

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Súlyos monogénes betegségek
prenatális és postnatális genetikai diagnosztikai
kihívásai**

Dr. Koczok Katalin



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2019

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Súlyos monogénis betegségek
prenatális és postnatális genetikai diagnosztikai kihívásai**

Dr. Koczok Katalin

Témavezető: Dr. Balogh István



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2019

**SÚLYOS MONOGÉNES BETEGSÉGEK
PRENATÁLIS ÉS POSTNATÁLIS GENETIKAI DIAGNOSZTIKAI KIHÍVÁSAI**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Koczok Katalin okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskolája
keretében

Témavezető: Dr. Balogh István, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora
Dr. Patócs Attila, az MTA doktora

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet könyvtára
2019. március 22. (péntek) 11:00 óra

Az értekezés bírálói: Prof. Dr. Panyi György, az MTA doktora
Dr. Tory Kálmán, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Panyi György, az MTA doktora
Dr. Tory Kálmán, PhD
Prof. Dr. Balázs Margit, az MTA doktora
Dr. Patócs Attila, az MTA doktora

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2019. március 22. (péntek) 14:00 óra

1. Bevezetés

Munkánk során a prenatalis és postnatalis molekuláris genetikai diagnosztika néhány speciális kihívást jelentő aspektusát vizsgáltuk. Súlyos monogénis betegségek esetén a genetikai diagnosztika fontos szerepet játszik a diagnózis felállításában, genotípus-fenotípus összefüggések révén a prognózis becslésében, a reprodukív döntéshozatalban és megteremti a prenatalis diagnosztika lehetőségét is.

A prenatalis molekuláris genetikai diagnosztika egy igen speciális preanalitikai befolyásoló tényezője az anyai sejtek bekerülése a magzati mintába invazív mintavétel során. *Az első tanulmány (Az anyai sejt kontamináció interferáló hatása invazív módszerrel nyert prenatalis minták molekuláris genetikai tesztelése során)* során a magzati mintákban előforduló anyai DNS kontamináció különböző molekuláris genetikai tesztekre, mint Sanger DNS szekvenálás, multiplex ligáció-függő próba amplifikáció (MLPA) és piroszekvenálás, gyakorolt interferáló hatását vizsgáltuk.

Az alkalmazott módszer analitikai specificitására, azaz az MLPA-val detektált egy exont érintő deléciók másik módszerrel való megerősítésének jelentőségére hívja fel a figyelmet *második tanulmányunk (Új misszensz mutáció a DMD génben)*. Előbbi mellett, az interpretációs kihívást jelentő új misszensz mutáció patogenitása megítélésének nehézségeit mutatjuk be egy igen nagy méretű fehérje, a dystrophin esetén. Az eset komplexitását mutatja az izom szövettani vizsgálat és dystrophin immunhisztokémiai analízis elvégzésének szükségessége is.

A *harmadik tanulmányban (Magyarországi Smith-Lemli-Opitz szindrómás betegek mutációs spektruma)* 2008-2012 között diagnosztizált magyar Smith-Lemli-Opitz (SLO) szindrómás betegek mutációs spektrumát írtuk le és hasonlítottuk össze az irodalomban közölt mutációtípus megoszlással, a mutációk génen belüli elhelyezkedésével és más európai országokban leírt SLO szindrómát okozó *DHCR7* génmutációkkal. A molekuláris genetikai adatok mellett tanulmányunkban összefoglaltuk a betegek biokémiai és klinikai fenotípusos jellemzőit is. Munkánk során egy új misszensz mutációt is detektáltunk, a patogenitás eldöntéséhez és az új variáns kategorizálásához *in silico* módszereket, illetve variáns klasszifikációs algoritmust alkalmaztunk.

1.1 Irodalmi áttekintés

1.1.1 Az anyai sejt kontamináció interferáló hatása invazív módszerrel nyert prenatális minták molekuláris genetikai tesztelése során

Napjainkban prenatális molekuláris genetikai diagnosztika számos súlyos mendeli betegség esetén elérhető. Habár az anyai vérben található szabad magzati DNS vizsgálata bizonyos esetekben non-invazív módszerrel lehetségessé vált, máig a legtöbb genetikai laboratóriumban az invazív módszerrel nyert magzati minták genetikai vizsgálata adja az elvégzett prenatális tesztek zömét. Az invazív mintavétel azonban a főtális minta anyai sejtekkel való kontaminációjának (maternal cell contamination, MCC) veszélyét rejti magában. A leggyakoribb, chorionboholy-mintavétellel (chorionic villus sampling, CVS) vagy amniocentézissel nyert mintatípusok (magzatvíz, amniotic fluid, AF) esetén az anyai sejt kontamináció minden esetben preanalitikai rizikófaktornak tekintendő. A chorionbiopsziás minták deciduával (méhnyálkahártya) szennyeződhetnek. Az amnionfolyadék genetikai analízisét anyai hemopoietikus sejtek jelenléte nehezítheti. A magzatvíz minták tenyésztési körülményei az amniocyták növekedésének kedveznek, az anyai perifériás vérsejtek előregednek, illetve elpusztulnak, emiatt a tenyésztett AF minták anyai DNS kontamináció veszélye kisebb. Ezzel ellentétben a CVS minták tenyésztése növeli az MCC kockázatát, mely nagymértékben csökkenthető a bolyhok megfelelő előkészítésével (a decida a chorionbolyhokról történő eltávolításával a tenyésztés elindítása előtt).

Anyai sejt kontamináció jelenlétében a PCR-alapú módszerek DNS szennyezéssel szembeni nagy érzékenysége miatt a magzat genotípusát esetlegesen rosszul határozhatjuk meg. Az eredmények megfelelő interpretációjához a rutinszerűen alkalmazott molekuláris diagnosztikai tesztek MCC-vel szembeni szenzitivitását javasolt meghatározni keverékes vizsgálatokkal.

A magzati eredmények értelmezését befolyásoló, vagyis szignifikáns MCC nagymértékben függ az alkalmazott diagnosztikai tesztől. Az eredmények értékelhetőségét az MCC jelenléte nem feltétlenül teszi lehetetlenné. Chamberlain és mtsai, a PCR módszer klinikai felhasználását bemutató egyik legelső publikációjukban, a dystrophin gén delécióinak kimutatására használt multiplex PCR MCC-vel szembeni szenzitivitását vizsgálva azt találták, hogy 3-5%-os MCC 25-ös ciklusszám mellett még tolerálható. Lamb és mtsai eredményei alapján 135K oligonukleotid-alapú microarray eredményeit csak magasabb koncentrációjú MCC (>20%) zavarja. Hessner és munkacsoportja kimutatta, hogy az apai vércsoportantigéneket kódoló allélok detektálása, melynek immuncytopenia által

veszélyeztetett magzatok esetén van jelentősége, 94-99,8%-os anyai kontamináció mellett is lehetséges volt allél-specifikus PCR-rel.

A különböző magzati mintákban az MCC előfordulási gyakorisága akár a 7,1%-ot is elérheti, ezért fontos a molekuláris diagnosztikai módszerek anyai DNS kontaminációra való érzékenységének ismerete.

1.1.2 A dystrophinopathiák molekuláris genetikai analízise, a dystrophin fehérje

A dystrophinopathiák a leggyakoribb neuromusculáris betegségek. Az X-kromoszómához kötött recesszív öröklődést mutató, progresszív izomvesztéssel járó allélikus betegségek a Duchenne- (Duchenne muscular dystrophy, DMD, MIM 310200) és Becker-izomdystrophia (Becker muscular dystrophy, BMD, MIM 300376) hátterében a dystrophin fehérjét kódoló *DMD* génben (MIM 300377, Xp21.2-p21.1) kialakuló mutációk állnak. A DMD a klinikailag súlyosabb forma, hátterében álló mutációk általában a dystrophin fehérje teljes hiányához vezetnek vagy a fehérje funkcionálisan kritikus doménjét érintik. A fenotípusos megjelenésében enyhébb BMD-re nagyfokú variabilitás jellemző a klinikai tünetek súlyosságát, megjelenésének idejét illetően, továbbá a progresszió tekintetében. Kialakulását abnormális, de funkcióját részben megtartott dystrophin fehérje jelenléte okozza.

A dystrophin egy sarcolemmával asszociált fehérje, mely a sejtmembránba integrált és citoplazmatikus proteinekkel (sarcoglycánok, dystroglycánok, syntrophinek és dystrobrevinek) való interakciója révén (ún. dystrophin-glikoprotein komplex, DGC) kapcsolatot létesít az extracelluláris mátrix bazális laminája és a citoskeletális aktin között. A DGC fő funkciója a sarcolemma stabilizálása és az izomrostok védelme hosszú távon az izomkontrakció-indukálta károsodással és nekrozissal szemben. A dystrophin fehérjének három teljes hosszúságú izoformája létezik, melyek egymástól független promóterek (agyi, Purkinje és izom promóter) szabályozása alatt állnak. Az izom promóter szabályozása alatt álló teljes hosszúságú dystrophin fehérje 3685 aminosavból áll, molekulatömege 427 kDa. A fehérje négy strukturális doménba szerveződik: 1) N-terminális aktinkötő domén (N-ABD); 2) középső pálca (central rod) domén (egy második aktinkötő domént is tartalmaz); 3) cisztein-gazdag (cystein rich) domén, ami a sejtmembránban elhelyezkedő beta-dystroglycánhoz kötődik; és a 4) C-terminális domén, mely a dystrobrevinhez és a syntrophinokhoz kapcsolódik.

Az emelkedett szérum kreatin kináz (CK) koncentráció és/vagy izombiopsziás lelet és/vagy klinikai tünetek megjelenése miatt felmerülő dystrophinopathia gyanúját a *DMD* gén molekuláris genetikai vizsgálata erősítheti meg. Az elsővonalbeli genetikai teszt deléciók/duplikációk kimutatására irányul, mely genetikai eltérések a DMD/BMD esetek

körülbelül 65%–80%-áért felelősek. Ha deléció/duplikáció nem mutatható ki, második vonalbeli tesztként a *DMD* gén szekvenálása ajánlható fel. Kis skálájú mutációk mintegy 20–35%-ban mutathatóak ki *DMD/BMD* háttérben, többségük nonszensz pontmutáció, kereteltolódást okozó kis deléció/inzerció vagy mRNS érést érintő mutáció.

A *DMD* gén a legnagyobb humán gén, 2,5 millió bp-ból áll, 99%-át intronok teszik ki és 79 exonból áll. A gén nagy mutációs rátájáért feltehetően az igen nagy méretű intronok felelősek. Az esetek 1/3-ában a betegség kialakulásának háttérben *de novo* mutáció áll. Fontos azonban szem előtt tartani, hogy a látszólagos sporadikus *DMD* esetek egy jelentős részében az édesanya esetében csírasejtes mozaicizmusról van szó, melyet az ismétlődési kockázat megállapításánál figyelembe kell venni.

A dystrophin fehérje aktin kötésért és az extracelluláris mátrixszal való összeköttetésért felelős strukturális elemei jól karakterizáltak. A kristályszerkezet alapján két dystrophin fehérjemolekula N-ABD doménjai egymással antiparallel dimert képeznek. Az N-ABD főként helikális szerkezetű és két calponin homológ (CH) szubdoménnal rendelkezik. A CH1 és CH2 szubdoménokat helikális összekötő (linker) régió kapcsolja össze (I hélix). A CH2 szubdomén fő (A, C, E és G) és rövid (B, D és F) hélixekkel rendelkezik. A CH1 szubdomén a CH2-höz hasonló konformációjú, de a rövid B és D hélixeket hurok (loop) régiók helyettesítik. Az N-ABD doménban három aktinkötő hely található.

A *DMD/BMD* betegek igen kis százalékában a betegség háttérben misszensz mutáció áll, azonban ezen mutációk közel fele az N-ABD-t érinti.

1.1.3 A Smith-Lemli-Opitz szindróma

A Smith-Lemli-Opitz szindróma (SLO szindróma, MIM 270400) a koleszterinszintézis elsőként felfedezett és leggyakoribb súlyos veleszületett zavara, melyet a 7-dehidrokoleszterin reduktáz (DHCR7) enzim deficienciája okoz.

A humán DHCR7 az endoplazmatikus retikulumba lokalizálódó NADPH-függő membránprotein, becsült molekulatömege 54,5 kDa. SLO szindrómában a DHCR7 enzim csökkent működése következtében a koleszterin és dezmoszterin szintézis csökkent, míg a 7-dehidrokoleszterin (7-DHC) és izomere, a 8-dehidrokoleszterin (8-DHC) koncentrációja emelkedett a vérben és a szövetekben egyaránt. Az SLO szindróma klinikai diagnózisa a szérum (/szövetek) emelkedett 7-DHC koncentrációjának kimutatása alapján erősíthető meg. A szérum koleszterin koncentrációja normál is lehet, így ez a paraméter kizárásra nem alkalmazható.

A leggyakrabban előforduló általános klinikai tünetek a növekedési elmaradás, megkésett fejlődés, mentális retardáció és a viselkedészavar. Több szervrendszert érintő

veleszületett fejlődési rendellenességek jelenléte szintén gyakori és jellegzetes arckarakter figyelhető meg. A 2. és 3. lábujj syndactyliája a betegek több, mint 95%-ában jelen van.

A koleszterinnek számos biológiailag fontos funkciója van. Az emlős sejtek membránjának esszenciális lipid alkotóeleme, a myelin fő összetevője, a szteroid hormonok, neuroszteroidok, oxiszterolok és epesavak prekursora, szerepe van továbbá az embrió fejlődésében és a morfogenezisben is. A koleszterin az ún. lipid tutajok fontos strukturális komponense, a szterol összetétel megváltozása befolyásolja a sejtmembrán fizikokémiai és funkcionális tulajdonságait. A 7-DHC helyettesítő szerepe számos metabolikus útvonalon egyelőre még nem teljes mértékben definiált. A rendkívül színes tünetegyütteshez nagy valószínűséggel a koleszterin deficiencia mellett az emelkedett 7-/8-DHC koncentráció illetve a felszaporodott metabolitok származékai mind hozzájárulnak.

Az SLO szindróma monogénis betegség, öröklődésmenete autoszomális recesszív, a Humán Gén Mutációs Adatbázis alapján 217 mutációt írtak le eddig a kóroki *DHCR7* génben (11q13.4, MIM 602858) (Professional Human Gene Mutation Database, 2018.2 release). A *DHCR7* egy ubiquiter fehérje, de a *DHCR7* mRNS legnagyobb mennyiségben a mellékvesékben, a májban, a herékben és az agyban mutatható ki.

Az SLO szindróma viszonylag gyakori a kaukázusi populációban, az incidencia 1:10 000-1:70 000 az észak- és közép-európai származásúakban. A null mutációk gyakorisága ellenére igen kevés a 0/0 genotípusú eset, mely indirekt bizonyíték a nagymértékű pre- és perinatális halálózásra nézve.

A *DHCR7* génmutációk jellegzetes földrajzi megoszlására Európában feltehetően az alapító hatás, a genetikai sodródás és visszatérő mutációk együttes jelenléte ad magyarázatot.

2. Célkitűzések

1) Célul tűztük ki három molekuláris genetikai diagnosztikai módszer anyai DNS kontaminációra való szenzitivitásának meghatározását:

- i) Sanger DNS szekvenálás,
- ii) multiplex ligáció-függő próba amplifikáció,
- iii) piroszekvenálás, egy új generációs szekvenálási módszer (nextgeneration sequencing, NGS).

2) Molekuláris diagnosztikai tevékenységünk kapcsán a *DMD* génben egy új misszensz mutációt detektáltunk. A mutáció patogenitásának megítélését a klinikai kép, az izom szövettani vizsgálata, a dystrophin immunhisztokémiai analízise és a fehérje szerkezetének *in silico* analízise alapján kíséreltük meg.

3) Tizenhárom (12 nem rokon) magyarországi SLO szindrómás beteg molekuláris genetikai vizsgálata alapján a magyar betegpopuláció mutációs spektrumának meghatározását, klinikai és biokémiai (koleszterin, 7-DHC) fenotípusos jellemzőinek összefoglalását, egy új misszensz mutáció patogenitásának megvizsgálását és a mutáció detektálási szenzitivitás meghatározását tűztük ki célul.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Az anyai sejt kontamináció interferáló hatása invazív módszerrel nyert prenatális minták molekuláris genetikai tesztelése során

3.1.1 MCC szimuláció

A tanulmány során elvégzett kísérletekben genomiális DNS keverékeket alkalmaztunk. Vad típusú DNS minta ('magzati') heterozigóta DNS mintával ('anyai') történő kontaminációjával 1%, 5%, 10%, 20%, 30% és 40%-os anyai sejt kontaminációt szimuláltunk, mely sorrendben 0,5%, 2,5%, 5%, 10%, 15% és 20% mutáns allél aránynak felelt meg.

A perifériás vér leukocytaiból a genomiális DNS izolálása QIAamp DNA Blood Mini Kit-tel (Qiagen, Hilden, Németország) történt. A DNS koncentrációt a NanoDrop 2000 spektrofotométeren (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) határoztuk meg a gyártó utasításai szerint.

3.1.2 A Sanger DNS szekvenálás anyai sejt kontaminációval szembeni szenzitivitásának meghatározása

Hat kis skálájú mutáció, (1) 5 egy nukleotidot érintő báziscsere és (2) egy 3 bp-t érintő deléció tesztelését végeztük el.

1) A vad típusú DNS mintát ('magzati') öt különböző *PKHD1* gén (fibrocystin/polyductin, 6p12.3-p12.2, MIM 606702) pontmutációra heterozigóta DNS mintával ('anyai') kontamináltuk: NM_138694.3: c.8870T>C, c.3407A>G, c.7916C>A, c.6992T>A és c.107C>T. A *PKHD1* génben előforduló mutációk autoszomális recesszív polycystás vesebetegséghez vezetnek (ARPKD, MIM 263200).

2) A vad típusú DNS mintát ('magzati') a *CFTR* gén (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, 7q31.2, MIM 602421) 3 bp-t érintő deléciójára heterozigóta DNS mintával ('anyai') kontamináltuk: NM_000492.3: c.1521_1523delCTT, a mutáció neve hagyományos nomenklatura szerint F508del. A *CFTR* gén mutációi az autoszomális recesszív öröklődésű cystás fibrosis (CF, MIM 219700) kialakulásához vezetnek.

Az ampliton szekvenálást a BigDyeTerminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-tel (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) végeztük a gyártó utasításai szerint. A kapilláris gélelektroforézist az ABI PRISM 310 Genetikai Analizátoron, míg az adatok analízisét Sequencing Analysis Software-rel végeztük (Applied Biosystems).

3.1.3 Az MLPA módszer anyai sejt kontaminációval szembeni szenzitivitásának meghatározása

Az MLPA módszer szenzitivitását 1) egy multiexon-deléció és 2) egy multiexon-duplikáció esetén vizsgáltuk meg. Minden MLPA kísérletet a gyártó utasításai szerint végeztünk. Az adatok analízisét blokk normalizációval végeztük.

1) Vad típusú női DNS mintát ('magzati') kevertünk a *MID1* gén (midline 1, Xp22.2, MIM 300552) 1-3. exonjainak deléciójára (NG_008197.1(NM_000381.3):c.(?-365)_(864 + 1_865-1)del) heterozigóta női DNS mintával ('anyai'). A *MID1* génben előforduló mutációk X-hez kötött Opitz G/BBB szindróma (XLOS, MIM 300000) kialakulásához vezetnek. Az MLPA analízist a SALSA MLPA P233-B2 MID1 próbamix (MRC-Holland, Amsterdam, Hollandia) alkalmazásával végeztük. Az X-hez kötött öröklődésment miatt a próba felismerési/komplementer szekvenciájának deléciója az amplifikáció teljes elmaradásához vezet férfiakban, míg a heterozigóta formában előforduló deléció a dózis kvóciens ~35-50%-os csökkenéséhez vezet.

2) Vad típusú DNS mintát ('magzati') kevertünk a *PKHD1* gén 33-35. exonjainak duplikációjára (NG_008753.1(NM_138694.3):c. (5236 + 1_5237-1)_(5751 + 1_5752-1)dup) heterozigóta ('anyai') DNS mintával. Az MLPA analízist a SALSA MLPA P341-B2/P342-B2 PKHD1 próbamix (MRC-Holland) alkalmazásával végeztük. Heterozigóta duplikáció esetén a dózis kvóciens tipikusan az 1,30-1,65 tartományba esik.

3.1.4 Az új generációs DNS szekvenálási módszer (piroszekvenálás) anyai sejt kontaminációval szembeni szenzitivitásának meghatározása

Vad típusú DNS mintát ('magzati') kevertünk az *FBN1* gén (fibrillin 1, 15q21.1, MIM 134797) egy nukleotidot érintő báziscseréjére (NM_000138.4: c.4727T>C) heterozigóta ('anyai') DNS mintával. Az *FBN1* gén mutációi Marfan szindrómához (MFS, MIM 154700) vezetnek, mely autoszomális domináns öröklődést mutat. A bidirekcionális piroszekvenálás GS Junior rendszeren történt és az adatok analízisét a GS Amplicon Variant Analyzer Software-rel (Roche 454 Life Sciences, Branford, Connecticut, Amerikai Egyesült Államok) végeztük. A DNS mixeket duplikátumban vizsgáltuk.

3.2 Új misszensz mutáció a *DMD* génben

3.2.1 Esetbemutató, klinikai jellemzők

A 6 hónapos fiúcssecsemő neurológiai kivizsgálása enyhe, generalizált izomgyengeség, hypotonia és megkésett motoros fejlődés miatt kezdődött. A perinatális anamnézis eseménytelen volt, mentális fejlődése rendben zajlott, érzészavara nem volt. Szenzomotoros tréning ellenére a tünetekben javulás nem következett be, ezért neuromusculáris betegség gyanúja merült fel. Az electromyographia myopathiás jeleket mutatott. Az 1 éves korban elvégzett laboratóriumi vizsgálat során mért emelkedett kreatin kináz érték (1497 U/L, referencia tartomány: 24–195 U/L) miatt dystrophinopathia gyanúja merült fel és 14 hónapos korban *DMD* gén analízis elvégzésére került sor. A családban *DMD*/*BMD* nem fordult elő. 25 hónapos korban a fizikális vizsgálat fekvésből való nehezített felülést, scapula alátát, a felső végtagokon és a mellkason csökkent izomtömeget és enyhe vádli hypertrophiát írt le. Ezt követően a quadriceps izomból biopszia elvégzésére került sor.

3.2.2 DNS izolálás

A DNS izolálás a perifériás vér leukocytaiból történt a 3.1.1 pontban leírtaknak megfelelően.

3.2.3 A *DMD* gén deléció/duplikáció analízise

Deléciók/duplikációk vizsgálata a *DMD* génben MLPA módszerrel történt a SALSA MLPA P034-B2 *DMD* és P035-B1 *DMD* próbamixekkel (MRC-Holland). Az adatok analízisét a gyártó utasításai szerint, blokk normalizációval végeztük. Férfiakban a próba komplementer szekvenciájának deléciója a próba amplifikáció elmaradásához (a fragment analízis során hiányzó csúcs a várt mérettartományban) vezet.

3.2.4 A *DMD* gén 4. exonjának Sanger DNS szekvenálása

A *DMD* gén 4. exonjának és a határoló introni szakaszoknak PCR-rel történő amplifikációja után bidirekcionális Sanger DNS szekvenálást végeztünk a 3.1.2 pontban leírtak szerint.

3.2.5 A DMD gén teljes kódoló régiójának szekvenálása

A DMD gén szekvenálása bidirekcionális piroszekvenálással GS Junior rendszeren (Roche 454 Life Sciences) történt a DMD MASTR esszével (Multiplicom, Niel, Belgium). Az adatok analízisét a GS Amplicon Variant Analyzer Software-rel (Roche 454 Life Sciences) végeztük.

3.2.6 Az izom szövettani vizsgálata, a dystrophin fehérje immunhisztokémiai analízise

Harántcsíkolt izom szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatát fagyasztott izombiopsziás mintából készült, 7 mikrométer vastagságú, keresztmetszeti síkú metszeteken végeztük el standard protokoll szerint. Sarcolemmális és sarcolemma-asszociált proteinek immunhisztokémiai vizsgálata az alábbiak szerint történt: a dystrophin fehérje 1-es, 2-es és 3-as epitópja ellen irányuló antitestekkel, melyek sorrendben a centrális/központi, C-terminális és N-terminális régióknak felelnek meg (Novocastra, Newcastle, UK, forgalmazó Biomarker, Gödöllő, Hungary; a primer antitestek hígítása 1:20 volt minden esetben); illetve sarcoglycan alpha, beta, gamma és delta (Novocastra, primer antitesthígítások sorrendben: 1:50, 1:100, 1:100 és 1:50); merosin (Novocastra, 1:100) és spectrin (Novocastra, 1:100) fehérjék elleni antitestekkel. A primer antitestek tárgylemezen történő inkubálását 1 órán át szobahőmérsékleten végeztük. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során a detektálás a MACH 4 Universal HRP-Polymer Detection System (Biocare Medical, Pacheco, California, Amerikai Egyesült Államok) kittel a gyártó utasításai szerint történt. *(Dr. Hortobágyi Tibor, Patológiai Intézet, Neuropathológiai Nem Önálló Tanszék, Debreceni Egyetem)*

3.2.7 In silico analízisek

A dystrophin (PDB ID:1DXX), utrophin (PDB ID: 1QAG), α -actinin 3 (PDB ID: 1WKU) és fimbrin (PDB ID: 1AOA) proteinek aktinkötő doménjének (actin-binding domain, ABD) Protein Data Bank adatbázisban elérhető kristályszerkezetét használtuk, a fehérjékre vonatkozó további információkat (pl. szekvencia) az UniProt adatbázisból töltöttünk le: dystrophin (UniProt ID: P11532), utrophin (UniProt ID: P46939), α -actinin 3 (UniProt ID: Q08043) és fimbrin (UniProt ID: P13797). A szerkezeti ábrák a PyMOL Molecular Graphics System (Version 1.3 Schrödinger, LLC) program segítségével készültek. A szerkezet-alapú szekvencia-illesztést a SALIGN web-szerverrel végeztük. A másodlagos szerkezetre vonatkozó predikciók a JPred4 szerver alkalmazásával készültek. A FoldX algoritmussal és a SDM web-szerverrel kalkuláltuk a pontmutációk hatására a protein stabilitásában bekövetkezett változásokat ($\Delta\Delta G$, kcal/mol), a dystrophin fehérje N-ABD kristályszerkezetének felhasználásával. Az aggregációs hajlamra vonatkozó dinamikus predikciót az N-ABD domén A láncának szerkezete alapján az

Aggrescan3D szerver használatával végeztük. (Dr. Mótyán János András, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debreceni Egyetem)

3.3 Magyarországi Smith-Lemli-Opitz szindrómás betegek mutációs spektruma

3.3.1 Betegek

2008-2012 között összesen 13 (12 nem rokon) egyén SLO szindróma irányú molekuláris genetikai és biokémiai diagnosztikáját végeztük el. A vizsgált betegek az ország különböző régióiból (Nyugat-Dunántúl, Dél-Dunántúl, Közép-Magyarország, Észak-Alföld, Észak-Magyarország) érkeztek. Az SLO szindróma klinikai gyanúját elsővonalbeli tesztként a szérumban 7-DHC koncentrációjának meghatározásával erősítettük meg. Minden esetben a *DHCR7* gén molekuláris genetikai vizsgálatát is elvégeztük. A súlyossági pontérték kiszámítását klinikai genetikus szakorvos végezte a Bialer és munkatársai által kifejlesztett, majd Kelley és Hennekam által módosított pontozó rendszer szerint.

3.3.2 Módszerek

3.3.2.1 Biokémiai diagnosztikai módszerek

Szérumból a 7-DHC szint meghatározását a Honda és mtsai által leírt UV spektrofotometriás módszerrel végeztük, a totál koleszterin koncentrációt enzimatikus kolorimetriás módszerrel határoztuk meg.

3.3.2.2 A *DHCR7* gén kódoló régiójának molekuláris genetikai analízise

A perifériás vér leukocytaiból történő genomiális DNS izolálást a 3.1.1 pontban leírtaknak megfelelően végeztük. A *DHCR7* gén molekuláris genetikai analízise során a kódoló 3–9. exonokat és az exon-intron határokat amplifikáltuk. A korábban Fitzky és mtsai által leírt intronokban lokalizálódó primereket alkalmaztuk, a 7. exon (e7F: 5'-GCT GGG CTC TCG CTA AGT AA-3', e7R: 5'-GCA GTA GAT TAA GGT CAT GGG AAT-3') és 9a exon reverz primer kivételével (e9aR: 5'-ATG TAG AAG TAG GGC AGC AGG TGG C-3'). A PCR termékek Sanger DNS szekvenálását a 3.1.2 pontban leírtak szerint végeztük. Az elektroferogramok manuális értékelésénél használt referencia szekvencia: NG_012655.2, NM_001360.2. A betegek DNS mintáiban detektált mutációk *transz* elhelyezkedését a szülői minták célzott analízisével minden esetben igazolni tudtuk.

3.3.2.3 A *DHCR7* gén nem-kódoló exonjainak és szabályozó szekvenciáinak analízise

A feltételezett promóter régiót és a 3' UTR egy részét a következő primerek alkalmazásával analizáltuk: PM1F (5'-CCT GAC ACC CATGTG TTT ACC-3'), PM1R (5'-CCG GAC TCG AGA TTG ACG-3'), PM2F (5'-AGC TGG GAT CCC GAA GAA G-3'), PM2R (5'-CAC GCC GCC TAC CCT CTA-3'), PM3-e1F (5'-GCA ATC GCTGAC ATC ATC C-3'), PM3-e1R (5'-CCT GTG AGT GGG CACCTG-3'), e2F (5'-GAG CTT CTG CCC TCT CCT G-3'), e2R (5'-TCA ACG CTG TGA AGC CAT AG-3'), 3UTR1F (5'-CTA CATGGC CAT CCT GCT G-3'), 3UTR1R (5'-CCC CAG GGA CACTGA TTA GA-3'), 3UTR2F (5'-GTT CCT TGC TTT TGC CTTCA-3') és 3UTR2R (5'-GGA GGG GGA TCT AGA GCT GA-3'). A PCR termékek Sanger DNS szekvenálását a 3.1.2 pontban leírtak szerint végeztük.

3.3.2.4 A *DHCR7* mRNS szekvenálása

EDTA-val (etilén-diamin-tetraecetsav) antikoagulált perifériás vérből végeztünk totál RNS izolálást Trizol reagenssel (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok). A reverz transzkripciót a High Capacity cDNA Kit-tel (Thermo Fisher Scientific) végeztük. A *DHCR7* cDNS-t 4 átfedő fragmentben amplifikáltuk *Pfu* DNS polimeráz enzimmal (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) a következő primerek alkalmazásával: DHCR7mR1F (5'-TGA CAG AACCGC ATC TCA A-3'), DHCR7mR1R (5'-CTC CTA CGT AGCCGG GTA GA-3'), DHCR7mR2F (5'-TAC CTT GTG GGT CACCTT CC-3'), DHCR7mR2R (5'-ATT GGT CAC ATG GCT GTGG-3'), DHCR7mR3F (5'-GAT CGG GAA GTG GTT TGA CT-3'), DHCR7mR3R (5'-GCC ACC CGG AAG ATG TAG TA-3'), DHCR7mR4F (5'-GAC TGT GTC TGG CTG CCT TA-3') és DHCR7mR4R (5'-AGG ATG GCC ATG TAG ATG ATG-3'). A PCR termékek Sanger DNS szekvenálását a 3.1.2 pontban leírtak szerint végeztük.

3.3.2.5 Az új misszensz mutáció patogenitásának megítélésére használt módszerek

A korábban nem leírt c.374A>G (p.Tyr125Cys) misszensz mutáció funkcionális hatásának megítélésére a Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) predikciós szoftvert használtuk. A *DHCR7* ortológok többszörös szekvencia-illesztését ClustalW bioinformatikai analízissel végeztük. Annak kizárására, hogy nem egy gyakori magyar populációban előforduló polimorfizmusról (benignus variánsról) van szó 50 egészséges egyén DNS mintáját analizáltuk a c.374A>G variáns jelenlétére PCR-RFLP (restrikciós fragmenthossz polimorfizmus) módszerrel, *Sna*BI restrikciós enzim alkalmazásával.

3.4 Szekvencia variánsok klasszifikációja

A korábban nem leírt szekvencia variánsok besorolására az Amerikai Orvosi Genetikai és Genomikai Társaság (American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)) variáns klasszifikációs rendszerét alkalmaztuk, mely két kritérium-szettet alkalmaz a patogén vagy valószínűleg patogén illetve a benignus vagy valószínűleg benignus variánsok klasszifikációjára.

4. Eredmények

4.1 Az anyai sejt kontamináció interferáló hatása invazív módszerrel nyert prenatális minták molekuláris genetikai tesztelése során

4.1.1 A Sanger DNS szekvenálás anyai sejt kontaminációval szembeni szenzitivitása

Vad típusú DNS minta ('magzati') és különböző pontmutációkra heterozigóta DNS minta ('anyai') keveréses vizsgálatával az alábbi mutáns allélra vonatkozó detektálási határértékeket (limit of detection, LOD) kaptuk: 1) NM_138694.3:c.8870T>C, 2.5% mutáns allél (5% MCC); 2) és 3) NM_138694.3:c.3407A>G és c.7916C>A, 5% mutáns allél (10% MCC); 4) NM_138694.3:c.6992T>A 10% mutáns allél (20% MCC); 5) NM_138694.3:c.107C>T, 15% mutáns allél (30% MCC).

Vad típusú DNS minta ('magzati') és egy 3 bp-os delécióra (NM_000492.3:c.1521_1523delCTT) heterozigóta DNS minta ('anyai') keveréses vizsgálata során 10% mutáns allél bizonyult a detektálás határának (20% MCC).

4.1.2 Az MLPA módszer anyai sejt kontaminációval szembeni szenzitivitása

A keveréses vizsgálatot két nagy skálájú mutációtípus 1) egy multiexon-deléció és 2) egy multiexon-duplikáció esetén végeztük el.

1) Az első esetben vad típusú női DNS mintát ('magzati') a *MID1* gén 1-3. exonjainak deléciójára heterozigóta női DNS mintával kevertünk ('anyai'). 30%-os szimulált MCC-ig a 'magzati' genotípus változatlan maradt, a deletált régióknak megfelelő próbák dózis kvóciensei a normál tartományban maradtak. 40%-os anyai sejt kontamináció hatására, mely 20% mutáns allél arálynak felel meg, a próbák relatív csúcsmagasság értéke a 0,70-0,89 tartományba esett, mely már diagnosztikai bizonytalanságot eredményezhet a gyakorlatban.

2) A második esetben vad típusú DNS mintát ('magzati') a *PKHD1* gén 33-35. exonjainak duplikációjára heterozigóta DNS mintával kevertünk ('anyai'). A vizsgálat az mutatta, hogy még 40%-os szimulált MCC (20% mutáns allél) sem változtatta meg a teoretikus magzati

genotípust, a duplikált régióra specifikus próbák dózis kvóciensei a normál tartományban maradtak.

4.1.3 Új generációs DNS szekvenálási módszer (piroszekvenálás) anyai sejt kontaminációval szembeni szenzitivitása

A vizsgálat során vad típusú DNS mintát ('magzati') egy, az *FBN1* génben előforduló pontmutációra (NM_000138.4: c.4727T>C) heterozigóta DNS mintával kevertünk ('anyai'). Piroszekvenálással nagy lefedettségénél 0,5% mutáns allél kimutatható volt. A 2,5%, 5%, 10%, 15% és 20% mutáns allél frakciók kvantifikálása megfelelőnek bizonyult (átlag lefedettség 752x, minimum-maximum lefedettség: 437-1165x).

4.2 Új misszensz mutáció a *DMD* génben

4.2.1 A szérum kreatin kináz időbeli változása

A szérum CK aktivitás emelkedő tendenciát mutatott (1497-4915 U/L) a követéses periódus alatt (12-33 hónap).

4.2.2 A *DMD* gén molekuláris genetikai analízise

Az MLPA módszerrel történt deléció/duplikáció analízis a *DMD* gén 4. exonjának delécióját mutatta. A 4. exon PCR-rel történő amplifikációja azonban sikeres volt, így ez a vizsgálat a deléciót nem erősítette meg. A 4. exon Sanger DNS szekvenálása egy új pontmutációt igazolt (LRG_199t1: c.227A>T, LRG_199p1: p.Asn76Ile), mely a 76. aminosavpozícióban aszparagin-izoleucin cserét eredményez. A mutáció *de novo*-nak bizonyult, az édesanya DNS mintájában nem volt kimutatható. A *DMD* génben egyéb, esetlegesen patogén mutáció jelenlétének kizárására a teljes kódoló régió szekvenálását elvégeztük, mely három hemizigóta variánst igazolt. Az eddig nem leírt misszensz mutáción (c.227A>T) kívül, melyet előzőleg Sanger DNS szekvenálással is kimutattunk, két további variánst detektáltunk (mindkettő szerepel a Single Nucleotide Polymorphism Adatbázisban (dbSNP) >5%-os minor allél frekvenciával (minor allele frequency, MAF)).

4.2.3 Az izom szövettani és immunohisztokémiai vizsgálata

Az izom szövettani vizsgálata enyhe dystrophiás vonásokat mutatott: mérsékelten fokozott rostkaliber ingadozás, elvértve néhány hyperkontrahált rost, helyenként enyhe fokú maginternalizáció, kis csoportokban basophil regeneratív rostok. A dystrophin

immunhisztokémiai vizsgálata: 1) az 1-es antitesttel a sarcolemma változó intenzitású jelölődést mutatott, szegmentálisan minimális vagy hiányzó immunoreaktivitással; 2) a 2-es antitesttel intenzív, lineáris sarcolemmális expresszió volt megfigyelhető (normál jelölődés); 3) a 3-as antitesttel a rostok döntő többsége negatív volt, a rostok kevesebb mint 5%-ában volt teljes vagy szegmentális sarcolemmális expresszió kimutatható. A spectrin immunhisztokémiai vizsgálata normál, lineáris sarcolemmális expressziót mutatott. Az α , β , γ és δ sarcoglycánok lineáris sarcolemmális expressziót mutattak közepes vagy erős intenzitással, néhány rostban szegmentális expresszió csökkenés volt látható. A merosin expresszió szabályos, erős sarcolemmális mintázatot adott. (Dr. Hortobágyi Tibor, Pathológiai Intézet, Neuropathológiai Nem Önálló Tanszék, Debreceni Egyetem)

4.2.4 Az Asn76Ile mutáció hatásának *in silico* analízise

4.2.4.1 A humán dystrophin 76. pozíciójában elhelyezkedő aszparagin reziduum (Asn76) jellemzése

A humán dystrophin N-ABD kristályszerkezete alapján az Asn76 reziduum az N-ABD CH1 szubdoménjának E hélixében helyezkedik el. Irodalmi adatok szerint az Asn76 reziduum nem része az aktinkötő helyek egyikének sem és közvetlenül nem vesz részt az aktin kötésben. Az Asn76 oldallánca nem a CH1 szubdomén felszínén, hanem sokkal inkább a C és E hélixek és a D hurok között „rejtve” helyezkedik el. Az Asn76 oldalláncát alkotó atomok hidrogénkötésnyi távolságra vannak az Asp46 és Glu65 reziduumok fő láncát alkotó atomoktól az N-ADB kristályszerkezete alapján (Asn76.ND2-Asp46.O és Asn76.OD1-Glu65.N). Ezek a hidrogénkötések feltehetően stabilizálják a CH1 szubdomént.

4.2.4.2 CH1 szubdoménnel rendelkező fehérjék szerkezet-alapú szekvencia-illesztése

A humán dystrophin, utrophin, α -actinin 3 és fimbrin fehérjék N-ABD doménjeinek szerkezeti összehasonlítása és szekvencia-illesztése is az Asn reziduum nagyfokú konzerváltságát mutatta (dystrophin számozás szerint a 76. pozícióban). Az Asn76 reziduummal interakcióban lévő Asp46 és Glu65 reziduumok konzerváltságát szintén megvizsgáltuk. Az Asp reziduum (Asp46 dystrophin számozás szerint) nem mutatott teljes mértékű konzerváltságot a vizsgált humán proteinek CH1 szubdoménjei között, míg az α -actinin 1 és 4 izoformái esetén Asp reziduum, a 2 és 3 izoformák esetén Asn található ebben a pozícióban. A humán dystrophin Glu65 reziduumhoz hasonlóan, az Asp46 esetében is hasonló oldalláncok konzerváltsága jellemző ebben a pozícióban (Asn vagy Asp).

4.2.4.3 Az Asn76Ile mutáció feltehetően nagymértékben destabilizáló hatású

Az Asn76Ile mutációnak a másodlagos szerkezetre gyakorolt hatását a mutáns N-ABD szekvenciája alapján jósoltuk. A predikció alapján az aminosavcsere nem változtatja meg sem az N-ABD domén, sem pedig az E hélix másodlagos szerkezetét. A mutáns humán dystrophin protein szerkezete (a FoldX algoritmussal végzett számítás alapján) úgy változik meg, hogy az Asn76-nak a szomszédos Asp46 és Glu65 reziduumokkal kialakított konzervált hidrogénkötései felbomlanak a poláros aszparagin hidrofób izoleucinra cserélődése miatt. A mutáció feltehetően nagymértékben destabilizáló ($\Delta\Delta G > 3$ kcal/mol) és következményes fehérje diszfunkciót okoz. Az p.Asn76Ile mutáció a dystrophin fehérje aggregációs hajlamára/szolubilitására gyakorolt hatását szintén megvizsgáltuk. Analízisünk alapján mind a vad típusú Asn76, mind a mutáns Ile76 reziduumok „rejtve” maradnak a C és E hélixek között, így a CH1 szubdomén aggregációra hajlamos régióinak nem képezik részét. (Dr. Mótyán János András, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debreceni Egyetem)

4.3 Magyarországi Smith-Lemli-Opitz szindrómás betegek mutációs spektruma

4.3.1 Szérum koleszterin és 7-DHC meghatározás

Minden beteg esetén extrém mértékben emelkedett szérum 7-DHC koncentrációt mértünk 87-302 mg/L tartományban, mely 580-2013-szorosa a referencia értéknek ($<0,15$ mg/L). A szérum koleszterin koncentráció 8/13 beteg esetén alacsony volt a korszpecifikus referencia tartományhoz viszonyítva. A 7-DHC/koleszterin arány minden esetben kóros volt.

4.3.2 A DHCR7 gén molekuláris genetikai analízise

4.3.2.1 DHCR7 génmutáció típusok a magyar SLO szindrómás betegpopulációban

12/13 beteg esetén mindkét kóroki mutációt azonosítottuk, 1 esetben egy mutációt detektáltunk heterozigóta formában. 12 nem rokon egyénben, 23 identifikált allél alapján: 56,5% (13/23) misszensz mutáció, 26,1% (6/23) nonszensz mutáció és 17,4% (4/23) splicingot érintő mutáció. 11 nem rokon betegben detektáltuk mindkét mutációt és egy beteg kivételével, aki homozigóta genotípusú volt a c.964-1G>C null allélra (9,1%, 1/11) minden esetben összetett heterozigótaság igazolódott: 63,6%-ban (7/11) null allél (nonszensz vagy splicing mutáció)/misszensz mutáció, 27,3%-ban (3/11) két különböző misszensz mutáció volt kimutatható.

4.3.2.2 Magyar DHCR7 génmutációs spektrum

A magyar SLO szindrómás betegekben detektált genetikai eltéréseket összehasonlítottuk egyéb európai országok mutációs spektrumával. A pánetnikus, de Nagy-Britanniában legelterjedtebb, leggyakoribb SLO szindrómát okozó mutáció a c.964–1G>C, mely gyakori Spanyolországban, Olaszországban, Németországban és Ausztriában, de ritka Lengyelországban, Csehországban, Szlovákiában és Dél-Olaszországban, a második leggyakoribb mutációnak adódott az általunk vizsgált betegpopulációban (4 allél). A p.Trp151* volt a leggyakoribb a (6 allél) magyar SLO szindrómás betegekben. A p.Trp151* szintén gyakori Lengyelországban, Németországban és Ausztriában, Csehországban, Szlovákiában, de nagyon ritka Nagy-Britanniában, Spanyolországban és Olaszországban. A másik tipikusan kelet-európai mutáció, a p.Val326Leu allél, az előbbi mutációhoz nagyon hasonló földrajzi megoszlást mutat, a magyar betegpopulációban is a 3. leggyakoribb előfordulású (3 allél). A p.Ser397Leu és p.Tyr432Cys mutációkat összesen 2-2 allélon detektáltuk, további 8,3-8,3%-ban. További, korábban leírt SLO szindrómát okozó mutációk 1-1 allélon fordultak elő: p.Ala247Val, p.Gly244Arg, p.Leu109Pro, p.Arg443His és p.Arg242His.

4.3.2.3 Új misszensz mutáció kimutatása a DHCR7 génben

A már ismert SLO szindrómát okozó nonszensz, misszensz és splicing mutációkon kívül egy új misszensz mutációt c.374A>G (p.Tyr125Cys) is detektáltunk. A mutáció patogenitását az alábbiak támasztják alá: 1) az érintett aminosavreziduum filogenetikailag konzervált, 2) a Grantham mátrix pontszám 194 és 3) a SIFT predikciós szoftver szerint ebben a pozícióban a tirozin-cisztein aminosavcsere nem tolerálható. Fentieken túl a c.374A>G volt az egyetlen potenciálisan patogén variáns *transz* pozícióban egy másik ismert SLO szindrómát okozó mutációval (c.976G>T, p.Val326Leu) az érintett egyénben. A c.374A>G 50 egészséges egyén DNS mintájában (100 allél) PCR-RFLP módszerrel nem volt kimutatható.

4.3.2.4 A DHCR7 gén többszintű molekuláris genetikai analízise

A 13. Beteg esetén a standard molekuláris genetikai analízissel egy korábban leírt, SLO szindrómát okozó mutációt tudtunk azonosítani heterozigóta formában (c.452G>A (p.Trp151*)). Második szintű analízisként a nem kódoló exonok, a feltételezett promóter régió és a 3' UTR régió vizsgálata történt. Ez a vizsgálat újabb potenciálisan patogén eltérést nem igazolt. Fehérvérsejtekből izolált *DHCR7* mRNS szekvenálás NMD-t igazolt a c.452G>A mutáció esetén. Ezen SLO szindrómát okozó mutáció esetén az NMD leírt jelenség, azonban

kimutatása korábban bőr fibroblasztokból izolált mRNA vizsgálatával történt. Egyéb patogén eltérést az mRNA szekvenálás sem igazolt.

5. Megbeszélés

5.1 Az anyai sejt kontamináció interferáló hatása invazív módszerrel nyert prenatális minták molekuláris genetikai tesztelése során

Ebben a tanulmányban 3 molekuláris genetikai módszer, a Sanger DNS szekvenálás, az MLPA és a piroszekvenálás anyai DNS kontaminációval szembeni érzékenységét határoztuk meg.

A Sanger DNS szekvenálás anyai DNS kontaminációra való szenzitivitásának vizsgálata során a keverékes kísérletek, melyeket hat (5 pontmutáció és egy 3 bp-t érintő kis delécia) kis skálájú mutáció esetén végeztünk el, különböző detektálási határértékeket (2,5-15% mutáns allél, mely 5-30% szimulált MCC-nek felel meg) mutattak. Eredményeink alapján ≥ 5 -30% MCC értékek esetén a magzati genotípus bizonytalanná válhat, és diagnosztikai bizonytalansághoz vagy akár fals magzati genotípus megállapításához vezethet a gyakorlatban.

Az általunk megállapított detektálási határértékek összhangban vannak az irodalomban közölt, a Sanger DNS szekvenálás analitikai szenzitivitását, mozaikosság detektálására való alkalmasságát vizsgáló tanulmányok eredményeivel. Ezekben a tanulmányokban tesztelt mutációk többségénél az LOD 15-20% mutáns allélnak adódott. A magzati mintában jelen lévő anyai DNS mennyiségétől függően a kvantifikációs képesség hiánya, a variábilis szenzitivitás és a gyenge reprodukálhatóság alacsony allélfrakciók esetén a Sanger DNS szekvenálással nyert prenatális eredmények interpretációját megnehezítheti.

Összefoglalva, habár az általunk elvégzett vizsgálatok és az irodalomban elérhető adatok a Sanger DNS szekvenálás alacsony analitikai szenzitivitását mutatják, fontos hangsúlyozni, hogy a szignifikáns anyai DNS kontamináció mértéke igen sok tényezőtől függhet: a már említett mutáció típusán túl, a szekvencia környezettől, az alapvonal variabilitásától, az öröklődés módjától és a DNS minta minőségétől egyaránt, nem is beszélve az esetleges PCR torzítás előfordulásáról, ezért minden eset egyedi és rendkívül fontos a prenatális minták bidirekcionális DNS szekvenálása is.

Az MLPA módszer anyai DNS kontaminációra való szenzitivitását vizsgáló első kísérletben vad típusú női DNS mintát a *MID1* gén 1-3. exonjainak deléciójára heterozigóta női DNS mintával kevertünk. 30%-os szimulált MCC koncentrációig (15% mutáns allél) a teoretikus magzati genotípus változatlan maradt. 40% MCC (20% mutáns allél) mellett a deléciós szakaszra specifikus próbák esetén a dózis kvóciensek 30%-os maximális csökkenését

detektáltuk, mely már diagnosztikai bizonytalansághoz vezethet. A második esetben vad típusú DNS mintát a *PKHD1* gén 33-35. exonjainak duplikációjára heterozigóta DNS mintával kevertünk. Az eredmények alapján 40%-os szimulált MCC (20% mutáns allél) sem változtatta meg a teoretikus magzati genotípust.

Van Veghel-Plandsoen és mtsai vizsgálták az MLPA alacsony szintű mozaicizmus kimutatására való képességét egy több exont érintő duplikáció és egy teljes gén deléció esetén, melyek megközelítőleg (sorrendben) 20% illetve 15% mutáns allél jelenléte esetén voltak kimutathatóak. A mi eredményeinkhez hasonlóan, az MLPA módszer kevésbé bizonyult érzékenynek duplikációk kimutatására a deléciókkal összehasonlítva. Habár ezen adatok az MLPA módszer inszenzitivitását mutatják anyai DNS kontaminációval szemben, a pontos magzati genotipizáláshoz elengedhetetlen a párhuzamosan elvégzett MCC szint meghatározás és az anyai genotípus figyelembevétele, amennyiben anyai DNS kontamináció jelen van.

A harmadik keverékes vizsgálat során a piroszekvenálás anyai DNS kontaminációval szembeni érzékenységét vizsgáltuk. Vizsgálatunk alapján piroszekvenálással 0,5% mutáns allél detektálása is lehetséges volt nagy lefedettségű, azonban ezt az igen alacsony allél frakciót a módszer alámérte. A 2,5-20%-os allél frakció tartományban a mutáns allél piroszekvenálással történő kvantifikálása pontos volt, ezért, amennyiben ugyanazon magzati mintán elvégezzük az MCC analízist és az anyai genotípus ismert, az eredmények interpretációja lehetséges lehet 1-40%-os anyai DNS kontamináció mellett is.

A piroszekvenálás szenzitivitását korábban *KRAS* génmutációk kimutatására kifejlesztett esszék esetén több munkacsoport is vizsgálta és körülbelül 5%-ban határozta meg. Rohlin és mtsai szerint a piroszekvenálás ennél is magasabb analitikai szenzitivitású, 1% mutáns allél is kimutatható igen magas lefedettségű. Jamuar és munkacsoportja egy másik típusú új generációs szekvenálási technika analitikai szenzitivitását vizsgálta és azt találták, hogy ≥ 200 -szoros átlagos szekvenálási lefedettségű 5% mutáns allél kimutatható.

Az új generációs szekvenálási technikák kvantitatív módszerek, a mintában lévő mutáns és vad allélok pontos arányának meghatározására képesek. Ezért, bár ezek a módszerek nagy lefedettség esetén igen szenzitívek az anyai DNS kontamináció jelenlétére, párhuzamosan meghatározott MCC szint és ismert anyai genotípus mellett az allél arányok pontos meghatározása lehetővé teheti az eredmények megfelelő interpretációját anyai DNS kontamináció jelenléte esetén is.

Jelen tudásunk alapján anyai DNS kontamináció jelenléte a magzati mintában nem feltétlenül teszi értékelhetetlenné az eredményeket, helyes prenatális molekuláris genetikai

diagnózis és leletkiadás az esetek döntő többségében lehetséges és az ismételt, invazív és vetelési kockázatot jelentő, mintavétel elkerülhető.

5.2 Új misszensz mutáció a *DMD* génben

A tizennégy hónapos fiúgyermek esetén jelentősen emelkedett CK érték, enyhe izomhypotonia és a motoros fejlődés elmaradása alapján BMD/DMD gyanúja merült fel. A többszintű molekuláris genetikai kivizsgálást a *DMD* gén MLPA analízisével kezdtük, mely a 4. exon delécióját mutatta. Az MLPA-val igazolt egy exont érintő deléciók más módszerrel történő megerősítése szükséges, mivel egy, "látszólagos" deléció háttérében a próbák hibridizációját vagy ligációját gátló, a hibridizációs régióban lévő pontmutáció állhat. A 4. exon sikeres PCR amplifikációja az előzetes MLPA eredmény fals pozitivitását igazolta, majd ezt követően Sanger DNS szekvenálással a 227. nukleotid helyet érintő A-T transzverziót detektáltunk az 5' MLPA próba ligációs helyének megfelelően. A pontmutáció nagy valószínűséggel a ligáció és/vagy hibridizáció és ezáltal a próbaamplifikáció elmaradásához vezetett. A *DMD* gén teljes kódoló régiójának szekvenálása nem igazolt egyéb potenciálisan patogén genetikai eltérést a korábban Sanger DNS szekvenálással detektált, nem leírt c.227A>T pontmutáción kívül. A c.227A>T variánst a legújabb variáns klasszifikáció alapján valószínűleg patogénként kategorizáltuk a következők alapján: i) a detektált variáns *de novo*, az édesanya DNS mintájában a mutáció nem volt kimutatható és a családi anamnézis negatív BMD/DMD-re nézve; ii) a genetikai eltérés nem szerepel az 1000 Genom Projekt és az ExAC (Exome Aggregation Consortium) adatbázisokban, iii) az érintett aminosavreziduum fajok közötti evolúciós konzerváltságot mutat, továbbá néhány strukturálisan hasonló, aktinkötő doménnel rendelkező humán proteinnel való összehasonlítás is az Asn76 konzerváltságát mutatta; iv) a beteg fenotípusa specifikus BMD/DMD-re.

A detektált új misszensz mutáció patogenitásának további (indirekt) alátámasztására és differenciáldiagnosztikai szempontok (BMD vagy DMD?) miatt izombiopszia elvégzésére is sor került. Az izom szövettani vizsgálata enyhefokú myopathiás jellegű elváltozásokat mutatott regeneratív aktivitással. A dystrophin fehérje expressziós mintázata patológiás volt. A fehérje központi részét felismerő antitesttel változó intenzitású, szegmentálisan minimális, illetve hiányzó sarcolemmális immunoreaktivitás volt detektálható, a fehérje N-terminális részét felismerő antitesttel a rostok kevesebb mint 5%-ában szegmentális, a többiben teljesen hiányzó festődés volt megfigyelhető. A dystrophin fehérje expressziós mintázatának megváltozása megfelelhet a genetikai analízis során detektált, N-ABD-t érintő misszensz mutáció következményének és Becker-féle izomdystrophiára utal.

Misszensz mutációk ritkán állnak DMD/BMD háttérben, azonban ezek egy jelentős része (~50%) az N-ABD-t érinti. *In silico* módszerek alkalmazásával a detektált pontmutáció dystrophin fehérje szerkezetére és stabilitására kifejtett hatását az N-ABD szintjén vizsgáltuk. Néhány CH1 szubdoménnel rendelkező humán fehérje szerkezeti összehasonlítása és az aminosavszekvencia illesztése a 76. pozícióban lévő Asn reziduum (dystrophin számozás szerint) konzerváltságát mutatta. Fenti analízis az Asn76 reziduum mellett a kölcsönható Asp46 és Glu65 reziduumok evolúciós konzerváltságát is mutatta, mely ezen kötések domén stabilizálásban betöltött szerepét sejteti.

Az Asn76Ile aminosavcsere az E hélix másodlagos szerkezetére nincs hatással. A protein stabilitásra vonatkozó predikciós vizsgálat a p.Asn76Ile mutáció nagymértékű destabilizáló hatását mutatta. Mivel a p.Asn76Ile mutáció analízisünk alapján az N-ABD másodlagos szerkezetét nem befolyásolja, nagy valószínűséggel lokális konformációváltozáshoz vezet a CH1 szubdoménon belüli stabilizáló interakciók megzavarása révén. A mutáció valószínűleg a B hurok flexibilitását (az E hélix és a B hurok közötti Asn76-Asp46 hidrogénkötés elvesztése miatt) és a D hurok reziduumainak térbeli elhelyezkedését (az E hélix és a D hurok közötti Asn76-Glu65 hidrogénkötés elvesztése miatt) változtatja meg. Feltehetően a C hélix konformációját is befolyásolja a p.Asn76Ile mutáció, mivel az E és C hélixek között nincs direkt hidrogénkötés, csak a C hélix N-terminális vége mellett elhelyezkedő Asp46 lép interakcióba az Asn76 reziduummal.

Sem a vad típusú, sem a p.Asn76Ile mutáns N-ABD esetén nem fokozott a CH1 szubdomén aggregációs hajlama.

Összefoglalva, a p.Asn76Ile mutáció az *in silico* analízisek alapján a másodlagos szerkezetet nem befolyásolja, hanem feltehetően a CH1 szubdoménon belüli stabilizáló interakciók megzavarása révén, nagymértékben destabilizáló hatású.

Mivel a mutáció eredete alapján *de novo*, az ismétlődési kockázat a korábban említett csírasejtes mozaicizmus BMD/DMD-ben való nem elhanyagolható gyakorisága miatt kb. 2%. Molekuláris genetikai analitikai szempontból eredményeink az MLPA módszerrel kimutatott egy exont érintő deléciók más módszerrel történő megerősítő vizsgálatának fontosságára hívják fel a figyelmet.

5.3 Magyarországi Smith-Lemli-Opitz szindrómás betegek mutációs spektruma

A koleszterin bioszintézis veleszületett zavarainak közös vonása a koleszterin deficiencia, feltehetően a különböző szterol prekursorok felszaporodása vezet az egyes szindrómákban

megfigyelhető eltérő tünetegyüttesekhez. Az SLO szindróma klinikai gyanúja esetén az elsővonalbeli laboratóriumi teszt a szérum/plazma 7-DHC koncentrációjának meghatározása.

Az általunk vizsgált betegcsoportban minden esetben extrém mértékben emelkedett szérum 7-DHC koncentrációt mértünk. A szérum koleszterin koncentráció a betegek közel 2/3-ában csökkent volt a korszpecifikus referencia tartománnyal összehasonlítva.

A *DHCR7* gén molekuláris genetikai analízise során 11 nem rokon beteg esetén mindkét mutáció jelenlétét sikerült igazolnunk, 1 esetben 1 mutációt detektáltunk heterozigóta formában (23/24 allél, 95,8%). Ez jó egyezést mutat az irodalmi adatok alapján 95-96%-os mutáció detektálási rátával a *DHCR7* gén kódoló régiójának és az exon-intron határok szekvenálása esetén.

Kiterjesztett genetikai analízis ellenére a 13. Beteg esetén egy mutációt detektáltunk heterozigóta formában (c.452G>A, p.Trp151*). Fehérvérsejtekből izolált *DHCR7* mRNS szekvenálás NMD-t igazolt a c.452G>A mutáció esetén. Ezen SLO szindrómát okozó mutáció esetén az NMD leírt jelenség, azonban kimutatása korábban bőr fibroblasztokból izolált mRNS vizsgálatával történt. Ezen eredményünk igazolja, hogy egy kevésbé invazív beavatkozással nyerhető mintatípusból, perifériás vérmintából izolált *DHCR7* mRNS analitikai szempontból szintén megfelelő.

Egyéb patogén eltérést az mRNS szekvenálás sem igazolt. Az általunk vizsgált 13. Beteg esetén az SLO szindróma diagnózisa a klinikai tünetek és az emelkedett szérum 7-DHC koncentráció alapján egyértelműen felállítható volt.

A mutációk kb. fele-fele arányban az 5-7. exonokban és a 8. intron-9.exonban helyezkedtek el, mely jó egyezést mutat a korábban irodalomban leírt megoszlással. A mutációk mintegy fele (56,5%) misszensz mutáció volt, mely kevesebb az irodalomban leggyakrabban közölt aránynál (~90%). Az aminosavcserével járó mutációk mintegy kétharmada (69%) a feltételezett transzmembrán (TM) doménekben helyezkedett el (p.Leu109Pro, p.Arg242His, p.Gly244Arg, p.Ala247Val, p.Val326Leu és p.Tyr432Cys) korábbi irodalmi adatoknak megfelelő arányban. Ezen belül is a TM mutációk kétharmada (p.Arg242His, p.Gly244Arg, p.Ala247Val, p.Val326Leu) a feltételezett szterol érzékelő doménben található. A nem TM doménben elhelyezkedő misszensz mutációk közül, a 2 allélon detektált p.Ser397Leu a nagymértékben konzervált, feltételezett szterol reduktáz „signature” motívumot (4. citoplazmatikus hurok), míg a p.Arg443His a 2-es szterol reduktáz motívumot (C-terminus) érinti és ez utóbbi nagy valószínűséggel a protein stabilitását csökkenti. A misszensz mutációk mellett 26,1% nonszensz és 17,4% splicingot érintő mutációt detektáltunk, melyek null allélt eredményeznek.

A genotípusok megoszlása az irodalomban leírthoz hasonlóan adódott. Egy beteg kivételével (9,1%) minden esetben összetett heterozigótaság igazolódott: 63,6%-ban null allél/misszensz mutáció, 27,3%-ban két különböző misszensz mutáció volt kimutatható.

A *DHCR7* gén mutációi érdekes földrajzi megoszlást mutatnak, mely jelenség más monogénis betegségek esetén is ismert. A null allélt eredményező p.Trp151* nonszensz mutáció volt a leggyakoribb a magyar SLO szindrómás betegekben. A p.Trp151*mutáció feltehetően Dél-Lengyelországban keletkezett és kelet-nyugati gradienst mutat Észak-Európában. A 8. intronban a splice akceptor helyet érintő, null allélt eredményező c.964–1G>C mutáció a második leggyakoribbnak adódott az általunk vizsgált betegpopulációban. A c.964–1G>C a leggyakoribb SLO szindrómát okozó, Észak-Európában nyugat-keleti gradienst mutató mutáció feltehetően brit eredetű. A másik tipikusan kelet-európai mutáció, a p.Val326Leu, mely a harmadik leggyakoribbnak bizonyult a magyar betegekben, a p.Trp151* és c.964–1G>C mutációkkal együtt az SLO szindrómát okozó eltérések 54%-áért felelős Magyarországon. Haplotípus analízis alapján feltehetően mindhárom alapító mutáció. A magyar populációban ≤8,3%-ban elforduló mutációk egyéb országokban is a ritka allélok közé számíthatnak.

Jelen tanulmányunkban egy új misszensz mutációt c.374A>G (p.Tyr125Cys) is detektáltunk. A SIFT szoftver szerint Tyr125Cys csere ártalmas a fehérje funkciójára nézve, a *DHCR7* ortológok szekvencia-illesztése az érintett aminosav reziduum nagyfokú konzerváltságát mutatta, a Grantham mátrix alapján kalkulált pontszám 194, vagyis a két aminosav fizikokémiai tulajdonságaiban jelentősen különbözik. Az általunk detektált c.374A>G 50 egészséges egyén DNS mintájában (100 allél) nem volt kimutatható, emellett sem az ExAC, sem az 1000 Genom Projekt adatbázisban nem szerepel. A *transz* helyzet megállapítása autoszomális recesszív öröklődésmenet esetén (vagyis, ha az új variáns *transz* helyzetben van egy ismert patogén variánssal) szintén a patogenitás mellett szól. Ha az adott betegség háttérében gyakoriak a misszensz mutációk, akkor ez egy új misszensz mutáció patogenitását illetően támogató bizonyíték. A beteg fenotípusa, mely SLO szindrómára jellegzetes, is további patogenitást támogató erejű. A fentieket figyelembe véve a c.374A>G (p.Tyr125Cys) variáns a valószínűleg patogén kategóriába sorolható.

Az SLO szindrómával érintett családokban a 2008-2018 közötti időszakban 10 esetben végeztünk prenatális vizsgálatot chorionboholy biopsziás vagy magzatvíz mintákból, mely 2 esetben a magzat érintettségét igazolta (homozigótaság vagy összetett heterozigótaság), 1 esetben hordozói státusz igazolódott (2018. júniusi CVS minta) és 7 egészséges gyermek (4 esetben heterozigóta hordozó, 3 esetben normál genotípus) született.

A bemutatott tanulmányok jól mutatják a molekuláris genetikai diagnosztika és a tudomány szoros összefonódását és elválaszthatatlanságát, a klinikus és egyéb diagnosztikus tevékenységet végző kollégákkal való szoros együttműködés és konzultáció fontosságát és a körültekintő és a tesztelési folyamat minden elemét figyelembe vevő interpretációs tevékenység szükségességét.

6. Összefoglalás

A bemutatott tanulmányokban súlyos monogénis betegségek prenatális és postnatális molekuláris genetikai diagnosztikájának néhány speciális kihívást jelentő aspektusát vizsgáltuk.

Az első vizsgálatsorozatban három molekuláris genetikai teszt anyai sejt kontaminációra való érzékenységeinek meghatározását végeztük el. A Sanger DNS szekvenálás esetén a szignifikáns anyai sejt kontamináció szint 5-30%-nak adódott. Az MLPA teszt esetén $\geq 40\%$ anyai DNS kontamináció interferált a 'magzati' genotipizálással. A piroszekvenálás igen érzékenynek bizonyult, 1% anyai sejt kontamináció kimutatása is lehetséges volt.

A második tanulmányban egy 14 hónapos fiúgyermek Duchenne/Becker-izomdystrophia irányú többszintű genetikai kivizsgálását végeztük el. Az elsővonalbeli tesztként elvégzett MLPA teszt a 4. exon delécióját mutatta, melyet más módszerrel megerősíteni nem tudtunk. A *DMD* gén teljes kódoló régiójának szekvenálása egy új pontmutáció (c.227A>T, p.Asn76Ile) jelenlétét igazolta, mely a dystrophin fehérje N-terminális aktinkötő doménját érinti. *In silico* analízisek alapján a mutáció feltehetően destabilizálja az N-terminális aktinkötő domént. A dystrophin fehérje immunhisztokémiai vizsgálata BMD-t valószínűsített.

A harmadik tanulmányunkban 13 magyar SLO szindrómás beteg molekuláris genetikai adatait, biokémiai és klinikai jellemzőit foglaltuk össze. Minden esetben jelentősen emelkedett szérum 7-DHC koncentrációt mértünk. A mutáció detektálási ráta 95,8% volt. Magyarországon három allél (p.Trp151*, c.964-1G>C és p.Val326Leu) felelős a betegséget okozó genetikai eltérések 54%-áért. Egy esetben null mutációra homozigóta genotípus, míg a további esetekben összetett heterozigótaság igazolódott. Egy új misszensz mutációt is detektáltunk (c.374A>G, p.Tyr125Cys), melyet valószínűleg patogénként kategorizáltunk.

7. Az értekezés új megállapításai

1) Keveréses vizsgálatokkal különböző mértékű (1, 5, 10, 20, 30 és 40%) szimulált anyai DNS kontamináció esetén komprehenzív módon meghatároztuk 3 molekuláris genetikai diagnosztikai módszer esetén a szignifikáns (magzati genotipizálást befolyásoló) anyai sejt kontamináció mértékét és a detektálási határértékeket. A Sanger DNS szekvenálás szenzitivitása variábilis volt, mutációtól függően a szignifikáns anyai sejt kontamináció szint 5-30%-nak adódott. Az MLPA teszt esetén nagy mértékű anyai DNS kontamináció ($\geq 40\%$) esetén jelentkezett interferencia. A piroszekvenálás igen érzékeny módszer, 1% anyai sejt kontamináció kimutatása is lehetséges volt. Eredményeinket összehasonlítottuk az irodalomban fellelhető, ezen módszerek analitikai szenzitivitására vonatkozó adatokkal és ezeket a prenatális molekuláris genetikai diagnosztika illetve az anyai DNS kontamináció összefüggésében elemeztük.

2) A misszensz mutációk előfordulása dystrophinopathiák háttérében igen ritka és érdekes módon ezen típusú mutációk mintegy fele a dystrophin fehérje N-terminális aktinkötő doménját érinti. A *DMD* génben egy új, szintén az N-terminális aktinkötő domént érintő és a dystrophin fehérje immunhisztokémiai vizsgálata alapján nagy valószínűséggel Becker-izomdystrophiához vezető misszensz mutációt (c.227A>T, p.Asn76Ile, LOVD adatbázis: <https://databases.lovd.nl/shared/variants/0000171133>) detektáltunk, mely *in silico* analízisek alapján feltehetően nagymértékben destabilizáló hatású.

3) Munkánk során összefoglaltuk a magyarországi Smith-Lemli-Opitz szindrómás betegek mutációs spektrumát, továbbá klinikai és biokémiai fenotípusos jellemzőit, mellyel kiegészítettük az eddigi irodalomban fellelhető európai mutációs és fenotípusra vonatkozó adatokat. A detektált mutációkat/genotípusokat génspecifikus adatbázisba is feltöltöttük (<https://databases.lovd.nl/shared/genes/DHCR7>). Egy új, valószínűleg patogén, SLO szindrómát okozó misszensz mutációt is detektáltunk (c.374A>G (p.Tyr125Cys). Magyarországon három allél (p.Trp151*, c.964–1G>C és p.Val326Leu) felelős a betegséget okozó genetikai eltérések mintegy feléért. Eredményeink alapján *DHCR7* mRNS analízis a perifériás vér leukocytaiból is elvégezhető.

8. 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/11/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Koczok Katalin
Neptun kód: GKQM6L
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10037481

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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: 2.487 (2017)
2. **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: 2.779 (2017)
3. Balogh, I., **Koczok, K.**, P. Szabó, G., Török, O., Hadzsiev, K., Csábi, G., Balogh, L., Dzsudzsák, E., Ajzner, É., Szabó, L., Csákváry, V., Oláh, A.: Mutational spectrum of Smith-Lemli-Opitz syndrome patients in Hungary.
Mol Syndromol. 3 (5), 215-222, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000343923>





További közlemények

4. **Koczok, K.**, Gurumurthy, C. B., Balogh, I., Korade, Z., Mirnics, K.: Subcellular localization of sterol biosynthesis enzymes.
J. Mol. Histol. 50 (1), 63-73, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10735-018-9807-y>
IF: 2.412 (2017)
5. 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: 3.73 (2017)
6. Korade, Z., Genaro-Mattos, T. C., Tallman, K. A., Liu, W., Garbett, K. A., **Koczok, K.**, Balogh, I., Mirnics, K., Porter, N. A.: Vulnerability of DHCR7+/- mutation carriers to aripiprazole and trazodone exposure.
J. Lipid Res. 58 (11), 2139-2146, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2017.12.003>
IF: 4.505
7. Korade, Z., Kim, H. Y. H., Tallman, K. A., Liu, W., **Koczok, K.**, Balogh, I., Xu, L., Mirnics, K., Porter, N. A.: The Effect of Small Molecules on Sterol Homeostasis: Measuring 7-Dehydrocholesterol in Dhcr7-Deficient Neuro2a Cells and Human Fibroblasts.
J. Med. Chem. 59 (3), 1102-1115, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01696>
IF: 6.259
8. **Koczok, K.**, Oláh, A., Szabó, G., Oláh, É., Török, O., Balogh, I.: A koleszterin-bioszintézis veleszületett zavara: a Smith-Lemli-Opitz-szindróma.
Orv. hetil. 156 (42), 1695-1702, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2015.30256>
IF: 0.291
9. Oláh, A., **Koczok, K.**, Szabó, G., Varga, J., Balogh, I., Harangi, J.: A veleszületett koleszterinhiány jellemző biomarkerei Smith-Lemli-Opitz-szindrómás betegekben és hordozókban.
Metabolizmus. 13 (3), 196-201, 2015.
10. 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





11. Bubán, T., **Koczok, K.**, Földesi, R., Szabó, G., Sümegi, A., Tanyi, M., Szerafin, L., Udvardy, M., Kappelmayer, J., Antal-Szalmás, P.: Detection of internal tandem duplications in the FLT3 gene by different electrophoretic methods.
Clin. Chem. Lab. Med. 50 (2), 301-310, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2011.762>
IF: 2.15
12. Szodoray, P., **Koczok, K.**, Szántó, A., Horváth, I. F., Nakken, B., Molnár, I., Zeher, M.: Autoantibodies to novel membrane and cytosolic antigens of the lachrymal gland in primary Sjögren's syndrome.
Clin. Rheumatol. 27 (2), 195-199, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10067-007-0678-y>
IF: 1.559

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 26,914

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
5,266**

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

Debrecen, 2019.01.17.



9. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönettel tartozom Témavezetőmnek, Dr. Balogh Istvánnak, aki megszerettette velem a genetikát. Szemléletmódja és lelkesedése nagy hatással volt rám. Témavezetőként és később Tanszékvezetőként egy igen szigorú, de következetes, önálló munkára nevelő, kiteljesedésre teret biztosító, vitára mindig nyitott és minden helyzetben emberséges és emberi munkatársat ismertem meg benne a hol nehéz és rögzös, hol pedig sikeres szakmai úton.

Köszönet illeti a Molekuláris Genetikai Részlegen dolgozó orvosdiagnosztikai analitikus és klinikai kutató kollégáimat és egyben szerzőtársaimat, Dzsudzsák Erikát, Kálmáncheyné Gombos Évát és Madar Lászlót, akiktől rengeteget tanultam és tanulok mind a mai napig.

Köszönöm minden közvetlen munkatársamnak, hogy a mindennapi diagnosztikai munkám és kutatási tevékenységem kapcsán egy „népes”, vidám és nagyszerű laboratóriumi genetikai csapatnak lehetek a tagja.

Köszönöm klinikus kollégámnak és szerzőtársamnak, dr. Török Olga Tanárnőnek, hogy megosztotta velem tudását és tapasztalatait a magzati mintavétel és a genetikai tanácsadás terén.

Köszönöm szerzőtársaimnak, hogy értékes munkájukkal hozzájárultak az értekezés alapjául szolgáló közlemények teljességéhez és sokrétűségéhez.

Köszönöm dr. Kappelmayer János Professzor Úrnak, a Laboratóriumi Medicina Intézet Igazgatójának, egykori kedvenc oktatómnak, hogy az általa vezetett intézetben, kihívásokkal teli, inspiráló és támogató környezetben fejlődhetek, dolgozhatok.

Köszönöm férjemnek, gyermekeimnek, szüleimnek, nagyszüleimnek és barátaimnak, hogy mindig mutatják a helyes utat, általuk lehetek az, aki vagyok.

A kutatómunka a Gazdaságfejlesztési és Innovációs Operatív Program (GINOP-2.3.2-15-2016-00039) támogatásával jött létre.