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.
- Chabbert E, Lachaud L, Crobu L, Bastien P.: Comparison of two widely used PCR primer systems for detection of *Toxoplasma* in amniotic fluid, blood, and tissues. *J Clin Microbiol* 2004;**42**:1719-1722.
- Chaiworapongsa T, Romero R, Whitten A, Tarca AL, Bhatti G, Draghici S, Chaemsathong P, Miranda J, Hassan SS.: Differences and similarities in the transcriptional profile of peripheral whole blood in early and late-onset preeclampsia: insights into the molecular basis of the phenotype of preeclampsia. *J Perinat Medicine* 2013;**41**:485-504.
- Chan KCA, Zhang J, Hui ABY, Wong N, Lau TK, Leung TN, Lo KW, Huang DWS, Lo YMD.: Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2004;**50**:88-92.
- Chan KC, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RW, Leung TN, Lau TK, Chim SS, Chung GT, Nicolaides KH, Lo YM.: Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis *Clin Chem* 2006;**52**:2211-2218
- Chitty L, Mistry B, Hogg J, Meaney C, Thomasson L, Norbury G, Daniels G, Finning K, Martin P.: Prospective register of outcomes of free-fetal DNA testing (PROOF) – results of the first year's audit. *Newsletter of the British Society for Human Genetics* 2007;**37**:8-9.
- Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY, Foo CH, Xie B, Tsui NB, Lun FM, Zee BC, Lau TK, Cantor CR, Lo YM.: Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;**105**:20458-20463.
- Clegg RM.: Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. In: *Methods in enzymology*. Lilley DMJ and Dahlber JE eds. Academic Press, New York 1992;**211**:353-388.

- Collmann RD, Stoller A.: A survey of mongoloid birth in Victoria, Australia, 1942-1957. *Am J Publ Health* 1962;**52**:813-828.
- Costa J-M., Giovangrandi Y, Ernault P, Lohmann L, Nataf V, El Halali N, Gautier E.: Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. *Brit J Haematol* 2002;**119**:255-260.
- Creger WP, Steele MR.: Human fetomaternal passage of erythrocytes. *N Engl J Med* 1957;**256**:158.
- Csako G.: Present and future of rapid and/or high-throughput methods for nucleic acid testing. *Clin Chim Acta* 2006;**363**:6-31.
- Csóka R.: Az emberi toxoplasmosis hazai előfordulása. Kandidátusi értekezés, Budapest, 1976.
- Daniels G.: The molecular genetics of blood group polymorphism. *Transplant Immunol* 2005;**14**:143-153.
- Dekker GA, Sibai BM.: Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *Am J Obstet Gynecol* 1998;**179**:1359–1375.
- Deng Z, Wu G, Li Q, Zhang X, Liang Y, Li D, Gao S, Lan Y.: Noninvasive genotyping of 9 Y-chromosome specific STR loci using circulatory fetal DNA in maternal plasma by multiplex PCR. *Prenat Diagn* 2006;**26**:362-368.
- Desmonts G, Couvreur J.: Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. *N Engl J Med* 1994;**290**:303-307.
- Desmonts G, Daffos F, Forestier F, Capella-Pavlovsky M, Thulliez P, Chatier M.: Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Lancet* 1985;**1**:500-504.
- Di Sant'Agnese PA.: Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *Pediatrics* 1953;**12**:549-552.
- Dobos M, Papp Z.: Down-szindróma. In: Papp Z. (Ed). *Klinikai Genetika*, Golden Book Kiadó, Budapest, 1995, p. 552-562.
- Doherty RA, Bradley LA, Haddow JE.: Prenatal screening for cystic fibrosis: An updated perspective. *Am J Obstet Gynecol* 1997;**176**:268-270.
- Dong Y, Zhang H, Hawthorn L, Ganther E.H, Ip C.: Delineation of the molecular basis for selenium-induced growth arrest in human prostate cancer cells by oligonucleotide array. *Cancer Research* 2005;**63**:52-59.
- Doyle CK, Labruna MB, Breitschwerdt EB, Tang YW, Corstvet RE, Hegarty BC, Bloch KC, Li P, Walker DH, McBride JW.: Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the dsb gene. *J Mol Diagn* 2005;**7**:504-510.

- Dubey JP, Lindsay DS, Forestier F, Capella-Pavlovsky M, Thulliez P, Chartier M.: Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev 1998;**11**:267-299.
- Edwards JH, Harnden DG, Cameron AH, Crosse M, Wolff OH.: A new trisomic syndrome. Lancet, 1960;**1**:787-790.
- Edwards KJ, Logan JMJ.: Performing real-time PCR. In: Real-time PCR. Logan L, Edwards K, Saunders N, editors, Caisters Academic Press, Norfolk, 2009, p. 85-93.
- Endreffy E, Burg K, Gyurkovits K, Kálmán M, László A, Raskó I.: Allele frequencies of cystic fibrosis-linked markers and F508 deletion in affected Hungarian families. Acta Pediatr Hung 1992;**32**:101-113.
- Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR, Smith TF.: Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clin Microbiol Rev 2006;**19**:165-256.
- Etminan M, FitzGerald JM, Gleave M, Chambers K.: Intake of selenium in the prevention of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. Cancer Causes Control. 2005;**16**:1125-1131.
- Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR.: Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DANN from maternal blood. Proc Natl Acad Sci USA 2008;**105**:16266-16271.
- Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR.: Analysis of the size distribution of fetal and maternal cell-free DANN by paired-end sequencing. Clinical Chemistry 2010;**8**:1279-1286.
- Fan HC, Wang J, Potanina A, Quake SR.: Whole-genome molecular haplotyping of single cells. Nature Biotechnology 2011;**29**:59.
- Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C.: Das coeliakiesyndrom bei angeborener zystischer pankreasfibromatose und bronchiektasien. Wien Med Wschr 1936;**86**:753-756.
- Farber S.: Some organic digestive disturbances in early life. J Mich Med Soc 1945;**44**:587-593.
- Fekete Gy, Váradi A, Pipiras E, Németh K, Réthy LA, Holics K, Ujhelyi R.: A deltaF508 mutatio kimutatása cysticus fibrózisban. Orvosi Hetilap 1992;**133**:2423-2430.
- Felley-Bosco E, Pourzand C, Zijlstra J, Amstad P, Cerutti P.: A genotypic mutation system measuring mutations in restriction recognition sequences. Nucleic Acids Res 1991;**19**:2913-2919

- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J.: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;**9**:669–766.
- Filisetti D, Gorcii M, Pernot-Marino E, Villard O, Candolfi E.: Diagnosis of congenital toxoplasmosis: comparison of targets for detection of *Toxoplasma gondii* by PCR. *J Clin Microbiol* 2003;**41**:4826-4828.
- Findlay I, Tóth T, Matthews P, Marton T, Quirke P, Papp Z.: Rapid trisomy diagnosis (21, 18, and 13) using fluorescent PCR and short tandem repeats: applications for prenatal diagnosis and preimplantation genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet* 1998;**15**:266-275.
- Finning KP, Martin J, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G.: Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ* 2008;**336**:816-818.
- Ford CE, Hamerton JL.: The chromosomes of man. *Nature* 1956;**178**:1020-1023.
- Galazios G, Papazoglou D, Tsikouras P, Kolios G.: Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and pregnancy. *J Mat-Fet Neonat Med* 2009;**22**:371-378.
- Galbiati S, Smid M, Gambini D, Ferrari A, Restagno G, Viora E, Campogrande M, Bastonero S, Pagliano M, Calza S, Ferrari M, Cremonesi L.: Fetal DNA detection in maternal plasma throughout gestation. *Hum Genet* 2005;**117**:243-248.
- Gardó S.: Gondolatok a Down szindróma szűréséről. *Orvosi Hetilap* 2009;**150**:497-501.
- Gargett CE, Rogers PA.: Human endometrial angiogenesis. *Reproduction* 2001;**121**:181–186.
- Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, Cortes-Flores R, Martinez-Gaytan V, Rivera-Munoz JE, Garcia-Mayorga EA, Meza-Lamas E, Rojas-Martinez A, Ortiz-Lopez R, Martinez-Fierro ML.: No association between polymorphisms/haplotypes of the vascular endothelial growth factor gene and preeclampsia. *BMC Pregnancy and Child Birth* 2011;**11**:35.
- Gross U, Roos T, Appoldt D, Heesemann J.: Improved serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection by detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against P30 using the immunoblot technique. *J Clin Microbiol* 1992;**30**:1436-1441.
- Guerina NG, Hsu HW, Meissner HC, Maguire JH, Lynfield R, Stechenberg B, Abrams I, Pasternack MS, Hoff R, Eaton RB, Grady FG.: Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii*

- infection. The New England Regional Toxoplasma Working Group. N Engl J Med 1994;**159**:736-740.
- Gundry CN, Bernard PS, Herrmann MG, Reed GH, Wittwer CT.: Rapid F508del and F508C assay using fluorescent hybridization probes. Genet Test 1999;**3**:365-370.
- Gundry CN.: Fluorescent hybridization probe detection of the F508del cystic fibrosis allele on the LightCycler. In: Rapid cycle real-time PCR. Eds., Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K.; Springer, Berlin, 2001; p. 111-125.
- Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J, Wittwer CT.: Amplicon melting analysis with labeled primers: A closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. Clin Chem 2003;**49**:396-406.
- Hahn S, Kiefer V, Brombacher V, Troeger C, Holzgreve W.: Fetal cells in maternal blood. An update from Basel. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1999;**85**:101-104.
- Hahn S, Zhong XY, Bürk MR, Troeger C, Holzgreve W.: Multiplex and real-time quantitative PCR on fetal DNA in maternal plasma. A comparison with fetal cells isolated from maternal blood. Ann N Y Acad Sci 2000;**906**:148-152.
- Hahn S, Rusterholz C, Hösli I, Lapaire O.: Cell-free nucleic acids as potential markers for preeclampsia. Placenta. 2011;**32** Suppl:S17-20.
- Hattori M, Yoshioka K, Sakaki Y.: High-sensitive fluorescent DNA sequencing and its application for detection and mass-screening of point mutation. Electrophoresis 1992;**15**:560-565.
- Hecht CA, Hook EB.: Rates of Down syndrome at livebirth by one-year maternal age intervals in studies with apparent close to complete ascertainment in populations of European origin: a proposed revised rate schedule for use in genetic and prenatal screening. Am J Med Genet 1996;**62**:376-385.
- Hedman K, Lappalainen M, Seppala I, Makela O.: Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. J Infect Dis 1989;**159**:736-739.
- Heller MJ, Jablonski EJ.: Fluorescent stokes shift probes for polynucleotide hybridisation assay. European Patent Application 1987;86116652.8.
- Hertig A, Berkane N, Lefevre G, Toumi K, Marti HP, Capeau J, Uzan S, Rondeau E.: Maternal serum sFlt1 concentration is an early and reliable predictive marker of preeclampsia. Clin Chem 2004;**50**:1702–1703.

- Higuchi R, Dolinger G, Walsh PS, Griffith R.: Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 1992;**10**:413-417.
- Higuchi R, Fockler C, Dolinger G, Watson R.: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993;**11**:1025-1030.
- Hochberg EP, Miklos DB, Neuberg D, Eichner DA, McLaughlin SF, Mattes-Ritz A, Alyea EP, Antin JH, Soiffer RJ, Ritz J.: A novel rapid single nucleotide polymorphism (SNP)-based method for assessment of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2003;**101**:363-369.
- Hohifeld P, Daffos F, Costa MJ, Thuylliez P, Forestier F, Vidaud M.: Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with polymerase chain reaction test on amniotic fluid. *N Engl J Med* 1994;**331**:695-699.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH.: Detection of specific polymerase chain reaction product by utilising the 5' -3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;**88**:7276-7280.
- Holzgreve W, Garritsen HS, Ganshirt-Ahlert D.: Fetal cells in the maternal circulation. *J Reprod Med* 1992;**37**:410-418.
- Honda H, Miharuru N, Ohashi Y, Ohama K.: Successful diagnosis of fetal gender using conventional PCR analysis of maternal serum. *Clin Chem* 2001;**47**:41-46.
- Honda H, Miharuru N, Ohashi Y, Samura O, Kinutani M, Hara T, Ohama K.: Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Genet* 2002;**110**:75-79.
- Hook EB, Chamber GM.: Estimated rates of Down-syndrome in live birth by one year maternal age intervals for mothers aged 20-49 in New York State study - implications of the risk figures for genetic counseling and cost-benefit analysis of prenatal diagnosis program. *Birth Defects Original Articles Series* 1977;**13**:123-141.
- Hristoskova S, Holzgreve W, Hahn S.: More than one-half of the erythroblasts in the fetal circulation and cord blood are TUNEL positive. *Clin Chem* 2001;**47**:1870-1871.
- Hughes C, Murphy A, Martin C, Sheils O, O'Leary J.: Molecular pathology of prostate cancer. *J Clin Pathol* 2005;**58**:183-192.
- Hunter A, Aitkenhead M, Caldwell C, McCracken G, Wilson D, McClure N.: Serum levels of vascular endothelial growth factor in preeclamptic and normotensive pregnancy. *Hypertension* 2000;**36**:965-969.

- Illanes S, Denbow M, Kailasam C, Finning K, Soothill PW.: Early detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Early Hum Dev* 2007;**83**:563–566.
- Kamory E, Csokay B, Hollo Z.: Rapid detection of cystic fibrosis transmembrane conductance regulatory gene IVS8 5T variant by real-time PCR. *Clin Chem* 2004;**50**:1837-1839.
- Karumanchi AS, Masnard SE, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP.: Preeclampsia: a renal perspective. *Kidney Internat* 2005;**67**:2101–2113.
- Kay R, Rosten PM, Humpries RK.: CD 24, a signal transducer modulating B cell activation responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor. *J Immunol* 1991;**147**:1412-1416.
- Kehler N, Lazar L, Rigó J Jr., Nagy B.: Isolation of fetal free nucleic acids from maternal plasma and detection of fetal gender. Human Genetics Congress, Amsterdam, May 28-31, 2010, *European J Human Genetics*, 2010;**19**:179.
- Kehler N.: Isolation of fetal free nucleic acids from maternal plasma and detection of fetal gender. Diploma Thesis, Semmelweis University, Budapest, 2010
- Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC.: Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989;**245**:1073-1080.
- Kim YJ, Park BH, Park H, Jung SC, Pang MG, Ryu HM, Lee KS, Eom SM, Park HY.: No association of the genetic polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase, dimethylarginine dimethylaminohydrolase, and vascular endothelial growth factor with preeclampsia in Korean population. *Twin Res Hum Genet* 2008;**11**:77-83.
- Klee SR, Tyczka J, Ellerbrok H, Franz T, Linke S, Baljer G, Appel B.: Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiol* 2006;**6**:2.
- Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG.: Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol.* 1971;**56**:341-361.
- Kopper L, Timár J, Becságh P, Nagy Zs.: Célzott diagnosztika és célzott terápia az onkológiában. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2009. p.173-191.
- Kopper L, Tímár L, Becságh P, Nagy Zs.: Célzott diagnosztika és célzott terápia az onkológiában 2. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2011. p.214-238.
- Kristiansen G, Denkert C, Schlüns K, Dahl E, Pilarsky C, Hauptmann S.: CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent prognostic marker of patients survival. *Am J Pathol* 2002;**161**:1215-1221.

- Kristiansen G, Winzer KJ, Mayordomo E, Bellach J, Schluns K, Denkert C, Dahl E, Pilarsky C, Altevogt P, Guski H, Dietel M.: CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003a;**9**:4906-4913.
- Kristiansen G, Schluns K, Yongwei Y, Denkert C, Dietel M, Petersen I.: CD24 is an independent prognostic marker of survival in non-small cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 2003b;**88**:231-236.
- Kristiansen G, Mammar M, Altevogt P.: Tumor biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J Mol Histology* 2004a;**35**:255-262.
- Kristiansen G, Pilarsky C, Pervan J, Stürzebecher B, Stephan C, Jung K, Loening S, Rosenthal A, Dietel M.: CD24 expression is a significant predictor of PSA relapse and poor prognosis in low grade or organ confined prostate cancer. *Prostate* 2004b;**58**:183-192.
- Kristiansen G, Machado E, Bretz N, Rupp C, Winzer KJ, König AK, Moldenhauer G, Marmé F, Costa J, Altevogt P.: Molecular and clinical dissection of CD24 antibody specificity by a comprehensive comparative analysis. 2010;**90**:1102-1116.
- Kubista M, Andrade MJ, Bengtson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Stahlberg S, Zoric N.: The real-time polymerase chain reaction. *Mol Asp Med* 2006;**27**:95-125.
- Kuoppa Y, Boman J, Scott L, Kumlin U, Eriksson I, Allard A.: Quantitative detection of respiratory *Chlamydia pneumoniae* infection by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002;**40**:2273-2274
- Kupferminc MJ, Daniel Y, Englender T, Baram A, Many A, Jaffa AJ, Gull I, Lessing JB.: Vascular endothelial growth factor is increased in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1997;**38**:302–306.
- Landegren U, Nilsson M, Kwok P-Y.: Reading of bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Res* 1998;**8**:769-776.
- Lappalainen M, Koskela P, Hedman K, Teramo K, Ammälä P, Hiilesmaa V, Koskiniemi M.: Incidence of primary toxoplasma infection during pregnancy in Southern Finland. *Scand J Infect Dis* 1992;**24**:97-104.
- 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* 2002;**87**:569-577.

- Lázár L, Bán Z, Szakács O, Nagy B, Beke A, Oroszné NJ, Rigó J Jr, Papp Z. Szabad magzati DNS kimutatása a magzati Y-kromoszóma igazolásával anyai vérplazmából. *Orvosi Hetilap* 2003;**49**:2405-2409.
- Lázár L, Bán Z, Harmath Á, Papp Z. The presence of maternal DNA in peripheral blood of newborn infants. In: Rodeck C. and Papp Z. (szerk.), *Recent advances in prenatal genetic diagnosis*. Medimond, 2004a: p. 43-46.
- 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: Rodeck C, Papp Z. (szerk.), *Recent advances in prenatal genetic diagnosis*. Medimond, 2004b: p. 51-54.
- Lázár L, Harmath A, Bán Z, Nagy B, Papp C, Rigó J Jr, Papp Z.: Detection of maternal deoxyribonucleic acid in peripheral blood of premature and mature newborn infants. *Prenat Diagn* 2006a;**2**:168-170.
- Lázár L, Nagy B, Bán Z, Nagy GR, Papp Z.: Presence of cell-free fetal DNA in plasma of women with ectopic pregnancies. *Clin Chem* 2006b;**8**:1599-1601.
- Lázár L.: Kétirányú transzplacentáris DNS transzport. Új lehetőségek a nem-invazív prae-natalis diagnosztikában. Ph.D. értekezés. Semmelweis Egyetem, Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola, Budapest, 2007a
- Lázár L, Nagy B, Bán Z, Nagy GR, Papp Z.: Non-invazív magzati Rh meghatározás real-time PCR-módszerrel. *Orvosi Hetilap* 2007b;**18**:497-500.
- Lázár 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
- Lázár L, Nagy B, Molvarec A, Szarka A, Rigó J Jr.: Role of hsa-miR-325 in the pathology of preeclampsia. *Mol Med Report* 2012;**6**:597-600.
- Lee D, Chen P-J, Lee G-B.: The evolution of real-time PCR machines to real-time PCR chips. *Biosensors and Bioelectronics* 2010;**25**:1820-1824.
- Lee MA, Connell CR, Bloch W.: Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acid Res* 1993;**21**:3761-3766.
- Lee MA, Squirrel DJ, Leslie DL, Brown T.: Homogeneous fluorescent chemistries for real-time PCR. In: *Real-time PCR*. Logan L, Edwards K, Saunders N, editors, Caisters Academic Press, Norfolk, 2009, p. 23-45.
- Lee T, LeShane ES, Messerlian GM, Canick JA, Farina A, Heber WW, Bianchi DW.: Down syndrome and cell-free fetal DNA in archived maternal serum. *Am J Obst Gynecol* 2002;**5**:1217-1221.

- Lejeune J, Gautier M, Turpin R.: Étude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. C.R. Acad Sci (D) (Paris) 1959;**248**,1721-1722.
- Leung TN, Zhang J, Lau TK, Chan LY, Lo YM.: Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. Clin Chem 1999;**45**:1747-1751.
- Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA.: Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. N Engl J Med 2004;**350**:672–683.
- Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP.: Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. J Clin Microbiol 2000;**38**:4121-4125.
- Lo YM, Patel P, Wainscoat JS, Sampietro M, Gillmer MD, Fleming KA.: Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. Lancet 1989;**2**:1363-1365.
- Lo YM, Bowell PJ, Selinger M, Mackenzie IZ, Chamberlain P, Gillmer MD, Elliott P, Pratt G, Littlewood TJ, Fleming KA, Wainscoat JS.: Prenatal determination of fetal rhesus D status by DNA amplification of peripheral blood of rhesus-negative mothers. Ann. NY. Acad Sci 1994;**731**:229-236.
- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS.: Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet 1997;**350**:485-487.
- Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AM, Hjelm NM.: Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. Am J Hum Genet 1998a;**62**:768-775.
- Lo YM, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, Poon PMK, Redman CWK, Wainscoat JS.: Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. N Engl J Med 1998b;**339**:1734-1738.
- Lo YM, Leung TN, Tein MS, Sargent IL, Zhang J, Lau TK, Haines CJ, Redman CW.: Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. Clin Chem 1999a;**45**:184-188.
- Lo YM, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AM, Hjelm NM, Elmes RS, Bianchi DW.: Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. Clin Chem. 1999b;**45**:1747-1751.

- Lyall F, Greer IA, Boswell F, Fleming R.: Suppression of serum vascular endothelial growth factor immunoreactivity in normal pregnancy and preeclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1997;**104**:223–228.
- Machay T.: Congenitalis toxoplasmosis. In: *Klinikai genetika*. Szerkesztő: Dr. Papp Z. Golden Book Kiadó, Budapest, 1995. p. 613-615.
- Mandel P, Métais P.: Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l’Homme. *CR Acad Sci Paris* 1948;**142**:241-243.
- Mansfield ES.: Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. *Hum Mol Genet.* 1993;**2**:43-50.
- Mardis ER.: Next-generation DNA sequencing methods. *Ann Rev Genomics Hum Genet* 2008;**9**:387-402.
- Mao F, Leung W, Xin X.: US Patent 2006;20060211028
- Mao F, Leung W, Xin X.: Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnol* 2007;**7**:76.
- Marras SA, Tyagi S, Kramer FR.: Real-time assays with molecular beacons and other fluorescent nucleic acid hybridization probes. *Clin Chim Acta* 2006;**363**:48-60.
- Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA.: Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003;**111**:649–658.
- McDonald AE, Wolfe WM.: The pro-inflammatory role of adiponectin at the maternal-fetal interface. *Am J Reprod Immunol* 2011;**66**:128-136.
- Meller M, Vadachkoria S, Luthy DA, Williams MA.: Evaluation of housekeeping genes in placental comparative expression studies. *Placenta* 2005;**26**:601-607.
- Meschede D, Eigel A, Horst A, Nieschlag E.: Compound heterozygosity for the delta F508 and F508C cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mutations in a patient with congenital bilateral aplasia of the vas deferens. *Am J Hum Genet* 1993;**53**:292-293.
- Méhes K, Schultz K, Soltész Gy.: Jellegzetes Edwards-syndroma (18-as trisomia). *Orvosi Hetilap* 1971;**112**:2891-2892.
- Méhes K.: Autosomalis trisomiák. *Orvosi Hetilap* 1966;**107**:594-598.

- Minon JM, Gerard C, Senterre JM, Schaaps JP, Foidart JM.: Routine fetal RhD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfusion* 2008;**48**:373-381.
- Montes MJ, Alemán P, García-Tortosa C, Borja C, Ruiz C, García-Olivares E.: Cultured human decidual stromal cells express antigens associated with hematopoietic cells. *J Reprod Immunol* 1996;**31**:53-56.
- Mueller UW, Hawes CS, Wright AE, Petropoulos A, DeBoni E, Firgaira FA, Morley AA, Turner DR, Jones WR.: Isolation of fetal trophoblast cells from peripheral blood of pregnant women. *Lancet* 1990;**336**:197-200.
- Mullis KB, Faloona FA.: Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;**155**:335-350.
- Nagy B, Tóth-Pál E, Papp Cs, Bán Z, Papp Z.: Prenatal detection of the $\Delta F508$ mutation using fluorescent PCR and comparison of the results with conventional PCR. *Pediatr Pathol Mol Medicine* 1999;**18**:213-219.
- Nagy B, Bán Z, Tóth-Pál E, Beke A, Papp Cs, Papp Z.: A cysticus fibrosist okozó $\Delta F508$ mutatio kimutatása fluorescens polimeráz láncreakcióval. *Magyar Nőorvosok Lapja* 2000a;**63**:25-28.
- Nagy B, Bán Z, Tóth-Pál E, Papp Cs, Fintor L, Papp Z.: Apolipoprotein E allele distribution in trisomy 13, 18, and 21 conceptuses in a Hungarian population. *Am J Clin Pathol* 2000b;**113**:535-538.
- Nagy B, Papp Z.: Az apolipoprotein E és a magzati triszómiák. *Orvosi Hetilap* 2002;**143**:1923-1927.
- 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 haematological malignancies: overexpression of MYC is poor prognostic sign in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol* 2003;**120**:434-441.
- 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* 2003;**88**:654-658.
- Nagy B, Laitinen T, Bán Z, Andrasofszky Z, Papp G, Lázár L, Nékám K, Papp Z, Réthy LA.: Molekuláris genetikai vizsgálatokra alkalmas „szabad” DNS izolálása archivált vérsavómintákból. *Orvosi Hetilap* 2004;**47**:2375-2378.
- Nagy B, Bán Z, Beke A, Csaba Á, Joó J, Váradi J, Tóth-Pál E, Papp Z.: *Toxoplasma gondii* kimutatása a magzatvízből fluoreszcens-PCR és DNS fragmens analízissel. *Magyar Nőorvosok Lapja* 2005a;**68**:95-100.

- Nagy B, Bán Z, Lázár L, Nagy GR, Papp Cs, Tóth-Pál E, Papp Z.: Rapid determination of trisomy 21 from amniotic fluid cells using single-nucleotide polymorphic loci. *Prenat Diagn* 2005b;**25**:1138-1141.
- Nagy B, Bán Z, Papp Z.: A DNS-izolálási módszer hatása a multiplex fluorescens PCR- és DNS-fragmens-analízis eredményeire. *Orvosi Hetilap* 2005c;**29**:1539-1541.
- Nagy B, Bán Z, Beke A, Nagy GR, Lázár L, Papp Cs, Tóth-Pál E, Papp Z.: Detection of *Toxoplasma gondii* from amniotic fluid, a comparison of four different molecular biological methods. *Clin Chim Acta* 2006a;**368**:131-137.
- Nagy B, Bán Z, Lázár L, Nagy GR., Papp Z.: A cystás fibrosist okozó F508 deléció kimutatása real-time PCR- módszerrel. *Orvosi Hetilap* 2006b;**147**:119-122.
- Nagy B, Szendrői A, Papp Z, Romics I.: CD24 mRNS expresszió meghatározása kvantitatív real-time PCR módszerrel túbiopsziával nyert prosztata mintákból. *UroOnkológia* 2006c;**4**:12-15.
- Nagy B, Hupuczi P, Rigo B, Szabo G, Berkes E, Sziller I, Papp Z.: Study of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in HELLP syndrome patients. XXI. International Society of Thrombosis and Haemostasis Congress, Geneva, July 6-12, 2007, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2007a;**5**;S1,P-T-481.
- Nagy B, Lázár L, Nagy GR, Bán Z, Papp Z.: *Toxoplasma gondii* kimutatása magzatvízből kvantitatív valós idejű PCR-módszerrel. *Orvosi Hetilap* 2007b;**148**:935-938.
- 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* 2007c;**21**:154-158.
- Nagy B, Nagy GyR, Lazar L, Ban Z, Papp Z.: Detection of deltaF507 using quantitative real-time PCR. *Fetal Diagnosis and Therapy* 2007d;**22**:63-67.
- 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. *Clin Chim Acta* 2008a;**389**:126-131.
- 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* 2008b;**23**:263-266.

- Nagy B, Szendrői A, Romics I.: Overexpression of CD24, c-myc and phospholipase 2A in prostate cancer tissue samples obtained by needle biopsy. *Pathol Oncol Res* 2009;**15**:279-283.
- Nagy B, Lázár L, Bán Z, Beke A, Rigó J. Jr.: A congenitális toxoplasmosis és kimutatása. In: *Praenatalis molekuláris genetika*. Szerkesztők: Nagy B, Lázár L, Rigó J Jr. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2011a, p.106-110.
- Nagy B, Lázár L, Bán Z.: A PCR módszeren alapuló molekuláris genetikai vizsgálatok a leggyakoribb számbeli kromoszóma rendellenességek kimutatására. In: *Praenatalis molekuláris genetika*. Szerkesztők: Nagy B, Lázár L, Rigó J Jr., Semmelweis Kiadó, Budapest, 2011b, p.43-48.
- Nagy B, Molvarec A, Hupuczi P, Rigó J. Jr.: Vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF) egynukleotidos polimorfizmusának meghatározása HELLP szindrómával szövődött terhességekben. *Magyar Nőorvosok Lapja* 2011c;**74**:10-14.
- Nagy B.: Beszámoló a 2nd Central-Eastern European Symposium on Free Nucleic Acids in Non-Invasive Prenatal Diagnosis-ról (Olmütz, 2012. október 25-26). *Magyar Nőorvosok Lapja* 2012;**75**:46-46.
- Nagy B.: Application of real-time polymerase chain reaction in the clinical genetic practice. *Journal of Pediatric Genetics* 2013;**2**:1-8.
- Nagy Gyula Richárd: A magzati sejtekből végzett jövőbeli noninvazív diagnosztika kibontakozásának első lépései. Ph.D. értekezés. Semmelweis Egyetem. Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola, Budapest, 2007.
- Nagy GyR, Nagy B, Papp Z.: A praenatalis genetikai diagnosztika az anyai vérkeringésbe kerülő magzati sejtekből - helyzetkép az eddigi eredményekről. *Magyar Nőorvosok Lapja* 2006;**69**:41-48.
- Németh K, Holics K, Újhelyi R, Váradi A, Fekete G.: A cystás fibrózis öt mutációjának vizsgálata a magyar populációban. *Orvosi Hetilap* 1996;**137**:899-903.
- Németi 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**:245-246.
- Németi M, Papp Z.: Cystikus fibrózis. In.: *Klinikai Genetika*. Ed. Papp Z. Golden Books, Budapest, 1995; p.455-469.
- Nicolle C, Manceaux L.: Sur une infection a corps de Leishman (ou organisms voisins) du gondii. *C R Acad Sci* 1908;**147**:763.
- NIH Consensus Statement: Genetic testing for cystic fibrosis. 1997;**15**:1-37.

- Norton ME, Brar H, Weiss J, Karimi A, Laurent LC, Caughey AB, Rodriguez MH, Williams J, Mitchell ME, Adair CD, Lee H, Jacobsson B, Tomlinson MW, Oepkes D, Hollemon D, Sparks MW, Oliphant A, Song K.: Non-Invasive Chromosomal Evaluation (NICE) Study: results of a multicenter prospective cohort study for detection of fetal trisomy 21 and trisomy 18. *Am J Obstet Gynecol* 2012;**207**:137.e1-8.
- Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M, van den Boom D, Bombard AT, Grody WWG, Nelson SF, Canick JA.: DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genetics in Medicine* 2012;**14**:296-305.
- Papantoniou N, Bagiokos V, Agiannitopoulos K, Kolialexi A, Destouni A, Tounta G, Kanavakis E, Antsaklis A, Mavrou A.: RASSF1A in maternal plasma as a molecular marker of preeclampsia. *Prenat Diagn.* 2013;**33**:682-687.
- Papazoglou D, Galazios G, Koukourakis IM, Kontomanolis EN, Maltezos E.: Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2004;**5**:321-324.
- Papp Z, Osztovcics M, Schuler D, Méhes K, Czeizel E, Horváth L, Szemere G, László J.: Down syndrome: Chromosome analysis of 362 cases in Hungary. *Hum Hered* 1977;**27**:305-309.
- Papp Z.: Congenitalis anomáliák, intrauterin (connatalis) infectiók. Szerk. Dr. Papp Z. A szülészeti-nőgyógyászati tankönyve. Budapest, 1999. p. 591-648.
- Patau KA, Smith DW, Therman EM, Inhorn SL, Wagner HP.: Multiple congenital anomaly caused by an extra chromosome. *Lancet*, 1960;**1**:790-793.
- Pelloux H, Guy E, Angelici C, Aspöck H, Bessièrès MH, Blatz R, Del Pezzo M, Girault V, Gratzl R, Holberg-Petersen M, Johnson J, Krüger D, Lappalainen M, Naessens A, Olsson M.: A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* involving 15 teams. *FEMS Microbiology Letters* 1998;**165**:231-237.
- Penrose LS.: The relative aetiological importance of birth order and maternal age in mongolism. *Proc R Soc London*, 1934;**115**:431-450.
- Pinon JM, Poirriez J, Leroux B.: Diagnostic précoce et surveillance de la toxoplasmose congénitale. Méthode des profils immunologiques comparés. *Presse Méd* 1987;**16**:471-474.
- Pont-Kingdon G, Lyon E.: Rapid detection of aneuploidy (trisomy 21) by allele quantification combined with melting curve analysis of single-nucleotide polymorphism loci. *Clin Chem* 2003;**49**:1087-1094.

- Poon LLM, Leung TN, Lau TK, Lo YMD.: Presence of fetal RNA in maternal plasma. Clin Chem 2000;**46**:1832–1834.
- Pourzand C, Cerutti P.: Genotyping mutation analysis by PCR-RFLP. Mutat Res 1993;**288**:113-121.
- Redman CW.: Current topic: pre-eclampsia and the placenta. Placenta 1991;**12**:301-308.
- Remington JS, Desmonts G.: Toxoplasmosis. In: Remington J.S., Klein J.O. eds. Infectious Diseases of the Fetus and the Newborn Infant. 3rd ed. Philadelphia, W.B. Saunders 1990.
- Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E.: A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. J Vasc Res 2000;**37**:443–448.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL.: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 1989;**245**:1066-1073.
- Romand S, Chosson M, Franck J, Wallon M, Kieffer F, Kaiser K, Dumon H, Peyron F, Thulliez P, Picot S.: Usefulness of quantitative polymerase chain reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*. Am J Obstet Gynecol 2004;**190**:397-802.
- Sabin AB, Feldman HA.: Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (Toxoplasma). Science 1948;**108**:660-663.
- Sagiv E, Arber N.: The novel oncogene *CD24* and its arising role in the carcinogenesis of the GI tract: from research to therapy. Exp Rev Gastroenterol Hepatol 2008;**2**:125-133.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985;**230**:1350-1354.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988;**239**:487-491.
- Sandrim VC, Palei AC, Cavalli RC, Araujo FM, Ramos ES, Duarte G, Tanus-Santos JE.: Vascular endothelial growth factor genotypes and haplotypes are associated with pre-eclampsia but not with gestational hypertension. Mol Hum Reprod 2009;**15**:115-120.

- Schmorl G.: Pathologisch-anatomische Untersuchungen ueber Pubereklampsie. 1893,Vogel, Leipzig.
- Schostak M, Krause H, Miller K, Schrader M, Weikert S, Christoph F, Kempkensteffen C, Kollermann J.: Quantitative real-time RT-PCR of *CD24* mRNA in the detection of prostate cancer. BMC Urol 2006;**6**:7 online doi: 10.1186/1471-2490-6-7.
- Schuler D.: Autosomalis chromosoma aberratiók. Medicina Kiadó, Budapest, 1968; p. 124-139.
- Scotet V, Duguépéroux I, Audrézet MP, Audebert-Bellanger S, Muller M, Blayau M, Férec C.: Focus on cystic fibrosis and other disorders evidenced in fetuses with sonographic finding of echogenic bowel: 16-year report from Brittany, France. Am J Obstet Gynecol. 2010;**203**:592.e1-6.
- Sekizawa A, Purwosunu Y, Matsuoka R, Koide K, Okazaki S, Farina A, Saito H, Okai T.: Recent advances in non-invasive prenatal DNA diagnosis through analysis of maternal blood. J Obstet Gynaecol Res. 2007;**33**:747-764.
- Shepp DH, Hackman RC, Conley FK, Anderson JB, Meyers JD.: *Toxoplasma gondii* reactivation identified by detection of parasitemia in tissue culture. Ann Intern Med 1985;**103**:218-221.
- Shim JY, Jun JK, Jung BK, Kim SH, Won HS, Lee PR, Kim A.: Vascular endothelial growth factor gene +936 C/T polymorphism is associated with preeclampsia in Korean women. Am J Obstet Gynecol 2007;**197**: e1–4271.
- Sibai B, Dekker G, Kupfermanc M.: Pre-eclampsia. Lancet 2005;**365**:785-799.
- Sifakis S, Papantoniou N, Kappou D, Antsaklis A.: Noninvasive prenatal diagnosis of Down syndrome: current knowledge and novel insights. J Perinat Med 2012;**40**:319-327.
- Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, Narter-Olaga EG, Hawthorne LM, Daniels G.: The presence of an RHD pseudogene containing a 37 basepair duplication and nonsense mutation in Africans with Rh D-negative blood group phenotype. Blood 2000;**96**:12-18.
- Smid M, Lagona F, de Benassuti L, Ferrari A, Ferrari M, Cremonesi L.: Evaluation of different approaches for fetal DNA analysis from maternal plasma and nucleated blood cells. Clin Chem 1999;**45**:1570-1572.
- Smyth GK, Yang YH, Speed T: Statistical issues in cDNA microarray data analysis. Methods Mol Biol 2003;**224**:111-136.
- Spencer K, de Kok JB, Swinkels DW. Increased total cell-free DNA in the serum of pregnant women carrying a fetus affected by trisomy 21. Prenat Diagn 2003;**23**:580-583.

- Stanghellini I, Bertorelli R, Capone L, Mazza V, Neri C, Percesepe A, Forabosco A.: Quantitation of fetal DNA in maternal serum during first trimester of pregnancy by the use of a DAZ repetitive probe. *Mol Hum Reprod* 2006;**12**:587-591.
- Steele MW, Breg WR.: Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. *Lancet* 1966;**1**:383-385.
- Stray-Pedersen B.: Toxoplasmosis in pregnancy. *Baillière's Clin Obstet Gynaecol* 1993;**7**:107-137.
- Szénási Z, Ozsvár Z, Nagy E, Jeszenszky M, Szabó J, Gellén J, Végh M, Verhofstede C.: Prevention of congenital toxoplasmosis in Szeged, Hungary. *Int J Epidemiol* 1977;**26**:428-435.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM.: *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000;**30**:1217-1258.
- The International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variations containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001;**409**:928-933.
- Tijo HJ, Levan A.: The chromosome numbers of man. *Hereditas* 1956;**42**,1-6.
- Tjoa ML, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Bianchi DW, Burton GJ.: Trophoblast oxidative stress and release of cell-free feto-placental DNA. *Am J Pathol* 2006;**169**:400-406.
- Tobiason DM, Seifert HS.: The obligate human pathogen, *Neisseria gonorrhoeae*, is polyploid. *PLOS Biol* 2006;**4**:e185.
- Tóth T, Findlay I, Papp C, Tóth-Pál E, Marton T, Nagy B, Quirke P, Papp Z.: Prenatal detection of trisomy 13 from amniotic fluid by quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenat Diagn* 1998a;**18**:669-674.
- Tóth T, Findlay I, Papp C, Tóth-Pál E, Marton T, Nagy B, Quirke P, Papp Z.: Prenatal detection of trisomy 21 and 18 from amniotic fluid by quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *J Med Genet* 1998b;**35**:126-129.
- Tsaliki E, Papageorgiou EA, Spyrou C, Koumbaris G, Kypri E, Kyriakou S, Satiriou C, Touvana E, Keravnou A, Karagrigoriou A, Lamissou K, Velissariou V, Patsalis PC.: MeDIP real-time qPCR of maternal peripheral blood reliably identifies trisomy 21. *Prenat Diagn* 2012;**32**:996-1001.
- Tsui NBY, Jiang P, Chow KCK, Su X, Leung TY, Sun H, Chan KCA, Chiu RWK, Lo YMD.: High resolution size analysis of fetal DNA in urine of pregnant women by paired-end massively parallel sequencing. *PLOS One* 2012;**7**:1-7. e48319
- Ulrich MP, Norwood DA, Christensen DR, Ulrich RI.: Using real-time PCR to specifically detect *Burkholderia mallei*. *J Med Microbiol* 2006;**55**:551-559.

- van den Boogert PHJF, van Gent-Pelzer MPE, Bonants PJM, De Boer SH, Wander JGN, Levesque CA, van Leeuwen GCM, Baayen RP.: Development of PCR based detection methods for the quarantine phytopathogen *Synchytrium endobioticum*, causal agent of potato wart disease. Eur J Plant Pathol 2005;**113**:47-57.
- Vidigal PV, Santos DV, Castro FC, Couto JC, Vitor RW, Brasileiro Filho G.: Prenatal toxoplasmosis diagnosis from amniotic fluid by PCR. Rev Soc Bras Med Trop 2002;**35**:1-6.
- Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G.: Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. Circulation 1996;**93**:1493–1495.
- Vogelstein B, Gillespie D.: Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc Natl Acad Sci USA 1979;**76**:615-619.
- Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM.: Practical and theoretical implications of fetal/maternal lymphocyte transfer. Lancet 1969;**1**:1119-1122.
- Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE.: Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. Cytokine 2000;**12**:1232–1235.
- Whitehead Institute <http://www.genome.wi.mit.edu/SNP/human>
- Whitman DF, Dunbar SA.: Real-time polymerase chain reaction detection methods, Recent Patents on DNA and Gene Sequences 2008;**2**:20-26.
- World Health Organization: The hypertensive disorders of pregnancy. World Health Organization Technical Report Series 758. Geneva, World Health Organization, 1987.
- Wittwer CT, Marshall BC, Reed GH, Cherry JL.: Rapid cycle allele-specific amplification: studies with the cystic fibrosis delta F508 locus. Clin Chem 1993;**39**:804-809.
- Wong SY, Remington SJ.: Toxoplasmosis in pregnancy. Clin Infect Dis 1994;**18**:853-861.
- Wright CF, Burton HT.:The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. Human Reproduction Update 2009;**15**:139–151.
- Yamada O, Matsumoto T, Nakashima M, Hagari S, Kamahora T, Ueyama H, Kishi Y, Uemura H, Kurimura T.: A new method for extracting DNA or RNA for polymerase chain reaction. J Virol Methods 1990;**27**:203-209.

- Zhou B, Sun Q-W, Lu Y-C, Sun M-M, Wang L-J, Huang X-H.: Prenatal fetal sex diagnosis by detecting amelogenine gene in maternal plasma. *Prenat Diagn* 2005;**25**:577-581.
- Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, Alitalo K, Damsky C, Fisher SJ.: Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol* 2002;**60**:1405–1423.
- 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* 2002;**119**:905-915.
- Zimmermann B, Holzgreve W, Wenzel F, Hahn S.: Novel real-time quantitative PCR test for trisomy 21. *Clin Chem* 2002;**48**:362-363.
- Zimmermann B, El-Sheikhah A, Nicolaides K, Holzgreve W, Hahn S.: Optimized Real-Time Quantitative PCR Measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2005;**51**:1598–1604.

7. A DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁBAN MEGJELENT SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Magyar nyelven

1. Lázár L, Bán Z, Szakács O, **Nagy B**, Beke A, Oroszné N J, Rigó J, Papp Z.: Szabad magzati DNS kimutatása a magzati Y-kromoszóma igazolásával anyai vérplazmából.
Orvosi Hetilap 2003;**144**:2405-2409.
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 2004;**47**:2375-2378.
3. **Nagy B**, Bán Z, Beke A, Csaba Á, Joó J, Váradi J, Tóth-Pál E, Papp Cs, Papp Z.: *Toxoplasma gondii* kimutatása magzatvizből fluorescens-PCR és DNS fragmens analízissel.
Magyar Nőorvosok Lapja 2005;**68**:95-100.
4. **Nagy B**, Bán Z, Papp Z.: A DNS izolálási módszer hatása a multiplex fluorescens PCR- és DNS-fragmens-analízis eredményeire.
Orvosi Hetilap 2005;**146**:1539-1541.
5. **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 2005;**68**:315-318.
6. Nagy GyR, **Nagy B**, Papp Z.: Praenatalis genetikai diagnosztika az anyai vérkeringésbe kerülő magzati sejtekből – helyzetkép az eddigi eredményekről.
Magyar Nőorvosok Lapja 2006;**69**:41-48.
7. **Nagy B**, Bán Z, Lázár L, Nagy GyR, Papp Z.: A cisztás fibrózist okozó F508 deléció kimutatása kvantitatív real-time PCR módszerrel.
Orvosi Hetilap 2006;**147**:1119-1123.
8. **Nagy B**, Szendrői A, Papp Z, Romics I.: CD24 mRNS expresszió meghatározása kvantitatív real-time PCR módszerrel túbiopsziával nyert prosztatata mintákból.
UroOnkológia 2006;**III**:61-54.
9. **Nagy B.**: Molekuláris genetikai diagnosztika.
Orvosképzés 2006;**LXXXI**:262-263.
10. Lázár L, **Nagy B**, Bán Z, Nagy GyR, Beke A, Papp Z.: Noninvazív magzati Rh-meghatározás real-time PCR-módszerrel.
Orvosi Hetilap 2007;**148**:497-500.

11. **Nagy B**, Lázár L, Nagy GyR, Bán Z, Papp Z.: *Toxoplasma gondii* kimutatása magzatvízből kvantitatív valósidejű PCR módszerrel.
Orvosi Hetilap 2007;**148**:935-938.
12. **Nagy B**, Hupuczi P, Szabó G, Rigó B, Papp Z.: A metiléntetrahidrofolát-reduktáz(MTHFR) C677T mutáció kimutatása kvantitatív valósidejű PCR módszer alkalmazásával HELLP szindrómás betegek mintáiban.
Magyar Nőorvosok Lapja 2007;**70**:171-175.
13. Lázár L, Harmath Á. **Nagy B**, Bán Z, Nagy GyR, Papp Z.: Anyai eredetű DNS kimutatása kora- és érett újszülöttek perifériás keringésében.
Magyar Nőorvosok Lapja 2007;**70**:97-100.
14. Lázár L, **Nagy B**, Molvarec A, Rigó J. Jr.: A vérplazma összes szabad DNS, valamint szabad magzati DNS mennyisége praeclampsiaával szövődött és szövődménymentes terhességek esetében.
Orvosi Hetilap 2010;**251**:784-787.
15. Várkonyi T, Than NG, Rigó J. Jr, **Nagy B.**: Leptin receptor (LEPR) egynukleotidos polimorfizmusának meghatározása HELLP szindrómával szövődött terhességekben.
Magyar Nőorvosok Lapja 2010;**73**:219-224.
16. **Nagy B**, Molvarec A, Hupuczi P, Rigó J. Jr.: Vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF) egynukleotidos polimorfizmusának meghatározása HELLP szindrómával szövődött terhességekben.
Magyar Nőorvosok Lapja 2011;**74**:10-14.
17. **Nagy B**, Szendrői A, Romics I.: A c-myc mRNS expresszió meghatározása kvantitatív valósidejű PCR-módszerrel tübiopsziával nyert prosztatamintákból.
UroOnkológia 2012;**IX**:5-8.
18. Lázár L, Nagy GyR, Rigó J. Jr, **Nagy B.**: Magzati aneuploidiák szabad nukleinsav-alapú, nem invazív diagnosztikája.
Orvosi Hetilap 2012;**153**:1687-1691.

Angol nyelven

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 2001;**151**:721-1728.
Impact factor: 4,293 **Idézettség: 51**

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 2002;**87**:569-577.
Impact factor: 3,226 **Idézettség: 44**

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 2002;**119**:905-915.
Impact factor: 3,052 **Idézettség: 37**

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 2002;**16**:2213-2221.
Impact factor: 4,693 **Idézettség: 18**

5. Savli H, Aalto Y, **Nagy B**, Knuutila S, Pakkala S.: Gene expression analysis of 1,25 (OH)₂ dependent differentiation of HL-60 cells: a cDNA array study.
British J Haematology 2002;**118**:1065-1070.
Impact factor: 3,052 **Idézettség: 22**

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 2003;**120**:434-441.
Impact factor: 3,267 **Idézettség: 49**

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 2003;**88**:654-658.
Impact factor: 3,453 **Idézettség: 7**
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 2003;**44**:1935-1941.
Impact factor: 1,163 **Idézettség: 33**
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 2003;**22**:7628-7631.
Impact factor: 6,495 **Idézettség: 17**
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.
Impact 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.
Impact factor: 6,318 **Idézettség: 49**
13. Savli H, Sirma S, **Nagy B**, Aktan M, Dincol G, Salcioglu Z, Özbek U.: Expression analysis of *DEK*, *AF4* and *FL1* 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* 2004;**109**:548-553.
Impact factor: 4,416 **Idézettség: 29**
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* 2004;**40**:334-341.
Impact factor: 4,276 **Idézettség: 9**
16. Wikmam H, Seppanen JK, 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* 2004;**203**:584-593.
Impact factor: 5,333 **Idézettség: 38**
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* 2004;**153**:69-72.
Impact factor: 1,577 **Idézettség: 23**
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* 2004;**36**:279-282.
Impact factor: 1,712 **Idézettség: 5**
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.: *L1CAM*, *INP10*, *P-cadherin*, *tPA* and *ITGB4* overexpression in malignant pleural mesotheliomas revealed by combined use of cDNA and tissue microarray. *Carcinogenesis* 2005;**26**:17-25.
Impact factor: 5,108 **Idézettség: 19**
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.* 2005;**156**:104-113.
Impact factor: 1,640 **Idézettség: 9**

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_L, and reduces proliferation of endometrial adenocarcinoma cells.
Am J Obstet Gynec 2005;**193**:1955-1960.
Impact factor: 3,083 **Idézettség: 13**
22. **Nagy B**, Bán Z, Papp Z.: The DNA isolation method has effect on allele drop out and on the results of fluorescent PCR and DNA fragment analysis.
Clinica Chimica Acta 2005;**360**:128-132.
Impact factor: 2,149 **Idézettség: 9**
23. **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 2005;**25**:1138-1141.
Impact factor: 1,640 **Idézettség: 8**
24. **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 2006;**368**:131-137.
Impact factor: 2,328 **Idézettség: 17**
25. 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 2006;**26**:168-170.
Impact factor: 1,514 **Idézettség: 2**
26. 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 2006;**52**:1599-1601.
Impact factor: 5,454 **Idézettség: 14**
27. 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 mass spectrometry.
Genetics in Medicine 2006;**8**:728-734.
Impact factor: 3,427 **Idézettség: 8**
28. 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 2006;**52**:2013-2020.
Impact factor: 5,454 **Idézettség: 8**

29. **Nagy B**, Lazar L, Nagy GR, Ban Z, Papp Z.: Detection of deltaF508del using quantitative real-time PCR, comparison of the results obtained by fluorescent PCR.
Fetal Diagnosis Therapy 2007;**22**:63-67.
Impact factor: 0,844
30. **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 Human Hypertension 2007;**21**:154-158.
Impact factor: 2,244 **Idézettség: 15**
31. **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. 2007;**31**:1595-1597.
Impact Factor: 2,561
32. **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 2008;**23**:263-266.
Impact factor: 1,184 **Idézettség: 1**
33. **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 2008;**389**:126-131.
Impact factor: 2,960 **Idézettség: 15**
34. Savli H, Szendrői A, Romics I, **Nagy B.**: Gene network and canonical pathway analysis in prostate cancer: a microarray study.
Experimental Molecular Medicine 2008;**40**:176-185.
Impact factor: 2,376 **Idézettség: 19**
35. Than N.G, 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 2008;**453**:387-401.
Impact factor: 2,082 **Idézettség: 30**

36. **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 2009;**15**:279-283.
Impact factor: 1,260 **Idézettség: 8**

37. 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;**10**:120.PMID: 19930583
Impact factor: 2,439 **Idézettség: 16**

38. Galimberti S, Cenastrano M, Savli H, Palumbo AG, Tibullo D, **Nagy B**, Piaggi S, Guerrini F, Cine N, Metelli RM, Petrini M.: ITF2357 Interferes with apoptosis and inflammatory pathways in the HL-60 model: a gene expression study.
Anticancer Research 2010;**30**:4525-4536.
Impact factor: 1.656

39. 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 mantel cell lymphoma.
Acta Haematologica 2010;**123**:91-95.
Impact factor: 1,316 **Idézettség: 5**

40. 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 Medical Genetics 2010;**11**:11:25. PMID: 20149225
Impact factor: 2,439 **Idézettség: 2**

41. 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 2011;**52**:142-144.

42. Varkonyi T, **Nagy B**, Fule T, Tarca LA, Karaszi K, Schonleber J, Hupuczi, P, Mihalik N, Kovalszky I, Rigo J. Jr, Meiri H, Papp Z, Romero R.: Microarray profiling reveals that placental transcriptomes of early-onset HELLP syndrome and preeclampsia are similar.
Placenta 32; S21-S29,2011
Impact factor: 3,693 **Idézettség: 22**

43. Lázár L, **Nagy B**, Molvarec A, Szarka A, Rigó J. Jr.: Role of hsa-miR-325 in the pathology of preeclampsia.
Mol Med Reports 2012;**6**:597-600.
Impact factor: 1,170
44. 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 2013;**5**:23-27.
Impact factor: 0,344
45. **Nagy B.**: Application of real-time polymerase chain reaction in the clinical genetic practice.
Journal of Pediatric Genetics 2013;**2**:1-8.

Az értekezést megalapozó *in extenso* közlemények impakt faktora: 112,398
Az értekezést megalapozó *in extenso* közlemények hivatkozásai: 653

Könyvfejezetek

1. **Nagy B**, Lázár L, Bán Z.: A PCR módszeren alapuló molekuláris genetikai vizsgálatok a leggyakoribb számbeli kromoszóma rendellenességek kimutatására. In Praenatalis molekuláris genetika. Editors: Nagy B., Lázár L., Rigó J Jr. ISBN 978-963-3311-53-0 Semmelweis Kiadó, Budapest 2011. p 43-48.
2. **Nagy B**, Harmath Á, Lázár L, Bán Z, Rigó J. Jr.: A cystás fibrózis és kimutatása. In Praenatalis molekuláris genetika. Editors: Nagy B, Lázár L, Rigó J Jr. ISBN 978-963-3311-53-0 Semmelweis Kiadó, Budapest 2011. p 49-55.
3. **Nagy B**, Lázár L, Bán Z, Beke A, Rigó J. Jr.: A congenitális toxoplasmosis és kimutatása. In Praenatalis molekuláris genetika. Editors: Nagy B, Lázár L, Rigó J Jr. ISBN 978-963-3311-53-0 Semmelweis Kiadó, Budapest 2011. p 106-112.
4. Bán Z, Lázár L, **Nagy B**.: Preimplantációs genetikai diagnosztika (PGD). Editors: Nagy B, Lázár L, Rigó J. Jr. ISBN 978-963-3311-53-0 Semmelweis Kiadó, Budapest 2011. p 150-157.
5. Lázár L, Nagy GR, **Nagy B**, Rigó J. Jr.: A neminvazív prenatalis diagnosztika lehetőségei. In Praenatalis molekuláris genetika. Editors: Nagy B, Lázár L, Rigó J Jr. ISBN 978-963-3311-53-0 Semmelweis Kiadó, Budapest 2011. p 158-174.

Könyvek:

1. **Nagy B**, Lázár L, Hahn S, Rigó J. Jr.(szerk): 1st Central-Eastern European Congress on Free Nucleic Acids in Non-Invasive Prenatal Diagnosis. Program and Proceedings, Budapest, Semmelweis Egyetem, 2010. 70 p. ISBN 978-963-9129-73-3
2. **Nagy B**, Lázár L, Rigó J. Jr.: Praenatalis molekuláris genetika. Editors: Nagy B., Lázár L., Rigó J Jr. Semmelweis Kiadó, Budapest 2011. 178p. ISBN 978-963-3311-53-0

8. A FŐBB SCIENTOMETRIAI ADATOK ÖSSZEFOGLALÁSA

Folyóiratcikkek száma:	163
Az összes folyóiratcikk kumulatív impakt faktora (ΣIF):	235,1
A PhD fokozat megszerzését követően megjelent közlemények impakt faktora (ΣIF):	201,3
Az értekezést megalapozó <i>in extenso</i> közlemények impakt faktora:	112,398
Az első szerzős közlemények száma:	42
Az utolsó szerzős közlemények száma:	18
Első és utolsó szerzőségű közlemények impakt faktora:	48,8
Az összes hivatkozások száma:	1850
Független hivatkozások száma:	1565
Hirsch index:	23
Szerkesztett könyvek száma:	2
Könyvfejezetek száma:	9

9. 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 prosztatata 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 dolgozóját a munkámhoz bármilyen formában nyújtott segítségéért. Kiemelem Dr. Papp Csaba, Dr. Tóth-Pál Ernő, Dr. Beke Artúr, Dr. Bán Zoltán, Dr. Lázár Levente, Dr. Nagy Gyula Richárd kollegáimat, akikkel szoros kapcsolat alakult ki az együtt töltött időszak alatt.

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 vezető munkatársait (Bethesda, MD, USA), akik bevezettek a molekuláris genetika és a modern műszerek világába.

A Helsinki Egyetemen eltöltött időszak alatt Prof. Sakari Knuutila és munkatársai biztosították a valósidejű 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 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.