

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Mutációs spektrum meghatározása monogénes kórképek esetén  
új generációs szekvenálási módszerek segítségével

Madar László

Témavezető: Prof. Dr. Balogh István



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2023

**Mutációs spektrum meghatározása monogénes kórképek esetén új generációs  
szekvenálási módszerek segítségével**

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

Írta: **Madar László**, okleveles klinikai laboratóriumi kutató

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

Témavezető: Prof. Dr. Balogh István, MTA doktora

Az értekezés bírálói: Dr. Nagy Nikoletta, MTA doktora  
Dr. Szatmári István, PhD

A bírálóbizottság elnöke: Prof. Dr. Csősz Éva, MTA doktora

A bírálóbizottság tagjai: Dr. Horváth Emese Beatrix, PhD  
Dr. Borbély Attila, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

2024. február 15. 13:00 óra

## 1. 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. A genetikai státusz ismeretében az adatok a szakirodalommal összehasonlíthatóvá válnak, 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 vizsgált populációban.

A Marfan szindróma egy monogénes örökletes betegség, melynek alapja a rendellenes kötőszöveti szerkezet kialakulása, ami magyarázza a különböző szervrendszerek érintettségét. A betegek számos tünettellel 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 kerül 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 háttérében több, sokszor nagyméretű gén is állhat, a genetikai vizsgálat és a betegségért felelős eltérés azonosítása nagy kihívást jelenthet.

A fenti két betegség genetikai háttérét 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 háttérében 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, melynek 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. Irodalmi áttekintés

### 2.1 Marfan szindróma

A Marfan szindróma (MFS, MIM#154700) egy autoszomális domináns módon öröklődő ritka kötőszöveti betegség. Régebben a MFS megnevezése volt az arachnodactylia (pókujjúság) is, mivel ez a Marfan-szindróma egyik tünete, amelyet abnormálisan hosszú, karcsú vagy pókszerű ujjak, valamint lábujjak jellemeznek. Hozzávetőlegesen az esetek felében figyelhető meg pozitív családi anamnézis. Főként a kardiovaszkuláris, szem, illetve vázrendszert érinti. A prevalenciája 1-5/10000 és előfordulási gyakorisága nem függ etnikumtól vagy nemtől. 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. A Marfan szindróma klinikai manifesztációi az életkor előrehaladtával még nyilvánvalóbbá válnak.

A Marfan szindrómás betegek egyik leggyakoribb tünete a myopia és a betegek 60%-ánál 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).

A Marfan szindróma diagnózisa elsősorban klinikai és a revideált Ghent nozológián alapul.

Leggyakrabban az *FBNI* (fibrillin 1, 15q21.1, MIM 134797) génben bekövetkező mutációk 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 mutációval 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. A gén által kódolt fehérje egy ciszteinben gazdag monomer glikoprotein, melynek molekulatömege 350 kDa. Az extracelluláris mátrix 10-12 nm-es mikrofibrillumainak fő komponense a fibrillin1. A fehérje 5 strukturális doménre osztható (A-E). Az *FBNI* gén nagy, körülbelül 200 kb genomialis DNS-t ölel fel, 65 kódoló exonba szerveződik és a transzkript mérete 10 kb. Napjainkig több mint 3000 kóroki vagy feltételezhetően kóroki mutációt írtak le, és ezen mutációk nagyrésze egyedi eltérés.

A korai mortalitás és morbiditás szorosan összefügg a szív- és érrendszeri tünetekkel. Az aortagyök és a felszálló aorta progresszív tágulata hajlamosít az aorta ruptúrára. Habár a mutáció detektálási ráta magasabb azoknál a betegeknél, akik mindenben teljesítik a Ghent kritériumokat, az *FBNI* mutációk 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.

## 2.2 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 szövödményekre hajlamosít. A prevalenciája 1:200-250-re tehető, míg a becsült prevalenciája a magyar populációban 1:340. 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 alul diagnosztizált és nem kellőképpen kezelt.

A diagnózis felállítását segítő, az Európai Atherosclerosis társaság ajánlásai alapján egy FH score rendszert állítottak fel. 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).

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 mutáció áll. Jóval ritkábban, de írtak már le más génekben bekövetkezett FH-t okozó mutációkat is, ilyen például a *PCSK9* gén vagy még ritkábban az *LDLRAP1* és a *STAP1* gének.

Ezekben a génekben bekövetkezett mutációk 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 mutáció 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. 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* mutációt írtak le az irodalomban. Nem azonosítottak mutációs forrópontokat az *LDLR* génben, míg 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.

### **2.2.1 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 ApoB48. Mindkét fehérjeforma az *APOB* gén terméke, de az ApoB48 az ApoB100 egy trunkált formája. Az ApoB100 a májban termelődik, míg az ApoB48 a proximális vékonybélben.

### **2.2.2 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, melynek 5 funkcionális doménje van. Az LDLR mediálja a koleszterin és a koleszterin-észter tartalmú alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL) részecskék vérből való kiürülését. Az LDLR kulcsszerepet játszik a koleszterin homeosztázisban. Ezt a tényt jól mutatja, hogy több mint 2100 *LDLR* mutációt írtak le olyan betegeknél, akik familiáris hiperkoleszterinémiában szenvedtek. Ezen mutációk különböző mértékben befolyásolhatják az LDLR aktivitást.

A mutációk fenotípusos hatásait alapul véve az *LDLR* mutációk 5 osztályba sorolhatók. I. osztály: null allél, II. osztály: transzport defektussal rendelkező allél, III. osztály: kötődési defektussal rendelkező allél, IV. osztály: internalizációs defektussal rendelkező allél, V. osztály: újrahasznosítási defektussal rendelkező allél.

### **2.3 Sanger féle DNS szekvenálás**

A Sanger féle szekvenálás az értekezés alapjául szolgáló mindkét tanulmányban használt arany standard módszer, melyet Sanger és munkatársai fejlesztettek ki 1977-ben. A módszer egy adott DNS fragment pontos nukleotid sorrendjének meghatározására szolgál. A módszer lényege, hogy egy adott DNS szakaszt felamplifikálunk, majd didezoxi-nukleotidokkal termináljuk a szintézist. 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 lánctermináció. Végző soron 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.

### **2.4 Új generációs DNS szekvenálás (NGS)**

Új generációs DNS szekvenálás alatt azokat a nagy áteresztőképességű 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 legelterjedtebb ilyen módszert szintézis alapú szekvenálásnak (Sequencing by synthesis (SBS)) 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: könyvtárkészítés, szekvenálás és alignment vagy illesztés, melyet a komplex bioinformatikai analízis követ.

#### **2.4.1. 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. A piroszekvenálás is az SBS, vagy szintézis alapú szekvenálás elvén működik, amikor is egy egyszálú DNS molekuláról komplementer szálat szintetizáltatunk 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 poliszitirén gyöngyök felületén. Ezt a folyamatot klonális amlifikációnak nevezzük. 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 szállba, 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.

## 2.4.2. 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. Mivel ezzel a technológiával akár mind a négy típusú nukleotid más-más fluoreszcens festékkel van megjelölve, így az azonosítás, a piroszekvenálástól eltérően, egyesével történik.

### 3. Célkitűzések

1) Célul tűztük ki különböző nagy áteresztőképességű 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 érkezett betegek molekuláris genetikai vizsgálata alapján a magyar betegpopuláció mutációs spektrumának meghatározását, fenotípusos jellemzőinek összefoglalását, és egy visszatérő csendes mutáció 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 deléció 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. 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.

#### **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 K3-EDTA-val (etiléndiamin-tetraecetsav) vagy Na-citráttal alvadásgátolt 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 Piro szekvenálás és Sanger féle szekvenálás alkalmazása az *FBN1* gén vizsgálatára**

Tizenöt beteg esetében az *FBN1* gén kódoló exonjait és az exon-intron határokat 65 individuális PCR reakcióban amplifikáltuk, melyhez egy korábbi közlemény PCR primerjeit vettük alapul. 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 túltreprezentáltak lennének.

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 miatt 49 exont analizáltunk piroszekvenálással, míg 16 exont, amely homopolimereket tartalmazott Sanger féle szekvenálással vizsgáltunk.

#### **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 kítet használtunk az *FBN1* gén vizsgálatára. Ez a kít egy multiplex PCR elven alapuló kít, mely az *FBN1* gén kódoló exonjait és az exon-intron határokat vizsgálta.

További 3 beteg esetében egy saját tervezésű génpanel (Qiagen) segítségével vizsgáltuk nemcsak az *FBN1*, de a *TGFBR1* és *TGFBR2* géneket is. Ez a génpanel az előző kittől eltérően egy úgynevezett „capture” elven működő könyvtárkészítő kít 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* gén mRNS vizsgálata**

A 26-os számú betegtől bőrbiopsiát 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. A primereket a Primer3 nevű szoftverrel terveztük. 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.

#### **4.6 A familiáris hiperkoleszterinémia háttérében 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.

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

Három esetben (12, 33, 38 számú betegek) az új generációs szekvenálással detektált kópiaszámbeli eltérések konfirmálására MPLA módszert alkalmaztunk, melyhez a SALSA MLPA Probemix P062 MIX1 kitet használtuk a gyártó utasításainak megfelelően.

#### **4.8 Variánsok filterezése és klasszifikációja FH háttérben 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. 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. A variánsok besorolásakor használtuk továbbá a HGMD (The Human Gene Mutation Database) Professional és a ClinVar mutációs 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.

#### **4.10 Mutációs adatbázisok és predikciós szoftverek**

Munkám során számos adatbázist használtam a detektált eltérések ellenőrzésére és leírására, melyek a következők voltak: Human Gene Mutation Database (HGMD) Professional, ClinVar, The Genome Aggregation Database (gnomAD), 1000 Genomes project, Mutation Taster, SIFT, PolyPhen-2, Franklin, Human Splicing Finder.

## **5. Eredmények**

### **5.1 A magyarországi Marfan szindrómás betegekben detektált eltérések**

#### **5.1.1 Az FBN1 gén mutáció 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 FBN1 eltérést mutattunk ki, 23 betegben. 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 mutációkat, 13%-ban (3/23) kis deléció/duplikációt, míg 17,4%-ban (4/23) splicing helyet érintő eltéréseket mutattunk ki. Ezen kívül egy ismétlődő csendes mutációt detektáltunk három egymástól független betegben, amelyet ártalmatlan variánsként tudunk besorolni az mRNS analízist követően.

#### **5.1.2 Cisztein reziduumot érintő misszensz FBN1 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 FBN1 misszensz mutációkat melyek cisztein aminosavat érintenek patogén eltérésnek tekintjük.

Három eltérés (4-es, 9-es, 11-es beteg) korábban nem került leírásra.

#### **5.1.3 Nem cisztein reziduumot érintő misszensz FBN1 variánsok**

Az általunk detektált misszensz mutációk majdnem harmada (5/16, 31,2%) nem cisztein aminosavat érint, ezen esetekben nagy körültekintéssel tanulmányoztuk az elérhető irodalmi adatokat és az adatbázisokat. A klasszifikációikat a revideált Ghent kritériumok és az American College of Medical Genetics and Genomics's (ACMG) legújabb, variáns interpretációra vonatkozó ajánlása alapján végeztük.

A c.640G>A, p.(Gly214Ser) eltérést számos esetben írták le különböző munkacsoportok. 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, valamint sem a gnomAD sem az 1000 Genomes Project populációs

adatbázisokban nem szerepelt. A 214-es pozícióban lévő glicin konzervált a fajok között, 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).

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. Az 1013. evolúciósan konzervált 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 mutációnak jósolható.

A betegünk az MFS súlyos atípusos formáját mutatta, neonatális korban megjelenő tünetekkel, hasonlóan az irodalomban korábban leírt esetekhez. 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. A kóroki mutációk kritériumai alapján, ezt az eltérést patogén misszensz mutációként ítéltük meg.

A c.4727T>C, p.(Met1576Thr) variánst korábban már leírták Marfan szindrómával összefüggésben (aortagyök tágulatot mindkét esetben leírtak), és hiányzott 400 kontroll kromoszómából. Három serdülőkori idiopathiás gerincferdülésben szenvedő betegben is leírták az eltérést. 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. 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 mutációt 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). Az eltérés jelen volt a GnomAD adatbázisban nagyon alacsony frekvenciával (4/245638).

Az 1861-es pozícióban lévő szerin aminosav nem teljesen konzervált a fajok között.

Az elérhető adatokat figyelembe véve az eltérést bizonytalan jelentőségű variánsként (VUS) soroltuk be.

#### **5.1.4 Kis skálájú deléciók/duplikációk az FBN1 génben**

Az *FBN1* 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 mutáció mediálta mRNS lebomlás (NMD) által, így mindegyik eltérést patogén eltérésnek soroltuk be. Két variáns új volt, míg egyet korábban már leírtak egy 18 éves Marfan szindrómás betegben, akinek felszálló aorta tágulata és enyhe szisztémás érintettsége volt. A 19-es számú betegünknek (44 éves) hasonlóan felszálló aorta tágulata volt <7 szisztémás érintettséggel.

#### **5.1.5 Slice helyet érintő variánsok az FBN1 génben**

Összesen 4 splice helyet érintő variánst (4/23, 17,4%) detektáltunk a génben. Két splice variáns a c.1468+5G>A és a c.4337-2A>G korábban leírt eltérés volt.

A c.1468+5G>A mutációt először 1997-ben írták le. 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.

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.

A c.3082+1G>A korábban nem leírt eltérést egy 10 hónapos fiú betegnél detektáltuk, akinek ectopia lentis 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.

### **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. 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. Sheikhzadeh és munkatársai összefoglalták, hogy nincs átfogó bizonyíték az eltérés patogenitásának megítéléséhez, habár a splicing defektust szoftveres predikciók alapján nem lehet kizárni. 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 splicing hely potenciális megváltozását jósolta.

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, valamint az exon-exon határok épek voltak. A 26-os beteg esetében pontos allél arány meghatározást végeztünk bidirekcionális piroszekvenálással, nagy lefedettséggel mind a genomi DNS, mind a cDNS mintán. 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. A variánst a következők alapján benignus variánsként soroltuk be: az eltérés allél frekvenciája nagyobb, mint a betegségből kifolyólag várható lenne, 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 mutációspektruma

### 5.2.1 Detektált eltérések

A vizsgálat során összesen 47 familiáris hiperkoleszterinémiával kapcsolatba hozható mutációt detektáltunk 44 betegben, melyek közül 3 beteg két eltérést is hordozott, azaz összetett heterozigóta genotípusúak voltak. A detektált mutációk nagy többsége (40 mutáció) az *LDLR* génben helyezkedett el, 7 esetben pedig az *APOB* génben detektáltunk eltérést. A *PCSK9*, *LDLRAP1*, *STAP1* génekben nem detektáltunk FH-val összefüggésbe hozható patogén mutációt. A mutációk *LDLR* génen belüli eloszlását tekintve 1 mutáció az *LDLR* gén promoterében, 17 mutáció a ligand kötő doménben, 18 az epidermal growth factor (EGF) precursor homology doménben, 1 az O-linked sugar doménben, további 3 mutáció a citoplazmatikus doménben volt található.

### 5.2.2 Az *APOB* génben kimutatott eltérések

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

Két olyan misszensz mutációt (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 mutációk ACMG szerint bizonytalan klinikai jelentőségű variáns (VUS) besorolásúak, így a mutációk patogenitásának megítélésére további vizsgálatok szükségesek. További egy betegben az *APOB* gén 29-es exonjában a c.13242delG olvasási kereteltolódást okozó mutációt detektáltuk heterozigóta formában. A deléció következménye egy korai stop kodon beépülése a 4415-ös aminosav pozícióba, mely, egy valószínűleg trunkált fehérjét eredményez. Mivel a mutáció az utolsó exonban található, nem valószínű, hogy nonszensz-mediált mRNS-lebomlás lenne a következménye, inkább valószínű az, hogy a csonkolt fehérjéből 148 aminosav fog hiányozni a C-terminálison. A mutáció a populációs adatbázisokban nem szerepel, azonban a ClinVar adatbázisban egyszer említik egy klinikai tesztelés során detektálták bizonytalan jelentőségű variánsként (ClinVar ID:927203). Összességében a predikációs szoftverek besorolása, valamint amiatt, hogy a detektált eltéréstől 3' irányba távolabb is írtak le patogén trunkáló mutációt, ami szintén a mutáció patogenitása mellett szól, az eltérést VUS/valószínűleg patogén kategóriába soroltuk.

### **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 mutációt detektáltunk az *LDLR* génben, amely több mint egy betegben volt jelen. 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 mutáció egyedi volt.

#### **5.2.3.2 Nonszensz *LDLR* variánst hordozó betegek**

A c.82G>T, p.(Glu28\*) és a c.337G>T, p.(Glu113\*) nonszensz mutációkat 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 mutációval együtt detektáltuk összetett heterozigóta formában.

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

Splicing defektust okozó eltérést összesen 8 betegben detektáltunk. 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 mutáció 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.

#### **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, mely 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* mutációk III-as osztályába tartozik, azaz hibás vagy hiányos LDL receptor fehérjét eredményez.

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 mutációt (c.862G>A, p.(Glu288Lys)) is azonosítottunk, így ezt a beteget az összetett heterozigóta *LDLR* mutációt hordozó betegek című fejezetben részletesen tárgyaljuk. A vizsgált betegek közül egyetlen betegben detektáltunk egy olvasási keretet nem érintő deléciót (c.654\_656delTGG, p.(Gly219del)).

### 5.2.3.5 Összetett heterozigóta *LDLR* mutációt 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.

A 12-es beteg esetén egy heterozigóta misszensz mutáció (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 mutáció transz öröklődését. 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 teljes 7-es exon delécióját.

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

A 28-as betegben egy misszensz (c.862G>A, p.(Glu288Lys)) és egy frameshift mutációt (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.

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.

### **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. 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 lefedettségi adatai alapján. A detektált eltéréseket MLPA módszerrel is megerősítettük.

### **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 analízisét.

Összesen 15 családtag mintájában mutattunk ki eltérést, melyek közül 1 esetben az *APOB* gén míg 14 esetben az *LDLR* gén volt érintett.

## 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* mutációval rendelkező MFS betegek azonosítására, továbbá definiálja az *FBNI* kóroki mutációk kritériumait, ami nagyban megkönnyíti az MFS esetek körülbelül 25-30 százalékában talált új genetikai eltérések patogenitásának megítélését.

Azokban a betegekben, akik megfelelnek a Ghent-kritériumoknak, akár 97%-os mutációdetektálási ráta is elérhető. 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, ii) egyes klinikai manifesztációk életkorfüggő kialakulása, iii) intra- és interfamiliáris variabilitás annak tekintetében, hogy a tünetek milyen életkorban jelennek meg, milyen szöveteket érintenek és milyen súlyosságúak az adott tünetek. Az *FBNI* mutációkat leggyakrabban Marfan szindrómával társítják, de számos Marfan-szerű fenotípussal kapcsolatban is leírtak eltéréseket, habár a mutáció detektálási ráta jóval alacsonyabb egyéb enyhe fibrillinopathiákban.

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 mutációk kétharmada misszensz eltérés volt, melyek nagyrésze a cbEGF mintázatok valamelyikében helyezkedik el és körülbelül 70 százalékuk konzervált cisztein reziduumot érint, összhangban az irodalmi adatokkal. A cisztein aminosavak az *FBNI* génben erősen konzerváltak a fajok között, mutatva ezzel lényeges szerepüket. Az is ismert, hogy a ciszteint érintő mutációk nagyobb eséllyel társulnak ectopia lentissel összehasonlítva más aminosavakat érintő misszensz mutációkkal. A mi betegek között is sokkal nagyobb arányban (11/9) volt megfigyelhető ectopia lentis azokban az esetekben, ahol ciszteint érintő misszensz mutációt 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, de közlésre került serdülőkori idiopátiás scoliosisban is.

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* mutációkat a gén teljes kódoló régiójában írtak már le. A legsúlyosabb és leggyorsabb lefolyású fenotípusos megjelenéssel a 24-32-es exonokban kialakuló mutációkat hozták összefüggésbe. 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) mutációt 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. 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. A glicin 1013-as pozíciót mutációs 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. A mutáció valószínű következménye a 24-es exon kivágódása az átíródás során. Mindkét betegünk az MFS tünetpektrumának 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 mutációkhoz, míg más splice hely variánsok olvasási kereteltolódással nem járó deléciókat okoznak. Egy 197 beteget vizsgáló tanulmány során azt a megállapítást tették, hogy majdnem minden olyan betegnek, akinek volt korai aorta eseménye, annak splicing vagy trunkáló mutációja volt. Ennek a megállapításnak fontos következményei vannak azon betegekre nézve, akik ilyen típusú eltéréseket hordoznak (a mi betegcsoportunkban összesen 30,4% volt ezen betegek aránya). Ismert tény, hogy az exoni csendes mutációk az *FBNI* génben exon skippinget okozhatnak.

Kutatásunkban egy visszatérő csendes mutáció (c.3294C>T) hatását vizsgáltuk az mRNA splicingra. *FBNI* transzkript analízist végeztünk bőrbioopsziából származó megfelelő sejttípusból (fibroblaszt) izolált totál RNS-ből.

A c.3294C>T variánst korábban leírták az irodalomban olyan betegekben, akiknél a tünetek kötőszöveti betegségre utaltak, de nem teljesítették a Marfan szindróma kritériumait. A c.3294C>T variáns esetében nem tudtuk megerősíteni az exon skippinget és az exon-exon határok is épek voltak az mRNA 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 mutációkat képes kimutatni, de a nagy méretű duplikációkat és deléciókat is, megfelelő bioinformatikai analízissel.

Egy variáns kivételével 39 *LDLR* mutációt korábban már leírták az irodalomban. Habár a 7-es exon delécióját korábban már leírták, mi meghatároztuk a töréspontokat is, ami korábban 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 eltérést, míg két esetben bizonytalan jelentőségű variánsként tudtuk besorolni a detektált eltérést. Az *LDLR* mutációk eloszlását tekintve a legtöbb eltérés a ligand kötő doménben és az EGF-szerű doménben helyezkedett el. Tudomásunk szerint, korábban nem készült olyan tanulmány, mely a magyarországi familiáris hiperkoleszterinemiás 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.

A 1618G>A, p.(Ala540Thr) misszensz mutációt 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)-prekursor 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.

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

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

Két betegben detektáltuk a c.1775G>A, p.(Gly592Glu) misszensz variánst heterozigóta formában. Ezt a mutációt korábban több populációban leírták, és egy korábbi tanulmány szerint alapító mutáció 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, mely hozzájárulhatott a mutáció elterjedéséhez.

Az általunk kimutatott nonszensz mutációkat korábban már leírták, mint patogén FH-t okozó eltérést. Ezek a mutációk minden esetben egy trunkált, nem működőképes formáját eredményezik az *LDLR* proteinnek. Az LDL-részecskék felvétele csökken a májban és más szövetekben.

A c.-153C>T promóter mutációt korábban már kimutatták cseh FH-s betegeket vizsgáló kutatásban. 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.

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

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

Az általunk detektált, korábban 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 betegekben, továbbá az eltérés konzervált spicing helyet érint.

A c.2416dupG, p.(Val806fs\*11) frameshift mutációt 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. A 18-as számú betegünknek szintén markánsan emelkedett (8,1 mmol/L) TC értéke volt, továbbá koszorúér betegsége és xantelasmája 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 mutációt. Az ott vizsgált betegekben kimutatott patogén mutációk 21%-át teszi ki ez a variáns. A mutáció 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 1992-ből.

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 c.862G>A, p.(Glu288Lys) misszensz mutációt először egy német betegben írták le 1999-ben. Olasz betegekben a mutáció fenotípusos következményeként szignifikánsan emelkedett LDL-C érték, valamint a súlyos esetekben xantóma is megfigyelhető volt.

Az *APOB* génben a leggyakoribb eltérés a magyar populációban is a c.10580G>A, p.(Arg3527Gln) mutáció volt, ami összhangban van az irodalmi adatokkal. 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 mutáció (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 mutációt tárt fel az *LDLR* génben, míg a magyar populációban előforduló mutációk nagy része korábban már leírásra került. A mutáció 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. 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. Összefoglalás

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 a mutációk 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. Ezt a problémát 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 hátterében 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 (neonatólis) 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 szövődményeket 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 hiperkoleszterinémiás 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. 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 genomialis 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 döntéshozatalt 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 átírási képesség 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.

## 9. Saját közlemények jegyzéke



**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

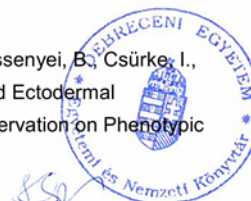
Jelölt: Madar László  
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10060418

### 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.: Helsmoortel-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)



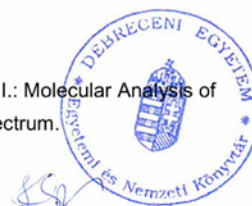


5. Gaál, Z., Szűcs, Z., Kántor, I., Luczay, A., Tóth, H. P., Benn, O., Felszeghy, E. N., Karádi, Z., **Madar, L.**, Balogh, I.: A Comprehensive Analysis of Hungarian MODY Patients-Part I: Gene Panel Sequencing Reveals Pathogenic Mutations in HNF1A, HNF1B, HNF4A, ABCC8 and INS Genes.  
*Life (Basel)*. 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 tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.03.31.



## 10. Kulcsszavak

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

## 11. Köszönetnyilvánítás

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