

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

MADAR LÁSZLÓ

MUTÁCIÓS SPEKTRUM MEGHATÁROZÁSA MONOGÉNES  
KÓRKÉPEK ESETÉN ÚJ GENERÁCIÓS SZEKVENÁLÁSI  
MÓDSZEREK SEGÍTSÉGÉVEL

DEBRECENI EGYETEM  
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI  
ISKOLA

DEBRECEN, 2023

# DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

Mutációs spektrum meghatározása monogénes kórképek  
esetén új generációs szekvenálási módszerek segítségével

Madar László

Témavezető: Dr. Balogh István



DEBRECENI EGYETEM  
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2023

## Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	3
2. Bevezetés.....	5
2.1 Irodalmi áttekintés.....	7
2.1.1 Marfan szindróma.....	7
2.1.2 Familiáris hiperkoleszterinémia .....	12
2.2 Sanger féle DNS szekvenálás.....	16
2.3 Új generációs DNS szekvenálás (NGS).....	17
2.3.1 Piroszekvenálás .....	18
2.3.2 Illumina szekvenálási technológia.....	20
3. Célkitűzések .....	23
4. Betegek és Módszerek.....	24
4.1 Betegek.....	24
4.1.1 Betegek Marfan szindróma gyanúval.....	24
4.1.2 Betegek Familiáris hiperkoleszterinémia gyanúval.....	24
4.2 Genomiális DNS izolálás .....	25
4.3 Piroszekvenálás és Sanger féle szekvenálás alkalmazása az <i>FBNI</i> gén vizsgálatára.....	25
4.4 Új generációs szekvenálás Illumina platformon Marfan szindrómás betegek esetén .....	28
4.5 <i>FBNI</i> mRNS vizsgálat .....	28
4.6 A Familiáris hiperkoleszterinémia háttérében álló gének szekvenálása.....	29
4.7 Az <i>LDLR</i> gén MLPA analízise.....	30
4.8 Variánsok filterezése és klasszifikációja FH háttérében álló gének vizsgálatakor.....	30
4.9 Töréspont meghatározása az <i>LDLR</i> génben .....	31
4.10 Variáns adatbázisok és predikációs szoftverek .....	31
5. Eredmények.....	34
5.1 A magyarországi Marfan szindrómás betegekben detektált eltérések.....	34
5.1.1 Az <i>FBNI</i> gén variáns analízise.....	34
5.1.2 Cisztein reziduumot érintő misszensz <i>FBNI</i> variánsok .....	35
5.1.3 Nem cisztein reziduumot érintő misszensz <i>FBNI</i> variánsok .....	36
5.1.4 Kis skálájú deléciók/duplikációk az <i>FBNI</i> génben .....	40
5.1.5 Splice helyet érintő variánsok az <i>FBNI</i> génben.....	41
5.1.6 Visszatérő csendes variáns három egymással nem rokon betegben.....	41
5.2 A magyarországi familiáris hiperkoleszterinémiás betegek mutációs spektruma .....	44
5.2.1 Detektált eltérések .....	44
5.2.2 Az <i>APOB</i> génben kimutatott eltérések .....	45

5.2.3	Az <i>LDLR</i> génben detektált eltérések .....	47
5.2.4	Az <i>LDLR</i> eltérést hordozó betegek családtagjainak vizsgálata .....	54
6.	Megbeszélés .....	55
6.1	Marfan szindrómás betegek vizsgálata során kimutatott eltérések összefoglalása.....	55
6.2	Az FH-s betegek vizsgálata során kimutatott eltérések összefoglalása.....	57
7.	Összegzés .....	61
8.	Summary .....	63
9.	Az értekezés új megállapításai .....	64
10.	Irodalomjegyzék.....	65
11.	Publikációs lista.....	73
12.	Tárgyszavak/keywords .....	77
13.	Köszönetnyilvánítás .....	78
14.	Függelék .....	79

## 1. Rövidítések jegyzéke

ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics, Amerikai Genetikai és Genomikai Társaság
<i>APOB</i>	Apolipoprotein B
BMI	Body Mass Index, testtömegindex
cbEGF	Calcium-Binding Epidermal Growth Factor, kalcium-kötő epidermális növekedési faktor
cDNS	Komplementer DNS
CHD	Coronary Heart Disease, szívkoszorúér-betegség
CNV	Copy Number Variant, kópiaszám eltérés
DLCNS	Dutch Lipid Clinic Network Score, holland lipid klinikai hálózat pontszáma
DNS	Dezoxiribonukleinsav
EL	Ectópia Lentis
ELS	Ectópia Lentis Szindróma
<i>FBNI</i>	Fibrillin 1
FH	Familiáris Hiperkoleszterinémia
gDNS	Genomiális DNS
LDL	Low Density Lipoprotein, alacsony sűrűségű lipoprotein
LDL-C	LDL-Cholesterin, LDL-koleszterin
LDLR	Low Density Lipoprotein Receptor, alacsony sűrűségű lipoprotein receptor
<i>LDLRAP1</i>	Low Density Lipoprotein Receptor Adaptor Protein 1, alacsony sűrűségű lipoprotein receptor adaptor fehérje 1
MASS	Marfan szindróma szerű fenotípus
MFS	Marfan szindróma
MIM	Mendelian Inheritance in Man, Mendeli öröklődés az emberben
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, multiplex ligáció-függő próba amplifikáció
mRNS	Messenger RNS, hírvivő RNS

NMD	Nonsense-Mediated mRNA decay, nonsense-mediált mRNS-lebontás
RNS	Ribonukleinsav
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, reverse transzkripció polimeráz láncreakció
SBS	Sequencing By Synthesis, szintézis alapú szekvenálás
SMAD2	SMAD Family Member 2
<i>STAP1</i>	Signal-Transducing Adaptor Protein 1, jelátvivő adaptor fehérje 1
TC	Total Cholesterol, összkoleszterin
<i>TGFBR1</i>	Transforming Growth Factor Beta Receptor 1, transzformáló növekedési faktor béta receptor 1
<i>TGFBR2</i>	Transforming Growth Factor Beta Receptor 2, transzformáló növekedési faktor béta receptor 2
TGFβ1bp	Transforming Growth Factor-β1 binding protein, transzformáló növekedési faktor-β1 kötő fehérje
VUS	Variants of Uncertain/ Unknown Significance, bizonytalan/ismeretlen jelentőségű variáns

## 2. Bevezetés

A monogénes betegségek diagnosztikája több szempontból is nagy fontossággal bír. A kóroki tényező meghatározása a diagnózis felállításán túl prognosztikai értékkel bírhat, illetve megalapozhatja a mutáció-specifikus kezelést is. A genetikai tesztelést számos tényező nehezítheti, melyek közül kiemelendő a vizsgált gének mérete és az adott betegség genetikai heterogenitása.

Tanulmányaim során két olyan, örökletes, monogénes betegséget vizsgáltam, melyeknek a genetikai háttere akár a betegség hátterében álló gének mérete, akár a száma miatt Magyarországon eddig nem került kivizsgálásra, így ezen betegségekről csak klinikai előfordulási adatok álltak rendelkezésre a betegség hátterében álló genetikai információk nélkül. A genetikai háttér ismerete nagyban segítheti a klinikumot az adott betegséggel kapcsolatban, akár a lehetséges kezelések, akár a várható szövődmények felmérésében és megelőzésében. Továbbá a szakirodalommal összehasonlíthatóvá válnak a betegadatok, így sok olyan információhoz juthatunk melyekből felmérhető például, hogy a hazai betegek milyen variánsokat hordoznak. Információt kaphatunk az egyes eltérések etnikai eredetéről, vagy alapító variánsokat fedezhetünk fel a magyar populációban.

A Marfan szindróma egy monogénes örökletes betegség, melynek alapja a rendellenes kötőszöveti szerkezet kialakulása, ami magyarázza a különböző szervrendszerek érintettségét.

A betegek számos tünettől rendelkezhetnek. A legszembetűnőbbek a vázrendszeri eltérések, úgymint a magas termet vagy a hosszú ujjak és végtagok, valamint a betegek nagyrésznél a szemlencse rendellenes elhelyezkedése. A betegekre a legnagyobb kockázatot azonban a szív és érrendszeri tünetek jelentik, melyeket az érfalakban bekövetkező elváltozások okoznak.

A Marfan szindróma hátterében leggyakrabban egyetlen nagy gén hibája állhat azonban előfordulhatnak más génekben bekövetkező eltérések is.

A Familiáris hiperkoleszterinémia a magas koleszterinszint egy olyan fajtája, melynek hátterében valamilyen, a koleszterin háztartásban kulcsszerepet játszó génben bekövetkezett eltérés áll. Fontos kiemelni, hogy a mai napig egy alul diagnosztizált, ám igen súlyos kardiológiai kockázatokkal járó kórképről van szó, ahol a betegek nagy része a kardiológiai szövődmények miatt fiatalon kerülnek a kezelő orvosok látóterébe. Legtöbb esetben ekkor derül fény az esetleges családi halmozódásra is, mivel a kaszkádvizsgálatokkal sok esetben több, még tünetmentes családtag is kiszűrésre kerülhet.

Fontos megemlíteni, hogy azokban az esetekben, ahol igazolódik a genetikai eltérés mindenképpen már fiatal kortól gyógyszeres kezelés szükséges a koleszterin célérték eléréséhez, valamint a kardiológiai szövődmények megelőzéséhez.

Minden olyan monogénes kórkép esetében, melynek hátterében több, sokszor nagyméretű gén is állhat, a genetikai vizsgálat és a betegségért felelős eltérés azonosítása nagy kihívást jelenthet.

Mind a Marfan szindróma, mind pedig a Familiáris hiperkoleszterinémia, olyan monogénes betegség, melynek genetikai hátterét hazánkban a gének mérete, illetve száma miatt korábban nem vizsgálták a magas költségek, nagy munkaerő igény és hosszú leletátfordulási idő miatt. Az új generációs szekvenálási technikák megjelenése a 2000-es évek elején, alapjaiban változtatta meg a molekuláris genetikai vizsgálatokat. A Sanger féle szekvenálással szemben lehetővé vált egyidejűleg több gén és több beteg vizsgálata az eddig ismert módszerekhez képest ugrásszerű gyorsasággal és költséghatékonysággal. A rohamos technológiai fejlődésnek köszönhetően néhány évente akár megduplázódik ezen készülékek teljesítő képessége, így tovább csökkentve a szekvenálási költségeket és tovább növelve a teljesítményt és a megbízhatóságot.

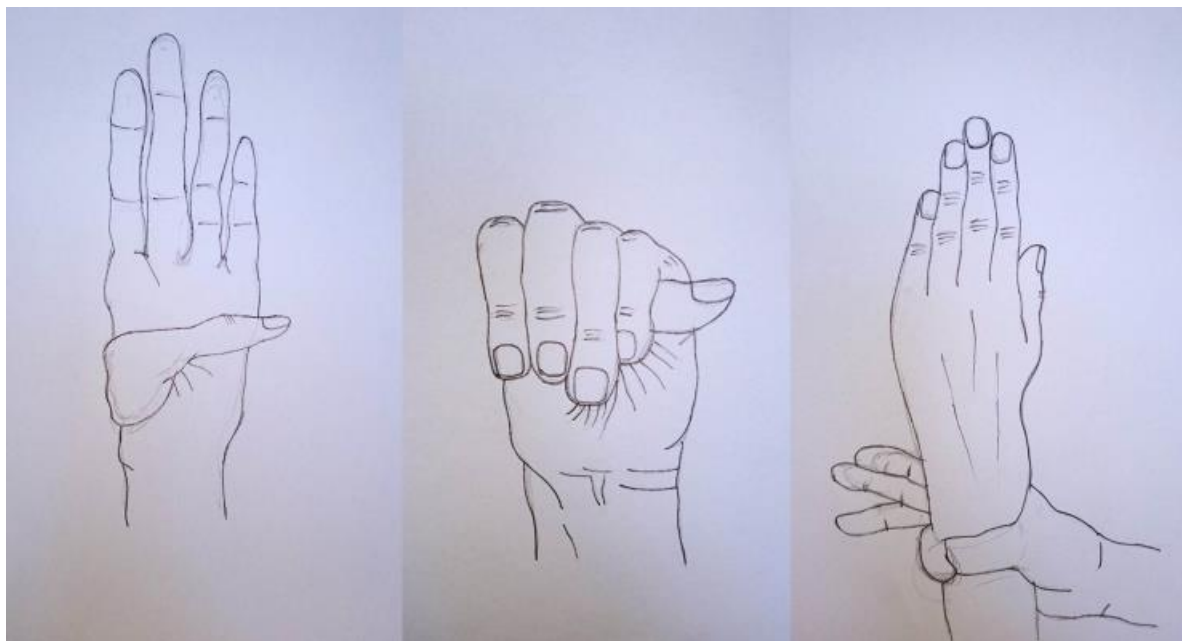
Az első tanulmányomban a célkitűzéseim között szerepelt a magyarországi Marfan szindrómás betegek genetikai vizsgálata, valamint egy rutinszerűen alkalmazható új módszer kidolgozása, mely magában foglalta az új generációs szekvenálás kínálta lehetőségeket is. Eddig a betegség hátterében álló gének mérete miatt a laboratóriumok számára rendkívül időigényes és költséges volt egy-egy ilyen beteg kivizsgálása. A technológiai áttörés miatt lehetővé vált egyszerre több beteg vizsgálata is jelentősen rövidebb idő alatt. Az eredmények értékelése után a detektált variánsokat tovább vizsgálva a genotípus-fenotípus összefüggésekre fókuszálva képet alkottunk a Magyarországon előforduló eltérésekről.

A második tanulmány a hazai familiáris hiperkoleszterinémiás betegek analízisét célozta, mely esetében még inkább elmondható, hogy csak klinikai adatok állnak rendelkezésre, genetikai információ nélkül. A betegség terápiájának szempontjából is rendkívül fontos lehet a genetikai vizsgálat, mivel bizonyos eltérések kimutatásakor különböző gyógyszeres kezeléseket alkalmaznak, valamint a betegség lefolyásával kapcsolatban is fontos információkkal szolgál a genetikai eredmény. A detektált variánsokat összehasonlítottuk a más országokban leírt variánsok típusával, eloszlásával, valamint elemeztük a géneken belüli elhelyezkedésüket is. Megvizsgáltuk és közöltük továbbá a genotípus-fenotípus összefüggéseket is az adott betegben. Munkánk során néhány eltérés esetében további részletes molekuláris, illetve szegregációs vizsgálatot is végeztünk.

## 2.1 Irodalmi áttekintés

### 2.1.1 Marfan szindróma

A Marfan szindróma (MFS, MIM# 154700) egy autoszomális domináns módon öröklődő ritka kötőszöveti betegség. Régebben a MFS megnevezése volt az arachnodactyilia (pókujjúság) is, mivel ez a Marfan-szindróma egyik tünete, amelyet abnormálisan hosszú, karcsú vagy pókszerű ujjak (1. ábra), valamint lábujjak jellemeznek.



**1. ábra:** Arachnodactyilia és hüvelykujj tünet és csukló tünet, mint tipikus Marfan jegy.

A történelemben számos olyan személyt ismerünk, akiről úgy gondolják Marfan-szindrómában szenvedtek, mivel számos kulcsfontosságú klinikai tünetet mutattak. A leghíresebb talán közülük egy volt amerikai elnök Abraham Lincoln. A Marfan-szindrómát először egy 5 és fél éves kislánynál írta le egy francia gyermekorvos, Antonin Marfan 1896-ban. Hozzávetőlegesen az esetek felében figyelhető meg pozitív családi anamnézis [1]. Főként a kardiovaszkuláris, szem illetve vázrendszert érinti [2]. A prevalenciája 1-5/10000 és előfordulási gyakorisága nem függ etnikumtól vagy nemtől [3] [4]. Az aortagyök és aortaív átmérője szignifikánsan nagyobb azoknál a betegeknél, akik pozitív családi anamnézissel rendelkeznek, mint azoknál, akiknél nincs ilyen előzmény, és a várható élettartam is rövidebbnek bizonyult [5]. A Marfan szindróma klinikai manifesztációi az életkor előrehaladtával még nyilvánvalóbbá válnak.

A Marfan szindrómás betegek egyik leggyakoribb tünete a myopia és a betegek 60% -nál kialakul a szemlencse rendellenes elhelyezkedése (ectopia lentis).

Szintén nagyobb kockázata van a betegekben a retina leválásnak, a glaucoma és korai szürkehályog kialakulásának. Másik gyakori tünet továbbá a váz és kötőszöveti rendszer érintettsége, úgy mint ízületi lazaság, hosszúfejűség (dolichocephalia), tölcsérmell (pectus excavatum), tyúkmell vagy galambmell (pectus carinatum) és a gerincferdülés (scoliosis) [6].

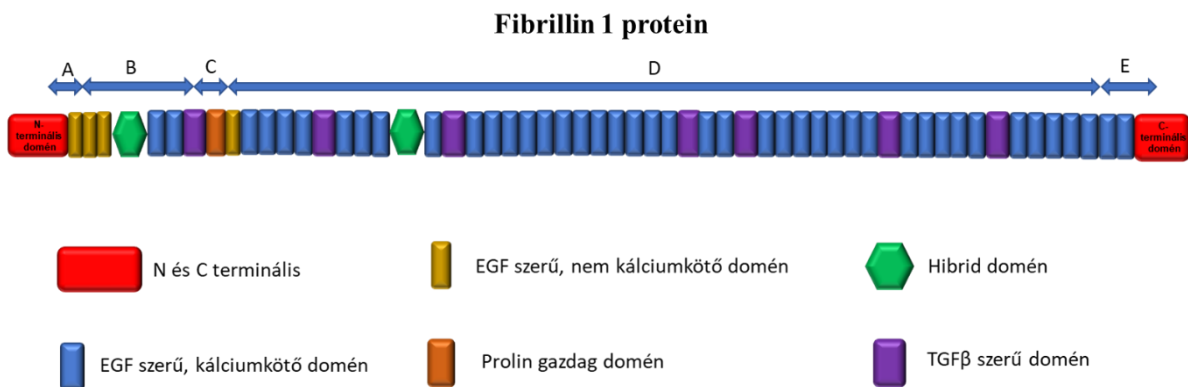
A Marfan szindróma diagnózisa elsősorban klinikai és a revideált Ghent nozológián alapul [7]. A korábbi verzióval ellentétben [8], a felülvizsgált Ghent nozológia a szisztémás tünetek mellett, az MFS két alapvető jellemzőjére helyez nagyobb hangsúlyt, nevezetesen az aortagyök dilatációjára és az ectopia lentisre, valamint az *FBNI* (fibrillin 1, 15q21.1, MIM \* 134797) és más ritka, klinikailag releváns gének molekuláris genetikai vizsgálatára [7] (1.táblázat). A szisztémás érintettség fennállásáról akkor beszélhetünk, ha a tünetek összpontszáma meghaladja a 7 pontot.

**1. táblázat:** Az új Ghent nozológia a Marfan szindróma diagnózisának felállításában.

<b>Szisztémás érintettség fennállása (&gt;7 pont)</b>		
	<b>Tünet</b>	<b>Pont</b>
	Hüvelykujj- ÉS csuklótünet	3
	Hüvelykujj- VAGY csuklótünet	1
	Pectus carinatum	2
	Pectus excavatum vagy mellkas aszimmetria	1
	Lábdeformitás (sarok valgus állása)	2
	Pes planus	1
	Pneumothorax	2
	Dura ectasia	2
	Protrusio acetabuli	2
	Csökkent felső szegmens/alsó szegmens ÉS emelkedett karfeszítávolság/magasság arány súlyos scoliosis NÉLKÜL	1
	Scoliosis vagy thoracolumbalis kyphosis	1
	Csökkent könyök extensio	1
	Arckarakter (3/5 pozitív)	1
	Striák a bőrön	1
	Myopia > 3 dioptria	1
	Mitralis billentyű prolapsusa	1
<b>MFS diagnosztikai kritériumai</b>		
Negatív családi anamnézis esetén (MFS)		
1.	Aorta érintettség	ÉS
	Ectopia lentis	
2.	Aorta érintettség	ÉS
	FBN1 eltérés	
3.	Aorta érintettség	ÉS
	Szisztémás érintettség	
4.	Ectopia lentis	ÉS
	FBN1 eltérés Aorta érintettséggel	
Pozitív családi anamnézis esetén (MFS)		
5.	Ectopia lentis	ÉS
	Családi előzmény	
6.	Szisztémás érintettség	ÉS
	Családi előzmény	
7.	Aorta érintettség	ÉS
	Családi előzmény	

Leggyakrabban az *FBNI* génben (fibrillin 1, 15q21.1, MIM \*134797) bekövetkező eltérések vezetnek Marfan szindrómához vagy egyéb kötőszöveti betegséghez, melyeket I. típusú fibrillinopathiáknak nevezünk, pl. Shprintzen-Goldberg szindróma, Weill-Marchesani szindróma és ectopia lentis szindróma. A Marfan szindrómára emlékeztető fenotípussal rendelkező betegek esetében ritkán, de előfordulnak eltérések a *TGFBR1* és *TGFBR2* génekben. Az ilyen variánsal rendelkező Marfan szindrómás egyének klinikai jellemzői gyakran átfedést mutathatnak más, szintén súlyos kötőszöveti betegségekkel, úgymint a Loeys-Dietz szindróma (LDS) vagy Familiáris thoracalis aorta aneurizma (FTAA) szindróma.

Magát az *FBNI* gént 1991 ben írták le [9]. A gén által kódolt fehérje egy ciszteinben gazdag monomer glikoprotein, melynek molekulatömege 350 kDa. Az extracelluláris mátrix 10-12 nm-es mikrofibrilliumainak fő komponense a fibrillin1 [10]. A fehérje 5 strukturális domain-re osztható (A-E) [11] (2. ábra).



**2. ábra:** A fibrillin 1 fehérje sematikus felépítése a strukturális doménekkal és a különböző ismétlődő mintázatokkal.

A B és D domain-ek három különböző ismétlődő motívumból állnak. Az epidermal growth factor-like (EGF) mintázatok 47 alkalommal fordulnak elő és többségük (n=43) tartalmaz egy további kalcium kötő konszenzus szekvenciát is, ezért ezeket kalcium kötő EGF-like motívumoknak nevezzük (cbEGF) [12]. A rejtett transforming growth factor- $\beta$ 1 binding protein (TGF $\beta$ 1bp) mintázat 7 alkalommal fordul elő a B és D domaineiben. A harmadik strukturális elemet Fib-nek vagy hibrid motívumnak nevezték el, mert az EGF és a TGF $\beta$ 1bp motívum egy részének fúziója lehet [11].

A legnagyobb régió a 2240 aminosav hosszúságú D régió mely 49 ciszteinben gazdag repetitív szakaszt tartalmaz megszakítások nélkül, a 11-63-as exonok által kódolva. Szerkezeti homológiájuk alapján ezek a szekvenciák három csoportba sorolhatók.

A legnagyobb csoport tagjai szoros homológiát mutatnak az EGF-motívumok kalciumkötő alosztályával (EGF-CB). Más fehérjékben kimutatták, hogy az EGF-CB szekvenciájú, meghatározott pozícióban lévő konzervált egységek nagy affinitású, K-vitamintól független kalcium-kötőhelyet hoznak létre. Összehasonlítva a D régió 41 EGF-CB ismétlődő szekvenciáját a következő konszenzus szekvenciát kapjuk:

$D^*X(N/D)^*ECX(6)CX(4)CXN^*X2GX(Y/F)^*XCXCX2GX(9)CX$  ( ahol a zárójelben lévő számok az átlagos reziduumszámot jelölik, az X bármilyen tetszőleges aminosavat, a csillagok pedig a kalcium-kötőhely konszenzus szekvenciájának aminosavát). Az EGF-CB repeat-ek közel fele pontosan tartja a fenti konszenzus mintázatot, így a hat cisztein reziduum mindegyike között azonos távolságot mutatnak. Egy további EGF-CB-szerű szekvencia (amelyből azonban a kalcium-kötőhelyek közül kettő hiányzik) is jelen van a D-régió amino-terminális végén, amelyet a 11-es exon kódol.

A második csoport tagjai a 8-cisztein motívummal analógok, amelyet először a TGF- $\beta$ 1-kötő fehérjében (TGF-bp) írtak le [13]. Ez a szekvencia három egymást követő cisztein belső klaszterét mutatja, amelyek feltételezhetően a láncok közötti diszulfid-kötések kialakításában játszanak szerepet. Hat ilyen motívum található elszórtan a D-régió EGF-CB ismétlődései között, ezeket a 16, 17, 24, 37, 38, 41, 42, 50, 51 és 57-es exonok kódolják. A 3. csoport egyetlen cisztein-gazdag szekvenciából áll. Ezt a szekvenciát a 21, 22-es exonok kódolják és nyolc ciszteint tartalmaz, amelyek közül kettő ugyanazon a relatív helyen csoportosul, mint a TGF-bp repeat egymást követő ciszteinjei.

Az *FBNI* második cisztein-gazdag régiója (B-régió) 336 reziduumot fed le, amelyet a 2-es exonban kezdődő és a 10-es exon 5' részéig tartó szakasz kódol. A szerkezeti homológia és a genomikai adatok alapján ez a régió a következő elemekből áll: két új cisztein-gazdag szekvencia (2-es és 3-as exonok); két EGF-szerű ismétlődés (4-es és 5-ös exonok); a Fib motívum egy 9-ciszteines származéka (6-os exon); két EGF-CB ismétlődés (7-es és 8-as exonok); valamint a TGF-bp motívum egy származéka (9/10-es exonok). Az *FBNI* két cisztein-gazdag régiója között van egy 58 aminosav hosszúságú szakasz (C-régió), amelyet szokatlanul magas prolin tartalom (42%) jellemez. Az *FBNI* két végi régiója a karboxi-terminális régió (E-régió) és a 29 aminosav hosszúságú, nagymértékben bázikus egységekből álló rész az amino-terminális végen (A-régió).

Feltételezések szerint a kalcium megkötése fontos szerepet játszik a mikrofibrillumok stabilitásában és összeállításában [14], és a számos cisztein reziduum a felelős az intramolekuláris diszulfid hidak kialakulásáért [15].

Az *FBNI* gén nagy, körülbelül 200 kb genomialis DNS-t ölel fel [16], 65 kódoló exonba szerveződik és a transzkript mérete 10 kb [11].

Napjainkig több mint 3000 kóroki vagy feltételezhetően kóroki eltérést írtak le (Professional Human Gene Mutation Database, 2022.4 release), és ezen variánsok nagyrésze egyedi eltérés [17].

A korai mortalitás és morbiditás szorosan összefügg a szív- és érrendszeri tünetekkel. Az aortagyök és a felszálló aorta progresszív tágulata, hajlamosít az aorta ruptúrára [2].

Habár a variáns detektálási ráta magasabb azoknál a betegeknél akik mindenben teljesítik a Ghent kritériumokat [7], az *FBNI* eltérések tesztelése különösen hasznos lehet számos klinikai szituációban, beleértve a Ghent kritériumokat nem teljesítő betegek tesztelését, vagy sporadikus esetekben, fiatal életkorban annak megállapítására, hogy szükség van-e aorta tágulat nyomon követésére vagy megelőző kezelésre [18] [19] [20].

### **2.1.2 Familiáris hiperkoleszterinémia**

A familiáris hiperkoleszterinémia (FH, MIM# 143890) az egyik leggyakoribb autoszomális domináns módon öröklődő genetikai betegség. Ez a kórkép a koleszterin háztartás zavara, korai érlemezésedésre és a szív- és érrendszeri szövődményekre hajlamosít. A prevalenciája 1:200-250-re tehető, míg a becsült prevalenciája a magyar populációban 1:340 [21]. A betegség korai felismerése és a megfelelő kezelés nagymértékben javítja a klinikai kimenetelt. Az FH diagnózisának felállítása elsősorban a beteg klinikuma alapján történik. A betegség mind a mai napig aluldiagnosztizált és nem kellőképpen kezelt.

A diagnózis felállítását segítő, az Európai Atherosclerosis társaság ajánlásai alapján egy FH score rendszert állítottak fel [22]. Ez a pontozási rendszer a Dutch Lipid Clinic Network Score (DLCNS) néven ismert, elsősorban Hollandiában alkalmazták és számos országban átvették a klinikai gyakorlatba. A pontokat a beteg családi anamnézise alapján illetve a klinikai története és fizikális vizsgálata alapján állítják össze a klinikusok, ami alapján eldönthető, hogy az adott betegnél az FH diagnózisa valószínűtlen (unlikely), lehetséges (possible), valószínű (probable) vagy határozott (definite) (2. táblázat).

**2. táblázat:** A Dutch Lipid Clinic Network Score (DLCNS) pontrendszer elemei és alkalmazása.

<b>Tünet/vizsgálat</b>	<b>Pont</b>
Ismert korai szívkoszorúér-betegségben (CHD) szenvedő elsőfokú rokon (<55 év, férfi; <60 év, nő) VAGY	<b>1</b>
Elsőfokú rokon, ismert LDL-C > 95%-os percentilis értékkel országokénti azonos életkor és nem szerint	
Elsőfokú rokon a következő tünettél: tendon xanthoma és/vagy arcus corneae VAGY	<b>2</b>
Gyermek(ek) LDL-C > 95%-os percentilis értékkel országokénti azonos életkor és nem szerint	
<b>Kórtörténet</b>	
A beteg korai szívkoszorúér-betegségben (CHD) szenved (<55 év, férfi; <60 év, nő)	<b>2</b>
A beteg idő előtti agyi vagy perifériás érbetegség szenved	<b>1</b>
<b>Fizikális vizsgálat</b>	
Tendon xanthoma	<b>6</b>
Arcus corneae 45 évnél fiatalabb személynél	<b>4</b>
<b>LDL-koleszterin</b>	
>8,5 mmol/L (>325 mg/dL)	<b>8</b>
6,5–8,4 mmol/L (251–325 mg/dL)	<b>5</b>
5,0–6,4 mmol/L (191–250 mg/dL)	<b>3</b>
4,0–4,9 mmol/L (155–190 mg/dL)	<b>1</b>
<b>Molekuláris genetikai tesztelés (DNS analízis)</b>	
Kóroki variáns az <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> vagy <i>PCSK9</i> génekben	<b>8</b>
	<b>Összesített pont</b>
<b>Diagnózis (FH) összpontszám alapján</b>	
<b>Határozott (definite)</b>	<b>&gt;8</b>
<b>Valószínű (probable)</b>	<b>6-8</b>
<b>Lehetséges (possible)</b>	<b>3-5</b>
<b>Valószínűtlen (unlikely)</b>	<b>&lt;3</b>

Az LDL molekula az LDL receptorhoz kötődik, amely a sejtek felszínén helyezkedik el, majd membránnal határolt vesicula formájában lefűződik. Lizoszomális enzimek segítségével az LDL lebomlik, majd a felszabadult koleszterin a sejt plazmába kerül. Az LDL receptor visszajut a sejt felszínére, így újabb LDL megkötésével, újra koleszterint tud a sejtbe juttatni. Az LDL és receptora közötti kötés akkor is károsodhat, ha az apoB100 szállítófehérjében következik be eltérés. Ekkor hiába van meg a receptor, ha az apoB100 nem kötődik elég erősen, akkor a koleszterin felvétele lassul.

A legtöbb esetben az FH hátterében az *LDLR* (Low density lipoprotein receptor, 19p13.2, MIM \* 143890) és az *APOB* (Apolipoprotein B, 2p24.1, MIM \* 144010) génekben bekövetkezett eltérés áll, azonban ritkábban, más familiáris hiperkoleszterinémiával összefüggébe hozható génekben is detektálnak patogén variánst.

Az első ilyen gén a *PCSK9* (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, 1p32.3, MIM \* 607786) ami egy protein konvertáló enzimet kódol, mely fontos a lipoprotein anyagcserében. A *PCSK9* az LDL-receptorhoz kötődve annak lebontását segíti ezáltal csökken a receptorok száma és nő a koleszterinszint. Az FH hátterében 1-2% - ban állhatnak a *PCSK9* gén variánsok. Az *LDLRAP1* (low-density lipoprotein receptor adaptor protein 1, 1p36.11, MIM \* 605747) eltérései a betegség ritka recesszív formájáért felelősek. Az *LDLRAP1* egy olyan feltételezett adaptor protein, mely szükséges az LDL normál kiürítéséhez a vérből és interakcióban áll foszfolipidekkel, a klatrin mediálta endocitózis rendszer elemeivel, valamint az LDL receptor citoplazmatikus régiójával. A legkevésbé ismert általunk is vizsgált gén a *STAP1* (Signal transducing adaptor family member 1, 4q13.2, \* 604298) ami egy dokkoló fehérjét kódol. Kaszkádvizsgálattal azonosították, mint az FH hátterében álló új lehetséges gént, azonban funkciója a lipid anyagcserében még ismeretlen.

Ezekben a génekben bekövetkezett variánsok negatív hatással lehetnek az LDL lipoproteinek (low-density lipoproteins) vérből történő megfelelő eliminációjára. Ez az LDL koleszterin (LDL-C) és a totál koleszterin (TC) szintek kóros emelkedését vonhatja maga után. Heterozigóta eltérés esetén a betegek LDL-C szintje magasabb mint 5 mmol/L, míg a homozigóta vagy összetett heterozigóta genotípusú betegek LDL-C szintje általában magasabb, mint 13 mmol/L [23]. A klinikai tünetek sokkal súlyosabbak lehetnek a homozigóta, illetve összetett heterozigóta betegeknél. Itt megjelenhetnek olyan fenotípusos tünetek, melyek felvetik a homozigóta familiáris hiperkoleszterinémia gyanúját. Ilyen tünetek például a bőr- és gumós xanthoma, a szaruhártyában extracellularisan lerakódó zsírok (arcus corneae), és az atheroscleroticus cardiovascularis betegség (ACVD) melyek fiatal, általában 20 éves kor előtt jelentkeznek. Napjainkig több mint 2100 *LDLR* és 250 *APOB* eltérést írtak le az irodalomban (Professional Human Gene Mutation Database, 2022.4 release). Nem azonosítottak mutációs forrópontokat az *LDLR* génben, az eltérések bárhol előfordulhatnak a génen belül a promótertől egészen a gén utolsó exonjáig, habár az irodalmi adatok alapján a patogén eltérések gyakrabban fordulnak elő a gén bizonyos régióiban, úgymint a ligand kötő doménben és az Epidermal growth factor-like doménekben.

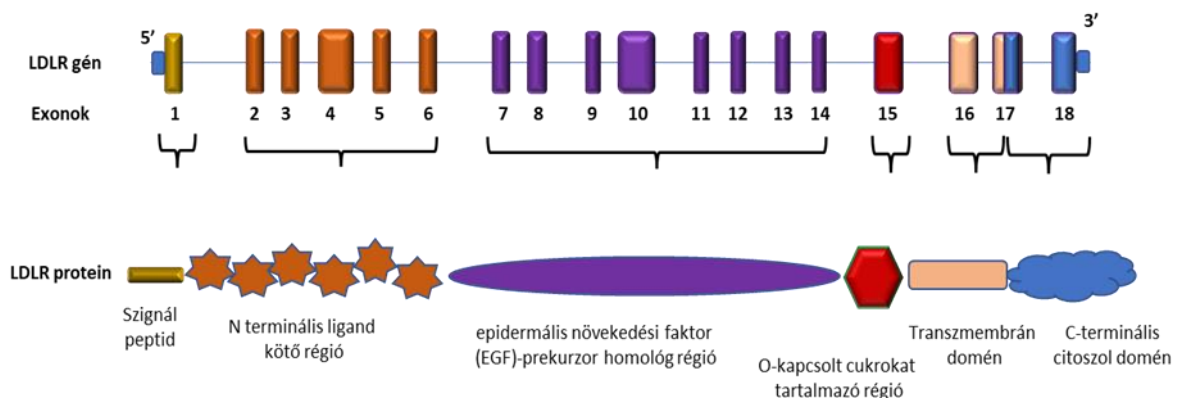
Az *APOB* gén esetében igen régóta ismert mutációs forrópont a 26-os exonban. Az európai populációban már az 1980 as évek végén ismert volt egy visszatérő eltérés, mely az irodalomban R3500Q néven szerepelt hosszú időn keresztül [24].

### 2.1.2.1 Az APOB szerkezeti felépítése és funkciója

Az *APOB* gén a 2-es kromoszómán helyezkedik el, 29 exonból áll, mely 4563 aminosavat kódol. Az apoproteinek kulcsfontosságú szerepet játszanak a lipoproteinek receptorokhoz való kapcsolódásában. A lipoproteinek egyik fő feladata a sejtek lipidekkel történő ellátása, valamint a felesleges lipidek elszállítása. Az *ApoB*-nek 2 formája létezik az egyik az *ApoB* 100 a másik az *ApoB*48. Mindkét fehérjeforma az *APOB* gén terméke, de az *APOB*48 az *APOB*100 egy trunkált formája. Az *APOB*100 a májban termelődik, míg az *APOB*48 a proximális vékonybélben.

### 2.1.2.2 Az LDLR gén szerkezeti felépítése és funkciója

A low density lipoprotein receptort a 44.5 kb nagyságú *LDLR* gén kódolja, mely a 19-es kromoszóma rövid karján helyezkedik el. A 18 exonból álló gén egy 860 aminosavból álló I. típusú transzmembrán proteint kódol. A génnek 5 funkcionális doménje van. Ezek a következők: N terminális ligand kötő régió, egy epidermális növekedési faktor (EGF)-prekursor homológ régió, egy O-kapcsolt cukrokat tartalmazó régió, egy transzmembrán domén, egy C-terminális citoszol domén (3.ábra).



**3. ábra:** Az *LDLR* gén sematikus felépítése és a gén exonjai által kódolt fehérje funkcionális doménjei.

Az LDLR mediálja a koleszterin és a koleszterin-észter tartalmú alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL) részecskék vérből való kiürülését [25]. Az LDLR kulcsszerepet játszik a koleszterin homeosztázisban. Ezt a tényt jól mutatja, hogy több mint 2100 *LDLR* variánst írtak le olyan betegekben, akik familiáris hiperkoleszterinémiában szenvedtek. Ezen eltérések különböző mértékben befolyásolhatják az LDLR aktivitást.

A variánsok fenotípusos hatásait alapul véve az *LDLR* variánsok 5 osztályba sorolhatók. I. osztály: az úgynevezett null variánsok tartoznak ebbe az osztályba, melyek következménye, hogy nem keletkezik protein (null allél).

II. osztály: azon eltérések tartoznak ebbe az osztályba, melyek következtében a keletkezett protein blokkolva van, akár részlegesen akár teljesen az endoplazmatikus retikulum és a Golgi komplex közötti transzportban (transzport defekt allél).

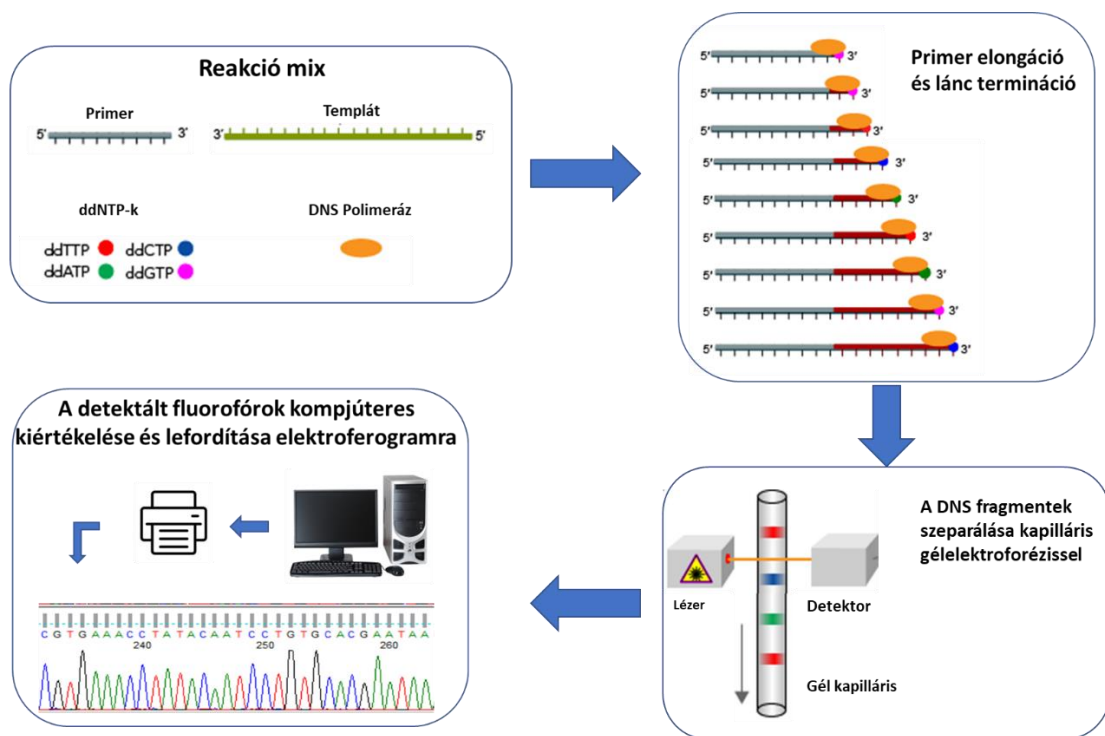
III. osztály: a harmadik osztályba azon variánsok tartoznak, ahol szintetizálódik és transzportálódik protein a sejt felszínére, de nem képes megfelelően kötni az LDL -t (kötődési defektussal rendelkező allél) .

IV. osztály: az ide sorolható eltérések esetében keletkezik protein, mely megfelelően ki is jut a sejt felszínére és meg is köti az LDL -t, de nem képes klatrin bevonatú gödröcskébe tömörülni, és így nem internalizálja az LDL-t (internalizációs defektussal rendelkező allél).

V. osztály: az ide tartozó variánsok esetében keletkezik receptor fehérje, mely meg is köti az LDL-t és internalizálódik is, azonban nem kapcsolja le a ligandumot az endoszómában, és nem jut vissza a felszínre (újrahasznosítási defektussal rendelkező allél) [26].

## 2.2 Sanger féle DNS szekvenálás

A Sanger féle szekvenálás az értekezés alapjául szolgáló mindkét tanulmányban használt arany standard módszer, melyet Frederick Sanger és munkatársai fejlesztettek ki 1977-ben[27]. A módszer egy adott DNS fragment pontos nukleotid sorrendjének meghatározására szolgál. A módszer lényege, hogy egy adott DNS szakaszt felamplifikálunk, miközben didezoxi-nukleotidokkal termináljuk a replikációt. Az eredeti módszer szerint a szintézis négy kémcsőben történik, ahol a dezoxiribonukleotidok mellé különböző didezoxi-nukleotidokat adnak, így minden esetben más nukleotid típusnál áll le a szintézis a lánctermináció miatt. Végsősoron minden csőben különböző hosszúságú fragmentek keletkeznek úgy, hogy ugyanarra a nukleotidra végződnek. A reakcióhoz radioaktívan jelölt dATP-t is adnak. A négy cső tartalmát poliakrilamid gélben elektroforézissel futtatják, melynek megfelelő a felbontása ahhoz, hogy az egy nukleotidnyi eltérést is detektálja. A fragmentumokat autoradiográfiával tették láthatóvá. A négy mintát egymás mellett futtatva, a különböző méretű fragmentumok hosszúság szerint szétválnak. A leolvasást a legtávolabbi, legrövidebb DNS szakasztól kezdik. Ez a módszer nagy pontosságú, de rendkívül időigényes, ezért kidolgozták ennek az automatizált változatát, mely szintén a Sanger módszeren alapult azzal a változtatással, hogy a négyféle didezoxi-nukleotid más-más színű fluoreszcens jelölést kapott, így gerjesztés hatására különböző színekben fluoreszkálnak. Ezzel lehetővé vált egyetlen csőben egy lézer segítségével történő leolvasás. A kibocsátott fény hullámhossza alapján egy detektor azonosítja a nukleotidokat és egy program segítségével leolvashatóak és szekvenciára fordíthatóak a detektált jelek. (4.ábra)



4. ábra: Sanger féle DNS szekvenálás folyamatát bemutató sematikus ábra.

### 2.3 Új generációs DNS szekvenálás (NGS)

Új generációs DNS szekvenálás alatt azokat a nagy átírási képességű módszereket értjük melyek képesek egyidejűleg, parallel akár a teljes humán genom nukleotid sorrendjének meghatározására. Az új módszerek a Sanger-féle szekvenálástól lényegesen különböznek mind a láncszintézisben, mind a detektálás módjában. Gyorsaságukból és a keletkezett adatok mennyiségéből adódóan rendkívül fejlett és precíz automatizációra és nagy számítógépes kapacitásra van szükségük.

A legerjedtebb ilyen módszert Sequencing by synthesis (SBS), vagy magyarul szintézis alapú szekvenálásnak is nevezik, mivel a leolvasás akkor történik, amikor a vizsgált DNS szállal komplementer szál szintetizálódik és ezt valós időben detektáljuk. Az új generációs DNS szekvenálási módszereknek 3 fő lépése van:

1. könyvtárkészítés: A könyvtárkészítés során a vizsgálni kívánt DNS molekulákat fragmentáljuk, majd olyan oligonukleotidokat (indexeket) és adaptereket ligálunk hozzá melynek segítségével kivitelezhető a fragmentek szekvenálása, A molekuláris bárkódok kifejlesztése és használata jelentette a megoldást a multiplexálhatóság problémájára, ugyanis így már DNS szinten jelölve vannak a betegminták és nincs szükség a fizikai elkülönítésükre a vizsgálat során.

A DNS szekvenálás alatt a minták összekeverve teljesen random módon rendeződnek és így történik meg a szekvenciák leolvasása. Fontos kiemelni azt, hogy a molekula szinten jelölt mintákat bioinformatikai úton tudjuk demultiplexálni, melynek során a leolvasott szekvenciákat adott betegekhez tudjuk társítani. Egyszerre a szekvenáló chip kapacitásától, a kívánt szekvenálás mélységétől és a használt indexek típusától függően akár 384 minta is futtatható egyetlen chipen. Ez a multiplexálási lehetőség nagy előre lépés a korábbi technikákhoz képest, ahol egy szekvenálás egyetlen minta vizsgálatát jelentette, a minták parallel történő szekvenálásával azonban töredék idő alatt végezhetjük el a vizsgálatot.

A fragmentek előállítására két alapvető megközelítés létezik. Az első a PCR alapú fragmentkészítés, ahol hagyományos primereket használnak multiplex PCR formájában így amplifikálva fel a vizsgálni kívánt szakaszokat a megfelelő fragmentméretben. A második, az úgynevezett „capture” alapú módszer, amikor a DNS mintát először fragmentálják mechanikusan vagy enzimatikusan a megfelelő méretre, majd a vizsgálni kívánt szakaszokra specifikus, biotinált próbákkal „kihalásszák” a megfelelő fragmenteket és a nem kívánt részeket lemossák. Ezt streptavidines mágneses gyöngyök segítségével teszik, melyek csak a vizsgálni kívánt szakaszokat kötik meg.

2. szekvenálás: ebben a lépésben valamilyen módon meghatározzuk a nukleotidok pontos sorrendjét. A detektálási módszer többféle is lehet, az esetek nagy részében nagy felbontású kamera segítségével és fluorescens jelöléssel, de például szemikonduktor segítségével pH változás mérésével is történhet a nukleotidok leolvasása.

3. Alignment vagy illesztés: Ebben a lépésben egy referencia genomhoz illesztjük az összes leolvasott szekvenciát, így megkapjuk az esetleges eltéréseket a referenciától.

A DNS alapú vizsgálatok költségei jelentősen csökkentek, míg a hatékonyságuk ugrásszerűen megnőtt. A módszer egyaránt használható DNS és RNS alapú vizsgálatokra is.

Megemlítendő, hogy jelenleg is igen aktív fejlesztés alatt áll az úgynevezett harmadik generációs DNS szekvenáló technológia, mely a második generációs technológiával szemben a leolvasott szekvencia hosszát helyezi előtérbe. A meghatározáshoz egyetlen DNS molekula is elég és a leolvasás hossza akár több tízezer bázispár is lehet. Ez a megközelítés kiválóan alkalmas a strukturális eltérések azonosítására.

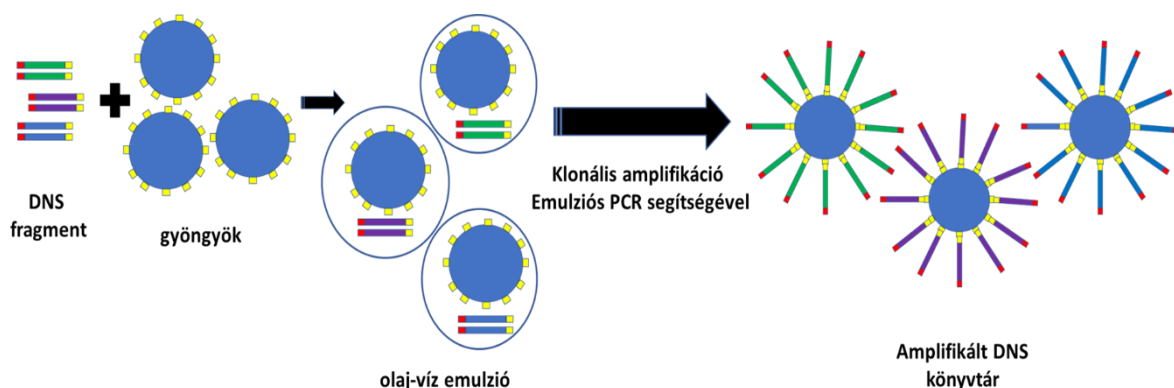
### **2.3.1 Piroszekvenálás**

A piroszekvenálás egy olyan új generációs szekvenáló módszer, melyet a 90-es évek végén dolgoztak ki és a 2000-es évek elején került kereskedelmi forgalomba 454 sequencing system néven az első ilyen elven működő szekvenáló készülékek.

A piroszekvenálás is az SBS, vagy szintézis alapú szekvenálás elvén működik, amikor is egy egyszálú DNS molekuláról komplementer szálat szintetizáltunk enzimatikusan. A szintézist valós időben követjük nyomon egy kemilumineszcens enzim segítségével. Egy nukleotid beépülése során pirofoszfát (PPi) keletkezik, melynek mennyiségét mérjük egy kapcsolt enzimreakcióval. A reakció végén a luciferáz enzim által kiváltott fényfelvillanás áll, melyet egy fejlett érzékenységű kamerarendszer segítségével képesek vagyunk detektálni. Ahhoz, hogy detektálható jelet kapjunk a fényfelvillanásból szükség van a jel felerősítésére, mely a szekvenálási reakciók párhuzamosításával érhető el. Erre az úgynevezett emulziós PCR reakciót dolgozták ki, melynek során a vizsgálandó DNS szakaszt PCR segítségével felszaporítják polisztrén gyöngyök felületén.

A gyöngyökhöz mindig csak 1-1 DNS darabot kapcsolnak, majd a gyöngyöket olaj-víz emulzióhoz adják. Egy vízcseppben 1 db gyöngy található és minden egyéb a PCR reakcióhoz szükséges reagenst tartalmaz.

Egy adott gyöngy felületén egy DNS molekula másolatai sokszorozódnak fel akár több millió kópiában. Ezt klonális amplifikációnak nevezzük (5. ábra).



**5. ábra:** Az emulziós PCR segítségével történő klonális amplifikáció működése.

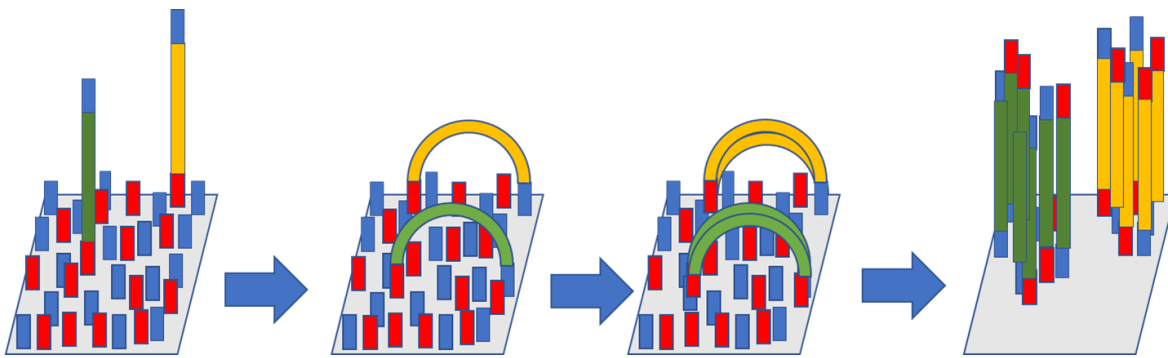
Ezután a gyöngyöket olyan száloptikából készített, néhány cm<sup>2</sup>-es lemezre juttatjuk centrifugálás segítségével, melynek felületén akár egy milliónál is több mélyedés található, melyek átmérője 40-50 µm körüli, így csak egyetlen gyöngy fér bele, térfogatuk pedig pikoliterben mérhető. A szekvenáláshoz szükséges egyéb reagenseket az automatizált rendszer adagolja a szekvenáló lemez felületére. Ezekben a kis mélyedésekben egymástól függetlenül, párhuzamosan zajlanak a szekvenáló reakciók, melyeket a kamera folyamatosan dolgoz fel. Az eljárás során fontos, hogy egyszerre csak egy típusú nukleotid legyen jelen, ami vagy beépül az újonnan szintetizálódó DNS szála, vagy nem. A be nem épült nukleotidokat a rendszerből eltávolítjuk mielőtt hozzáadjuk a következő nukleotidot.

Ha az adott nukleotid beépül akkor az adott jel nagysága egy egység lesz. Ha egymás után azonos nukleotidok, úgynevezett homopolimerek találhatók a vizsgált DNS szakaszon, akkor a homopolimerek nagyságának megfelelően nő a jelintenzitás nagysága, azaz például 3 adenin beépülése esetén a detektált jel háromszoros lesz. A piroszekvenálás módszerének ismert problémája, hogy ez az elméletileg lineáris jel növekedés egy bizonyos nagyságú homopolimer felett már nem mindig ad megbízható eredményt. Ez a szám általában 4 nukleotidig megbízható azonban efelett bizonytalan mérési adatot adhat, az adott nukleotid típusától és a homopolimer hosszától függően [28].

### **2.3.2 Illumina szekvenálási technológia**

Világszerte a legelterjedtebb szekvenálási módszer jelenleg az Illumina cég szintézis alapú szekvenáló technológiája. Eredetileg rövid és gyors leolvasásra tervezték, mára azonban a többszáz nukleotidos leolvasás is elérhető. A minta előkészítéséhez a DNS-t rövid 100-200 bp körüli szakaszokra fragmentálják mechanikusan vagy enzimatikusan. A duplaszálú DNS szálak végeit kijavítják, és egy adenint adnak a 3' végekhez. Ehhez egy túlnyúló timinnel rendelkező adapter DNS darabot ligálnak. Ez az adapter tartalmazza az úgynevezett index szekvenciákat, melyek a minták azonosítására szolgálnak egyfajta molekuláris bárkódként, illetve az adapterek végein olyan rövid szekvenciákat, melyek minden amplikon végén azonosak (P5 és P7 adapterként jelölik). Ezek lehetővé teszik a denaturált egyszálú DNS könyvtárnak a szekvenáló chippekhez történő kötődését, oly módon, hogy a chip felszínére ezekkel a szekvenciákkal komplementer primerek vannak kihorgonyozva.

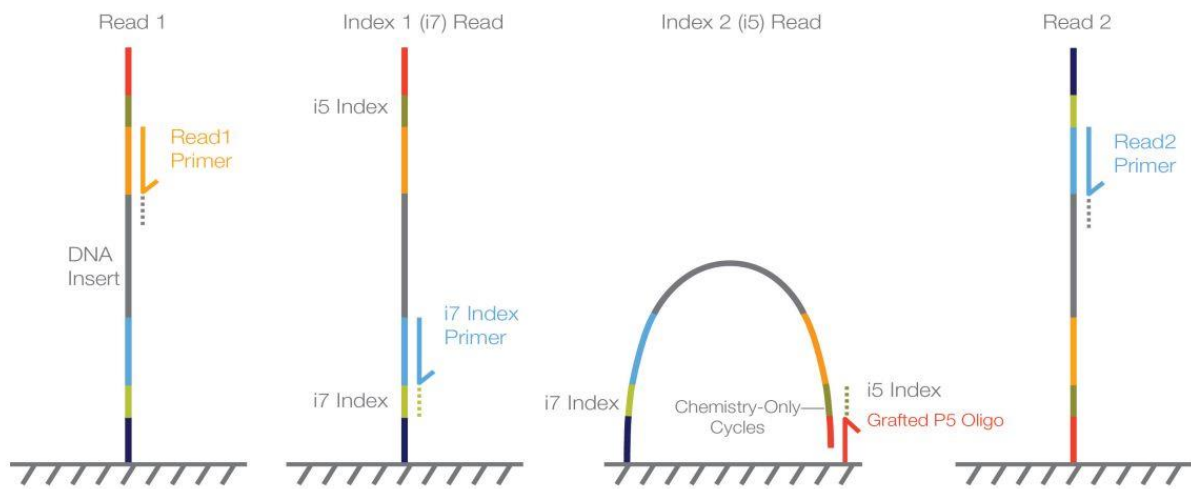
A detektáláshoz itt is szükséges a klonális amplifikáció, ami ennél a technológiánál egy úgynevezett híd amplifikációt jelent. Ebben a lépésben a chip felszínéhez kötött molekulákat helyben amplifikáljuk és az amplifikációt követően a DNS molekulák úgynevezett klasztereket alkotnak. Minden egyes klaszter egy-egy DNS kópia több ezer másolatát reprezentálja, melyek egymáshoz nagyon közel helyezkednek el. Ez az eljárás lehetővé teszi az érzékeny kamera számára a klaszterek detektálását a szekvenáló reakció alatt, ugyanis minden egyes DNS kópia egyszerre ad jelet egy klaszteren belül (6. ábra).



**6. ábra:** Klonális amplifikáció híd (bridge) PCR segítségével (sematikus ábra).

A szekvenálás első lépéseként a denaturált DNS szálakhoz hibridizáltatunk egy szekvenáló primert, melynek segítségével a DNS polimeráz katalizálja a fluoreszcensen jelölt dezoxiribonukleotid trifoszfátok (dNTP-k) beépülését a DNS templát száljához a szekvenálási ciklusok alatt.

Minden egyes ciklus alatt a nukleotid beépülését követően a kibocsátott fluoreszcens jel alapján azonosítjuk. Mivel ezzel a technológiával akár mind a négy típusú nukleotid más-más fluoreszcens festékkel van megjelölve, így az azonosítás, a piroszekvenálástól eltérően, egyesével történik. Minden jelölt nukleotidon található egy reverzibilis terminátor (3' blokkoló), amit a detektálás után kémiai úton eltávolítanak majd minden be nem épült nukleotiddal együtt lemosnak a rendszerből. Az úgynevezett paired-end szekvenálás során egy adott DNS molekula nukleotid sorrendjét mindkét irányból meghatározzuk, így szükség van a templát szál átírására, ami szintén a chip felszínén történik az első leolvasás után. Az újonnan szintetizálódott DNS szálát denaturáljuk, majd az ellenkező irányból is meghatározzuk a nukleotid sorrendet egy második szekvenáló primer segítségével. Szükség van a rövid 6-10 bp-os index szekvenciák pontos leolvasására is a minták későbbi azonosítása miatt így ennek érdekében külön index szekvenáló primereket használunk, ami lehet a DNS templát mindkét végén azonos, de különböző is. Az így kapott readeket vagy szekvenciákat bioinformatikai úton egyesítjük és értékeljük. Egy mindkét végén indexált DNS könyvtár paired-end leolvasási sorrendje Illumina MiSeq készüléken a következő: Read1, Index1, Index2, Read2 (7. ábra).



**7. ábra:** Az illumina Miseq szekvenáló készülék nukleotid leolvasási sorrendjének sematikus ábrája. Forrás:www.illumina.com

### 3. Célkitűzések

- 1) Célul tűztük ki különböző nagy átírási képességű új generációs DNS szekvenáló módszerek alkalmazhatóságának és hatékonyságának vizsgálatát, olyan monogénes betegségek esetében, ahol a kóroki gének mérete vagy száma miatt korábban a diagnosztikai vizsgálatok a hagyományos módszerekkel drágák és időigényesek lettek volna.
  
- 2) Egymással rokoni kapcsolatban nem álló, magyarországi Marfan szindróma gyanújával vizsgált betegek molekuláris genetikai eredményei alapján a magyar betegpopuláció mutációs spektrumának meghatározását, fenotípusos jellemzőinek összefoglalását, és egy visszatérő csendes variáns patogenitásának vizsgálatát tűztük ki célul.
  
- 3) A magyar klinikailag FH gyanús betegek esetében célul tűztük ki a genetikai vizsgálat elvégzését, valamint a mutációs spektrum meghatározását és összehasonlítását az irodalmi adatokkal. Az egymással nem rokon betegek esetében detektált feltételezett kóroki eltérések és a genotípus-fenotípus összefüggések leírását, illetve egy egy exont érintő deléciónál esetében a pontos töréspont meghatározását.

## 4. Betegek és Módszerek

### 4.1 Betegek

#### 4.1.1 Betegek Marfan szindróma gyanúval

Huszonhat olyan beteg esetében, akik Marfan szindróma vagy egyéb kötőszöveti rendellenesség gyanújával érkeztek, a fenotípusos jegyeket és az elérhető klinikai adatokat a detektált eltérésekkel együtt az eredmények fejezetben részletesen tárgyaljuk. A klinikai diagnózis felállítását, amennyiben elérhető volt, klinikai genetikus, gyermekgyógyász vagy belgyógyász állította fel a Ghent kritériumok alapján[7]. A betegek szisztémás érintettségét és a számított pontszámokat az 3. táblázatban foglaltuk össze. A betegek átlagéletkora 19 év volt. A legfiatalabb beteg 1 hónapos, míg a legidősebb 52 éves volt. Tizenhét beteg 20 évnél fiatalabb, míg 2 beteg 1 év alatti volt. Minden beteg esetében rendelkezünk a beteg vagy törvényes képviselője által aláírt genetikai beleegyező nyilatkozattal.

**3. táblázat:** A betegek szisztémás érintettségét összefoglaló táblázat a részletes tünetekkel.

Szisztémás tünet	Pont	Beteg azonosító																									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Hüvelykujj- ÉS csuklótünet	3		X	X	NA		X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	NA	X	NA					X	
Hüvelykujj- VAGY csuklótünet	1				NA				X			X		X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	
Pectus carinatum	2		X		NA		X	X					X				X		NA	X							
Pectus excavatum vagy mellkas aszimmetria	1	X		X	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	NA	X	X	X	X	X	X	X	
Lábdeformitás (sarok valgus állása)	2	X	NA		NA	NA	NA	NA	X	X	NA	X	X	NA	NA				NA								
Pes planus	1	X	NA	X	NA	NA	NA	X	X		NA	X	X	X	NA	X	X	X	NA	X	X	X	X	X	X	X	
Pneumothorax	2		NA		NA		X	NA	X			X							NA								
Dura ectasia	2				NA														NA				NA				
Protrusio acetabuli	2				NA	NA	NA					X							NA								
Csökkent felső szegmens/alsó szegmens ÉS emelkedett karfeszítésválság/magasság arány súlyos scoliosis NÉLKÜL	1		NA	NA		NA			X	NA	NA		X	X	NA		X	NA		X	X	X	X	X	X	X	
Scoliosis vagy thoracolumbalis kyphosis	1	X	X	X	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Csökkent könyök extensio	1		NA	NA	NA		NA			NA	NA			NA	NA			X	NA		NA	NA	NA	NA	X		
Arckarakter (3/5 pozitív)	1	X	X	X	NA	X	X	X		X	X		X	X	X	NA		X	X		X	X	X	X	X	X	
Striák a bőrön	1				NA					X	NA				NA			X		X			X	X	X	X	
Myopia > 3 dioptria	1		X	X	NA	X				X				X	NA	X											
Mitralis billentyű prolapsusa	1	X	X		NA	X	X	X	X	X		X	X	X	X	NA		X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Összpontszám:		7	9	8	2	3	10	8	10	10	7	10	8	12	7	4	7	7	9	6	8	7	6	6	6	8	9

Jelölések: NA, nincs adat. A „Pont” oszlopban a szisztémás tünetek egyes pontértékei láthatóak, melyek segítségével a tünetek összességének pontértéke kiszámítható.

#### 4.1.2 Betegek Familiáris hiperkoleszterinémia gyanúval

Az egész ország területéről vizsgáltunk olyan betegeket, akik familiáris hiperkoleszterinémia (FH) klinikai diagnózisával érkeztek. Azon betegek esetében, ahol genetikai eltérést detektáltunk, az elérhető vér szerinti családtagok genetikai vizsgálatát is elvégeztük. Minden beteg esetében rendelkezünk a beteg vagy törvényes képviselője által aláírt genetikai beleegyező nyilatkozattal. A releváns klinikai információk és laboratóriumi eredmények a legtöbb beteg esetében rendelkezésünkre álltak. A klinikai diagnózist, ahol lehetséges volt, klinikai genetikus vagy belgyógyász állította fel a laboratóriumi leletek és az esetleges fenotípusos jegyek alapján. A patogén variánsal rendelkező betegek között 31 női és 13 férfi beteg volt.

A betegek átlagéletkora 48 év volt. A legfiatalabb 14 éves, míg a legidősebb 78 éves volt a klinikai diagnózis felállításakor. Az átlagos LDL koleszterinszint 7,2 mmol/L, míg az átlagos összkoleszterinszint 10,4 mmol/L volt azon betegek között, akik legalább egy patogén eltérést hordoztak.

## 4.2 Genomiális DNS izolálás

A DNS izolálás K<sub>3</sub>-EDTA-val (etiléndiamin-tetraecetsav) vagy Na-citráttal alvadésgátolt perifériás vérmintáiból történt QIAamp Blood Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) segítségével a gyártó utasításai szerint. Az izolált DNS minták koncentrációját és tisztaságát NanoDrop 2000/2000c UV-Vis spektrofotométerrel, illetve Qubit 4 Fluorometerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) határoztuk meg.

## 4.3 Piroszekvenálás és Sanger féle szekvenálás alkalmazása az *FBNI* gén vizsgálatára

Tizenöt beteg esetében az *FBNI* gén kódoló exonjait és az exon-intron határokat 65 individuális PCR reakcióban amplifikáltuk, melyhez egy korábbi közlemény PCR primerjeit vettük alapul [29] [30]. Az individuális amplifikációhoz alkalmazott PCR kondíciók az alábbiak voltak:

	Térfogat/reakció	PCR kondíciók (35 ciklus)
Forward primer (10 pmol/μL)	1.0 μL	95 °C 5 perc
Reverse primer (10 pmol/μL)	1.0 μL	94 °C 45 másodperc
dNTP mix (10mM)	1.0 μL	60 °C 1,5 perc
10x PCR buffer (PicoMax)	5.0 μL	72 °C 1,5 perc
steril desztillált víz	36,6 μL	72 °C 10 perc
Taq-polimeráz:	0.4 μL	4 °C ∞
Templát (gDNS) (100ng)	5.0 μL	
Végtérfogat	50.0 μL	

Huszonhét PCR primert újraterveztünk a Primer3 nevű tervezőszoftver segítségével (<http://bioinfo.ut.eu/primer3-0.4.0/>), hogy megfeleljenek az általunk támasztott követelménynek, mely szerint a PCR termékek mindegyikének hasonló hosszúságú terméknek kell lennie, ugyanis a túl rövid PCR termékek a klonális amplifikáció során túlreprezentáltak lennének. A primereket az 4. táblázatban foglaltuk össze. Az amplikonok vizsgálatát bidirekcionális piroszekvenálással végeztük 40x-es lefedettségi kritériummal (lefedettség alatt azt a számot értjük, ahány alkalommal leolvastuk az adott nukleotidot) Roche GS Junior 454 piroszekvenáló készüléken (Roche 454Life Sciences, Branford, CT).

A piroszekvenálás metodikájának jól ismert homopolimer problémája [28] miatt 49 exont analizáltunk piroszekvenálással, míg 16 exont, amely homopolimereket tartalmazott Sanger féle szekvenálással vizsgáltuk.

A Sanger szekvenálás kivitelezéséhez Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kitet használtunk a gyártói instrukciók alapján (Applied Biosystems, Foster City, CA). A mintákat ABI prism 310 Genetic Analyzer készüléken futtattuk és a nyers adatokat a Sequencing Analysis Software (Applied Biosystems) segítségével értékeltük. A piroszekvenálás során nyert nyers adatokat az Amplicon Variant Analyzer szoftver (Roche 454 Life Sciences) segítségével a referencia szekvenciához illesztettük, és értékeltük.

4. táblázat: Az *FBNI* gén vizsgálata során felhasznált primerek

Exon	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
1.	GCA AGA GGC GGC GGG AG *	TGA AAC TTG GGA GAC CCA C *
2.	TCT GCC AGG ATT CAT CTT GC *	CAA CAC AAC AAA AGA AGG AC *
3.	TCG TGT TCC AAA TCC ATG TG *	GGG GTA TAA CCA CAT AAA ATA AT *
4.	AAC TCC TGT GAG CTG TTG C *	GCT GTG TCC CAG GTA ATC G *
5.	TTT ATT GTT GTC CTT CCA GAG G †	GCC ATG CAG ACC CAA TGT C †
6.	TCT GCA TGA TGG TTC CTG C *	CCA GAG CAA ATA AGA TTA ATC C
7.	TCT GCA ATG AAT TTC ATA TGA G *	ACT ACA CCC CCC AAC TGC *
8.	ACT GAC GAA TGG TTT TAT ATT G *	TAC ACA AAC CAT GCA TGC TG *
9.	GTT ACA AGT ATT ATC TCA GCG *	TGA GGG CTG GGA TGG GAT A ◊
10.	CAG CTG TTG TGT TTT GTT TTG *	ATG TTA ACT TGA ACA ATG CAA G *
11.	ACT GAT GAA AGA TAC CAT AGT T *	AGG AAC AGA ATT ACA ACA GAC *
12.	CTT AGA ATT ATG AGG TAT TGC T ◊	CAG TTA GCA TAT ATG TCC CAC *
13.	TCC CCT AAA TAA AGC TAT TTC *	TGA AAC TGC AAT GGA AGG AG *
14.	TCT GGT CAT AAG AAA ATG TAT G *	AGG AGA AAA GGC ACG TGA AG ◊
15.	TGT CAC TTC ATT TTT AAT AAG TG *	GTG ACA GAG GCT GAA CCT C *
16.	CTC ATC TGT TTG AAG TGA CAG *	GGT GGC AGA AGG CTG GC *
17.	TTT AAA ATG GGA GCC TGG TG ◊	ACC CAC AAG AAA GCC TGA TG ◊
18.	TGA GAA AAA GAG ACA GAG TGT *	TCT AAG CTA CTC AAA GGC AG *
19.	AAA GTT TGG GCC CTT TTT AAG *	ATA GCA AAG TAC ACA GTA TAA G *
20.	CCA AGA CTA GAT TTT AGC AG *	TTA AGT ATA ACA ACA TTG ATA AAC *
21.	GTG TAT GTT TGA ATT TTT ATA TAG *	TTC TCA TGT GAG CCT AGA TAA A ◊
22.	CTA CTT CAT GTT CCA GGT C *	CTG TTC CGT TTT GTA GTT CTC *
23.	GTT TTA TGA ACT TAC CAG GTT C *	ACC TGA AGC TAA GTG CTC A ◊
24.	GCC GTG TGG CTC TAT TTA AC ◊	ATT GGC CAT GGA AAA CGT AA ◊
25.	CAA GAA CTT CCA ACC TTC ATG *	TTA AAG GAC GTC CCC TCT C *
26.	AAT TAA GGC TGT CCT GAG AC *	CAT GGA ATC CTT CTC TTT CTG *
27.	GGC CCC CAC CTT TAA CAT G *	GTG TGA AAG TCT TTC TCC T ◊
28.	TGC CAA AGT TGG AAG CTT ATG *	TCA GAG TAC ATA GAG TGT TT ◊
29.	CAG ACA TCC AAA CCA TAT CAG *	GAA CCT ACT GAG AGA TTC AAC *
30.	AAT AGT CTT ATG CTA GTA GGC *	ACA GTG CTT ATG ACT AAC AAG *
31.	GTA CTC AAT GAT ATC AAA TAG C *	ACC AAT CTC TTA ACT ACT TAA TA *
32.	CCA AAA GAC ATT TGT GCT GAG *	GTG TAA TCT ATG CAG TCC TTG *
33.	GGT TTT AAA TAC CAC CCT TTC *	CTG GCT TCT CTG ACT AGT G *
34.	CGA GGA AGA GTA ACG TGT G *	TCA AGC CCA GCA AGG CTC *
35.	AGT TTT TTG CTT TTT TCT CCC TC *	CGG GAC ACC AGG GAG CTG *
36.	GAT AAC TCC ACT ACT CAC TG ◊	AAT ACA CAG TAT GCT TGC TTC *
37.	GTA GAA AGA TTC TGC CTG ATG *	GAA CTG GCT GGA GTT GAA AT *
38.+39.	AAA AAC TTT AGA TTC AAA ACA ACT CAA ◊	CCT TAT CAT CCT ACC AGG ACC A ◊
40.	AAA TGT GAA GTT TTC ATA TTC AC *	CAT GCA TTA CTG AGA AAA GCT *
41.	GCT TGT TGA GTA TCC ACT TAG *	GCT TCC TTC GCT AAG ACT G *
42.	CTA TCC TCC CAT CCC ACC TT ◊	CAG GGT GTT TGC ACA GTT TG ◊
43.	TGT CCT GTC ACT CAT GAA TG *	CTC TTT TCT GGA TAT GAT AAA G *
44.	CTG TTC TCC TTC AAA TTC AGT *	GTA GGC ATG TCC AGC CTG *
45.	GAG CTA GGA TTA CTC CTG AG *	CTG CTG CAT ATC TGT CTG TG *
46.	AAG TTC TCA GCC TAT GGA TG *	TGG AAC ACT AGA GAT GAT GC *
47.	TAT TAA AGG ATT GTT GGG GA †	TTC CAG GTC TTT CTA AGT CC †
48.	GAT GGA AGT CAT GCC AGT G *	GGA CAC CCG ACA CTC CTC *
49.	TGA TGA TGT CTC CAT CGT GT †	TGC AGC ATT GAA AGC CCA AA †
50.	ACG GAC TCA GTA GGA AAG C *	CAG TCT GCA CCC TGC ATG *
51.	AAT CAC AGA TGC CCA AGG AG ◊	CTG AGA AAT GCT GAG AAT CCA ◊
52.	TTT TGT CCC TTC ATT TAG ATA GCA ◊	TTT GTA AAG TTC CTA TGG AAG AAA A ◊
53.	TTA TCT CAA TTC ATC ATG TTT TG ◊	CCA TCA GGC CTA GAT GAT C *
54.	TTT TGT TGC TGT CCA TGA TC *	CTC ACA GAT AAA GCT TCC TG *
55.	GCA GAT ATA TGC ATT TTC TTT G *	GTC CAC TGT CAC TTC TGA TG *
56.	TGG TCA GAT GAC TCT TCT TG *	GTG TGG AGG CTG AGG TTA G *
57.	ATT TCC TGA CAT CCC CTT TG *	CAA ATA AAT AGA TTC CCT GCA AG *
58.	CAC TGA AGT GAC CCC CTA C *	AAT TTC CAC TTG AGG ATA AGC *
59.	GCG TGT ACA CAT CAT TTT TAG *	ATG TGT CAG GAG CTA GGT G *
60.	ATC CTG TTT TGT TGG CTG GAC *	GAA TCG CTA CAA TCC ATG TAG *
61.	GTA TGT GTG AGC ACA CCT G *	CTC CAC AAG GAT TCA CCA G *
62.	AGA GAT GTT GAG TTG GCA TC *	TAG GAC CTG ATA GCC ATG C *
63.	AAG TGG CCA GAT CCA ATG TC ◊	ATC TCC AAC CAT GAC CAG GA ◊
64.	CCT ACC TTG TCT TCC CAT TC *	AGT TTC TCC CTG GGG AGC *
65.A	AAT ATG AGA GCT AAG TGG CAT ATG TA ◊	TGA ATA GGT TCC AGC CAC TG ◊
65.B	CAA CCA AAA GGA AGG GAT CA ◊	TGA TTC TGA TTG GGG GAA AA ◊

A primerek forrásai: \* [29], † [30], ◊ Újratervezett primerek.

#### 4.4 Új generációs szekvenálás Illumina platformon Marfan szindrómás betegek esetén

Nyolc Marfan szindróma gyanújával érkezett beteg esetében egy Marfan MASTR (Multiplicom, Niel, Belgium) nevű kereskedelmi forgalomban kapható kitet használtunk az *FBNI* gén vizsgálatára. Ez a kit egy multiplex PCR elven alapuló kit, mely az *FBNI* gén kódoló exonjait és az exon-intron határokat vizsgálta. További 3 beteg esetében egy saját tervezésű génpanel (Qiagen) segítségével vizsgáltuk nemcsak az *FBNI*, de a *TGFBR1* és *TGFBR2* géneket is. Ez a génpanel az előző kittől eltérően egy úgynevezett "capture" elven működő könyvtárkészítő kit volt. Az előkészített mintákat Illumina Miseq készüléken futtattuk (Illumina, San Diego, CA). A nyersadatokat a NextGene nevű analizáló szoftver segítségével analizáltuk (SoftGenetics, State College, PA).

#### 4.5 *FBNI* mRNS vizsgálat

A 26-os számú betegtől bőrbioptát vettünk a hónaljából, fibroblaszt sejtek tenyésztése és vizsgálata céljából. Totál RNS-t izoláltunk a bőr fibroblasztokból 3-5 passzálás után TRIzol reagens segítségével (UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Ltd., Debrecen, Hungary). Ezt követően reverz transzkripció segítségével cDNS-t nyertünk a mintából High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit segítségével (Thermo Fisher Scientific). A reverz transzkripció után a 26-os exont és a környező exon-exon határokat amplifikáltuk és bidirekcionális Sanger szekvenálással vizsgáltuk az alábbi PCR kondíciók szerint:

	Térfogat/reakció	PCR kondíciók (40 ciklus)
Forward primer (10 pmol/μL)	1.0 μL	95 °C 5 perc
Reverse primer (10 pmol/μL)	1.0 μL	94 °C 30 másodperc
dNTP mix (10mM)	1.0 μL	50 °C 30 másodperc
10x PCR buffer	5.0 μL	72 °C 1 perc
steril desztillált víz	40.6 μL	72 °C 10 perc
DNS polimeráz	0.4 μL	4 °C ∞
Templát (cDNS)	1.0 μL	
Végtérfogat	50.0 μL	

A primereket a Primer3 nevű szoftverrel terveztük. A cDNS vizsgálatára felhasznált primereket a 5. táblázat tartalmazza. A mutáns és vad típusú allélek arányát is meghatároztuk mind a cDNS, mind genomiális DNS-ből.

Az arány megállapítására piroszekvenálást alkalmaztunk, és a nyers adatokat a Amplicon Variant Analyzer szoftver (Roche 454 Life Sciences) segítségével értékeltük.

**5. táblázat:** Az *FBN1* cDNS vizsgálatához tervezett és használt primerek.

Amplifikáló/szekvenáló primer	Primer szekvencia (5'→3')
FBN1cDNS 25-27F	GAAACACCATTTGGCAGCTTT
FBN1cDNS 25-27R	GGCATTACAGCGGTAACCT

#### 4.6 A Familiáris hiperkoleszterinémia hátterében álló gének szekvenálása

Az FH-val leggyakrabban kapcsolatba hozható gének vizsgálatára a Devyser FH V2 kitet alkalmaztuk a gyártói instrukciók alapján (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Ez az amplicon alapú könyvtárkészítő kit képes vizsgálni a gének kódoló régióit és az exon/intron határokat minimum +/- 10bp távolságban. A kit az alábbi géneket vizsgálja *APOB*: MIM \* 144010, *LDLR*: MIM \* 143890, *PCSK9*: MIM \* 603776, *LDLRAP1*: MIM \* 603813, *STAP1*.

A szekvenálásokat Illumina MiSeq készüléken végeztük 300 ciklusos leolvasással a gyártó utasításainak megfelelően. A nyers adatok kiértékelését a NextGENe (SoftGenetics) szoftver segítségével végeztük 40x-es lefedettségi kritériummal.

A vizsgált mintákat kópiaszámbeli (CNV) eltérésekre nézve is megvizsgáltuk a lefedettségi adatok alapján. A detektált patogén eltéréseket Sanger szekvenálással is konfirmáltuk. A primerek tervezéséhez a Primer3 nevű tervező szoftvert használtuk (<https://primer3.ut.ee/>).

A primereket a 6. táblázatban foglaltuk össze.

**6. táblázat:** Az *LDLR* gén exonjainak amplifikációjához és Sanger szekvenálásához használt primerek listája.

<i>LDLR</i> amplifikáló és szekvenáló primerek		
Exon	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
1	GGGTTAAAAAGCCGATGTCA	TCCCAGGGATGGAGTGATTA
2	CAGACTGTTCTGATCGGATG	AGCGGATCACTTGAGACCA
3	CGCCACCACACCAACTA	GGACCCCGTAGAGACAAAGTC
4a	GACTTCACACGGTGATGGTG	CCCCTTGGAACACGTAAAGA
4b	AAGTGCATCTCTCGGCAGTT	CCAGGGACAGGTGATAGGAC
5	ACTCCTGGGCTCAAGCAAT	GCCCTCTGGCTTCACAAAT
6	GGGATTACAGGCACAAACCA	TTCCAAAAACCTACAGCAC
7	GAGAGTGACCAGTCTGCATCC	TTTCCATGCAGGTGGAATCT
8	GATGACTGGGATGACACCT	TCAGGGGATATGAGTCTGTGC
9	TTTTCCACCCTCTTTTCTGG	TGCTGAGGCAGGAGGAGA
10	TGATGCCCTTCTCTCTCTCT	GCCCACTAACCAAGTTCCTGA
11	AAGCCACATTGGAGTTTGG	ACCTTCAGGGAGCAGCTTG
12	CTCACATGTGGTTGGAGCTG	CAACCAGTTTCTGCGTTCA
13	TGGGCAACAAAAGTGAACACTC	TCCACAAGGAGGTTTCAAGG
14	TCACCCAGCCAAGAGGTAAG	ACGACCTTGAGGTACCCATT
15	CCTCCCAAGGTCATTTGAGA	GTCAGCAAGGGAGTGAGGAC
16	CTCCAAGTGTCCAGGGAGAT	AAAAAGTGAACAGGCCAAC
17	CCGCAAGGCGATCTCTAA	GCCTGGTCCCTTGAGGAT
18	TACTCACCGTCTCCCTCTGG	GGCAATGCTTTGGTCTTCTC

#### **4.7 Az LDLR gén MLPA analízise**

Három esetben (12, 33, 38 számú betegek) az új generációs szekvenálással detektált kópiaszámbeli eltérések konfirmálására MPLA (Multiplex ligáció-függő próba amplifikáció) módszert alkalmaztunk, melyhez a SALSA MLPA Probemix P062 MIX1 kitet használtuk a gyártó utasításainak megfelelően (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands).

#### **4.8 Variánsok filterezése és klasszifikációja FH hátterében álló gének vizsgálatokor**

Minden olyan detektált eltérés, melynek a MAF (minor allele frequency) értéke  $>0,01$  azaz meghaladja az 1 %-ot a GnomAD populációs adatbázisban kiszűrésre került, mint nem patogén eltérés. Elvégeztük a fennmaradó variánsok ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) ajánlás szerinti klasszifikációját [31]. Az ACMG egy nagyon széles körben elfogadott és használt öt kategóriás rendszert használ, melyek a következők: patogén, valószínűleg patogén, bizonytalan klinikai jelentőségű, valószínűleg benignus, benignus [31]. Annak érdekében, hogy a benignitást illetve a patogenitást minél inkább megítélhessük és az öt kategória valamelyikébe beilleszthessük a detektált variánsokat, a klasszifikáció különböző evidenciákon alapuló keretrendszert használ. Ezeket a benignus irányba való besoroláshoz a következőképpen adja meg: BS azaz erős bizonyíték a benignitásra, illetve BP azaz támogató bizonyíték a benignitásra. A patogenitás megítélésére támogató PS, mérsékelt PM, erős PS és nagyon erős PVS evidenciákat használ. Ezen szempontok kitöltésével az eltérés már könnyebben beilleszthető a már említett öt kategória valamelyikébe. A variánsok besorolásakor használtuk továbbá a HGMD (The Human Gene Mutation Database) professional és a ClinVar variáns adatbázisokat.

#### 4.9 Töréspont meghatározása az *LDLR* génben

Egy beteg esetében az *LDLR* génben a 7-es exon heterozigóta delécióját mutattuk ki új generációs szekvenálással. A pontos töréspontok meghatározásához primereket terveztünk a feltételezett deléció köré a 6-os és 8-as intronokba. A PCR amplifikációt követően bidirekcionális Sanger szekvenálást végeztünk. A felhasznált primereket a 7. táblázat tartalmazza. Az alkalmazott PCR kondíciók az alábbiak voltak:

	Térfogat/reakció	PCR kondíciók (35 ciklus)
Forward primer (10 pmol/μL)	1.0 μL	95 °C 5 perc
Reverse primer (10 pmol/μL)	1.0 μL	94 °C 40 másodperc
dNTP mix (10mM)	1.0 μL	60 °C 1 perc
10x PCR buffer (PicoMax)	5.0 μL	72 °C 4 perc
steril desztillált víz	36,6 μL	72 °C 10 perc
Taq-polimeráz:	0.4 μL	4 °C ∞
Templát (gDNS) (100ng)	5.0 μL	
Végtérfogat	50.0 μL	

7. táblázat: Az *LDLR* génben detektált deléció töréspont meghatározására használt primerek szekvenciája.

<i>LDLR</i> töréspont meghatározásra használt amplifikáló és szekvenáló primerek		
Exon	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
7 del	GATTACAGGTGCCCGTCCTA	GGAACCCAACCAAGAGTGTG

#### 4.10 Variáns adatbázisok és predikciós szoftverek

Munkám során számos adatbázist használtam a detektált eltérések ellenőrzésére és leírására.

Laboratóriumunkban elérhető a Human Gene Mutation Database (HGMD) Professional nevű előfizetéses variáns adatbázis mely alapvetően a betegségekkel összefüggésbe hozható variánsokat tartalmazza gének szerint és negyedévente frissül a megjelent publikációk alapján. Az adatbázisnak létezik egy publikus HGMD verziója is, azonban ebben az adatbázisban a frissítések késleltetve jelennek meg így körülbelül 145000 variánssal kevesebbet tartalmaz, mint az előfizetéses verzió. (elérhetőség: <https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>, megtekintve 2023. 06. 15.)

A ClinVar egy szabadon hozzáférhető és szerkeszthető adatbázis, amely a humán variánsokat genotípus-fenotípus közötti összefüggéseket alátámasztó adatokkal és evidenciákkal együtt tárolja, valamint a beküldőkről is tartalmaz információkat.

Megkönnyíti a variáns megítélését azáltal, hogy az adott eltérés teljes beküldői történetét láthatjuk a genotípus-fenotípus adatokkal együtt. (elérhetőség: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/intro>, megtekintve: 2023. 06. 15.)

A The Genome Aggregation Database (gnomAD) egy rendkívül nagy populációs adatbázis mely igyekszik kizárni minden olyan mintát, mely valamilyen súlyos betegséggel kapcsolatba hozható, így egyfajta referencia populációs adatbázisként működik. A gnomAD adatbázis a világ minden tájáról származó exom- és genomszekvenciákból áll. Jelenleg a V2-es frissítésével 125,748 exom és 15,708 genom adat érhető el a GRCh37 referenciára illesztve, valamint a V3.1 es frissítéssel 76,156 genom érhető el a GRCh38 referencia szekvenciára illesztve. (elérhetőség: <https://gnomad.broadinstitute.org/>, megtekintve: 2023. 06. 15.).

Az 1000 Genomes project egy nemzetközi együttműködés keretében létrejött adatbázis melynek célja, hogy forrásként szolgáljon a kutatók és egészségügyi szakemberek számára azáltal, hogy 1000, magát egészségesnek valló ismeretlen egyén teljes genomjának nukleotidsorrendjét határozták meg egyfajta referenciaként a humán variánsokra és haplotípusokra nézve. (elérhetőség: <https://www.internationalgenome.org/>, megtekintve: 2023.06.15.)

A Mutation Taster nevű predikciós szoftver egy olyan online program melynek segítségével megjósolható egy adott variáns hatása a fehérjére nézve. A program megvizsgálja az adott variáns esetében a konzerváltságot, a lehetséges új splicing helyeket és a keletkezett új fehérje tulajdonságait, hogy várhatóan mennyire képes tolerálni az adott eltérést. (elérhetőség: <https://www.mutationtaster.org/>, megtekintve: 2023.06.15.)

A SIFT predikciós szoftver előre jelzi, hogy az aminosav-szubsztitúció befolyásolja-e a fehérje működését. Egy 0-1-ig terjedő pontértékkel látja el a variánst mely az egymással rokon szekvenciák konzerváltsági fokán alapul. Minél kisebb ez a szám annál inkább valószínű, hogy az eltérés patogénnek tekinthető.

(forrás:[https://sift.bii.a-star.edu.sg/www/Extended\\_SIFT\\_chr\\_coords\\_submit.html](https://sift.bii.a-star.edu.sg/www/Extended_SIFT_chr_coords_submit.html), megtekintve: 2023.06.15.)

A PolyPhen-2 egy olyan program, amely egyszerű fizikai és összehasonlító megfontolások (filogenetikai és strukturális) alapján előre jelzi az aminosav-szubsztitúció lehetséges hatását az emberi fehérje szerkezetére és működésére. (forrás: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>, megtekintve: 2023.06.15.)

A Franklin egy olyan komplex internetes felület, mely számos predikciós szoftvert ötvöz és szinte az összes ingyenesen elérhető adatbázist használja.

További nagy előnye, hogy saját eseteket is feltölthetünk, ahol a detektált variánsokat össze tudjuk hasonlítani más klinikusok vagy kutatók által feltöltött adatokkal így genotípus-fenotípus adatokkal is.

Szintén fontos előnye, hogy igyekezik az elérhető szakirodalmi hivatkozásokat hozzárendelni az adott variánshoz, ami nagymértékben segíti a variánsok megítélését. (Forrás: <https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>, megtekintve: 2023.06.15.)

A legtöbb patogén eltérés az exonokban lokalizálódik, azonban mára már felismerték, hogy egy részük nem a fehérjére gyakorolt hatása miatt patogén, hanem a splicing folyamatra gyakorolt hatása miatt. Ez a felismerés párosítva az introni patogén eltérések tanulmányozásával kulcsfontosságúvá tette a splicing folyamatok vizsgálatát a különböző betegségekben. A Human Splicing Finder több algoritmust és mátrixot egyesít annak érdekében, hogy minden lehetséges splicing mintázatot felismerjen. A felhasználók számára könnyen érthető patogenitási előrejelzést biztosít minden olyan intronikus vagy exoni variánsra, amely potenciálisan befolyásolja a splicing folyamatot. (Forrás: <https://www.genomnis.com/>, megtekintve: 2023.06.15.)

A Genomic Evolutionary Rate Profiling (GERP) pontszám a szekvencia konzerváltságának mérőszáma a különböző fajok között. Ez a módszer többszörös szekvencia-illesztésből becsüli meg a semleges mutáció arányát egy adott fajcsoportban, majd azonosítja a szekvencia azon régióit, amelyek a vártnál kevesebb mutációt tartalmaznak. Ezekhez a régiókhoz a megfigyelt mutációs ráta és a várható háttérmutációs ráta közötti különbség alapján pontszámokat rendel. A magas GERP-pontszám így erősen konzervált szekvenciát jelez. (Forrás: <http://mendel.stanford.edu/sidowlab/downloads/gerp/>, megtekintve:2023.07.05.)

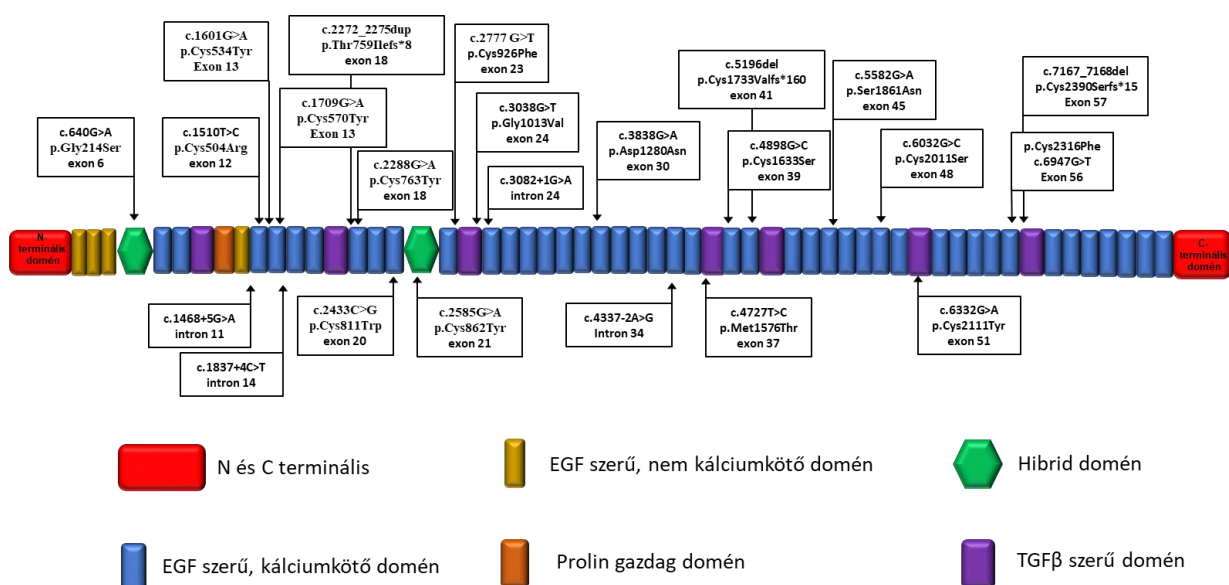
Az Evolutionary model of Variant Effect (EVE) egy modell az emberi variánsok klinikai jelentőségének előrejelzésére, amely az evolúció során különböző organizmusok szekvenciáin alapul. Ez egy olyan tanulásra képes algoritmus, mely 140 ezer faj fehérjeszekvenciáját tartalmazza, és minden egy aminosavat érintő eltérésre a program egy értéket generál. A program által adott érték 0 és 1 között változik ahol a leginkább benignus a 0 és leginkább patogén az 1. (Forrás: <https://evemodel.org/>, megtekintve:2023.07.05.)

## 5. Eredmények

### 5.1 A magyarországi Marfan szindrómás betegekben detektált eltérések

#### 5.1.1 Az *FBNI* gén variáns analízise

Ebben a tanulmányban genomiális DNS-t, egy esetben pedig teljes RNS mintát vizsgáltunk összesen 26 olyan beteg esetében, akik Marfan szindróma, vagy egyéb társult fibrillinopathia iránydiagnózissal érkeztek. Összesen 23 egyedi kóroki vagy potenciálisan kóroki *FBNI* eltérést mutattunk ki 23 betegben (8. ábra).



**8.ábra:** A detektált eltérések az *FBNI* (NM\_000138.5) génben, és azok elhelyezkedése a fehérjében.

Az eltérések több mint 30,4%-a (7/23) új eltérés, míg 69,6%-a (16/23) visszatérő variáns volt. A családi anamnézis 23 betegnél volt elérhető, ez alapján megállapítottuk, hogy 7 esetben sporadikus, míg 16 esetben familiáris esetekről beszélhetünk. 69,6 %-ban (16/23) misszensz variánsokat, 13%-ban (3/23) kis deléció/duplikációt, míg 17,4%-ban (4/23) splicing helyet érintő eltéréseket mutattunk ki. Ezen kívül egy ismétlődő csendes variánst detektáltunk három egymástól független betegben, amelyet ártalmatlan variánsként tudtunk besorolni az mRNS analízist követően.

## 5.1.2 Cisztein reziduomot érintő misszensz *FBNI* variánsok

16 misszensz eltérésből 11 (68,8%) konzervált cisztein aminosavat érintett a fibrillin 1 fehérjében. A klinikai és molekuláris adatokat a 8. táblázatban foglaltuk össze. A revideált Ghent kritériumok szerint, azokat az *FBNI* misszensz eltéréseket, melyek cisztein aminosavat érintenek patogén eltérésnek tekintjük [7]. Három eltérés (4-es, 9-es, 11-es beteg) korábban nem került leírásra.

**8. táblázat:** Cisztein aminosavat érintő misszensz *FBNI* eltérések.

Beteg	Kor (év)	Exon	Genotípus	Protein szint	Domén	Ref.	Variáns klasszifikáció	EL	Ao	SP <sup>f</sup>	Család történet	Diagnózis
1	10	e 12	c.1510T>C	p.Cys504Arg	D - cbEGF-szerű #03	[32]	patogén	+	-	7	f	MFS
2	13	e 13	c.1601G>A	p.Cys534Tyr	D - cbEGF-szerű #04	[33]	patogén	+	-	9	NA	MFS
3	8	e 13	c.1709G>A	p.Cys570Tyr	D - cbEGF-szerű #04	[34]	patogén	+	NA	8	f	potenciális MFS
<b>4</b>	<b>15</b>	<b>e 18</b>	<b>c.2288G&gt;A</b>	<b>p.Cys763Tyr</b>	<b>D - cbEGF-szerű #07</b>	<b>saját kutatás</b>	patogén	+	NA	2	<b>f</b>	-
5	22	e 20	c.2433C>G	p.Cys811Trp	D - cbEGF-szerű #09	[35]	patogén	+	NA	3	f	ELS?
6	11	e 21	c.2585G>A	p.Cys862Tyr	D - hibrid motív #02	[36]	patogén	+	+	10	s	MFS
7	18	e 23	c.2777 G>T	p.Cys926Phe	D - cbEGF-szerű #10	umd.be/ FBNI	patogén	-	-	8	s	potenciális MFS
8	8	e 39	c.4898G>C	p.Cys1633Ser	D - cbEGF-szerű #23	[32]	patogén	+	-	10	s	potenciális MFS
<b>9</b>	<b>27</b>	<b>e 48</b>	<b>c.6032G&gt;C</b>	<b>p.Cys2011Ser</b>	<b>D - cbEGF-szerű #30</b>	<b>saját kutatás</b>	patogén	+	-	<b>10</b>	<b>f</b>	<b>ELS</b>
10	7	e 51	c.6332G>A	p.Cys2111Tyr	D - TGFB1bp #06	[15]	patogén	+	NA	7	s	potenciális MFS
<b>11</b>	<b>39</b>	<b>e 56</b>	<b>c.6947G&gt;T</b>	<b>p.Cys2316Phe</b>	<b>D - cbEGF-szerű #36</b>	<b>saját kutatás</b>	patogén	-	+	<b>10</b>	<b>f</b>	<b>MFS</b>

Jelölések: EL, ectopia lentis, Ao, aorta gyök tágulat/disszekció, <sup>f</sup> SP, szisztémás pontszám (lásd részletesen 6. táblázat), családtörténet: f, familiáris, s: sporadikus. Félkövérrrel kiemelve a korábban nem leírt eltérések.

### 5.1.3 Nem cisztein reziduomot érintő misszensz *FBNI* variánsok

Az általunk detektált misszensz variánsok majdnem harmada (5/16, 31,2%) nem cisztein aminosavat érint (9. táblázat).

**9. táblázat:** A nem ciszteint érintő misszensz *FBNI* eltérések részletes leírása.

Beteg	Kor (év)	Exon	Genotípus	Protein szint	Domén	Referencia	Variáns klasszifikáció	EL	Ao	SP <sup>f</sup>	Családtörténet	Diagnózis
12	10	e 6	c.640G>A	p.Gly214Ser	B - hybrid module #01	[37]	valószínűleg patogén	+	-	8	f	potenciális MFS
13	0.1	e 24	c.3038G>T	p.Gly1013Val	D - TGFβ1bp #03	saját kutatás	valószínűleg patogén	-	+*	12	f	neonatális MFS
14	33	e 30	c.3838G>A	p.Asp1280Asn	D - cbEGF-szerű #17	rs794728210	Patogén	-	+	7	f	MFS
15	14	e 37	c.4727T>C	p.Met1576Thr	D - TGFβ1bp #04	[14]	VUS	-	-	4	f	potenciális MFS
16	25	e 45	c.5582G>A	p.Ser1861Asn	D - cbEGF-szerű #27	rs766583553	VUS	-	-	7	s	-

Jelölések: EL, ectopia lentis, Ao, aorta gyök tágulat/disszekció, <sup>f</sup> SP, szisztémás pontszám, családtörténet: f, familiáris, s: sporadikus, VUS Bizonytalan/ismeretlen jelentőségű variáns. Félkövérrel kiemelve a korábban nem leírt eltérések.

A nem ciszteint érintő misszensz eltérések esetében nagy körültekintéssel tanulmányoztuk az elérhető irodalmi adatokat és az adatbázisokat. A klasszifikációikat a revideált Ghent kritériumok [7] és az American College of Medical Genetics and Genomics's (ACMG) legújabb, variáns interpretációra vonatkozó ajánlása alapján végeztük [31].

A c.640G>A, p.(Gly214Ser) eltérést számos esetben írták le különböző munkacsoportok [38], [39], [37], [40]. Marfan szindrómás, ectópia lentis szindrómás (ELS) betegekben és sporadikus aorta disszekcióval összefüggésben. Az eltérés együtt szegregált a fenotípusos tünetekkel és hiányzott az egészséges egyénekből, a nagy kontrollpopulációból [38], [37], valamint sem a gnomAD sem az 1000 Genomes Project populációs adatbázisokban nem szerepelt. A 214-es pozícióban lévő glicin konzervált a fajok között (9. ábra), valamint az *in silico* predikciós szoftverek is valószínűleg patogén eltérésnek klasszifikálják. A 12-es számú 10 éves betegünknek ectopia lentise és szisztémás érintettsége is volt aorta gyök tágulat nélkül (diagnózis: lehetséges MFS).

**Orthologous amino acid conservation**

| Taxonomy  | Organism  | Protein ID  | Include low confidence

Taxonomy	Protein ID	Alignment	Similarity
<a href="#">Homo sapiens</a>	<a href="#">NP_000129.3</a>	204 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 224	100%
<a href="#">Acanthisitta chloris</a>	<a href="#">XP_009068354.1</a>	106 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 126	100%
<a href="#">Acinonyx jubatus</a>	<a href="#">XP_014918928.1</a>	202 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 222	100%
<a href="#">Atluropoda melanoleuca</a>	<a href="#">XP_002917594.1</a>	204 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 224	100%
<a href="#">Alligator mississippiensis</a>	<a href="#">XP_019333139.1</a>	211 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 231	100%
<a href="#">Alligator sinensis</a>	<a href="#">XP_014377923.2</a>	113 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 133	100%
<a href="#">Anas platyrhynchos</a>	<a href="#">XP_027322593.1</a>	206 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 226	100%
<a href="#">Anolis carolinensis</a>	<a href="#">XP_003229148.2</a>	217 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 237	100%
<a href="#">Antrostomus carolinensis</a>	<a href="#">XP_010164384.1</a>	106 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 126	100%
<a href="#">Aotus nancymaae</a>	<a href="#">XP_012297739.1</a>	204 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 224	100%
<a href="#">Apaloderma vittatum</a>	<a href="#">XP_009865578.1</a>	106 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 126	100%
<a href="#">Aptenodytes forsteri</a>	<a href="#">XP_009274768.1</a>	106 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 126	100%
<a href="#">Astyanax mexicanus</a>	<a href="#">XP_022542758.1</a>	194 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 214	95%
<a href="#">Balaenoptera acutorostrata scammoni</a>	<a href="#">XP_007170507.1</a>	209 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 229	100%
<a href="#">Balearica regulorum gibbericeps</a>	<a href="#">XP_010303925.1</a>	106 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 126	100%
<a href="#">Boleophthalmus pectinirostris</a>	<a href="#">XP_020794545.1</a>	227 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 247	100%
<a href="#">Bos indicus</a>	<a href="#">XP_019823414.1</a>	204 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 224	100%
<a href="#">Bos mutus</a>	<a href="#">XP_014332592.1</a>	132 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 152	100%
<a href="#">Bos taurus</a>	<a href="#">XP_015328665.1</a>	204 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 224	100%
<a href="#">Bubalus bubalis</a>	<a href="#">XP_025151327.1</a>	204 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 224	100%
<a href="#">Calidris pugnax</a>	<a href="#">XP_014799912.1</a>	204 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 224	100%
<a href="#">Callithrix jacchus</a>	<a href="#">XP_009003654.2</a>	350 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 370	100%
<a href="#">Calypte anna</a>	<a href="#">XP_008490238.1</a>	106 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 126	100%
<a href="#">Camelus bactrianus</a>	<a href="#">XP_010963648.1</a>	200 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 220	100%
<a href="#">Camelus dromedarius</a>	<a href="#">XP_010996927.1</a>	217 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 237	100%
<a href="#">Camelus ferus</a>	<a href="#">XP_006192393.1</a>	204 CTKTLCCATVGRVWGHPCCEMC 224	100%

**9.ábra:** A 214-es glicin fajok közötti konzerváltságát szemléltető ábra. Pirossal kiemelve az aminosav pozíció.

A c.3038G>T, p.(Gly1013Val) korábban nem leírt misszensz eltérést a 13-as számú betegben detektáltuk. Olyan aminosav pozíciót érint ahol korábban más, a c.3037G>A, p.(Gly1013Arg) misszensz eltérést már leírtak [34], [29], [41]. Az 1013. evolúciósan konzervált aminosav pozíció (10. ábra).

Orthologous amino acid conservation

| Taxonomy  | Organism  | Protein ID  | Include low confidence

Taxonomy	Protein ID	Alignment	Similarity
<a href="#">Homo sapiens</a>	<a href="#">NP_000129.3</a>	1003 EYEELCPROG <b>PGF</b> ATKEITNGK 1023	100%
<a href="#">Acanthisitta chloris</a>	<a href="#">XP_009068354.1</a>	897 EFEALCPROG <b>PGF</b> STKIEISGK 917	64%
<a href="#">Acinonyx jubatus</a>	<a href="#">XP_014918928.1</a>	1001 EYEELCPROG <b>PGF</b> ATKEITNGK 1021	100%
<a href="#">Ailuropoda melanoleuca</a>	<a href="#">XP_002917594.1</a>	1003 EYDELCPROG <b>PGF</b> ATKEITNGK 1023	97%
<a href="#">Alligator mississippiensis</a>	<a href="#">XP_019333139.1</a>	1017 EYSALCPROG <b>PGF</b> STRVEINGK 1037	66%
<a href="#">Alligator sinensis</a>	<a href="#">XP_014377923.2</a>	919 EYSALCPROG <b>PGF</b> STRVEINGK 939	66%
<a href="#">Anas platyrhynchos</a>	<a href="#">XP_027322593.1</a>	997 EFEALCPROG <b>PGF</b> STKIEITGK 1017	56%
<a href="#">Anolis carolinensis</a>	<a href="#">XP_003229148.2</a>	1015 DYEALCPROG <b>PGF</b> SRDPVNGK 1035	69%
<a href="#">Antrostomus carolinensis</a>	<a href="#">XP_010164384.1</a>	897 EFEALCPROG <b>PGF</b> STKIEITGK 917	56%
<a href="#">Aotus nancymaae</a>	<a href="#">XP_012297739.1</a>	1004 EYEELCPROG <b>PGF</b> ATKEITNGK 1024	100%
<a href="#">Apaloderma vittatum</a>	<a href="#">XP_009865578.1</a>	899 EFEALCPROG <b>PGF</b> STKIEITGK 919	64%
<a href="#">Aptenodytes forsteri</a>	<a href="#">XP_009274768.1</a>	897 EFEALCPROG <b>PGF</b> STKIEITGK 917	56%
<a href="#">Balaenoptera acutorostrata scammoni</a>	<a href="#">XP_007170507.1</a>	1008 EYEELCPROG <b>PGF</b> ATKEITNGK 1028	100%
<a href="#">Balearica regulorum gibbericeps</a>	<a href="#">XP_010303925.1</a>	897 EFEALCPROG <b>PGF</b> STKIEITGK 917	56%
<a href="#">Bos indicus</a>	<a href="#">XP_019823414.1</a>	1003 EYEELCPROG <b>PGF</b> ATKEITNGK 1023	100%
<a href="#">Bos mutus</a>	<a href="#">XP_014332592.1</a>	931 EYEELCPROG <b>PGF</b> ATKEITNGK 951	100%
<a href="#">Bos taurus</a>	<a href="#">XP_015328665.1</a>	1003 EYEELCPROG <b>PGF</b> ATKEITNGK 1023	100%
<a href="#">Bubalus bubalis</a>	<a href="#">XP_025151327.1</a>	1003 EYEELCPROG <b>PGF</b> ATKEITNGK 1023	100%
<a href="#">Calidris pugnax</a>	<a href="#">XP_014799912.1</a>	995 EFEALCPROG <b>PGF</b> STKIEITGK 1015	64%
<a href="#">Callithrix jacchus</a>	<a href="#">XP_009003654.2</a>	1150 EYEELCPROG <b>PGF</b> ATKEITNGK 1170	100%
<a href="#">Calypte anna</a>	<a href="#">XP_008490238.1</a>	899 EFDALCPROG <b>PGF</b> STKIEITGK 919	60%
<a href="#">Camelus bactrianus</a>	<a href="#">XP_010963648.1</a>	999 EYDELCPROG <b>PGF</b> ATKEITNGK 1019	89%
<a href="#">Camelus dromedarius</a>	<a href="#">XP_010996927.1</a>	1016 EYDELCPROG <b>PGF</b> ATKEITNGK 1036	89%
<a href="#">Camelus ferus</a>	<a href="#">XP_006192393.1</a>	991 EYDELCPROG <b>PGF</b> ATKEITNGK 1011	89%

10. ábra: Az 1013. glicin aminosav fajok közötti konzerváltságát szemléltető ábra. Pirossal kiemelve az aminosav pozíció.

Száz allélt reprezentáló 50 kontroll mintában is vizsgáltuk a c.3038G>T eltérést, melyet egy allélon sem tudtunk kimutatni, valamint az eltérés nem volt jelen sem a gnomAD sem az 1000 Genom Project populációs adatbázisban, így potenciálisan kóroki eltérésnek jósolható. A betegünk az MFS súlyos atípusos formáját mutatta, neonatális korban megjelenő tünetekkel, hasonlóan az irodalomban korábban leírt esetekhez [34], [29], [41]. A rendelkezésre álló adatok alapján az eltérést a valószínűleg patogén kategóriába soroltuk. Minták hiányában a szülők analizését nem tudtuk elvégezni, azonban, ha az eltérés *de novo* eredetét bizonyítjuk, akkor az evidenciák alapján patogén eltéréssé sorolható át.

A c.3838 G>A, p.(Asp1280Asn) eltérés nem volt jelen sem a gnomAD sem az 1000 Genom Project populációs adatbázisban. Egy alkalommal került közlésre a ClinVar adatbázisban a ClinVar ID:200025 azonosítóval, mint valószínűleg patogén variáns. Szintén megtalálható volt a lókuszt specifikus adatbázisban (<http://www.umd.be/FBN1/>), ahol egy Marfan szindrómás betegben közölték az eltérést. Az 1280-as aszparaginsav evolúciósan konzervált az egyes fajok között, és része egy konzervált cbEGF konszenzus szekvenciának (X-D-X-(N/D)-E-C-X(6)-C-X(4)-C-X-N\*-X(2)-G-X-(Y/F)-X-C-X-C-X(2)-G-X(9)-C).

Az érintett aszparaginsav (**D**) félkövérrel kiemelve a szekvenciában [2]. A kóros variánsok kritériumai alapján [7], ezt az eltérést patogén misszensz eltérésként ítéltük meg.

A c.4727T>C, p.(Met1576Thr) variánst korábban már leírták Marfan szindrómával összefüggésben (aortagyök tágulatot mindkét esetben leírtak) [14], [42], és hiányzott 400 kontroll kromoszómából [42]. Három serdülőkori idiopathiás gerincferdülésben szenvedő betegben is leírták az eltérést [43]. Az utóbbi tanulmányban Western blot analízist végeztek három beteg paraspinalis izom mintáján, ami megemelkedett foszforilált SMAD2 (pSMAD2) szintet mutatott, ami indirekt bizonyítéka a fokozott TGF- $\beta$  jelátvitelnek MFS-ban [44], [45]. A variáns nagyon kis frekvenciával fordult elő a GnomAD adatbázisban (34/282694), és nem volt jelen az 1000 Genom Project adatbázisban. Habár mint MFS asszociált variánst említik az irodalomban, a predikciós szoftverek (PolyPhen2, SIFT, Mutation Taster) benignus variánsnak jósolják. A nem egyértelmű adatok alapján az eltérést bizonytalan jelentőségű variánsként (VUS) soroltuk be.

A c.5582 G>A, p.(Ser1861Asn) misszensz eltérés szerepelt a ClinVar adatbázisban (ClinVar ID:406289) mint MFS-al összefüggésbe hozható bizonytalan klinikai jelentőségű variáns (VUS). Jelen volt a GnomAD adatbázisban nagyon alacsony frekvenciával (4/245638).

Az 1861-es pozícióban lévő szerin aminosav nem teljesen konzervált a fajok között (11. ábra). Az elérhető adatokat figyelembe véve az eltérést bizonytalan jelentőségű variánsként (VUS) soroltuk be.

### Orthologous amino acid conservation

Taxonomy  | Organism  | Protein ID  | Include low confidence

Taxonomy	Protein ID	Alignment	Similarity
<a href="#">Homo sapiens</a>	<a href="#">NP_000129.3</a>	1851 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 1871	100%
<a href="#">Acanthisitta chloris</a>	<a href="#">XP_009068354.1</a>	1745 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 1765	100%
<a href="#">Acinonyx jubatus</a>	<a href="#">XP_014918928.1</a>	1849 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 1869	100%
<a href="#">Ailuropoda melanoleuca</a>	<a href="#">XP_002917594.1</a>	1851 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 1871	100%
<a href="#">Alligator mississippiensis</a>	<a href="#">XP_019333139.1</a>	1865 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 1885	100%
<a href="#">Alligator sinensis</a>	<a href="#">XP_014377923.2</a>	1767 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 1787	100%
<a href="#">Anas platyrhynchos</a>	<a href="#">XP_027322593.1</a>	1845 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 1865	100%
<a href="#">Anolis carolinensis</a>	<a href="#">XP_003229148.2</a>	1863 NECQEIPN:CSH5DCIDREGG 1883	80%
<a href="#">Antrostomus carolinensis</a>	<a href="#">XP_010164384.1</a>	1745 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 1765	100%
<a href="#">Aotus nancymaae</a>	<a href="#">XP_012297739.1</a>	1852 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 1872	100%
<a href="#">Apaloderma vittatum</a>	<a href="#">XP_009865578.1</a>	1747 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 1767	100%
<a href="#">Aptenodytes forsteri</a>	<a href="#">XP_009274768.1</a>	1745 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 1765	100%
<a href="#">Astyanax mexicanus</a>	<a href="#">XP_022542758.1</a>	1712 DECREIPGV:DN5VCINMIGS 1732	59%
<a href="#">Balaenoptera acutorostrata scammoni</a>	<a href="#">XP_007170507.1</a>	1856 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 1876	100%
<a href="#">Balearica regulorum gibbericeps</a>	<a href="#">XP_010303925.1</a>	1745 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 1765	100%
<a href="#">Boleophthalmus pectinirostris</a>	<a href="#">XP_020794545.1</a>	1822 DECREIPGV:EN5VCINMIGS 1842	59%
<a href="#">Bos indicus</a>	<a href="#">XP_019823414.1</a>	1848 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 1868	100%
<a href="#">Bos mutus</a>	<a href="#">XP_014332592.1</a>	1779 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 1799	100%
<a href="#">Bos taurus</a>	<a href="#">XP_015328665.1</a>	1851 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 1871	100%
<a href="#">Bubalus bubalis</a>	<a href="#">XP_025151327.1</a>	1851 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 1871	100%
<a href="#">Calidris pugnax</a>	<a href="#">XP_014799912.1</a>	1843 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 1863	100%
<a href="#">Callithrix jacchus</a>	<a href="#">XP_009003654.2</a>	1998 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 2018	100%
<a href="#">Calypte anna</a>	<a href="#">XP_008490238.1</a>	1747 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 1767	100%
<a href="#">Camelus bactrianus</a>	<a href="#">XP_010963648.1</a>	1828 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 1848	100%
<a href="#">Camelus dromedarius</a>	<a href="#">XP_010996927.1</a>	1864 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 1884	100%
<a href="#">Camelus ferus</a>	<a href="#">XP_006192393.1</a>	1835 NECQEIPN:CSH5QCIDTVGS 1855	100%

11. ábra: Az 1861. szerin aminosav fajok közötti konzerváltságát szemléltető ábra. Pirossal kiemelve az aminosav pozíció.

### 5.1.4 Kis skálájú deléciók/duplikációk az *FBNI* génben

Az *FBNI* génben kis skálájú deléciókat/duplikációkat a 23 betegünkben 3 esetben detektáltunk (13%). Mindegyik eltérés olvasási keret eltolódáshoz és valószínűleg trunkált proteinhez vagy mRNS degradációhoz vezet nonszensz variáns mediálta mRNS lebomlás (NMD) által, így mindegyik eltérést patogén eltérésnek soroltuk be [7] (10. táblázat). Két variáns új volt, míg egyet korábban már leírtak egy 18 éves Marfan szindrómás betegben, akinek felszálló aorta tágulata és enyhe szisztémás érintettsége volt [46]. A 19-es számú betegünknek (44 éves) hasonlóan felszálló aorta tágulata volt <7 szisztémás érintettséggel.

10. táblázat Kis duplikációk/deléciók az *FBNI* génben.

Beteg sorszám	Kor (év)	Exon	Genotípus	Protein szint	Referencia	Variáns klasszifikáció	EL	Ao	SP <sup>f</sup>	Családtörténet	Diagnózis
17	5	e 18	c.2272_2275dup	p.Thr759Ilefs*8	Saját tanulmány	patogén	-	-	7	f	potenciális MFS
18	33	e 41	c.5196del	p.Cys1733Valfs*160	Saját tanulmány	patogén	-	+	9	f	MFS
19	44	e 57	c.7167_7168del	p.Cys2390Serfs*15	[46]	patogén	-	-	6	NA	MFS

Jelölések: EL, ectopia lentis, Ao, aorta gyök tágulat/disszekció, <sup>f</sup> SP, szisztémás pontszám, családtörténet: f, familiáris. Félkövérrrel kiemelve a korábban nem leírt eltérések.

### 5.1.5 Splice helyet érintő variánsok az *FBNI* génben

Összesen 4 splice helyet érintő variánst (4/23, 17,4%) detektáltunk a génben, melyeket a 1. táblázatban foglaltunk össze a klinikai adatokkal együtt. Két splice variáns a c.1468+5G>A és a c.4337-2A>G korábban leírt eltérés volt. A c.1468+5G>A variánst először Liu és munkatársai írták le [47]. A szerzők RT-PCR segítségével bemutatták, hogy fibroblasztokból izolált totál RNS mintákban ez az eltérés exon skippinget okozott. A c.4337-2A>G eltérést egy női betegben írták le, aki szülést követően aorta disszekcióban hunyt el [48].

A c.1837+4C>T variánst egy betegben mutatták ki és szerepel a ClinVar adatbázisban is (ClinVar ID:406295), valamint nagyon alacsony frekvenciával (9/246104) fordul elő a gnomAD adatbázisban. A predikciók alapján (Human Splicing Finder, Mutation Taster) kóroki eltérés, mivel potenciálisan megzavarja a splicing folyamatot. A rendelkezésre álló adatok alapján a variánst bizonytalan jelentőségű variánsként (VUS) soroltuk be. További információkra van szükség, úgymint szegregációs vizsgálatok (együtt öröklődik-e a fenotípussal az eltérés), hogy az eltérés milyen eredetű (*de novo* vagy öröklött) és meg kell határozni a splicingra gyakorolt hatását, hogy pontosan meg tudjuk ítélni a variánst.

A c.3082+1G>A korábban nem leírt eltérést egy 10 hónapos fiú betegnél detektáltuk, akinek ectopia lentise és enyhe szisztémás érintettsége volt. A predikciók alapján (Human Splicing Finder, Mutation Taster) kóroki eltérés. A variáns a 24-es intronban található és a kanonikus +1-es donor splice helyet érinti, mely legtöbbször megzavarja a normál splicingot (lehetséges exon skippinget okoz). Emiatt a variánst patogén eltérésként definiáltuk [34], [31].

**11. táblázat:** Splice site variánsok az *FBNI* génben.

Beteg sorszám	Kor (év)	Exon	Genotípus	Protein szint	Referencia	Variáns klasszifikáció	EL	Ao	SP <sup>f</sup>	Család történet	Diagnosis
20	27	intron 11	c.1468+5G>A	p.?	[47]	patogén	-	-	8	f	MASS
21	15	intron 14	c.1837+4C>T	p.?	rs199950267	VUS	-	-	7	NA	-
22	0.8	intron 24	c.3082+1G>A	p.?	saját tanulmány	patogén	+	-	6	s	neonatólis MFS
23	52	intron 34	c.4337-2A>G	p.?	[48]	patogén	-	+	6	f	MFS

Jelölések: EL, ectopia lentis, Ao, aorta gyök tágulat/disszekció, f SP, szisztémás pontszám, családtörténet: f, familiáris, s, sporadikus. Félkövérrel kiemelve a korábban nem leírt eltérés.

### 5.1.6 Visszatérő csendes variáns három egymással nem rokon betegben

Három egymással rokoni kapcsolatban nem álló, és kizárólag enyhe szisztémás fenotípusos tünetekkel rendelkező betegben detektáltuk ugyanazt a c.3294C>T, p.(Asp1098=) csendes variánst (12. táblázat).

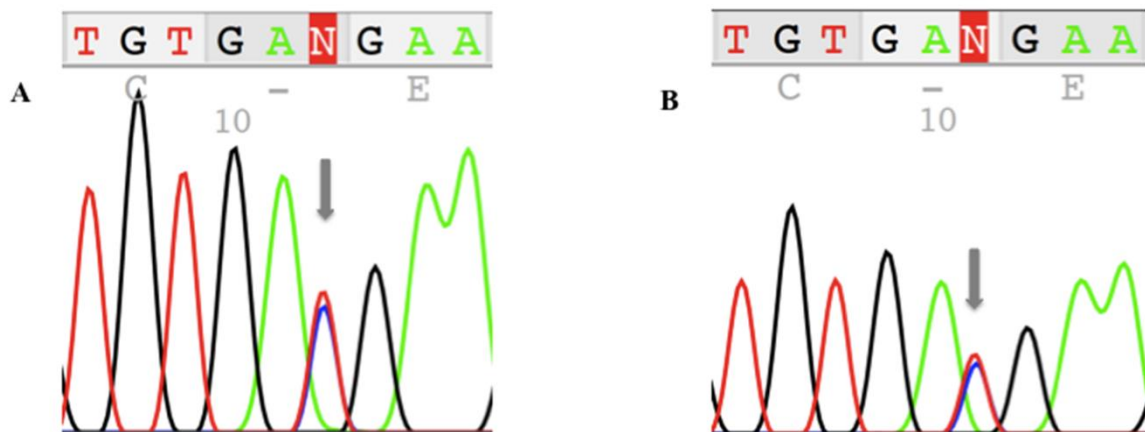
A variáns szerepel a HGMD adatbázisban csakúgy, mint a Universal Mutation Database (<http://www.umd.be/FBN1/>) adatbázisában. Két személyes közlés (Ads, Holman, 2000; Boileau, 2013), és két publikáció elérhető a fenotípussal összefüggésben [49], [42]. Sheikhzadeh és munkatársai összefoglalták, hogy nincs átfogó bizonyíték az eltérés patogenitásának megítéléséhez, habár a splicing defektust szoftveres predikciók alapján nem lehet kizárni [42]. A c.3294C>T, p.(Asp1098=) variáns minor allél frekvenciája (MAF) kisebb mint 1% a GnomAD és az 1000 Genomes Project adatbázisokban. A Human Splicing Finder (HSF) predikciós szoftver a slicing hely potenciális megváltozását jósolta.

**12. táblázat** A c.3294C>T (p.Asp1098=) csendes *FBNI* variánst hordozó betegek klinikai érintettsége.

Beteg sorszám	Kor (év)	EL	Ao	SP <sup>b</sup>	Család történet
24	28	-	-	6	familiáris
25	20	-	-	8	sporadikus
26	18	-	-	9	familiáris

Jelölések: EL, ectopia lentis, Ao, aorta gyök tágulat/disszekció, <sup>b</sup> SP, szisztémás pontszám.

A 26-os betegtől származó bőr fibroblasztokból izolált RNS mintából transzkript analízist végeztünk. A 26-os exon és az exon-exon határok bidirekcionális Sanger szekvenálását is elvégeztük, mely azt mutatta, hogy a mutáns allél körülbelül 50%-ban volt jelen a beteg cDNS mintájában (a 12. ábra mutatja a reprezentatív elektroferogramot), valamint az exon-exon határok épek voltak.



**12. ábra:** A 26-os beteg gDNS (A) és cDNS (B) mintájának Sanger szekvenálása. A c.3294C>T (p.Asp1098=) csendes variáns (nyíllal jelölve). A mutáns allél a beteg cDNS mintájában körülbelül 50%-ban van jelen, hasonlóan a gDNS mintához. A képen a megváltozott kodon és a szomszédos kodonok láthatók.

A 26-os beteg esetében pontos allél arány meghatározást végeztünk bidirekcionális piroszekvenálással, nagy lefedettséggel mind a genomi DNS, mind a cDNS mintán (13. táblázat). Az utóbbi analízis azt mutatta, hogy a vad típusú és a mutáns allélek egyenlő arányban voltak a beteg cDNS mintájában, hasonlóan a genomi DNS mintához. Végeredményben elmondható, hogy sem NMD, sem exon skipping nem volt megfigyelhető.

**13. táblázat:** Vad (C) és mutáns (T) allélok arányának meghatározása piroszekvenálással

Minta típusa	Lefedettség (F+R)	Allél arány (C:T)
gDNA	750x	57,47%:42,53%
cDNA	611x	43,86%:56,14%

Az allélok arányainak megoszlása a c.3294C>T variáns esetében a 26-os beteg gDNS és cDNS mintáiban. F, forward irány, R, reverz irány.

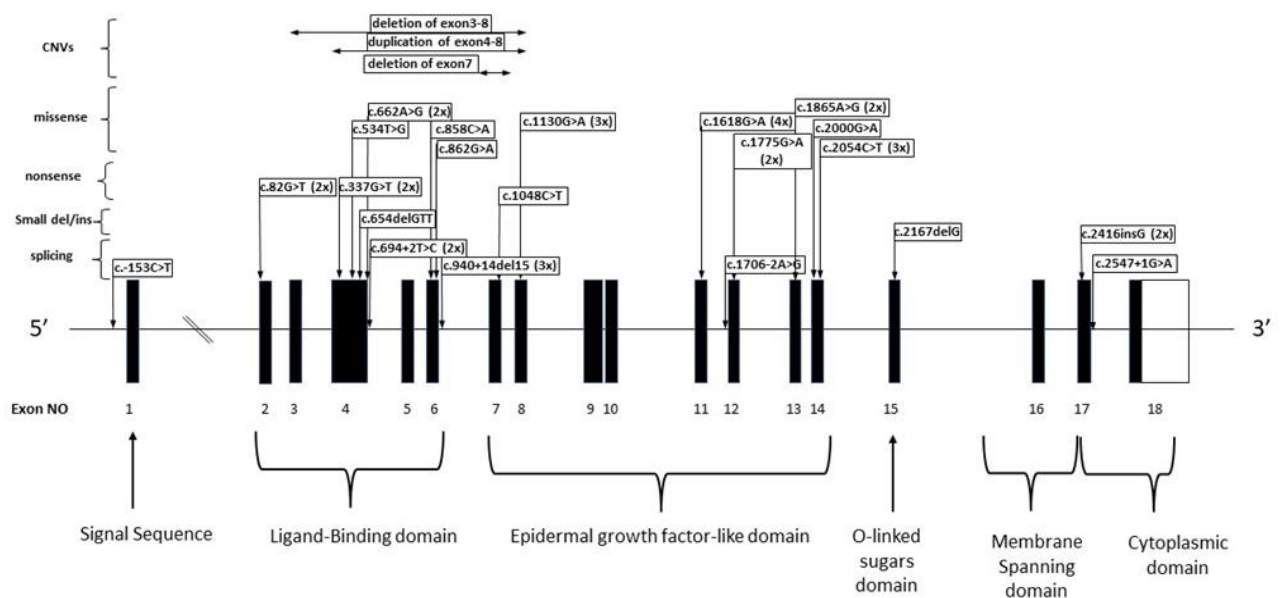
A variánst a következők alapján benignus variánsként soroltuk be: az eltérés allél frekvenciája nagyobb, mint a betegségből kifolyólag várható lenne[31], nem detektáltunk rendellenes splicingot, valamint a feltételezett betegségnek (MFS, egyéb fibrillinopátiák) ismert a genetikai (lókusz) heterogenitása, vagyis a tüneteket más génekben lévő eltérés is okozhatja.

## 5.2 A magyarországi familiáris hiperkoleszterinémiás betegek mutációs spektruma

### 5.2.1 Detektált eltérések

A vizsgálat során összesen 47 familiáris hiperkoleszterinémiával kapcsolatba hozható variánst detektáltunk 44 betegben, melyek közül 3 beteg két eltérést is hordozott, azaz összetett heterozigóta genotípusúak voltak. A detektált eltérések nagy többsége (40 variáns) az *LDLR* génben helyezkedett el, 7 esetben pedig az *APOB* génben detektáltunk eltérést. Az *LDLR* génben detektált eltérések közül 1, míg az *APOB* génben 2 új variánst mutattunk ki, melyek korábban még nem szerepeltek az irodalomban. A *PCSK9*, *LDLRAP1*, *STAP1* génekben nem detektáltunk FH-val összefüggésbe hozható patogén eltérést.

A variánsok *LDLR* génen belüli eloszlását tekintve 1 variáns az *LDLR* gén promoterében, 17 variáns a ligand kötő doménben, 18 az epidermal growth factor (EGF) precursor homology doménben, 1 az O-linked sugar doménben, további 3 eltérés a citoplazmatikus doménben volt található (13.ábra).



13. ábra: A detektált *LDLR* variánsok és azok génen belüli elhelyezkedése.

## 5.2.2 Az *APOB* génben kimutatott eltérések

A vizsgálat során 7 betegben azonosítottunk *APOB* variánst, ezek közül a leggyakoribb c.10580G>A p.(Arg3527Gln) FH -t okozó *APOB* eltérést 4 betegben azonosítottuk[50].

Két olyan misszensz variánst (c.8213T>A, p.(Ile2738Lys), c.10438A>G, p.(Lys3480Glu)) mutattunk ki 2 probandban, melyek patogenitása nem tisztázott, azonban egyik eltérés sem szerepel a populációs adatbázisokban, tehát nincs jelen a normál populációban, valamint egyik betegben sem detektáltunk más eltérést a vizsgált génekben. A variánsok ACMG szerint bizonytalan klinikai jelentőségű variáns (VUS) besorolásúak, így a variánsok patogenitásának megítélésére további vizsgálatok szükségesek. További egy betegben az *ApoB* gén 29-es exonjában a c.13242delG olvasási kereteltolódást okozó eltérést detektáltuk heterozigóta formában. A deléció következménye egy korai stop kodon beépülése a 4415 -ös aminosav pozícióba, mely, egy valószínűleg trunkált fehérjét eredményez. Mivel az eltérés az utolsó exonban található, nem valószínű, hogy nonszensz-mediált mRNS-lebomlás lenne a következménye[51], inkább valószínű az, hogy a csonkolt fehérjéből 148 aminosav fog hiányozni a C-terminálison. A variáns a populációs adatbázisokban nem szerepel, azonban a ClinVar adatbázisban egyszer említik egy klinikai tesztelés során detektálták bizonytalan jelentőségű variánsként (ClinVar ID:927203). Összességében a predikciós szoftverek besorolása, valamint amiatt, hogy a detektált eltéréstől 3' irányba távolabb is írtak le patogén trunkáló variánst, ami szintén az eltérés patogenitása mellett szól [52], az eltérést VUS/valószínűleg patogén kategóriába soroltuk. A detektált *APOB* variánsokat a 14. táblázatban foglaltuk össze.

**14. táblázat:** *APOB* (NM\_000384.3) eltérést hordozó magyar betegek klinikai és fenotípusos adatainak összefoglalása.

Beteg azonosító	exon	variáns cDNS szinten	variáns fehérjeszinten	variáns típus	ACMG klasszifikáció	TC (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	Kor (év)	Nem	BMI	Dutch Score	Xanthoma, xanthelasma	Referencia
7.	26	c.8213T>A	p.Ile2738Lys	misszensz	VUS	8,1	5,72	69	F	22,50	11	-	saját tanulmány
4.	26	c.10438A>G	p.Lys3480Glu	misszensz	VUS	8	5,3	65	F	25,50	13	-	saját tanulmány
30.	26	c.10580G>A	p.Arg3527Gln	misszensz	valószínűleg patogén	7,66	5,51	60	F	29,90	11	-	[50]
37.	26	c.10580G>A	p.Arg3527Gln	misszensz	valószínűleg patogén	8,3	6	51	F	30,10	14	-	[50]
1.	26	c.10580G>A	p.Arg3527Gln	misszensz	valószínűleg patogén	6,9	4,6	78	F	N/A	10	-	[50]
39.	26	c.10580G>A	p.Arg3527Gln	misszensz	valószínűleg patogén	8,1	5,2	61	F	23,50	4	-	[50]
29.	29	c.13242delG	p.Leu4415*	olvasási kereteltolódást okozó	VUS/valószínűleg patogén	5,62	7,3	51	M	26,30	16	-	ClinVar ID:927203

### 5.2.3 Az LDLR génben detektált eltérések

A vizsgálat során 37 betegben összesen 40 LDLR variánst mutattunk ki. Három beteg esetében összetett heterozigóta genotípust detektáltunk, ami magyarázta a betegek súlyosabb, klinikai tüneteit. Az összetett heterozigóta genotípus ugyanolyan súlyos klinikai tüneteket okoz, mint egy homozigóta genotípus, mindkettő esetben mindkét allél funkcióvesztését eredményezik.

#### 5.2.3.1 Misszensz LDLR variánst hordozó betegek

Számos olyan misszensz variánst detektáltunk az LDLR génben, amely több mint egy betegben volt jelen (15. táblázat). A leggyakrabban előforduló variáns a c.1618G>A, p.(Ala540Thr) négy családban, míg a c.1130G>A, p.(Cys377Tyr) három családban, és a c.2054C>T, p.(Pro685Leu) szintén három családban volt kimutatható. A c.662A>G, p.(Asp221Gly), c.1775G>A, p.(Gly592Glu), c.2000G>A, p.(Cys667Tyr) és a c.1865A>G, p.(Asp622Gly) variánsok mindegyike két-két családban fordult elő. A többi misszensz variáns egyedi volt.

**15. táblázat:** Az LDLR (NM\_000527.5) génben detektált heterozigóta misszensz variánsok, valamint a betegek részletes klinikai és biokémiai adatai.

Beteg azonosító	Exon	Domén	variáns cDNS szinten	variáns fehérje szinten	ACMG klasszifikáció	TC (mmol/l)	LDL-C (mmol/l)	Kor (év)	Nem	BMI	Dutch Score	Xanthoma, xanthelasma	Referencia
25	4	ligand-binding	c.534T>G	p.Asp178Glu	Patogén	4.2	2.4	48	Ffi	27.8	11	-	[53]
5	4	ligand-binding	c.662A>G	p.Asp221Gly	Patogén	5.6	3.8	66	Nő	25.2	2	-	[54]
20	4	ligand-binding	c.662A>G	p.Asp221Gly	Patogén	12	8.81	50	Nő	22	18	-	[54]
27	6	ligand-binding	c.858C>A	p.Ser286Arg	Patogén	9.2	6.93	34	Nő	22.9	13	-	[54]
36	8	EGF precursor homology	c.1130G>A	p.Cys377Tyr	Patogén	9.4	8.5	18	Ffi	N/A	14	-	[55]
19	8	EGF precursor homology	c.1130G>A	p.Cys377Tyr	Patogén	8.4	6.2	18	Nő	19.6	12	-	[55]
24	8	EGF precursor homology	c.1130G>A	p.Cys377Tyr	Patogén	13.3	10.56	60	Nő	23	18	-	[55]
21	8	EGF precursor homology	c.1618G>A	p.Ala540Thr	Patogén	N/A	N/A	54	Nő	N/A	N/A	N/A	[56]
42	8	EGF precursor homology	c.1618G>A	p.Ala540Thr	Patogén	9.1	6.65	28	Ffi	26.9	13	-	[56]
26	12	EGF precursor homology	c.1775G>A	p.Gly592Glu	Patogén	10.3	7.7	45	Nő	19.8	13	-	[57]
31	12	EGF precursor homology	c.1775G>A	p.Gly592Glu	Patogén	10.2	7.62	53	Nő	N/A	13	-	[57]
3	13	EGF precursor homology	c.1865A>G	p.Asp622Gly	Patogén	9.6	7.3	67	Ffi	24.3	8	-	[58]
6	13	EGF precursor homology	c.1865A>G	p.Asp622Gly	Patogén	10	7.9	60	Ffi	27.8	11	+	[58]
2	14	EGF precursor homology	c.2000G>A	p.Cys667Tyr	Patogén	12.9	10.4	64	Nő	30.1	10	-	[54]
17	14	EGF precursor homology	c.2054C>T	p.Pro685Leu	Patogén	8.1	5.4	40	Nő	N/A	12	-	[59]
15	14	EGF precursor homology	c.2054C>T	p.Pro685Leu	Patogén	9.6	7.6	22	Ffi	21.1	14	-	[59]
40	14	EGF precursor homology	c.2054C>T	p.Pro685Leu	Patogén	9.6	7.14	56	Nő	24.2	19	+	[59]

### 5.2.3.2 Nonszensz *LDLR* variánst hordozó betegek

A c.82G>T, p.(Glu28\*) és a c.337G>T, p.(Glu113\*) nonszensz eltéréseket két-két családban is kimutattuk, míg a c.1048C>T, p.(Arg350\*) eltérést egy családban detektáltuk heterozigóta formában.

A 13-as számú beteg esetében a c.337G>T, p.(Glu113\*) nonszensz eltérést egy másik patogén misszensz variánssal együtt detektáltuk összetett heterozigóta formában. A variánsokhoz tartozó klinikai és fenotípusos adatokat a 16. táblázatban foglaltuk össze.

**16. táblázat:** Az *LDLR* (NM\_000527.5) génben detektált heterozigóta nonszensz variánsok, valamint a betegek részletes klinikai és biokémiai adatai.

Beteg azonosító	exon	variáns cDNS szinten	variáns fehérje szinten	ACMG klasszifikáció	TC (mmol/l)	LDL-C (mmol/l)	Kor (év)	Nem	BMI	Dutch Score	Xanthoma, xanthelasma	Referencia
10	2	c.82G>T	p.Glu28*	Patogén	9.07	7.18	33	Nő	24.6	14	-	[60]
16	2	c.82G>T	p.Glu28*	Patogén	13.3	10.23	53	Nő	34.7	18	-	[60]
35	4	c.337G>T	p.Glu113*	Patogén	12.1	9.25	36	Ffi	28.1	16	-	[61]
9	7	c.1048C>T	p.Arg350*	Patogén	11.9	9.75	52	Nő	N/A	16	N/A	[54]

### 5.2.3.3 Splice helyet érintő *LDLR* variánst hordozó betegek

Splicing defektust okozó eltérést összesen 8 betegben detektáltunk (17. táblázat). Kettő ezek közül több mint egy probandban volt jelen. A c.940\_940+14del kóroki eltérés három betegben is kimutatható volt (8,11,23-as beteg). Ez a variáns nagy valószínűséggel befolyásolja a splicing folyamatát és emiatt sérül a protein funkciója. A c.694+2 T>C variánst két családban találtuk meg. Egy betegben egy korábban nem közölt, splicing variánst is detektáltunk a c.1706-2A>G eltérést az *LDLR* génben (17. táblázat).

**17. táblázat:** Az *LDLR* (NM\_000527.5) génben detektált heterozigóta promóter és splicing variánsok, valamint a betegek részletes klinikai és biokémiai adatai.

Beteg azonosító	exon	variáns cDNS szinten	variáns fehérje szinten	ACMG klasszifikáció	TC (mmol/l)	LDL-C (mmol/l)	Kor (év)	Nem	BMI	Dutch Score	Xanthoma, xanthelasma	Referencia
43	promóter	c.-153C>T	p.?	Valószínűleg Patogén	9	6.13	21	Nő	22	13	-	[62]
22	intron 4	c.694+2 T>C	p.?	Patogén	9.4	9.4	47	Ffi	34.2	17	-	[63]
32	intron 4	c.694+2 T>C	p.?	Patogén	9	7.4	50	Ffi	26.3	16	-	[63]
8	6	c.940_940+14del	p.?	Patogén	10.4	7.9	30	Nő	25.8	14	-	[55]
11	6	c.940_940+14del	p.?	Patogén	10	10.5	14	Nő	22.4	17	-	[55]
23	6	c.940_940+14del	p.?	Patogén	11.4	8.7	53	Nő	22.2	17	-	[55]
34	intron 11	c.1706-2A>G	p.?	Valószínűleg Patogén	8.2	5.8	50	Nő	30.5	12	-	saját tanulmány
14	intron 17	c.2547+1G>A	p.?	Patogén	11.1	8.9	66	Ffi	24.8	18	-	[64]

#### 5.2.3.4 Az FH-s betegekben detektált kis deléciók/duplikációk az *LDLR* génben

A c.2416dupG, p.(Val806Glyfs\*11) eltérést két családban is detektáltuk heterozigóta formában. Ez az eltérés egy 1 bp-os inzerció az *LDLR* gén 17-es exonjában, egy 5 guaninból álló homopolimer szakaszban. Az inzerció eredményeként az 5 helyett 6 guanin lesz a homopolimer szakaszban, mely eltolja az olvasási keretet és korai stop kodon beépülését eredményezi. Ez az eltérés az *LDLR* variánsok III-as osztályába tartozik, azaz hibás vagy hiányos LDL receptor fehérjét eredményez (18. táblázat).

A 28-as betegben a c.2167delG, p.(Glu723Argfs\*7) eltérést mutattuk ki heterozigóta formában. Ez a 15-ös exonban lévő kis deléció szintén megzavarja a normál olvasási keretet és korai stop kodon beépüléséhez vezet. Ebben a betegben egy további heterozigóta misszensz eltérést (c.862G>A, p.(Glu288Lys)) is azonosítottunk, így ezt a beteget az összetett heterozigóta *LDLR* variánst hordozó betegek című fejezetben részletesen tárgyaljuk.

A vizsgált betegek közül egyetlen betegben detektáltunk egy olvasási keretet nem érintő deléciót (c.654\_656delTGG, p.(Gly219del)).

**18. táblázat:** Az *LDLR* (NM\_000527.5) génben detektált heterozigóta kis deléciók és inzerciók, valamint a betegek részletes klinikai és biokémiai adatai.

Beteg azonosító	Exon	variáns cDNS szinten	variáns fehérje szinten	ACMG klasszifikáció	TC (mmol/l)	LDL-C (mmol/l)	Kor (év)	Nem	BMI	Dutch Score	Xanthoma, xanthelasma	Referencia
41	4	c.654_656delTGG	p.Gly219del	Patogén	13	N/A	48	M	24.7	2	-	[65]
18	17	c.2416insG	p.Val806fs	Patogén	8.1	5.4	58	F	N/A	12	+	[66]
44	17	c.2416insG	p.Val806fs	Patogén	10	3.1	58	F	22.6	9	-	[66]

### 5.2.3.5 Összetett heterozigóta *LDLR* variánst hordozó betegek

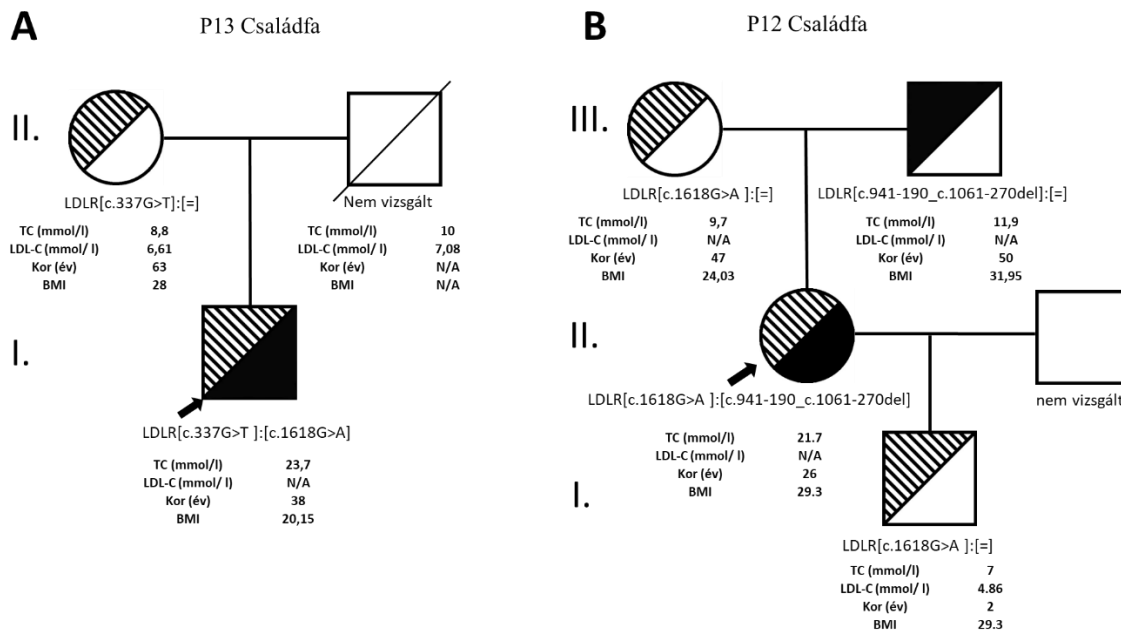
A vizsgálat során 3 olyan beteg volt (P12, P13, P28) akik összetett heterozigóta genotípussal rendelkeztek. Mindhárom esetben a genotípushoz súlyos klinikai kép társult (19. táblázat).

**19. táblázat:** Az *LDLR* (NM\_000527.5) génben detektált variánsok az összetett heterozigóta betegek esetében, valamint a betegek részletes klinikai és biokémiai adatai.

Beteg Azonosító	exon	variáns cDNS szinten	variáns fehérje szinten	ACMG klasszifikáció	TC (mmol/l)	LDL-C (mmol/l)	Kor (év)	Nem	BMI	Dutch Score	Xanthoma, xanthelasma	Referencia
12.	11	c.1618G>A	p.Ala540Thr	Patogén								[67]
	7	c.941-190_c.1061-270del	p.?	Patogén	21.7	N/A	26	Nő	29.36	20	+	Saját tanulmány
13.	4	c.337G>T	p.Glu113Term	Patogén								[61]
	11	c.1618G>A	p.Ala540Thr	Patogén	23.7	N/A	38	Ffi	20.15	20	+	[67]
28.	6	c.862G>A	p.Glu288Lys	Patogén								[68]
	15	c.2167delG	Glu723Argfs*7	Patogén	10.4	10.8	13	Ffi	29.4	17	-	[56]

A 12-es beteg esetén egy heterozigóta misszensz variáns (c.1618G>A, p.(Ala540Thr)) mellett az *LDLR* gén 7-es exonjának delécióját (c.941-190\_c.1061-270del) detektáltuk heterozigóta formában. Célzott kaszkádvizsgálatot végeztünk, mely bizonyította a két eltérés transz öröklődését (14. ábra). Sikeresen meghatároztuk a 7-es exon deléciójának töréspontjait is az *LDLR* génben. A vad típusú *LDLR* gén 7-es exonja előtt és után is található egy 32bp hosszúságú homológ DNS szekvencia.

A beteg esetében ez a szekvencia a PCR termék szekvenálását követően csak egyszer volt kimutatható, és a gén 7 es exonja is kiesett. Vizsgálatunk alapján ennek a rövid introni szakasznak a deléciója magyarázhatja a teljen 7-es exon delécióját (15. ábra).



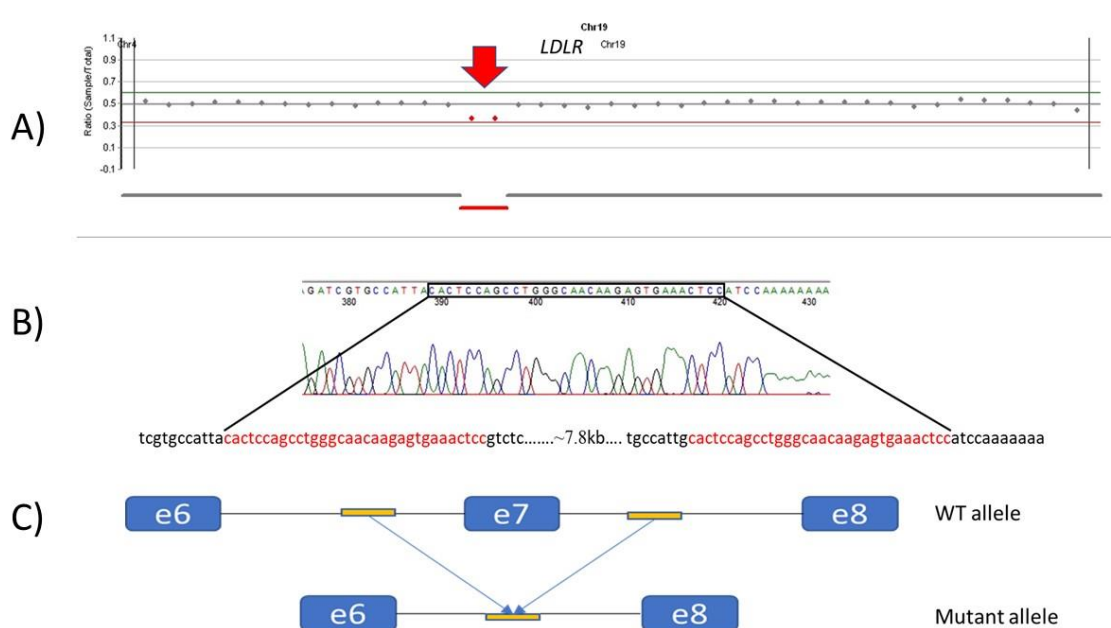
**14. ábra:** A 13-as és a 12-es beteg családfája. **A)** A 13-as beteg családtagjai. A proband édesapját nem tudtuk tesztelni. **B)** A 12-es beteg családfája, ahol 3 generációt tudtuk vizsgálni.

A 13-as betegnél (P13) egy nonszensz ( $c.337G>T$ , p.(Glu113\*)) és egy misszensz eltérést ( $c.1618G>A$ , p.(Ala540Thr)) mutattunk ki heterozigóta formában. A kaszkád vizsgálat során kimutattuk, hogy a nonszensz variánst az édesanyjától örökölte. Az apai DNS minta nem volt elérhető, mivel a beteg édesapja korábban kardiovaszkuláris komplikációk miatt elhunyt (12. ábra).

A 28-as betegben egy misszensz ( $c.862G>A$ , p.(Glu288Lys)) és egy frameshift variánst ( $c.2167delG$ , p.(Glu723Argfs\*7)) detektáltunk heterozigóta formában.

A  $c.2167delG$ , p.(Glu723Argfs\*7) eltérést korábban már leírták egy olyan betegben, akinek emelkedett volt az összkoleszterin szintje [60].

Az általunk vizsgált beteg esetében szintén emelkedett LDL-C és TC értékeket mértek. Habár a beteg fiatal kora miatt (13 év) xanthoma nem került leírásra, de az életkor előrehaladtával kialakulhat. A 28-as beteg családtagjaitól nem állt rendelkezésre DNS minta így a kaszkádvizsgálatot nem tudtuk elvégezni, így a transz öröklődésmentet nem tudtuk igazolni.



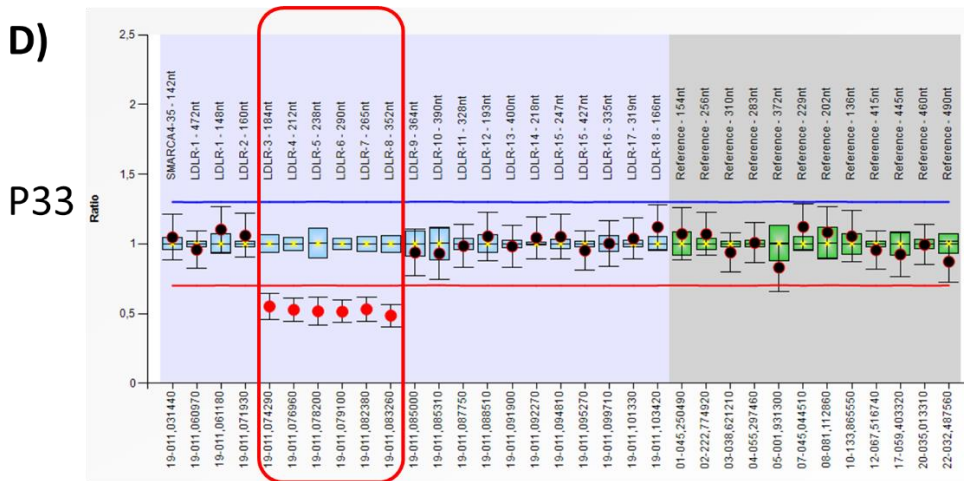
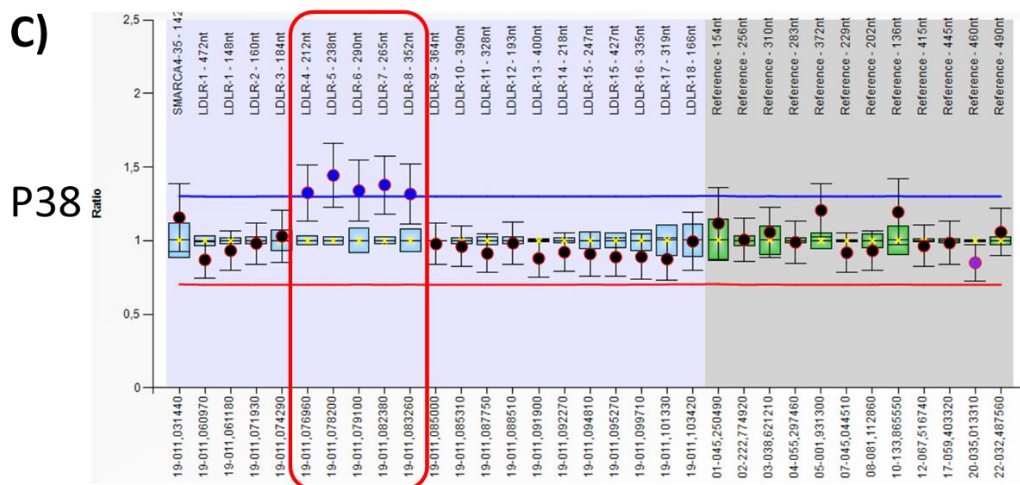
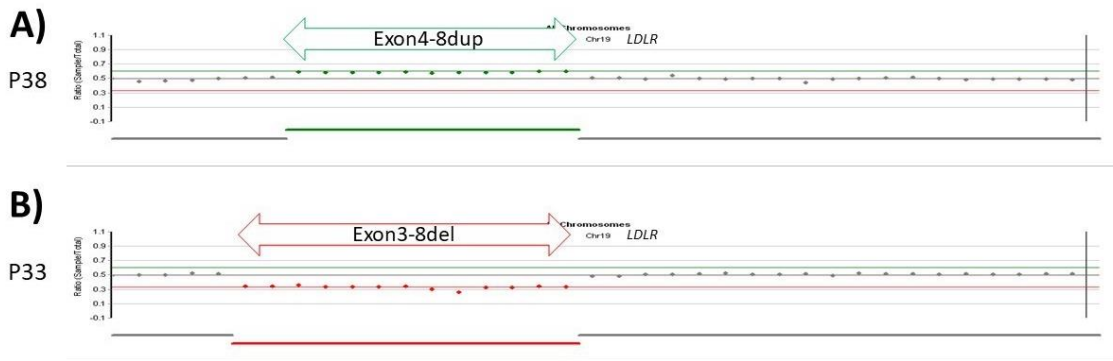
**15. ábra:** A 7-es exon deléció töréspontjainak meghatározása. **(A)** Lefedettség alapú CNV analízis NGS adatokból. A piros nyíl mutatja a teljes 7-es exon heterozigóta delécióját, mely két amplikonnal (a két piros pont jelzi) is le volt fedve (12-es beteg). **(B)** A mutáns allél PCR amplifikációt követő Sanger szekvenálásának eredménye. A rövid homológ DNS szekvencia kerettel kiemelve és piros színnel kiemelve a referencia szekvenciában. **(C)** A vad típusú és a mutáns allél a 7-es exon nélkül. A mutáns allél csak 1 kópiát tartalmaz a rövid homológ DNS szekvenciából.

### 5.2.3.6 *LDLR* kópiaszámbeli eltérést hordozó betegek

Három beteg esetében detektáltunk az *LDLR* génben kópiaszámbeli eltérést heterozigóta formában. Egy fentebb leírt beteg esetében (12-es beteg) összetett heterozigóta formában (20. táblázat). A 38-as betegben a 4-8 as exonok duplikációja, míg a 33-as betegben a 3-8-as exonok deléciója volt kimutatható heterozigóta formában az új generációs szekvenálás lefedettség adatai alapján (16. ábra). A detektált eltéréseket MLPA módszerrel is megerősítettük.

**20. táblázat:** *LDLR* (NM\_000527.5) CNV-t hordozó betegek klinikai és biokémiai adatait összefoglaló táblázat.

Beteg azonosító	exon	variáns típusa	ACMG klasszifikáció	TC (mmol/l)	LDL-C (mmol/l)	Kor (év)	nem	BMI	Dutch Score	Xanthoma, xanthelasma	Referencia
38	exon 4-8	duplikáció	Patogén	16.6	9.8	69	Nő	25.7	24	+	[69]
33	exon 3-8	deléció	Patogén	N/A	N/A	74	Nő	40.4	10	+	[70]



**16. ábra:** Lefedettség alapú CNV eltérések az *LDLR* génben. **A)** A 38-as betegben a lefedettségi adatok alapján a 4-8 exonok duplikációját mutattuk ki. A zöld nyíl mutatja a duplikáció helyét és méretét. **B)** A 33-as betegben a 3-8 exonok delécióját detektáltuk a lefedettségi adatok alapján. A piros nyíl a deléció helyét és méretét jelöli. **C)** A 38-as beteg 4-8 exonok duplikációjának megerősítése MLPA módszerrel. **D)** A 33-as betegben detektált 6 exonos deléció konfirmálása MLPA módszerrel.

## 5.2.4 Az LDLR eltérést hordozó betegek családtagjainak vizsgálata

Minden olyan beteg esetében, ahol kóroki vagy valószínűleg kóroki variánst mutattunk ki, elvégeztük az elérhető családtagok mintájának célzott analizisét. Összesen 15 családtag mintájában mutattunk ki eltérést, melyek közül 1 esetben az *APOB* gén míg 14 esetben az *LDLR* gén volt érintett. A családtagok eredményeit és a fontosabb fenotípusos adatokat a 21-22. táblázatok tartalmazzák.

**21. táblázat:** A vizsgált vér szerinti családtagokban detektált *LDLR* (NM\_000527.5) eltérések és a főbb klinikai és biokémiai adataik.

Vér szerinti családtag	exon	cDNS szintű eltérés	variáns fehérje szinten	ACMG klasszifikáció	TC (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	Kor (év)	Nem	BMI	Dutch Score	Xanthoma, xanthesmasma	Referencia
13-1	4	c.337G>T	p.Glu113*	Patogén	8,8	6,61	63	Nő	28	11	+	[61]
41-1	4	c.654_656delTGG	p.Gly219del	Patogén	9,7	6,6	17	Ffi	25	n/a	-	[65]
11-1	6	c.940_940+14del	p.?	Patogén	8,4	5,9	12	Nő	17	12	-	[71]
11-2	6	c.940_940+14del	p.?	Patogén	8	5,98	45	Ffi	45	12	-	[71]
19-1	8	c.1130G>A	p.Cys377Tyr	Patogén	7,5	5,5	29	Ffi	28	11	-	[55]
12-1	11	c.1618G>A	p.Ala540Thr	Patogén	7	4,86	2	Ffi	15	11	-	[56]
12-2	11	c.1618G>A	p.Ala540Thr	Patogén	9,7	n/a	47	Nő	24	11	+	[56]
12-3	7	c.941-190_c.1061-270del	?	Patogén	11,9	n/a	50	Ffi	32	14	+	S
26-1	12	c.1775G>A	p.Gly592Glu	Patogén	8,81	6,38	63	Ffi	32	19	-	[56]
6-1	13	c.1865A>G	p.Asp622Gly	Patogén	6,1	4,1	40	Ffi	23	9	-	[58]
15-1	14	c.2054C>T	p.Pro685Leu	Patogén	8,9	6,54	26	Ffi	22	14	-	[59]
17-1	14	c.2000G>A	p.Cys667Tyr	Patogén	7,5	5,08	14	Nő	20	12	-	[54]
18-1	17	c.2416insG	p.Val806fs	Patogén	9,1	n/a	31	Nő	18	9	-	[66]
38-1	4-8	exon 4-8dup	?	Patogén	10,69	8,92	48	Nő	18,7	23	+	[69]

Jelölések: S: saját tanulmány.

**22. táblázat:** A vizsgált vér szerinti családtagban detektált *APOB* (NM\_000384.3) eltérés és a főbb klinikai és biokémiai adatai.

Vér szerinti családtag	exon	cDNS szintű eltérés	variáns fehérje szinten	ACMG klasszifikáció	TC (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	Kor (év)	Nem	BMI	Dutch Score	Xanthoma, xanthesmasma	Referencia
30-1	26	c.10580G>A	p.Arg3527Gln	Valószínűleg Patogén	8,1	6,43	32	Ffi	n/a	12	-	[50]

## 6. Megbeszélés

### 6.1 Marfan szindrómás betegek vizsgálata során kimutatott eltérések összefoglalása

Ebben a tanulmányban 23 *FBNI* variánst azonosítottunk Marfan szindrómában vagy más kötőszöveti betegségben szenvedő betegekben. A Ghent nozológia kiváló specificitást mutat az *FBNI* variánssal rendelkező MFS betegek azonosítására [7], továbbá definiálja az *FBNI* kóroki eltérések kritériumait, ami nagyban megkönnyíti az MFS esetek körülbelül 25-30 százalékában talált új genetikai eltérések patogenitásának megítélését [32],[7].

Azokban a betegekben, akik megfelelnek a Ghent-kritériumoknak, akár 97%-os variánsdetektálási ráta is elérhető [18],[35],[34]. Az MFS klinikai diagnózisa azonban nem mindig egyszerű a következő okok miatt: i) számos olyan betegség van, melyek átfedő cardiovascularis, vázrendszeri és szemészeti tüneteket mutathatnak a Marfan szindrómával [7], ii) egyes klinikai manifesztációk életkorfüggő kialakulása [7], iii) intra- és interfamiliáris variabilitás annak tekintetében, hogy a tünetek milyen életkorban jelennek meg, milyen szöveteket érintenek és milyen súlyosságúak az adott tünetek [17]. Az *FBNI* variánsokat leggyakrabban Marfan szindrómával társítják [9], de számos Marfan-szerű fenotípussal kapcsolatban is leírtak eltéréseket, habár a detektálási ráta jóval alacsonyabb egyéb enyhe fibrillinopathiákban [34]. A fent említett okokból az *FBNI* gén tesztelése számos olyan klinikai szituáció miatt volt indokolt, melyet a mi betegpopulációnk is reprezentált. Mindösszesen 23 kóroki vagy potenciálisan kóroki eltérést detektáltunk az *FBNI* génben, beleértve a három bizonytalan jelentőségű variánst is, melyeknek hozzávetőlegesen 30 %-a korábban nem detektált, új eltérés volt. A variánsok kétharmada misszensz eltérés volt, melyek nagyrésze a cbEGF mintázatok valamelyikében helyezkedik el és körülbelül 70 százalékuk konzervált cisztein reziduomot érint, összhangban az irodalmi adatokkal [2]. A cisztein aminosavak az *FBNI* génben erősen konzerváltak a fajok között, mutatva ezzel lényeges szerepüket [72], [15], [33]. Az is ismert, hogy a ciszteint érintő variánsok nagyobb eséllyel társulnak ectopia lentis-sel összehasonlítva más aminosavakat érintő misszensz variánsokkal [73], [35]. A mi betegek között is sokkal nagyobb arányban (11/9) volt megfigyelhető ectopia lentis azokban az esetekben, ahol ciszteint érintő misszensz eltérést detektáltunk, szemben egyéb eltérésekkel (12/2).

Öt esetben azonosítottunk nem ciszteint érintő misszensz eltérést. A variánsok ezen csoportja jól példázza a genetikai eredmények interpretációjának nehézségeit. A c.4727T>C, p.(Met1576Thr) variánst korábban már leírták Marfan szindrómával és aorta gyök tágulattal összefüggésben [14], [42], de közlésre került serdülőkori idiopátiás scoliosisban is [43].

A proband (14 éves) és a nővére (16 éves) az édesapjuktól örökölték az eltérést (az édesapáról nem álltak rendelkezésre klinikai adatok), mindkettőjüknek volt scoliosisa és enyhe szisztémás érintettsége (lúdtalp, hüvelykujj tünet, ízületi lazaság). Nyilvánvaló, hogy rendszeres kardiológiai követés ajánlott, azonban kérdés, hogy az eredmény hogyan befolyásolja a nővér életmódját, aki kontaktsportot űz.

*FBNI* eltéréseket a gén teljes kódoló régiójában írtak már le. A legsúlyosabb és leggyorsabb lefolyású fenotípusos megjelenéssel a 24-32-es exonokban kialakuló variánsokat hozták összefüggésbe [74]. Két 1 év alatti betegünk esetén, egy misszensz (c.3038G>T, p.(Gly1013Val), exon 24) és egy splice site (c.3082+1G>A, intron 24) variánst azonosítottunk az *FBNI* génben (13-as és 22-es betegek). A 22-es beteg esetében az eltérést *de novo* eltérésként írtuk le, mivel a szülők vizsgálatakor nem mutattuk ki a családra jellemző eltérést. A 13-as beteg esetében az édesapa marfanoid fenotípussal rendelkezett, de nem egyezett bele a genetikai vizsgálatba.

Az ugyanezen aminosav pozíciót érintő p.(Gly1013Arg) variáns egy viszonylag gyakori visszatérő eltérés, melyet atípusos súlyos cardiovascularis, vázrendszeri manifesztációkkal, valamint ectopia lentissel összefüggésben írtak le [34],[29] [41]. Az 1013-as glicin aminosav erősen konzervált és kulcsfontosságúnak tűnik ebben a pozícióban, mely a TGFβ1bp #03 és cbEGF #11 motívumok interdomén kapcsolódási régióiban található, mutatva ezen régió kulcsszerepét [41]. A glicin 1013-as pozíciót variáns forrópontként is tekinthetjük a korai megjelenésű és súlyos fenotípusú betegek esetében.

A c.3082+1G>A splicingot befolyásoló eltérés a 24-es intronban a donor splicing helyet érinti. Egy másik szubsztitúciót (c.3082+1G>T) korábban már leírtak ebben a pozícióban egy klasszikus Marfan szindrómás betegben. Az eltérés valószínű következménye a 24-es exon kivágódása az átíródás során. Mindkét betegünk az MFS tünetspektrumának súlyos végén helyezkedett el, a tünetek korai megjelenésével az irodalmi adatoknak megfelelően. A splice helyet érintő eltérések következménye alkalmanként lehet trunkált protein, ezért hatásukat tekintve hasonlóak a nonszensz vagy az olvasási kereteltolódást okozó variánsokhoz [75],[76], míg más splice hely variánsok olvasási kereteltolódással nem járó deléciót okoznak [77]. Egy 197 beteget vizsgáló tanulmány során azt a megállapítást tették, hogy majdnem minden olyan betegnek, akinek volt korai aorta eseménye, annak splicing vagy trunkáló variánsa volt [48]. Ennek a megállapításnak fontos következményei vannak azon betegekre nézve, akik ilyen típusú eltéréseket hordoznak (a mi betegcsoportunkban összesen 30,4% volt ezen betegek aránya).

Érdekes megállapítás, hogy habár a kardiovaszkuláris komplikációk gyakoribbak ezekben a betegekben, azonban a Marfan szindróma szisztémás tüneteit kevésbé mutatják, mely késleltetheti a diagnózis felállítását.

Ismert tény, hogy az exoni csendes variánsok az *FBNI* génben exon skippinget okozhatnak [47]. Kutatásunkban egy visszatérő csendes variáns (c.3294C>T) hatását vizsgáltuk az mRNS splicingra. *FBNI* transzkript analízist végeztünk bőrbioopsziából származó megfelelő sejttípusból (fibroblaszt) izolált totál RNS-ből [78].

A c.3294C>T variánst korábban leírták az irodalomban olyan betegekben, akiknél a tünetek kötőszöveti betegségekre utaltak, de nem teljesítették a Marfan szindróma kritériumait [7]. A c.3294C>T variáns esetében nem tudtuk megerősíteni az exon skippinget és az exon-exon határok is épek voltak az mRNS vizsgálatok során. A mutáns és a vad típusú allélok aránya közel 1:1 volt a beteg genomiális és cDNS mintájában egyaránt, melyeket piroszekvenálással vizsgáltunk. Ezt a visszatérő variánst 3 egymással rokoni kapcsolatban nem álló betegben is kimutattuk. A betegek az irodalomban is leírt szisztémás fenotípusos tünetekkel rendelkeztek, ectopia lentis és aorta gyök tágulat nélkül. Ezen variáns enyhe, eddig ismeretlen hatása összhangban állhat ezzel az enyhe fenotípussal.

Összefoglalásként elmondható, hogy 26 egymással rokoni kapcsolatban nem álló Marfan szindrómás vagy egyéb kötőszöveti betegségben szenvedő beteg klinikai és molekuláris adatait írtuk le. Azonosítottunk 7 eddig nem leírt és 16 visszatérő kóroki, vagy valószínűleg kóroki variánst 23 betegben. Az *FBNI* variánsok nagy része a Marfan szindrómát okozott, kettő esetben a betegség korai és súlyos formáját.

## **6.2 Az FH-s betegek vizsgálata során kimutatott eltérések összefoglalása**

Klinikailag diagnosztizált familiáris hiperkoleszterinemiás betegeket vizsgáltunk új generációs szekvenáló módszerrel, mely nem csak a kis skálájú eltéréseket képes kimutatni, de a nagy méretű duplikációkat és deléciókat is, megfelelő bioinformatikai analízissel.

Egy variáns kivételével 39 *LDLR* variánst korábban már leírták az irodalomban. Habár a 7-es exon delécióját már leírták [79], mi meghatároztuk a töréspontokat is, ami eddig nem történt meg.

Összesen 59 egyénben mutattunk ki familiáris hiperkoleszterinemiával összefüggésbe hozható eltérést a betegek vizsgálata során. Negyvennégy proband és tizenöt családtag hordozott az ACMG kritériumok szerint patogén/valószínűleg patogén, míg két esetben bizonytalan jelentőségű variánsként tudtuk besorolni a detektált eltérést.

Az *LDLR* variánsok eloszlását tekintve a legtöbb eltérés a ligand kötő doménben és az EGF-szerű doménben helyezkedett el (11. ábra).

Tudomásunk szerint, korábban nem készült olyan tanulmány, mely a magyarországi familiáris hiperkoleszterinémiás betegek genetikai hátterét vizsgálta volna. Ami a mutációs spektrumot illeti, a magyar adatok nagy átfedést mutattak a szomszédos országok például Lengyelország és Csehország adataival. A lengyel populációban előforduló leggyakoribb *LDLR* eltérések megtalálhatóak voltak a mi beteganyagunkban is [58] [69].

A 1618G>A, p.(Ala540Thr) misszensz variánst 4 egymással nem rokon egyénben (4/37, 10,8%), és a kaszkádvizsgálatok során további 2 családtagban mutattuk ki. Ez a patogén variáns számos európai és latinamerikai populációban előfordult és gyakori eltérés volt az általunk vizsgált betegek között is. Az irodalomban közölt és a saját betegeink fenotípusa nagyon hasonló volt.

Ez az eltérés az epidermal growth factor (EGF)-prekurzor homológ doménben található. A patogenitását alátámasztja az a tény is, hogy az irodalomban számos esetben írták le korábban, valamint az eltérést homozigóta formában hordozó betegeknek súlyos klinikai tünetek voltak, úgymint korai szívkoszorúér betegség, ín xantómák és magas összkoleszterin szint [67], [80].

A c.1130G>A, p.(Cys377Tyr) misszensz variánst 3 családban detektáltuk. Először egy svéd tanulmányban írták le az eltérést [55]. A patogenitás mellett szól az is, hogy azóta további európai populációs vizsgálatokban is leírták ezt az eltérést FH-s betegekben.

Egy másik misszensz variánst a c.2054C>T, p.(Pro685Leu) eltérést szintén 3 családban mutattuk ki. Egy több mint 2000 FH-t okozó variánst leíró átfogó tanulmány szerint, ez az eltérés patogénnek tekinthető. Megjegyzendő, hogy ebben a tanulmányban 7 olyan eltérést találtak, amelyeket minden kontinensen, több országban leírtak már, és ezek egyike a c.2054C>T, p.(Pro685Leu) misszensz variáns [59]. Ez a tény arra utal, hogy az eltérés nagyon régi alapító eltérés, vagy gyakran visszatérő variáns lehet.

Két betegben detektáltuk a c.1775G>A, p.(Gly592Glu) misszensz variánst heterozigóta formában. Ezt a variánst korábban több populációban leírták, és egy korábbi tanulmány szerint alapító eltérés egy görög régióban, ahol a vizsgált betegek csaknem egyharmadánál volt jelen, és több esetben is kimutatták homozigóta formában is. Irodalmi adatok alapján ez az V-ös osztályba sorolható *LDLR* eltérés nem okoz drasztikus koleszterinszint emelkedést homozigóta formában, így arra lehet következtetni, hogy az eltérés csak kis mértékben csökkenti az *LDLR* aktivitását [57], mely hozzájárulhatott a variáns elterjedéséhez.

Az általunk kimutatott nonszensz eltéréseket korábban már leírták, mint patogén FH-t okozó variánst.

Ezek a variánsok minden esetben egy trunkált, nem működőképes formáját eredményezik az *LDLR* proteinek. Az LDL-részecskék felvétele csökken a májban és más szövetekben.

A c.-153C>T promóter variánst korábban már kimutatták cseh FH-s betegeket vizsgáló kutatásban[62].

Ez az eltérés egy konzervált, úgynevezett sterol-dependent regulatory element 2 (SRE2) szekvenciát érint az *LDLR* gén promóter régiójában. Egy luciferáz alapú funkcionális assay-vel arra a következtetésre jutottak, hogy az eltérés szignifikánsan csökkentheti az *LDLR* promóter aktivitását [62].

A c.940\_940+14del eltérést korábban egy skandináv populációt vizsgáló tanulmányban írták le, ahol a családvizsgálatok alapján együtt szegregált a betegséggel [71]. Abban a tanulmányban a klinikai kép és a családvizsgálat is igazolta a patogenitást, korai szív és érrendszeri eltérést írtak le az eltérést hordozó betegekből. Az LDL-C szintek a mi betegeinkben is nagyon magasak voltak a kezelést megelőzően (7,9-10,5 mmol/L).

A c.694+2T>C variánst korábban, mint izlandi alapító eltérést írták le, melynek eredetét a 18. századig tudták visszavezetni. Az eltérés egy konzervatív spicing helyet érint és a patogenitása szegregációs vizsgálatokkal is bizonyított [63].

Az általunk detektált, eddig nem leírt c.1706-2A>G eltérés patogenitását támasztja alá az a tény, hogy más nukleotid cserét már írtak le ebben a pozícióban (c.1706-2A>C; c.1706-2A>T). A c.1706-2A>T nukleotid cserét 2 arab családban detektálták és további vizsgálatokkal kimutatták, hogy az adenin-timin csere ebben a nukleotid pozícióban patogén, mivel nagy mértékben csökkent *LDLR* mRNS szinteket mértek a betegekből [81], továbbá az eltérés konzervált spicing helyet érint.

A c.2416dupG, p.(Val806fs\*11) frameshift variánst egy svéd populációs tanulmányban írták le, majd feltűnt pakisztáni és más populációs vizsgálatokban is. A proband betegben és további 8 családtagjában a heterozigóta FH-s betegekre jellemző emelkedett TC értéket mértek (7,8-12,9 mmol/L), míg a proband 5 éves gyermekénél a homozigótákra jellemző magas (23,2 mmol/L) TC értéket mértek és tipikus xantomái is voltak [66]. A 18-as számú betegünknek szintén markánsan emelkedett (8,1 mmol/L) TC értéke volt, továbbá koszorúér betegsége és xantelaszmája is volt, míg a 44-es beteg TC-szintje volt emelkedett (10 mmol/L).

A c.654\_656delTGG, p.(Gly219del) eltérést korábban askenázi zsidó populációban mutatták ki mint FH-t okozó alapító variánst. Az ott vizsgált betegekből kimutatott patogén eltérések 21%-át teszi ki ez a variáns [65]. Az eltérés eredményeként egy glicin aminosav deletálódik a 219. pozícióban, mely egy erősek konzervált ligand kötő doménben található.

A c.337G>T, p.(Glu113\*) eltérés az *LDLR* gén 4. exonjában található és az 1. osztályba tartozó, null allélt eredményező patogén eltérések közé sorolható. Első leírása Hobbs és munkatársai nevéhez fűződik [61].

A 1618G>A, p.(Ala540Thr) variáns egy szintén jól ismert patogén eltérés, melyet számos vizsgálatban kimutattak különböző populációkban úgymint spanyol, német, olasz vagy görög. A variáns egy korábbi genotípus fenotípus összefüggéseket vizsgáló nagyobb tanulmányban is megtalálható [80].

A c.862G>A, p.(Glu288Lys) misszensz eltérést először egy Német betegben írták le [68]. Olasz betegekben a variáns fenotípusos következményeként szignifikánsan emelkedett LDL-C érték, valamint a súlyos esetekben xantóma is megfigyelhető volt [54].

Korábban az *APOB* gén mérete miatt a célzott *APOB* tesztelés volt jellemző a leggyakoribb FH-t okozó c.10580G>A, p.(Arg3527Gln) variánsra nézve [82]. Napjainkra az új generációs szekvenálás fejlődésének köszönhetően, elérhetővé vált az *APOB* gén teljes kódoló régiójának és a splicing régióinak szekvenálása, így több FH és egyéb lipid anyagcsere zavarral összefüggő variánst is leírtak [83]. Az *APOB* génben a leggyakoribb eltérés a magyar populációban is a c.10580G>A, p.(Arg3527Gln) variáns volt, ami összhangban van az irodalmi adatokkal [82]. A teljes *APOB* gén tesztelésével, további 3 eltérést tudtunk kimutatni, melyek közül két misszensz variánst korábban még nem írtak le. Mindkét misszensz eltérést bizonytalan klinikai jelentőségű variánsként soroltuk be. A harmadik, egy olvasási kereteltolódással járó variáns (c.13242delG, p.(Leu4415\*)), melyet korábban a ClinVar adatbázisban írtak le egy alkalommal mint FH-val összefüggésbe hozott eltérés. Ez az eredmény azt tükrözi, hogy a teljes *APOB* gén szekvenálása a célzott *APOB* tesztelés helyett nagymértékben javíthatja a diagnosztikai hatékonyságot.

Vizsgálatunk egy új variánst tárt fel az *LDLR* génben, míg a magyar populációban előforduló eltérések nagy része korábban már leírásra került. A variáns típusok aránya és a génen belüli lokalizációja is nagymértékben hasonló más populációs vizsgálatokhoz. A genetikai diagnózis felállításának fontosságát jelzi, hogy a lipidcsökkentő terápia megkezdésének időpontja nagyban befolyásolhatja a várható szövődmények kialakulását és súlyosságát.

Egy nagy tanulmányból, amely 20 éven át követte a gyermekek kezelését, azt a következtetést vonták le hogy a korai kezelés nagymértékben késleltette a felnőttkori szív- és érrendszeri szövődmények megjelenésének kockázatát és a várható tünetek súlyosságát [84]. A megfelelő kezelés megkezdéséhez fontos tudni, hogy a beteg heterozigóta, összetett heterozigóta vagy homozigóta genotípusú-e. Emellett a kaszkádvizsgálattal azonosíthatók az érintett, de még tünetmentes családtagok, ami fontos a prevencióhoz és a megfelelő, időben elkezdett kezeléshez.

## 7. Összegzés

A bemutatott tanulmányokban különböző új generációs szekvenálási módszerek alkalmazhatóságát és hatékonyságát vizsgáltuk két monogénes kórképben. Mindkét betegség esetén elmondható, hogy a molekuláris genetikai vizsgálati módszerek az elmúlt 10-15 évben teljes mértékben átalakultak. Korábban az eltérések kimutatását célzó genetikai vizsgálat az ismert variánsok esetében célzott vizsgálatot, például restrikciós emésztést jelentett, addig az ismeretlen, nukleotid szintű eltérések kimutatására a költséges és időigényes Sanger féle DNS szekvenálás jelentette az egyetlen lehetőséget. Olyan nagyméretű gének esetében, mint például a 65 kódoló exonnal rendelkező *FBNI* ez rendkívül költséges és időigényes volt, hiszen minden egyes exonra meg kellett tervezni a primereket és külön-külön elvégezni a Sanger szekvenálást. Szintén nehezen kivitelezhető volt ez a megközelítés a genetikai heterogenitással rendelkező kórképek esetén, mint például a familiáris hiperkoleszterinémia, mivel a betegség háttérében nemcsak egy, hanem több gén is állhat. Ezen gének mérete pedig szintén kihívást jelentett. Sokáig itt is a variáns specifikus, vagy egy-egy rövid DNS szakasz célzott vizsgálata jelentette a DNS szintű analízist.

Ezeket a problémákat küszöbölte ki egyszerre a molekuláris diagnosztikába berobbanó új generációs szekvenáló technikák megjelenése. Immáron nem volt kizáró ok egy gén mérete, illetve az sem, ha egy adott betegség háttérében több gént is vizsgálnunk kell a kóroki eltérés keresése során.

Az első tanulmányban 26 egymással rokoni kapcsolatban nem álló egyén genotípus-fenotípus összefüggéseit írtuk le, akik Marfan szindróma vagy egyéb kötőszöveti betegség iránydiagnózisával érkeztek. A vizsgálat során két különböző új generációs szekvenáló platformot és három DNS könyvtárkészítési módszert használtunk. Összesen 23 betegben azonosítottunk valamilyen kóroki vagy potenciálisan kóroki eltérést az *FBNI* génben, melyek közül 16 visszatérő variáns volt, 7 eltérést pedig korábban még nem írtak le. Az általunk kimutatott eltéréseket összevetettük az irodalmi adatokkal. Az esetek nagyrésztében az *FBNI* variánsok Marfan szindrómával társultak, 2 esetben pedig a szindróma súlyos, korai megjelenésű (neonatális) formájával. Marfan szindróma esetén nagy jelentősége lehet a patogén eltérések azonosításának, mivel rendkívül fontos a várható következmények miatt a pontos genotípus-fenotípus összefüggés felismerése. A patogén variáns ismeretében az irodalmi adatok jó támpontot nyújthatnak abban, hogy a várható szövödményeket megelőzzék, illetve késleltessék. Sok esetben szoros kardiológia, szemészeti és ortopédiai követés ajánlott a betegeknek.

A súlyos aortaérintettség miatt szintén fontos szerep jut a genetikai diagnózisnak az esetleges műtéti beavatkozások tekintetében.

A második tanulmányban a magyarországi familiáris hiperkoleszterinémias betegek genetikai hátterét igyekeztünk feltérképezni. Mivel a betegség hátterében több gén patogén eltérése is felmerül ezért a kórképpel kapcsolatba hozható géneket vizsgáló kitet használtunk a minták analízisére. Összesen 44 beteg esetében tudtunk kóroki vagy valószínűleg kóroki eltéréseket kimutatni. Hét beteg az *APOB*, míg 37 beteg az *LDLR* génben hordozott valamilyen eltérést. Három beteg esetében összetett heterozigóta genotípus igazolódott, mely magyarázta a súlyosabb klinikai tüneteket. Bemutattuk a betegek főbb klinikai paramétereit és a genotípus-fenotípus összefüggéseit. Két-két *LDLR* és *APOB* eltérés detektáltunk, melyek korábban még nem kerültek leírásra. A familiáris hiperkoleszterinémia hátterében álló leírt és nem leírt variánsokat összehasonlítottuk az irodalmi adatokkal. Meghatároztuk továbbá egy 1 exont érintő deléció pontos töréspontjait is. A familiáris hiperkoleszterinémia korai felismerése rendkívül fontos. A betegség még mindig rendkívül aluldiagnosztizált és későn vagy egyáltalán nem kerül felismerésre a végzetes kimenetelű kardiovaszkuláris szövődmények miatt. A korai életkorban (főleg gyerekkorban) felismert FH időben elindított lipidcsökkentő kezelése esetlegesen rendelkezésre álló célzott gyógyszerterápia, valamint a diéta és a szoros követés mind hozzájárulhat ahhoz, hogy a betegek jó életminőségben és kisebb kardiovaszkuláris kockázattal élhessenek. Szintén hangsúlyozni szükséges a genetikai tanácsadás fontosságát, hiszen az érintett családtagok felvilágosítása és szűrése kiemelkedő fontosságú a lehetséges szövődmények miatt.

## 8. Summary

In the presented studies we investigated the applicability and efficiency of different next generation sequencing methods in two monogenic diseases.

In the first study we described genotype-phenotype correlations of 26 unrelated individuals who were clinically diagnosed with Marfan syndrome or another connective tissue disease. Two different next-generation sequencing platforms and three DNA library preparation methods were used in the investigation. In the case of 23 patients we identified pathogenic or potentially pathogenic variants in the FBN1 gene, of which 16 were recurrent and 7 had not been described before. Mutational spectrum data were compared to literature data. In the majority of cases, FBN1 mutations were associated with MFS syndrome, in 2 cases with the severe, early-onset (neonatal) form of the syndrome.

In the other study, we investigated the genetic background of patients with familial hypercholesterolemia in Hungary. Genetic analysis was performed with a kit applicable for detecting variants in genes associated with FH. Pathogenic or potentially pathogenic variants were detected in 44 patients, APOB gene mutations in 7 and LDLR gene mutations in 37 patients. Compound heterozygous genotype was found in 3 patients explaining their more severe clinical symptoms. We also described main clinical parameters of the patients as well as the genotype-phenotype correlations. We detected 2 novel LDLR and 2 APOB mutations. The variants associated with familial hypercholesterolemia were also compared with literature data.

## 9. Az értekezés új megállapításai

1) Különböző típusú új generációs DNS szekvenálási platformok segítségével meghatároztuk 23 beteg esetében a Marfan szindróma vagy egyéb társult kötőszöveti betegség genetikai hátterét. Ennek során 7 esetben írtunk le olyan *FBNI* eltérést, melyet az irodalomban eddig nem közöltek. Kísérletes munkával vizsgáltuk egy visszatérő csendes variáns patogenitását genomiai DNS, valamint fibroblasztokból izolált RNS felhasználásával cDNS mintákon, melynek alapján végül az eltérést benignus variánsként soroltuk be. A Marfan szindróma hátterében álló gének mérete és száma miatt korábban nem térképezték fel a magyar betegek genetikai hátterét így nem állt rendelkezésre információ a variánsokról és azok várható következményeiről. A detektált eltéréseket összehasonlítottuk az irodalmi adatokkal.

2) Vizsgáltuk magyarországi familiáris hiperkoleszterinémiában szenvedő betegek genetikai hátterét. Korábban nem állt rendelkezésre adat a magyar FH-s populáció genetikai hátterét illetően így ez a tanulmány fontos, az irodalmi adatokkal és más populációs vizsgálatokkal összehasonlítható eredményeket adott. A betegség genetikai hátterének felderítése segíti a klinikai döntéshozatal is az esetleges terápiák és a várható fenotípusos tünetek tekintetében. Leírásra kerültek új eltérések melyek a familiáris hiperkoleszterinémia hátterében állhatnak. Az *APOB* génben két misszensz eltérést a (c.8213T>A, p.(Ile2738Lys)) és a (c.10438A>G, p.(Lys3480Glu)) variánst, míg az *LDLR* génben egy új splicing eltérést (c.1706-2A>G) és egy 1 exonos deléciót (c.941-190\_c.1061-270del) mutattunk ki.

3) Mindkét tanulmány során egyértelművé vált, hogy a korábbi hagyományos Sanger szekvenáló módszert ki fogják szorítani a különböző új generációs szekvenáló készülékek. A nagy áteresztőképesség és a költséghatékony működtetés lehetővé tette olyan, eddig nem vizsgált betegségek genetikai hátterének rutinszerű vizsgálatát, melyeket korábban a gének mérete és /vagy száma miatt túl költséges és rendkívül időigényes volt vizsgálni.

## 10. Irodalomjegyzék

1. Yetman, A.T.; Bornemeier, R.A.; McCrindle, B.W. Long-Term Outcome in Patients with Marfan Syndrome: Is Aortic Dissection the Only Cause of Sudden Death? *Journal of the American College of Cardiology* **2003**, *41*, 329–332.
2. Robinson, P.; Godfrey, M. The Molecular Genetics of Marfan Syndrome and Related Microfibrilopathies. *J Med Genet* **2000**, *37*, 9–25, doi:10.1136/jmg.37.1.9.
3. Dietz, H.; Pyeritz, R. Mutations in the Human Gene for Fibrillin-1 (FBN1) in the Marfan Syndrome and Related Disorders. *Human Molecular Genetics* **1995**, *4*, 1799–1809.
4. Groth, K.A.; Hove, H.; Kyhl, K.; Folkestad, L.; Gaustadnes, M.; Vejlstrup, N.; Stochholm, K.; Østergaard, J.R.; Andersen, N.H.; Gravholt, C.H. Prevalence, Incidence, and Age at Diagnosis in Marfan Syndrome. *Orphanet J Rare Dis* **2015**, *10*, 153.
5. Silverman, D.I.; Gray, J.; Roman, M.J.; Bridges, A.; Burton, K.; Boxer, M.; Devereux, R.B.; Tsipouras, P. Family History of Severe Cardiovascular Disease in Marfan Syndrome Is Associated with Increased Aortic Diameter and Decreased Survival. *Journal of the American College of Cardiology* **1995**, *26*, 1062–1067.
6. Tsipouras, P.; Silverman, D.I. THE GENETIC BASIS OF AORTIC DISEASE: Marfan Syndrome and Beyond. *Cardiology Clinics* **1999**, *17*, 683–696.
7. Loeys, B.L.; Dietz, H.C.; Braverman, A.C.; Callewaert, B.L.; De Backer, J.; Devereux, R.B.; Hilhorst-Hofstee, Y.; Jondeau, G.; Faivre, L.; Milewicz, D.M.; et al. The Revised Ghent Nosology for the Marfan Syndrome. *J Med Genet* **2010**, *47*, 476–485.
8. De Paepe, A.; Devereux, R.B.; Dietz, H.C.; Hennekam, R.C.; Pyeritz, R.E. Revised Diagnostic Criteria for the Marfan Syndrome. *Am J Med Genet* **1996**, *62*, 417–426.
9. Dietz, H.C.; Cutting, C.R.; Pyeritz, R.E.; Maslen, C.L.; Sakai, L.Y.; Corson, G.M.; Puffenberger, E.G.; Hamosh, A.; Nanthakumar, E.J.; Curristin, S.M.; et al. Marfan Syndrome Caused by a Recurrent de Novo Missense Mutation in the Fibrillin Gene. *Nature* **1991**, *352*, 337–339.
10. Fibrillin, a New 350-KD Glycoprotein, Is a Component of Extracellular Microfibrils. *J Cell Biol* **1986**, *103*, 2499–2509.
11. Pereira, L.; D’Alessio, M.; Ramirez, F.; R.Lynch, J.; Sykes, B.; Pangilinan, T.; Bonadio, J. Genomic Organization of the Sequence Coding for Fibrillin, the Defective Gene Product in Marfan Syndrome. *Human Molecular Genetics* **1993**, *2*, 961–968.
12. Handford, P.A.; Mayhew, M.; Baron, M.; Winship, P.R.; Campbell, I.D.; Brownlee, G.G. Key Residues Involved in Calcium-Binding Motifs in EGF-like Domains. *Nature* **1991**, *351*, 164–167.
13. Kanzaki, T.; Olofsson, A.; Morén, A.; Wernstedt, C.; Hellman, U.; Miyazono, K.; Claesson-Welsh, L.; Heldin, C.-H. TGF- $\beta$ 1 Binding Protein: A Component of the Large Latent Complex of TGF- $\beta$ 1 with Multiple Repeat Sequences. *Cell* **1990**, *61*, 1051–1061.

14. Rommel, K.; Karck, M.; Haverich, A.; von Kodolitsch, Y.; Rybczynski, M.; Müller, G.; Singh, K.K.; Schmidtke, J.; Arslan-Kirchner, M. Identification of 29 Novel and Nine Recurrent Fibrillin-1 (FBN1) Mutations and Genotype–Phenotype Correlations in 76 Patients with Marfan Syndrome. *Human Mutation* **2005**, *26*, 529–539.
15. Hayward, C.; Porteous, M.E.; Brock, D.J.H. Mutation Screening of All 65 Exons of the Fibrillin-1 Gene in 60 Patients with Marfan Syndrome: Report of 12 Novel Mutations. *Human Mutation* **1997**, *10*, 280–289.
16. Biery, N.J.; Eldadah, Z.A.; Moore, C.S.; Stetten, G.; Spencer, F.; Dietz, H.C. Revised Genomic Organization Of FBN1 and Significance for Regulated Gene Expression. *Genomics* **1999**, *56*, 70–77.
17. Faivre, L.; Collod-Beroud, G.; Loeys, B.L.; Child, A.; Binquet, C.; Gautier, E.; Callewaert, B.; Arbustini, E.; Mayer, K.; Arslan-Kirchner, M.; et al. Effect of Mutation Type and Location on Clinical Outcome in 1,013 Probands with Marfan Syndrome or Related Phenotypes and FBN1 Mutations: An International Study. *Am J Hum Genet* **2007**, *81*, 454–466.
18. Arslan-Kirchner, M.; Arbustini, E.; Boileau, C.; Child, A.; Collod-Beroud, G.; De Paepe, A.; Epplen, J.; Jondeau, G.; Loeys, B.; Faivre, L. Clinical Utility Gene Card for: Marfan Syndrome Type 1 and Related Phenotypes [FBN1]. *Eur J Hum Genet* **2010**.
19. De Backer, J.; Loeys, B.; Leroy, B.; Coucke, P.; Dietz, H.; De Paepe, A. Utility of Molecular Analyses in the Exploration of Extreme Intrafamilial Variability in the Marfan Syndrome. *Clin Genet* **2007**, *72*, 188–198.
20. Faivre, L.; Collod-Beroud, G.; Child, A.; Callewaert, B.; Loeys, B.L.; Binquet, C.; Gautier, E.; Arbustini, E.; Mayer, K.; Arslan-Kirchner, M.; et al. Contribution of Molecular Analyses in Diagnosing Marfan Syndrome and Type I Fibrillinopathies: An International Study of 1009 Probands. *Journal of Medical Genetics* **2008**.
21. Paragh, G.; Harangi, M.; Karányi, Z.; Daróczy, B.; Németh, Á.; Fülöp, P. Identifying Patients with Familial Hypercholesterolemia Using Data Mining Methods in the Northern Great Plain Region of Hungary. *Atherosclerosis* **2018**, *277*, 262–266.
22. Nordestgaard, B.G.; Chapman, M.J.; Humphries, S.E.; Ginsberg, H.N.; Masana, L.; Descamps, O.S.; Wiklund, O.; Hegele, R.A.; Raal, F.J.; Defesche, J.C.; et al. Familial Hypercholesterolaemia Is Underdiagnosed and Undertreated in the General Population: Guidance for Clinicians to Prevent Coronary Heart Disease: Consensus Statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J* **2013**, *34*, 3478–3490a.
23. Cuchel, M.; Bruckert, E.; Ginsberg, H.N.; Raal, F.J.; Santos, R.D.; Hegele, R.A.; Kuivenhoven, J.A.; Nordestgaard, B.G.; Descamps, O.S.; Steinhagen-Thiessen, E.; et al. Homozygous Familial Hypercholesterolaemia: New Insights and Guidance for Clinicians to Improve Detection and Clinical Management. A Position Paper from the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J* **2014**, *35*, 2146–2157.

24. Soria, L.F.; Ludwig, E.H.; Clarke, H.R.; Vega, G.L.; Grundy, S.M.; McCarthy, B.J. Association between a Specific Apolipoprotein B Mutation and Familial Defective Apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1989**, *86*, 587–591.
25. Gent, J.; Braakman, I. Low-Density Lipoprotein Receptor Structure and Folding. *Cell Mol Life Sci* **2004**, *61*, 2461–2470.
26. Galicia-Garcia, U.; Benito-Vicente, A.; Uribe, K.B.; Jebari, S.; Larrea-Sebal, A.; Alonso-Estrada, R.; Aguilo-Arce, J.; Ostolaza, H.; Palacios, L.; Martin, C. Mutation Type Classification and Pathogenicity Assignment of Sixteen Missense Variants Located in the EGF-Precursor Homology Domain of the LDLR. *Sci Rep* **2020**, *10*, 1727.
27. Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1977**, *74*, 5463–5467.
28. Ivády, G.; Madar, L.; Dzsudzsák, E.; Koczok, K.; Kappelmayer, J.; Krulisova, V.; Macek, M.; Horváth, A.; Balogh, I. Analytical Parameters and Validation of Homopolymer Detection in a Pyrosequencing-Based next Generation Sequencing System. *BMC Genomics* **2018**, *19*, 158.
29. Nijbroek, G.; Sood, S.; McIntosh, I.; Francomano, C.A.; Bull, E.; Pereira, L.; Ramirez, F.; Pyeritz, R.E.; Dietz, H.C. Fifteen Novel FBN1 Mutations Causing Marfan Syndrome Detected by Heteroduplex Analysis of Genomic Amplicons. *Am J Hum Genet* **1995**, *57*, 8–21.
30. Stheneur, C.; Collod-Béroud, G.; Faivre, L.; Buyck, J.F.; Gouya, L.; Le Parc, J.-M.; Moura, B.; Muti, C.; Grandchamp, B.; Sultan, G.; et al. Identification of the Minimal Combination of Clinical Features in Proband for Efficient Mutation Detection in the FBN1 Gene. *Eur J Hum Genet* **2009**, *17*, 1121–1128.
31. Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; Spector, E.; et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* **2015**, *17*, 405–424.
32. Comeglio, P.; Johnson, P.; Arno, G.; Brice, G.; Evans, A.; Aragon-Martin, J.; Silva, F.P. da; Kiotsekoglou, A.; Child, A. The Importance of Mutation Detection in Marfan Syndrome and Marfan-Related Disorders: Report of 193 FBN1 Mutations. *Human Mutation* **2007**, *28*, 928–928.
33. Kilpatrick, M.W.; Lembessis, P.; Rose, E.; Tsiouras, P. A Novel G to A Substitution at Nucleotide 1734 of the FBN1 Gene Predicting a C534Y Mutation Responsible for Marfan Syndrome. *HHE* **1999**, *49*, 176–177.
34. Loeys, B.; Nuytinck, L.; Delvaux, I.; De Bie, S.; De Paepe, A. Genotype and Phenotype Analysis of 171 Patients Referred for Molecular Study of the Fibrillin-1 Gene FBN1 Because of Suspected Marfan Syndrome. *Archives of Internal Medicine* **2001**, *161*, 2447–2454.
35. Loeys, B.; De Backer, J.; Van Acker, P.; Wettinck, K.; Pals, G.; Nuytinck, L.; Coucke, P.; De Paepe, A. Comprehensive Molecular Screening of the FBN1 Gene Favors Locus Homogeneity of Classical Marfan Syndrome. *Human Mutation* **2004**, *24*, 140–146.

36. Song, S.; Zhao, B.; Li, S.; Zhang, J.; Wang, H.; Jia, C.; Zhang, F.; Zhang, X.; Xie, J. [Mutation analysis and prenatal diagnosis of FBN1 gene mutations for four patients with Marfan syndrome]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* **2013**, *30*, 534–538.
37. Sui, R.; Wei, H.; Zhao, J.; Hu, S.; Wang, B.; Huang, S.; Dong, M. [Novel mutation of fibrillin 1 gene cause ectopia lentis in a Chinese family]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* **2004**, *40*, 828–831.
38. Dong, J.; Bu, J.; Du, W.; Li, Y.; Jia, Y.; Li, J.; Meng, X.; Yuan, M.; Peng, X.; Zhou, A.; et al. A New Novel Mutation in FBN1 Causes Autosomal Dominant Marfan Syndrome in a Chinese Family. *Mol Vis* **2012**, *18*, 81–86.
39. Li, Z.; Zhou, C.; Tan, L.; Chen, P.; Cao, Y.; Li, X.; Yan, J.; Zeng, H.; Wang, D.-W.; Wang, D.-W. A Targeted Sequencing Approach to Find Novel Pathogenic Genes Associated with Sporadic Aortic Dissection. *Sci. China Life Sci.* **2018**, *61*, 1545–1553.
40. Yang, H.; Luo, M.; Fu, Y.; Cao, Y.; Yin, K.; Li, W.; Meng, C.; Ma, Y.; Zhang, J.; Fan, Y.; et al. Genetic Testing of 248 Chinese Aortopathy Patients Using a Panel Assay. *Sci Rep* **2016**, *6*, 33002.
41. Tiecke, F.; Katzke, S.; Booms, P.; Robinson, P.N.; Neumann, L.; Godfrey, M.; Mathews, K.R.; Scheuner, M.; Hinkel, G.K.; Brenner, R.E.; et al. Classic, Atypically Severe and Neonatal Marfan Syndrome: Twelve Mutations and Genotype-Phenotype Correlations in FBN1 Exons 24-40. *Eur J Hum Genet* **2001**, *9*, 13–21.
42. Sheikhzadeh, S.; Kade, C.; Keyser, B.; Stuhmann, M.; Arslan-Kirchner, M.; Rybczynski, M.; Bernhardt, A.; Habermann, C.; Hillebrand, M.; Mir, T.; et al. Analysis of Phenotype and Genotype Information for the Diagnosis of Marfan Syndrome. *Clinical Genetics* **2012**, *82*, 240–247.
43. Buchan, J.G.; Alvarado, D.M.; Haller, G.E.; Cruchaga, C.; Harms, M.B.; Zhang, T.; Willing, M.C.; Grange, D.K.; Braverman, A.C.; Miller, N.H.; et al. Rare Variants in FBN1 and FBN2 Are Associated with Severe Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Hum Mol Genet* **2014**, *23*, 5271–5282.
44. Kim, K.L.; Yang, J.H.; Song, S.-H.; Kim, J.Y.; Jang, S.Y.; Kim, J.-M.; Kim, J.-A.; Sung, K.-I.; Kim, Y.-W.; Suh, Y.-L.; et al. Positive Correlation Between the Dysregulation of Transforming Growth Factor- $\beta_1$  and Aneurysmal Pathological Changes in Patients With Marfan Syndrome. *Circulation Journal* **2013**, *77*, 952–958.
45. Neptune, E.R.; Frischmeyer, P.A.; Arking, D.E.; Myers, L.; Bunton, T.E.; Gayraud, B.; Ramirez, F.; Sakai, L.Y.; Dietz, H.C. Dysregulation of TGF- $\beta$  Activation Contributes to Pathogenesis in Marfan Syndrome. *Nat Genet* **2003**, *33*, 407–411.
46. Biggin, A.; Holman, K.; Brett, M.; Bennetts, B.; Adès, L. Detection of Thirty Novel FBN1 Mutations in Patients with Marfan Syndrome or a Related Fibrillinopathy. *Human Mutation* **2004**, *23*, 99–99.
47. Liu, W.O.; Oefner, P.J.; Qian, C.; Odom, R.S.; Francke, U. Denaturing HPLC-Identified Novel FBN1 Mutations, Polymorphisms, and Sequence Variants in Marfan Syndrome and Related Connective Tissue Disorders. *Genet Test* **1997**, *1*, 237–242.

48. Baudhuin, L.M.; Kotzer, K.E.; Lagerstedt, S.A. Increased Frequency of FBN1 Truncating and Splicing Variants in Marfan Syndrome Patients with Aortic Events. *Genetics in Medicine* **2015**, *17*, 177–187.
49. Howarth, R.; Yearwood, C.; Harvey, J.F. Application of DHPLC for Mutation Detection of the Fibrillin-1 Gene for the Diagnosis of Marfan Syndrome in a National Health Service Laboratory. *Genetic Testing* **2007**, *11*, 146–152.
50. Tybjærg-Hansen, A.; Humphries, S.E. Familial Defective Apolipoprotein B-100: A Single Mutation That Causes Hypercholesterolemia and Premature Coronary Artery Disease. *Atherosclerosis* **1992**, *96*, 91–107.
51. Khajavi, M.; Inoue, K.; Lupski, J.R. Nonsense-Mediated mRNA Decay Modulates Clinical Outcome of Genetic Disease. *Eur J Hum Genet* **2006**, *14*, 1074–1081.
52. Rimbart, A.; Vanhoye, X.; Coulibaly, D.; Marrec, M.; Pichelin, M.; Charrière, S.; Peretti, N.; Valéro, R.; Wargny, M.; Carrié, A.; et al. Phenotypic Differences Between Polygenic and Monogenic Hypobetalipoproteinemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2021**, *41*, e63–e71.
53. Weiss, N.; Binder, G.; Keller, C. Mutations in the Low-Density-Lipoprotein Receptor Gene in German Patients with Familial Hypercholesterolaemia. *J Inherit Metab Dis* **2000**, *23*, 778–790.
54. Bertolini, S.; Pisciotta, L.; Rabacchi, C.; Cefalù, A.B.; Noto, D.; Fasano, T.; Signori, A.; Fresa, R.; Aversa, M.; Calandra, S. Spectrum of Mutations and Phenotypic Expression in Patients with Autosomal Dominant Hypercholesterolemia Identified in Italy. *Atherosclerosis* **2013**, *227*, 342–348.
55. Ekström, U.; Abrahamson, M.; Wallmark, A.; Florén, C.H.; Nilsson-Ehle, P. Mutations in the Low-Density Lipoprotein Receptor Gene in Swedish Familial Hypercholesterolaemia Patients: Clinical Expression and Treatment Response. *Eur J Clin Invest* **1998**, *28*, 740–747.
56. Bochmann, H.; Geisel, J.; Herrmann, W.; Purcz, T.; Reuter, W.; Julius, U.; Metzler, W.; Bergmann, S.; Jaross, W.; Gehrisch, S. Eight Novel LDL Receptor Gene Mutations among Patients under LDL Apheresis in Dresden and Leipzig. *Human Mutation* **2001**, *17*, 76–77.
57. Miltiadous, G.; Elisaf, M.; Bairaktari, H.; Xenophontos, S.L.; Manoli, P.; Cariolou, M.A. Characterization and Geographic Distribution of the Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR) Gene Mutations in Northwestern Greece. *Hum Mutat* **2001**, *17*, 432–433.
58. Tichý, L.; Freiburger, T.; Zapletalová, P.; Soška, V.; Ravčuková, B.; Fajkusová, L. The Molecular Basis of Familial Hypercholesterolemia in the Czech Republic: Spectrum of LDLR Mutations and Genotype-Phenotype Correlations. *Atherosclerosis* **2012**, *223*, 401–408.
59. Chora, J.R.; Medeiros, A.M.; Alves, A.C.; Bourbon, M. Analysis of Publicly Available LDLR, APOB, and PCSK9 Variants Associated with Familial Hypercholesterolemia: Application of ACMG Guidelines and Implications for Familial Hypercholesterolemia Diagnosis. *Genet Med* **2018**, *20*, 591–598.
60. Usifo, E.; Leigh, S.E.A.; Whittall, R.A.; Lench, N.; Taylor, A.; Yeats, C.; Orenge, C.A.; Martin, A.C.R.; Celli, J.; Humphries, S.E. Low-Density Lipoprotein Receptor Gene Familial

- Hypercholesterolemia Variant Database: Update and Pathological Assessment. *Ann Hum Genet* **2012**, *76*, 387–401.
61. Hobbs, H.H.; Brown, M.S.; Goldstein, J.L. Molecular Genetics of the LDL Receptor Gene in Familial Hypercholesterolemia. *Hum Mutat* **1992**, *1*, 445–466.
  62. Francová, H.; Trbusek, M.; Zapletalová, P.; Kuhrová, V. New Promoter Mutations in the Low-Density Lipoprotein Receptor Gene Which Induce Familial Hypercholesterolaemia Phenotype: Molecular and Functional Analysis. *J Inherit Metab Dis* **2004**, *27*, 523–528.
  63. Gudnason, V.; Sigurdsson, G.; Nissen, H.; Humphries, S.E. Common Founder Mutation in the LDL Receptor Gene Causing Familial Hypercholesterolaemia in the Icelandic Population. *Hum Mutat* **1997**, *10*, 36–44.
  64. Bourbon, M.; Alves, A.C.; Medeiros, A.M.; Silva, S.; Soutar, A.K. Familial Hypercholesterolaemia in Portugal. *Atherosclerosis* **2008**, *196*, 633–642.
  65. Meiner, V.; Landsberger, D.; Berkman, N.; Reshef, A.; Segal, P.; Seftel, H.C.; van der Westhuyzen, D.R.; Jeenah, M.S.; Coetzee, G.A.; Leitersdorf, E. A Common Lithuanian Mutation Causing Familial Hypercholesterolemia in Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet* **1991**, *49*, 443–449.
  66. Ajmal, M.; Ahmed, W.; Sadeque, A.; Ali, S.H.B.; Bokhari, S.H.; Ahmed, N.; Qamar, R. Identification of a Recurrent Insertion Mutation in the LDLR Gene in a Pakistani Family with Autosomal Dominant Hypercholesterolemia. *Mol Biol Rep* **2010**, *37*, 3869–3875.
  67. Mehta, R.; Zubirán, R.; Martagón, A.J.; Vazquez-Cárdenas, A.; Segura-Kato, Y.; Tusié-Luna, M.T.; Aguilar-Salinas, C.A. The Panorama of Familial Hypercholesterolemia in Latin America: A Systematic Review. *J Lipid Res* **2016**, *57*, 2115–2129.
  68. Ehardt, M.; Schmidt, H.; Doerk, T.; Tietge, U.; Haas, R.; Manns, M.P.; Schmidtke, J.; Stuhmann, M. Mutation Analysis in 46 German Families with Familial Hypercholesterolemia: Identification of 8 New Mutations. Mutations in Brief No. 226. Online. *Hum Mutat* **1999**, *13*, 257.
  69. Chmara, M.; Wasag, B.; Zuk, M.; Kubalska, J.; Wegrzyn, A.; Bednarska-Makaruk, M.; Pronicka, E.; Wehr, H.; Defesche, J.C.; Rynkiewicz, A.; et al. Molecular Characterization of Polish Patients with Familial Hypercholesterolemia: Novel and Recurrent LDLR Mutations. *J Appl Genet* **2010**, *51*, 95–106.
  70. Fouchier, S.W.; Defesche, J.C.; Umans-Eckenhuis, M.W.; Kastelein, J.P. The Molecular Basis of Familial Hypercholesterolemia in The Netherlands. *Hum Genet* **2001**, *109*, 602–615.
  71. Maglio, C.; Mancina, R.M.; Motta, B.M.; Stef, M.; Pirazzi, C.; Palacios, L.; Askaryar, N.; Borén, J.; Wiklund, O.; Romeo, S. Genetic Diagnosis of Familial Hypercholesterolaemia by Targeted Next-Generation Sequencing. *J Intern Med* **2014**, *276*, 396–403.
  72. Corson, G.M.; Charbonneau, N.L.; Keene, D.R.; Sakai, L.Y. Differential Expression of Fibrillin-3 Adds to Microfibril Variety in Human and Avian, but Not Rodent, Connective Tissues. *Genomics* **2004**, *83*, 461–472.

73. Faivre, L.; Collod-Beroud, G.; Adès, L.; Arbustini, E.; Child, A.; Callewaert, B.; Loeys, B.; Binquet, C.; Gautier, E.; Mayer, K.; et al. The New Ghent Criteria for Marfan Syndrome: What Do They Change? *Clinical Genetics* **2012**, *81*, 433–442.
74. Booms, P.; Cisler, J.; Mathews, K.R.; Godfrey, M.; Tiecke, F.; Kaufmann, U.C.; Vetter, U.; Hagemeyer, C.; Robinson, P.N. Novel Exon Skipping Mutation in the Fibrillin-1 Gene: Two ‘Hot Spots’ for the Neonatal Marfan Syndrome. *Clinical Genetics* **1999**, *55*, 110–117.
75. Dietz, H.C.; McIntosh, I.; Sakai, L.Y.; Corson, G.M.; Chalberg, S.C.; Pyeritz, R.E.; Francomano, C.A. Four Novel FBN1 Mutations: Significance for Mutant Transcript Level and EGF-like Domain Calcium Binding in the Pathogenesis of Marfan Syndrome. *Genomics* **1993**, *17*, 468–475.
76. Guo, D.; Tan, F.K.; Cantu, A.; Plon, S.E.; Milewicz, D.M. FBN1 Exon 2 Splicing Error in a Patient with Marfan Syndrome. *Am J Med Genet* **2001**, *101*, 130–134.
77. Liu, W.; Qian, C.; Comeau, K.; Brenn, T.; Furthmayr, H.; Francke, U. Mutant Fibrillin-1 Monomers Lacking EGF-like Domains Disrupt Microfibril Assembly and Cause Severe Marfan Syndrome. *Hum Mol Genet* **1996**, *5*, 1581–1587.
78. Summers, K.M.; West, J.A.; Hattam, A.; Stark, D.; McGill, J.J.; West, M.J. Recent Developments in the Diagnosis of Marfan Syndrome and Related Disorders. *Med J Aust* **2012**, *197*, 494–497.
79. Sun, X.M.; Webb, J.C.; Gudnason, V.; Humphries, S.; Seed, M.; Thompson, G.R.; Knight, B.L.; Soutar, A.K. Characterization of Deletions in the LDL Receptor Gene in Patients with Familial Hypercholesterolemia in the United Kingdom. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology* **1992**, *12*, 762–770.
80. Sun, X.M.; Patel, D.D.; Knight, B.L.; Soutar, A.K. Influence of Genotype at the Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor Gene Locus on the Clinical Phenotype and Response to Lipid-Lowering Drug Therapy in Heterozygous Familial Hypercholesterolaemia. The Familial Hypercholesterolaemia Regression Study Group. *Atherosclerosis* **1998**, *136*, 175–185.
81. Shawar, S.M.; Al-Drees, M.A.; Ramadan, A.R.; Ali, N.H.; Alfadhli, S.M. The Arabic Allele: A Single Base Pair Substitution Activates a 10-Base Downstream Cryptic Splice Acceptor Site in Exon 12 of LDLR and Severely Decreases LDLR Expression in Two Unrelated Arab Families with Familial Hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* **2012**, *220*, 429–436.
82. Kalina, A.; Császár, A.; Czeizel, A.E.; Romics, L.; Szabóki, F.; Szalai, C.; Reiber, I.; Németh, A.; Stephenson, S.; Williams, R.R. Frequency of the R3500Q Mutation of the Apolipoprotein B-100 Gene in a Sample Screened Clinically for Familial Hypercholesterolemia in Hungary. *Atherosclerosis* **2001**, *154*, 247–251.
83. Alves, A.C.; Benito-Vicente, A.; Medeiros, A.M.; Reeves, K.; Martin, C.; Bourbon, M. Further Evidence of Novel APOB Mutations as a Cause of Familial Hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* **2018**, *277*, 448–456.

84. Luirink, I.K.; Wiegman, A.; Kusters, D.M.; Hof, M.H.; Groothoff, J.W.; de Groot, E.; Kastelein, J.J.P.; Hutten, B.A. 20-Year Follow-up of Statins in Children with Familial Hypercholesterolemia. *New England Journal of Medicine* **2019**, *381*, 1547–1556.

## 11. Publikációs lista



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/93/2023.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Madar László  
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10060418

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Madar, L.**, Juhász, L., Szűcs, Z., Kerkovits, L., Harangi, M., Balogh, I.: Establishing the Mutational Spectrum of Hungarian Patients with Familial Hypercholesterolemia.  
*Genes*. 13 (1), 1-13, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/genes13010153>  
IF: 4.141 (2021)
2. **Madar, L.**, Szakszon, K., Pfliegler, G., P. Szabó, G., Brúgós, B., Ronen, N., Papp, J., Zahuczky, K., Szakos, E., Fekete, G., Oláh, É., Koczok, K., Balogh, I.: FBN1 gene mutations in 26 Hungarian patients with suspected Marfan syndrome or related fibrillinopathies.  
*J. Biotechnol.* 301, 105-111, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.05.012>  
IF: 3.503

### További közlemények

3. Deák, A., Koczok, K., Bessenyei, B., Szűcs, Z., **Madar, L.**, Csorba, G. É., Orosz, O., Laki, I., Halász, A., Marsal, G., Balogh, I.: A magyar Cystás Fibrosis Regiszter genetikai revíziója.  
*Orv. hetil.* 163 (51), 2052-2059, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2022.32655>  
IF: 0.707 (2021)
4. Szabó, T. M., Balogh, I., Ujfalusi, A., Szűcs, Z., **Madar, L.**, Koczok, K., Bessenyei, B., Csürke, I., Szakszon, K.: Helmoortel-Van der Aa Syndrome: Cardiothoracic and Ectodermal Manifestations in Two Patients as Further Support of a Previous Observation on Phenotypic Overlap with RASopathies.  
*Genes*. 13 (12), 1-13, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/genes13122367>  
IF: 4.141 (2021)



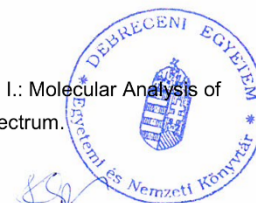


5. Gaál, Z., Szűcs, Z., Kántor, I., Luczay, A., Tóth, H. P., Benn, O., Felszeghy, E. N., Karádi, Z., **Madar, L.**, Balogh, I.: A Comprehensive Analysis of Hungarian MODY Patients-Part I: Gene Panel Sequencing Reveals Pathogenic Mutations in HNF1A, HNF1B, HNF4A, ABCC8 and INS Genes.  
*Life (Basel)*. 11 (755), 1-13, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/life11080755>  
IF: 3.251
6. Gaál, Z., Szűcs, Z., Kántor, I., Luczay, A., Tóth, H. P., Benn, O., Felszeghy, E. N., Karádi, Z., **Madar, L.**, Balogh, I.: A Comprehensive Analysis of Hungarian MODY Patients-Part II: glucokinase MODY Is the Most Prevalent Subtype Responsible for about 70% of Confirmed Cases.  
*Life (Basel)*. 11 (8), 1-20, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/life11080771>  
IF: 3.251
7. Mokánszki, A., Chang Chien, Y. C., Mótyán, J. A., Juhász, P., Bádon, E. S., **Madar, L.**, Szegedi, I., Kiss, C., Méhes, G.: Novel RB1 and MET Gene Mutations in a Case with Bilateral Retinoblastoma Followed by Multiple Metastatic Osteosarcoma.  
*Diagnostics*. 11 (1), 1-11, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics11010028>  
IF: 3.992
8. Juhász, L., Balogh, I., **Madar, L.**, Kovács, B., Harangi, M.: A Rare Double Heterozygous Mutation in Low-Density Lipoprotein Receptor and Apolipoprotein B-100 Genes in a Severely Affected Familial Hypercholesterolaemia Patient.  
*Cureus*. 12 (12), 1-5, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7759/cureus.12184>
9. Mezei, Z. A., Tornai, D., Földesi, R., **Madar, L.**, Sümegi, A., Papp, M., Antal-Szalmás, P.: A DNA pool of FLT3-ITD positive DNA samples can be used efficiently for analytical evaluation of NGS-based FLT3-ITD quantitation: testing several different ITD sequences and rates, simultaneously.  
*J. Biotechnol.* 303, 25-29, 2019.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.06.305>  
IF: 3.503
10. Ivády, G., **Madar, L.**, Dzsudzsák, E., Koczok, K., Kappelmayer, J., Krulisova, V., Macek, J. M., Horváth, A., Balogh, I.: Analytical parameters and validation of homopolymer detection in a pyrosequencing-based next generation sequencing system.  
*BMC Genomics*. 19, 1-8, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-018-4544-x>  
IF: 3.501





11. Koczok, K., Merő, G., P. Szabó, G., **Madar, L.**, Gombos, É., Ajzner, É., Mótyán, J. A., Hortobágyi, T., Balogh, I.: A novel point mutation affecting Asn76 of dystrophin protein leads to dystrophinopathy.  
*Neuromusc. Disord.* 28 (2), 129-136, 2018.  
IF: 2.612
12. Szabó, T., Orosz, P., Balogh, E., Jávorszky, E., Mátyus, I., Bereczki, C., Maróti, Z., Kalmár, T., Szabó, A., Reusz, G., Várkonyi, I., Marián, E., Gombos, É., Orosz, O., **Madar, L.**, Balla, G., Kappelmayer, J., Tory, K., Balogh, I.: Comprehensive genetic testing in children with a clinical diagnosis of ARPKD identifies phenocopies.  
*Pediatr. Nephrol.* 33 (10), 1713-1721, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00467-018-3992-5>  
IF: 2.816
13. Koczok, K., Gombos, É., **Madar, L.**, Török, O., Balogh, I.: Interfering effect of maternal cell contamination on invasive prenatal molecular genetic testing.  
*Prenat. Diagn.* 38 (9), 713-719, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/pd.5319>  
IF: 2.434
14. Molnár, Z., Balogh, L., Kappelmayer, J., **Madar, L.**, Gombos, É., Balogh, I.: Congenital hyperinsulinism caused by a de novo mutation in the ABCC8 gene: a case report.  
*eJIFCC.* 8 (28), 85-91, 2017.
15. Zádori, D., Szpisjak, L., **Madar, L.**, Varga, V. E., Csányi, B., Bencsik, K., Balogh, I., Harangi, M., Kereszty, É., Vécsei, L., Klivényi, P.: Different phenotypes in identical twins with cerebrotendinous xanthomatosis: case series.  
*Neurol. Sci.* 38 (3), 481-483, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10072-016-2776-6>  
IF: 2.285
16. László, B., Ferenczi, A., **Madar, L.**, Gyöngyösi, E., Szalmás, A., Szakács, L., Veress, G., Kónya, J.: CpG methylation in human papillomavirus (HPV) type 31 long control region (LCR) in cervical infections associated with cytological abnormalities.  
*Virus Genes.* 52 (4), 552-555, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11262-016-1338-6>  
IF: 1.431
17. Ivády, G., Koczok, K., **Madar, L.**, Gombos, É., Tóth, I., Győri, K., Balogh, I.: Molecular Analysis of Cystic Fibrosis Patients in Hungary - an Update to the Mutational Spectrum.  
*J. Med. Biochem.* 34, 1-6, 2015.  
IF: 0.742





18. Varga, V. E., Katkó, M., Harangi, J., Balogh, I., Kapás, I., **Madar, L.**, Seres, I., Molnár, M. J., Paragh, G., Kovács, G. G., Harangi, M.: Egy ritka, veleszületett neurodegeneratív betegség: a cerebrotendinosus xanthomatosis laboratóriumi diagnosztikája.  
*Orv. Hetil.* 155 (21), 811-816, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2014.29887>
19. Ivády, G., **Madar, L.**, Nagy, B., Gönczi, F., Ajzner, É., Dzsudzsák, E., Dvorakova, L., Gombos, É., Kappelmayer, J., Macek, J. M., Balogh, I.: Distribution of CFTR mutations in Eastern Hungarians: relevance to genetic testing and to the introduction of newborn screening for cystic fibrosis?  
*J. Cyst. Fibros.* 10 (3), 217-220, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2010.12.009>  
IF: 3.19

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 45,5**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,644**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománytermetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.03.31.



## 12. Tárgyszavak/keywords

Sanger DNS szekvenálás, új generációs DNS szekvenálás, piroszekvenálás, MLPA, Illumina MiSeq, szintézis alapú szekvenálás, Marfan szindróma, *FBNI*, Familiáris hiperkoleszterinémia, *LDLR*, *APOB*.

Sanger sequencing, next generation sequencing, pyrosequencing, MLPA, , Illumina MiSeq, Sequencing by synthesis, Marfan syndrome, *FBNI*, Familial Hypercholesterolemia, *LDLR*, *APOB*.

### **13. Köszönetnyilvánítás**

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik lehetővé tették és segítettek a PhD dolgozatom elkészítését.

Elsősorban szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr. Balogh István professzor úrnak a Klinikai Genetikai Tanszék, valamint a Humángenetikai Tanszék vezetőjének, akinek köszönhetően a genetikát választottam. Vezetőként mindig önálló gondolkodásra, munkára és folyamatos fejlődésre nevelt. Köszönöm, hogy minden helyzetben támogatott hol könnyebb, hol nehezebb szakmai utamon.

Köszönettel tartozom Dr. Koczok Katalinnak, akitől több mint 10 éves szakmai kapcsolatunk alatt rengeteg tudást és nagyon sok segítséget, tanácsot kaptam.

Köszönet illeti a Molekuláris Genetikai Részleg egykori és jelenlegi dolgozóit, Kálmáncheyné Gombos Évát, Csorba Gabriellát, Szűcs Zsuzsannát, Dr. Nagy Orsolyát.

Köszönettel tartozom Dr. Kappelmayer János Professzor úrnak, a Laboratóriumi Medicina Intézet igazgatójának, hogy ebben az intézetben végezhettem a PhD munkámat. Folyamatos támogatásával, biztosította a tudományos munkámhoz szükséges anyagi és tárgyi feltételeket.

Köszönöm szerzőtársaimnak, hogy értékes munkájukkal és támogatásukkal hozzájárultak az értekezés alapjául szolgáló közlemények elkészüléséhez, mindenekelőtt Dr. Harangi Mariann professzor asszonynak.

Köszönöm feleségemnek, gyermekemnek, szüleimnek, nagyszüleimnek és barátaimnak, hogy mindig támogatnak, és miattuk idáig eljuthattam.

A kutatómunka a GINOP-2.3.2-15-2016-00039 számú, a „Ritka betegségek pathogenezisének kutatása, új diagnosztikai és terápiás eljárásokat megalapozó fejlesztések” című pályázat támogatásával jött létre. Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik lehetővé tették és segítettek a PhD dolgozatom elkészítését.

## 14. Fűggelék