

Egyetemi Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Új genotípus-fenotípus összefüggések örökletes szemészeti
kórképekben**

Orosz Orsolya

Témavezető: Dr. Losonczy Gergely



DEBRECENI EGYETEM
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2018

ÚJ GENOTÍPUS-FENOTÍPUS ÖSSZEFÜGGÉSEK ÖRÖKLETES SZEMÉSZETI KÓRKÉPEKBEN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Orosz Orsolya, okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolája
(klinikai vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Dr. Losonczy Gergely, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Nagy Bálint, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Méhes Gábor, az MTA doktora
Dr. Skribek Ákos, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK, Élettudományi Központ,
Humángenetikai Intézet 2.405 tárgyalója,
2018. május 3. 11:00 óra

Az értekezés bírálói: Dr. Penyige András, PhD
Dr. Sohár Nicolette, PhD

A bíráló bizottság:

elnök: Prof. Dr. Nagy Bálint, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Méhes Gábor, az MTA doktora
Dr. Penyige András, PhD
Dr. Skribek Ákos, PhD
Dr. Sohár Nicolette, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet
„A” épület tanterme, 2018. május 3. 13:00 óra

BEVEZETÉS

A szem és azon belül elsősorban a retina bonyolult struktúrája és jelátviteli mechanizmusa, valamint az ott expresszálandó több ezer gén az oka, hogy a több mint 6000 ismert öröklődő betegség közül nagyon sok érinti a látószervet. Ezek a rendellenességek előfordulhatnak izolált formában, de gyakran más szemészeti eltéréssel vagy más szervrendszereket is érintő szindrómával társulnak. A szemészeti genetikai betegségek többségében alapos klinikai vizsgálattal is legfeljebb csak a betegségcsoportra következtethetünk. Pontos és megkérdőjelezhetetlen diagnózist minden esetben kizárólag a genetikai vizsgálat elvégzésétől várhatunk. A technológia gyorsütemű fejlődése egyre több eddig nem megoldott vagy ismeretlen eredetűnek vélt kórkép diagnózisát teszi lehetővé. Vizsgálataink során három, rövidlátással járó ritka örökletes szemészeti betegség esetén írtunk le új genotípus-fenotípus összefüggést. A három betegség irodalmi előzményeit egyenként ismertetjük, kiemelve a vizsgálat szempontjából fontos részleteket.

Az örökletes myopia egyik lehetséges oka: színlátászavarral járó csap dystrophia - stacioner vagy progresszív betegség a Bornholm szembetegség?

A hosszú és közepes hullámhosszúságú fény érzékeléséért felelős L és M opszin fehérjéket kódoló gének (*OPN1LW*, *OPN1MW*) az X kromoszómán (Xq28) helyezkednek el szorosan egymás után. A szekvencia homológia és a gének közelsége miatt gyakori az ún. intra-és intergénikus rekombinációjuk, mely a fotopigmentek nagyfokú variabilitásához vezet. Ebben a génkonverzióknak is fontos szerepe van, mely stabilizálhatja a szekvencia azonosságot, de létrehozhat ritka ún. *interchange* haplotípusokat. A ritka exon 3 *interchange* haplotípusok az opszin génekben előforduló egynukleotidos polimorfizmusok azon csoportjai, melyek a 153. 171. 174. 178. és 180. pozíciókban lévő aminosavakat érintik. Ezek alapján a vad típusú opszin génekben előforduló haplotípusok a következők: az L-opszinban LVAIS (Leucin, Valin, Alanin, Izoleucin, Szerin) és az M-opszinban MVAIA (Metionin, Valin, Alanin, Izoleucin, Alanin). Az irodalomban a toxikus exon 3 *interchange* haplotípusok legtöbbször Bornholm betegséggel (Bornholm Eye Disease, BED) kapcsolatban kerültek leírásra. A BED-et, mint stacioner csap diszfunkciót elsőként egy, a dániai Bornholm szigetről származó családban diagnosztizálták. A második családot Minnesotában írták le, akik szintén dán származásúak voltak. A betegség jellemző sajátosságai mindkét család érintett férfi tagjainál a következők voltak: gyermekkori myopia asztigmatizmussal, gyermekkortól csökkent látásélesség, szubnormális fotopikus és normál szkotopikus ERG paraméterek, normál megjelenésű macula. A betegség az életkorral összefüggésben nem mutatott

progressziót. Az első családban a zöld színlátást érintő (deutan), míg a második családban a vörös színlátást érintő (protan) színlátászavart detektáltak. A betegség genetikai oka mindkét esetben az X kromoszóma array első és második pozíciójában elhelyezkedő opszin gének valamelyikében detektált LVAVA toxikus haplotípus volt. Látva a haplotípusokhoz társuló eltérő színlátászavarokat, érdekes kérdés, hogy miként vezetnek ezek a haplotípusok a színlátászavar kialakulásához. Erre a választ génexpressziós kísérletekből ismerjük. Az *interchange* haplotípusok az opszin gének átíródáskor a 3-as exon elvesztéséhez vezetnek exon *skipping* mechanizmuson keresztül. Ez olvasási kereteltolódáshoz, ezáltal a fehérje translációjának idő előtti terminációjához vezet. Ugyanakkor a polimorfizmusok jelenléte nem minden esetben okozza a fehérje teljes hiányát. Ebből a szempontból a LIAVA haplotípus hatása a legsúlyosabb, mely esetében kizárólag a 3-as exont nem tartalmazó opszin mRNS íródik át. Ezzel szemben az LVAVA és MIAVA haplotípusok esetén a mutáns, 3-as exon hiányos mRNS mellett csekély mennyiségű normál opszin transzkripció is kimutatható, mely kis mennyiségben ugyan, de funkcióképes fehérje translációját biztosítja. Mindez arra enged következtetni, hogy a színlátászavar a LIAVA haplotípus esetén az opszin gén direkt inaktivációjával és a fehérje hiányával magyarázható, azonban az LVAVA és MVAVA haplotípusok esetében a színlátászavar nem a haplotípusok közvetlen inaktíváló hatásának tudható be. Sokkal valószínűbb, hogy az LVAVA és MVAVA haplotípusok a csap fotoreceptorok elhalásán keresztül vezetnek a színlátászavarhoz. Emellett úgy tűnik, hogy ezeknek a haplotípusoknak a BED másik jellemző tüneteinek, a myopiának a kialakulásában van domináns szerepe. Érdekesség, hogy bár a BED nem progresszív retina betegség, Caroll és mtsai két LVAVA haplotípusú betegen végzett spektrál domén optikai koherencia (SD-OCT) és adaptív optikai scanning lézer oftalmoszkópiás vizsgálatai progresszív macula dystrophiákra jellemző karakterisztikus jegyeket igazoltak. Mindez közvetett bizonyíték arra, hogy az LVAVA haplotípus progresszív degeneratív elváltozásokat okoz nemcsak a mutáns opszin expresszáló, de a szomszédos fotoreceptor sejtekben is. Az utóbbi évek során a BED-ről mint egy stationer, színlátási zavarral járó kórképről alkotott elképzeléseink az irodalomban megjelent genotípus-fenotípus korrelációk alapján kezdenek új irányt venni. Közvetlen bizonyíték azonban eddig nem áll rendelkezésre arról, hogy a BED, vagy a ritka *interchange* haplotípusokhoz társuló egyéb kórképek progresszív retina dystrophiával járnának.

Örökletes diabetes és retina dystrophia - a *NEURODI* gén etiológiai szerepe es feltételezett hatása

A Neurod1 egy szövet specifikus hélix-hurok-hélix (bHLH) transzkripciós faktor, mely neuronális elemek valamint az endokrin pancreas fejlődését és megfelelő működését szabályozza. Fontos szerepet tölt be a glükóz homeosztázis fenntartásában. A *NEURODI* génről és a gén hiányában kialakuló kórképről szerzett ismereteink kizárólag állatkísérletekből származnak, ugyanis emberben ezidáig nem írtak le *NEURODI* null mutációval járó genotípust. Egerekben a *NEURODI* teljes funkcióvesztésével járó mutációja letális, ezért egyszerű *knockout* kísérletben nem vizsgálható a hatása. Ugyanakkor az inzulin promóter mögé illesztett *NEURODI* transzgénnel vagy a null mutáció más genetikai háttérrel való visszakeresztezésével életben tarthatóak a *NEURODI* homozigóta mutáns egerek. Ezek különböző idegrendszeri tüneteket mutatnak: ataxia, egyensúlyzavar, cerebelláris hypoxia, epilepszia, súlyos hallás- és látáskárosodás. A *NEURODI* gén retinában betöltött funkciójának meghatározására Ochocinska és munkatársai kondicionális *knockout* (cKO) egereket használtak, melyeknél a *NEURODI* génexpresszió csökkenése kizárólag a retinára korlátozódott. A két hónapos cKO egerek retinájában drasztikus változásokat figyeltek meg. ERG vizsgálattal elsősorban a pálcika és csap válasz csökkenését mérték, a szövettani vizsgálatokkal pedig a retina külső szegmentumának dezorganizáltságát találták. Idősebb korban a fotoreceptorok teljes hiányát detektálták. A kísérleti eredmények igazolták, hogy a *NEURODI* gén nemcsak a retina fejlődésében, de a fotoreceptorok homeosztázisának fenntartásában is fontos szerepet játszik. Emberben a *NEURODI* homozigóta funkcióvesztő mutációja sokáig nem volt ismert. Ismert volt ugyanakkor a gén heterozigóta funkcióvesztéssel járó mutációjának hatása: ilyen a Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) 6-os típusában és II-es típusú diabetesben detektáltak.

2010-ben ugyanakkor nagy meglepetésre mégis leközöltek két egymástól független beteget, akikben a *NEURODI* funkcióvesztéssel járó mutációját homozigóta formában találták meg: c.364dupG, p.Asp122Glyfs*12 és c.427_428delCT, p.Leu143Alafs*55. Mindkét betegnél permanens neonatalis diabetest (PNDM), neurológiai eltéréseket, úgymint cerebelláris hypoplasia, gyermekkori megkésett fejlődést, súlyos látás- és halláskárosodást diagnosztizáltak. Érdekes, hogy az életben tartott *NEURODI* null mutáns egerek és a két homozigóta mutációval rendelkező beteg hasonló tüneteket mutatott. A betegek pontos szemészeti státusza, a mutációk anatómiai és funkcionális következményei nem voltak ismertek, így számos, a szemészet számára fontos kérdés maradt tisztázatlanul: továbbra sem

tudtuk, hogy mik a *NEURODI* gén inaktivációjának anatómiai és funkcionális következményei az emberi szemben illetve azon belül a retinában.

Oculodentodigitális dysplasia

Az Oculodentodigitális dysplasia, egy ritka veleszületett szindróma melyből eddig mindössze kb. 300 esetet közöltek a világon. Kialakulásáért a szem fejlődésében szerepet játszó connexin 43 proteint kódoló, *GJA1* gén (6q21-23) hibája felelős. A betegség főként az arcot, az ujjakat és a szemet érinti. Tipikus eltérés a hosszú keskeny orr, kiemelkedő orrhíddal, hypoplasticus alae nasi, vékony, ritka haj és szemöldök. A szemészeti eltérések közül a leggyakrabban előforduló tünetek a microphthalmia és a microcornea, mely minden esetben együtt jár. Ezen kívül jelentkezhet glaucoma, irisz atrophia, cataracta és optikus atrophia. Az irodalomban eddig több mint 60 mutációt közöltek a betegséggel összefüggésben, ennek ellenére több patogén eltérés esetén is hiányzik a részletes fenotípus karakterizálása.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során céлом volt a Debreceni Egyetem Szemklinikáján diagnosztizált ritka, öröklődő szemészeti kórképek genetikai vizsgálata, valamint a genotípus-fenotípus jellemzők összefüggéseinek feltárása. Ennek során az alábbi kórképeket vizsgáltam, illetve az alább felsorolt tudományos kérdésekre kerestem választ:

1. Céлом volt egy X kromoszómához kötött öröklődő nagyfokú rövidlátásban szenvedő családban a betegség kialakulásért felelős patogén mutáció meghatározása, valamint a családban előforduló myopiás páciensek fenotípusának részletes karakterizálása. Ennek jelentőségét az adja, hogy a vizsgálat kezdetekor nem volt olyan ismert mutáció, mely X kromoszómához kötött nem szindrómás rövidlátást okozott volna, ugyanakkor több kromoszómarégiót is ismertünk, melyek kapcsoltsági analízis alapján bizonyítottan együtt öröklődtek a nagyfokú rövidlátással.
2. Mivel az örökletes nagyfokú rövidlátás génje ismeretlen volt, ezért a genetikai eltérés azonosítására ebben az esetben célzott és újgenerációs klinikai exom szekvenálási módszert kívántam tervezni, optimalizálni és alkalmazni. Céлом volt olyan vizsgálati algoritmus megalkotása, mely a kapott nagymennyiségű adatból a kóroki mutáció azonosításához vezet.
3. Céljaim között szerepelt, hogy feltárjam a *NEURODI* gén teljes funkciókiesésének következményeit emberben, ezzel megválaszolva a kérdést, hogy milyen szerepet tölt be a *NEURODI* gén az emberi retina fejlődésében és működésében. A gén homozigóta null mutációjához társuló humán fenotípus eddig ismeretlen volt, ennek karakterizálásával tehát a gén kiesésének anatómiai és funkcionális következményeit terveztem leírni - elsőként a szakirodalomban. A betegség patomechanizmusának megismerése, a betegség lefolyásának üteme és a prognózis előrejelzése érdekében a proband esetén hosszú vizsgálati periódust kívántam alkalmazni.
4. Célul tűztem ki egy oculodentodigitális dysplasiára jellemző szemészeti eltérésekkel és dysmorphiás jegyekkel rendelkező betegnél a kórkép kialakulásáért felelős mutáció azonosítását és a részletes szemészeti fenotípus leírását. A legtöbb, oculodentodigitális dysplasiában leírt kóroki mutáció esetén nem ismert a részletes szemészeti fenotípus, ezért is fontos az általunk detektált mutációhoz kapcsolódó szemészeti megjelenés részletes meghatározása. Ezen belül külön fontosnak tartottuk a szem fénytörési

hibájának meghatározását és összehasonlítását korábban közölt ocudentodigitalis dysplasiás esetekkel illetve egyéb, microphthalmussal járó állapotokkal.

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

Betegek

A három vizsgálni kívánt kórképet három különböző családban azonosítottuk. Mindhárom család tagjainak szemészeti vizsgálatára a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Szemklinikáján került sor. A genetikai vizsgálatokat a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Laboratóriumi Medicina Intézetének Klinikai Genetikai Tanszékén végeztük. Vizsgálataink során a Helsinkai Nyilatkozat alapelveit, illetve a genetikai kutatásokra vonatkozó hazai törvényi szabályozást tartottuk irányadónak. A vizsgálatok elvégzésére minden esetben a Debreceni Egyetem Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának engedélyével, a páciensek és vizsgált családtagjaik írásbeli beleegyezését követően került sor.

Esetismertetés I.

Az első esetben egy X kromoszómához kötött nagyfokú myopiában szenvedő hat generációs család elérhető férfi tagjainak részletes szemészeti és molekuláris genetikai vizsgálatát végeztük el. A családtagok elmondása alapján a második generáció férfi tagjai súlyos látáskárosodásban szenvedtek, melynek oka ismeretlen volt. A myopia minden érintett férfi családtag esetén gyermekkorban kezdődött. Látáscsökkenésről egyik családtag sem számolt be. Egészséges színlátású emberekhez képest eltérő színlátásról több családtag is beszámolt, ezek azonban csak egyes kevert színek esetén jelentkeztek, a mindennapi életben nem jelentettek problémát. A szemészeti és genetikai vizsgálatokat több érintett családtag bevonásával végeztük: VI:6 (11 év), a proband V:1 (46 év), V:3 (42 év), IV:5 (62 év), IV:7 (51 év).

Esetismertetés II.

A 21 éves, neonatális diabétesszel diagnosztizált nőbeteg esetében 2009 (14 éves kora) és 2014 (19 éves kora) között a DE KK Szemklinikáján és a nyíregyházi Jósa András Kórház Szemészeti Osztályán évente került sor szemészeti vizsgálatra. A páciens gyermekora óta szenved nyctalopiától, fokozódó látótérszűkülettől, egyre csökkenő látásélességtől. Legjobban korrigált látásélessége a vizsgálati periódus alatt mindkét szemem 20/25-ről 15/25-re csökkent. A refrakciós hiba nem változott a vizsgálatok között: -7.5D szférikus és +3.0D cylinder mindkét szemem. 2013-ban mindkét oldalon centrális 30 fokos látótérsziget volt detektálható. A szemészeti eltérések mellett az alábbi anamnesztikus adatokat illetve klinikai tüneteket regisztráltuk: intrauterin retardáció, megkésett gyermekkori fejlődés, súlyos halláskárosodás, cerebelláris hypoplasia és a pancreas megtartott exocrin funkciója. A megfelelő inzulinpótlás mellett a páciens vércukorszintje normál tartományon belüli volt. A korábban elvégzett

genetikai vizsgálat a *NEURODI* génben a c.427_428delCT (p.Asp143Glyfs*55) homozigóta funkcióvesztéssel járó mutációt igazolta. Részletes szemészeti vizsgálat korábban a páciensnél nem történt.

Esetismertetés III.

28 éves, oculodentodigitális dysplasiára jellemző fenotípust mutató férfi beteget vizsgáltunk, akinek dysmorphiás tünetei a következők voltak: hosszú, keskeny orr, abnormális alakú fogak a fogzománcot érintő hypopláziával illetve magas szájpad. A születéskori IV-V-ös ujjakat érintő syndactyliát már a vizsgálat előtt sebészeti műtét során oldották (Ábra). A páciens részletes szemészeti vizsgálatát elülső szegmentum OCT, Pentacam és tengelyhossz meghatározással egészítettük ki. A betegség a család más tagjánál nem fordult elő. Az elérhető családtagokat (a páciens édesanyját és anyai nagyapját) szintén megvizsgáltuk. A betegség genetikai státuszának igazolására molekuláris genetikai vizsgálatot végeztünk.

Szemészeti vizsgálatok

A 21 éves *NEURODI* mutációval rendelkező nőbeteg, a 28 éves oculodentodigitális dysplasiával rendelkező férfi beteg és az örökletes nagyfokú myopiával diagnosztizált család tagjainál részletes szemészeti vizsgálatok történtek. A szemfenéki képet színes fundusfotókon rögzítettük, melyek ZK-5 színes szenzorral (Allied Vision Technologies GmbH, Stadroda, Németország) felszerelt Zeiss Visupack 4.4 szoftver alapú Zeiss FF450+IR fundus kamerával (Carl Zeiss AG, Jena, Németország) készültek. Az optikai koherencia tomográfia vizsgálat valamint a konfokális scanning lézer fundus autofluoreszcens leképezés Heidelberg Spectralis OCT készüléssel (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Németország) történt. Az elülső szegmentum műszeres vizsgálata Zeiss Visante OCT készüléssel (Carl Zeiss AG, Jena, Németország) vagy Scheimpflug leképezést használó Pentacam HR készüléssel (OCULUS Optikgeräte GmbH, Wetzlar, Ausztria) történt. A retina fotoreceptorainak elektromos működését Ganzfeld Q400-as készüléssel végzett elektroretinográfiával vizsgáltuk (Roland Consult GmbH, Brandenburg, Németország), a standard ISCEV paraméterek alkalmazásával. A fotoreceptor diszfunkció mértékének megállapítása az alábbi osztályozás szerint történt: enyhe (a normál amplitúdó 70–99%-a), mérsékelt (a normál 30–69%-a), súlyos (a normál amplitúdó 1–29%-a), vagy detektálhatatlan. A látóteret Octopus 900 automatizált statikus periméterrel, standard white/white teljes látótér programmal (Haag Streit AG, Koenitz, Svájc) teszteltük. Az autorefraktometriát Topcon KR 8100 készüléssel (Topcon Corp., Tokyo, Japán) végeztük. A színlátás ellenőrzése pseudoizokromatikus táblákkal (Tafeln für Prüfung

des Farbensinnes, 29. Auflage, 2002), Farnsworth Munsell 100-hue tesztel (X-Rite Pantone, MI, USA) és Nagel II-es típusú anomaloszkóppal történt.

Molekuláris genetikai módszerek

Genomiális DNS izolálása

A genomiális DNS izolálását EDTA-val (ethylenediaminetetraacetic acid) vagy citráttal antikoagulált perifériás vérből QIAamp Blood Mini kittel (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) végeztük, a gyártó által ajánlott protokollt követve.

Array CGH analízis

Az X-hez kötött nagyfokú myopia és késői életkorban kialakuló csap dystrophia háttérben álló genetikai okok kimutatásához először a proband (V:1) X kromoszómáján előforduló kópiaszámbeli eltérések (CNVs) vizsgálatát végeztettük el a NimbleGen Systems of Iceland, LLC, reykjaviki laboratóriumának közreműködésével, komparatív genomi hibridizációs array (arrayCGH) használatával (Roche, NimbleGen, Madison, USA). A jelölési és a hibridizációs lépések kivitelezését a gyártó utasításainak megfelelően végezték az izlandi laborban. Ezt követően a nyers adatok értékelését a gyártó által javasolt SingleMap (1.9 verzió) analízáló szoftverrel saját magunk végeztük, az NCBI36/hg18 humán genom alapján.

RPGR gén ORF15 exonjának bidirekcionális Sanger szekvenálása

A myopiában szenvedő család feltételezett csap disztrófiájának genetikai okát első lépésben az *RPGR* gén (*retinitis pigmentosa GTP-áz regulátor gén*) ORF15 (open reading frame in exon 15) exonjában kerestük. Ez ugyanis az X-kromoszómához kötötten öröklődő myopiával társuló csap dystrophiák háttérben álló mutációk leggyakoribb előfordulási helye. A PCR termékek amplifikációját követően bidirekcionális szekvenálást végeztük, a proband (V:1) genomiális DNS mintáján. A polimeráz láncreakciókhoz (PCR) az irodalomban közölt és saját tervezésű primerpárokat alkalmaztunk. A PCR kivitelezéséhez Verity thermal cycler PCR készüléket (Applied Biosystem, Foster City, CA) használtunk. A reakció hőmérsékleti paraméterei a következők voltak: kezdő denaturálási lépés (95°C, 10 perc), denaturálás (94°C, 30 másodperc), hibridizációs lépés (55°C, 30 másodperc), elongáció (72°C, 1perc). Az amplifikáció 35 ciklusból állt. A 982 bázispár hosszúságú 15/5 fragmentnél: kezdő denaturálási lépés (95°C, 10 perc), denaturáció (94 °C, 45 másodperc), hibridizációs lépés (60°C, 45 másodperc) elongáció (72°C, 1,5 perc). Az amplifikáció 40 ciklusból állt. A PCR termékeket MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével

tisztítottuk meg a szekvenálási reakció előtt. A szekvenálás ABI BigDye Terminator 3.1 cycle sequencing kit-tel (Applied Biosystems, Foster City, CA) ABI 310 típusú szekvenáló készüléken (Applied Biosystems) történt. A nukleotid szekvenciákat az *RPGR* gén (NM_001034853) referencia szekvenciájához hasonlítottuk.

Klinikai exom szekvenálás

Klinikai exom szekvenálást az örökletes nagyfokú myopiában szenvedő család tagjai, nevezetesen a proband (V:1) és a proband édesanyja (IV:3) esetén végeztünk TruSight One Sequencing Panel (Illumina, San Diego, CA) használatával. Ez a hibridizáción alapuló új-generációs szekvenálási technika 4813, klinikai szempontból jelentős gén egyidejű vizsgálatára alkalmas. A könyvtárkészítést a gyártó által megadott utasítások alapján végeztük (TruSight One Sequencing Panel Library Preparation, Illumina).

A minták szekvenálása Illumina Miseq (Illumina) készüléken történt. Ezt követően ellenőriztük a szekvenálás eredményét minőségi szempontok szerint, mely alapján a target régióban lévő nukleotidok 92%-a elérte a legalább 20X-os lefedettséget. Az adatok bioinformatikai elemzéséhez a NextGene (2.3.4 verzió) szoftvert használtuk (SoftGenetics, State College, PA). Az analízis során először a nyers *fastq* fájlokat, melyek tartalmazzák a nukleotid szekvenciát és annak minőségi paramétereit, *fasta* fájlkká konvertáltuk. A beteg szekvenciáját tartalmazó *fasta* fájlokat az NCBI37/hg19 referencia genomhoz hasonlítottuk (*BAM* fájl). A variánsok elemzésekor az X kromoszómához kötött recesszív öröklésmentet vettük figyelembe, így az X kromoszómán lévő gének kódoló régióit és exon-intron határait (± 5 bp) vizsgáltuk. Az aminosav cserét nem okozó eltéréseket kizártuk az analízisből. A variánsok és a minor allél frekvencia (MAF) ellenőrzéséhez az Ensembl (<http://ensembl.org>), HGMD (<http://hgmd.cf.ac.uk>) és ExAC (<http://exac.broadinstitute.org>) és dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) adatbázisokat használtuk.

OPNILW, OPNIMW és CACNA1F génekben detektált eltérések validálása szegregációs analízissel

A klinikai exom szekvenálással detektált, potenciálisan patogén variánsok (*OPNILW*, *OPNIMW* c.532A>G, p.Ile178Val és c.538T>G, p.Ser180Ala és *CACNA1F* c.1843G>T/p.Ala615Ser) jelenlétének megerősítését és családon belüli szegregációját (IV:3, IV:5, IV:7, V:1, V:3, VI:6) Sanger szekvenálással ellenőriztük. Ehhez saját tervezésű primereket használtunk. A PCR reakciók hőmérsékleti paraméterei a következők voltak: kezdő denaturálási lépés (95°C, 10 perc), denaturálás (94°C, 30 másodperc), hibridizáció

(55°C, 30 másodperc), elongáció (72°C, 1 perc). Az amplifikáció 35 ciklusból állt. A PCR termékeket MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) segítségével tisztítottuk meg a szekvenálási reakció előtt. A szekvenálás ABI BigDye Terminator 3.1 cycle sequencing kit-tel (Applied Biosystems), ABI 310 típusú szekvenáló készüléken (Applied Biosystems) történt.

***GJAI* gén bidirekcionális Sanger szekvenálása**

Az oculodentodigitális dysplasia igazolására a *GJAI* gén célzott genetikai vizsgálatát végeztük el. A *GJAI* gén két exonból áll, melyek közül csak a második kerül transzlációra. A *GJAI* 96%-os szekvencia homológiát mutat a *GJA1PI* pszeudogénnel. A *GJAI* gén 2-es exonjának amplifikációjához saját tervezésű primereket használtunk. A reakció hőmérsékleti paraméterei a következők voltak: kezdő denaturálási lépés (95°C, 10 perc), denaturálás (94°C, 30 másodperc), hibridizációs lépés (55°C, 30 másodperc), elongáció (72°C, 1perc). Az amplifikáció 35 ciklusból állt. A PCR reakció kivitelezéséhez Verity thermal cycler PCR készüléket (Applied Biosystem, Foster City, CA) használtunk. Az általunk használt primerek a *GJA1PI* pszeudogént is amplifikálták, így a szekvencián több heterozigótának tűnő eltérést is láttunk. E pozíciókat összevetettük a HGMD adatbázisban leírt ismert mutációs helyekkel, majd olyan primer párt alkalmaztunk (*GJAI* 2/1F- *GJAI* 2/2R), melyek specifikusan csak a *GJAI* gén e régióit tudják amplifikálni. Ez esetben a PCR reakció elongációs fázisának idejét emeltük (72°C, 1,5 perc), a többi paraméter nem változott. A PCR termékeket MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével tisztítottuk meg a szekvenálási reakció előtt. A szekvenálás ABI BigDye Terminator 3.1 cycle sequencing kit-tel (Applied Biosystems, Foster City, CA) ABI 310 típusú szekvenáló készüléken (Applied Biosystems) történt. A kapott szekvenciákat a *GJAI* gén referencia szekvenciájához (NM_000165) hasonlítottuk.

EREDMÉNYEK

Az X kromoszómához kötött nagyfokú myopiával és késői életkorban kialakuló csap dystrophiával diagnosztizált család szemészeti vizsgálatainak eredményei

Az X-hez kötöten öröklődő nagyfokú myopiában szenvedő családban több különböző életkorú férfi családtag vizsgálatát végeztük el. A hosszú távú követési periódus (V:1 probandnál nyolc év) és a legidősebb családtag (IV:5) szemészeti előzményeinek retrospektív elemzése a betegség késői tüneteinek és a progresszió ütemének megismerését tette lehetővé. Minden érintett családtagnál már iskolás kor előtt jelentős mértékű rövidlátás volt detektálható. A refrakció a IV:5 beteg esetén nem változott, míg a többi érintett családtagnak évről évre fokozódott a rövidlátása. A szférikus ekvivalens -5.0 és -21.0D között változott a vizsgálati periódus alatt. Az érintettek, a legfiatalabb családtag (VI:6) kivételével fotofóbiáról és egyre fokozódó színlátászavarról számoltak be. A kevert színek illetve a színárnyalatok megkülönböztetése egyre nehezebbé vált. Éjszakai látási nehézségről (farkasvakság) és a látásélesség csökkenéséről nem panaszkodtak. Még a legidősebb (IV:5) családtag is megfelelőnek ítélte a látásélességét a mindennapi munkájának elvégzéséhez. Szignifikáns látásélesség csökkenés a két legidősebb, 50 év feletti (IV:5 és IV:7) betegnél volt megfigyelhető. Az 50 év feletti pácienseknél a látásélesség csökkenésével évről évre egyre fokozódó protan/deutan színvakság lépett fel, melyet azonban az ötven év alatti családtagoknál nem tapasztaltunk. Bár a 11 éves (VI:6) családtagnál enyhe deutan színlátás zavart lehetett detektálni a pszeudoizokromatikus teszttel és a Nagel anomaloszkóppal, az FM100 hue teszt nem mutatott színlátászavart. A 40 év feletti családtagoknál (V:1, V:3, IV:5, IV:7) myopiás fundus elváltozások és a maculában centrális PE atrophia volt látható.

A 11 éves fiú fundusa teljesen normál megjelenésű volt. Az autofluoreszcens fundus fotókon centrálisan elhelyezkedő hipofluoreszcens foltok látszódtak, melyek a súlyos centrális PE atrophia jelei. A macula dystrophiákra jellemző, parafoveálisan elhelyezkedő hiperreflektív gyűrű a IV:7 és a VI:6 egyének autofluoreszcens fundus fotóján (FAF) egyértelműen látható volt. Az OCT képeken a pigment epithelium atrophiját és a külső nukleáris réteg valamint a fotoreceptorok külső szegmentuma alkotta réteg vastagságának csökkenését lehetett detektálni a 40 év feletti betegeknél. Az 11 éves érintett fiúgyermek ERG vizsgálata normál scotopikus pálcika választ, a maximális scotopikus ingerléskor (ERG 3.0) pedig enyhén csökkent választ mutatott. Mérsékeltlen csökkent amplitúdó volt regisztrálható a *single* fotopikus stimulációkor és enyhén csökkent csap válasz látszott a fotopikus 30 Hz flicker stimuláció esetén. A proband (V:1) és a IV:7 beteg ERG-je súlyosan csökkent pálcika választ, a maximális scotopikus ingerléskor mérsékeltlen csökkent amplitúdót, a fotopikus és 30 Hz flicker stimulációkor detektálhatatlan elektromos aktivitást mutatott. A IV:5,

legidősebb családtagnál mérsékelten csökkent pálcika válasz, a maximális scotopikus ingerléskor enyhén csökkent amplitudó, a fotopikus és a 30 Hz flicker ingerléskor detektálhatatlan elektromos aktivitás volt megfigyelhető.

Az X kromoszómához kötött nagyfokú myopiával és késői kezdetű csap dystrophiával diagnosztizált család molekuláris genetikai vizsgálatának eredményei

Az elsőként elvégzett genetikai vizsgálat nem vezetett eredményre, ugyanis a nagy felbontású X kromoszóma specifikus komparatív genomi hibridizáció (arrayCGH) analízis során sem az X kromoszómát érintő strukturális átrendeződést, sem kópiaszámbeli eltérést nem tudtunk detektálni. Az X kromoszómához kötött csap dystrophiák másik leggyakoribb genetikai okai az *RPGR* ORF15 exonjában előforduló mutációk lehetnek.

Az ORF15 bidirekcionális szekvenálását követően egy 12 nukleotidos, kereteltolódást nem okozó deléciót detektáltunk, mely négy aminosav eliminációját okozza (rs201134185, c.3074_3085delTGGGAAGGGGAGG, p.Val1025_Glu1028del). Patogenitását tekintve az adatbázisok alapján egyértelműen benignus polimorfizmusnak minősül.

Az *RPGR* gén ORF15 exonjának és az X kromoszóma arrayCGH segítségével történt vizsgálatával kizártuk a betegség hátterében előforduló gyakori genetikai hibákat, egyúttal elértünk a célzott genetikai vizsgálatok adta lehetőségek végére. A genetikai eltérés feltételezhetően vagy egy eddig ismeretlen mutáció egy ismert génben, esetleg egy a betegség hátterében eddig le nem írt gén eltérése lehetett. Ilyen esetekben célzott genetikai vizsgálattal nem lehet a betegséget okozó mutációt azonosítani. Ehelyett a teljes X kromoszóma, de legalábbis az összes X kromoszómán található gén exonjának szekvenálása adhat választ. Ezért klinikai exom szekvenálást végeztünk a proband (V:1) és édesanyja (IV:3) esetében. Az analízis első lépéseként a nagymennyiségű genetikai adatból azokat a variánsokat emeltük ki, melyek a kódoló régióban illetve az azokat határoló introni régióban (exon-intron határ \pm 5 nukleotid) helyezkednek el. Ezzel a szűkítéssel a proband esetén 8174, az édesanyjánál 8041 variánst detektáltunk. A variánsok számának csökkentésére további szűkítési paramétereket kellett használnunk. A variánsok közül kizártuk az összes nem X kromoszómán elhelyezkedő illetve az összes aminosav cserét nem okozó mutációt, vagyis az X kromoszómán előforduló és aminosav cserével, kereteltolódással járó, korai stop kodont kialakító, start/stop kodon elvesztését okozó mutációkat vettük figyelembe. Ezzel a lépéssel a probandnál 47 hemizigóta, az édesanyjánál 50 heterozigóta potenciális kóroki variáns maradt az adatbázisban. A variánsok közül azonban értelemszerűen csak az állhat a betegség hátterében, amely mind az

édesanyában, mind pedig a probandban megtalálható, így tovább tudtuk szűkíteni az adatbázisunkat, melyben végül mindössze 17 potenciálisan kóroki variáns maradt.

A különböző adatbázisok segítségével (Ensembl, EXac, dbSNP) minden esetben megkerestük a minor allél frekvenciát és alacsony frekvencia ($MAF < 0.01$) esetén az adott variánshoz tartozó fenotípust. Az 1%-nál magasabb allélfrekvencia olyan gyakori előfordulást jelent, ami szinte teljes bizonyossággal kizárja annak kóroki szerepét (mivel rengeteg egészséges emberben is előfordul). Így a variánsok számát tovább szűkíthettük. Ezek közül a *DIAPH* génben detektált eltérés nem áll szoros összefüggésben a beteg fenotípusával, mivel kizárólag a korai ovárium elégtelenség kialakulásában játszik szerepet, így ezt az eltérést nem vettük figyelembe. A másik eltérés a *CACNA1F* génben detektált eddig ismeretlen missense variáns (c.1843G>T, p.Ala615Ser) volt, melynek kóroki szerepét sem az adatbázis szűkítéssel, sem a genetikai adatbázisok segítségével nem tudtuk kizárni. Irodalmi adatok alapján a *CACNA1F* génben előforduló patogén mutációk felelősek az X-hez kötött veleszületett stationer farkasvakság és az Aland Island betegség kialakításáért. Bár mindkét betegség az általunk vizsgált betegekétől eltérő fenotípussal jár, nem zárhattuk ki, hogy ez az új a mutáció a betegség egy új fenotípusát alakítja ki. Ezért a *CACNA1F* génben detektált eddig ismeretlen missense variáns (c.1843G>T, p.Ala615Ser) igazolására minden családtagban Sanger szekvenálást végeztünk, mely megerősítette az eltérést a probandban, viszont nem igazolta azt a többi családtagnál. Ezzel a vizsgálattal ennek a variánsnak a kóroki szerepét, illetve a családban a *CACNA1F* génhez kötött mindkét betegség jelenlétét ki tudtuk zárni. Az *OPN1LW* génben két (c.532A>G, p.Ile178Val és c.538T>G, p.Ser180Ala), míg az *OPN1MW* génben egy missense (c.532A>G, p.Ile178Val) eltérést találtunk. Az opszin génekben detektált eltérések minor allél frekvenciái nagyobbak, mint 1%, de ismert, hogy részt vesznek az LVAVA és MVAVA toxikus haplotípusok kialakításában. A Sanger szekvenálás ezen haplotípusok jelenlétét igazolta mind a proband mind pedig a további családtagok vizsgálatakor. A két opszin gén szekvenciája 98%-ban megegyezik, ám a kis különbségért például éppen a haplotípusok egyik tagja, a 153. pozícióban lévő aminosavat kódoló nukleotidtriplet felel. Az *OPN1MW*-ben Leucint, az *OPN1LW* génben pedig Metionint kódoló nukleotidtriplet egy nukleotidban tér el egymástól, melyet a Sanger szekvenálás során magunk is detektáltunk az L és M opszinok szekvenciájának megfelelően. Az újgenerációs szekvenálás adataiból viszont egyértelműen látszott, hogy a haplotípus kialakításában részt vevő nukleotid pozíciókban csak az L és M haplotípusoknak megfelelő nukleotidok voltak jelen jelen minden szekvenátumban (readben), tehát nem mutációról van szó. Ezt egyébként az is bizonyítja, hogy a hemizigóta probandban is látható volt a heterozigóta mutációnak tűnő

eltérés az elektroferogramon, mely az általunk alkalmazott módszer sajátosságának következménye, hiszen hemizigóta egyénnél csak azonos allélról származhatott az eltérés. Az L és az M opszin gének kópiaszámára az elektroferogramos csúcsok arányából, a klinikai exom szekvenálás során azonosított M és L readek számából, valamint a klinikai exom szekvenálás során azonosított M gének számából is következtethetünk. Ez alapján nagy biztonsággal kijelenthető, hogy a probandban és az érintett családtagokban egy L és egy M gén kópia volt jelen.

Az újgenerációs és a hagyományos Sanger szekvenálás eredményeinek összevetésével megállapítottuk, hogy az LVAVA és MVAVA haplotípusok szegregálódtak a betegséggel a családban. Az *OPNILW* és *OPNIMW* génekben egyéb polimorfizmust vagy mutációt nem detektáltunk. Az édesanya (IV:3) esetében a klinikai exom szekvenálás egy második M opszin gént (*OPNIMW2*) is azonosított. A két M opszin megkülönböztetése egy exoni (*OPNIMW*, c.849A és *OPNIMW2*, c.849C) és egy introni (*OPNIMW*, c.984+59 és *OPNIMW2*, c.984+59C) eltérés alapján történt. Az édesanya (IV:3) szekvenciájában a megfelelő pozíciókban *OPNIMW2* specifikus nukleotidokat is detektáltunk. A probandnál nem láttunk *OPNIMW2* specifikus nukleotidokat, a lefedettség ezekben a pontokban 0X-os volt, vagyis a proband nagy valószínűséggel nem rendelkezett *OPNIMW2* génnel. Az újgenerációs adatok elemzése arra engedett következtetni, hogy az anya egyik kromoszómáján egy normál L és két M opszin gént hordozott, a másik kromoszómáján pedig egy mutáns L és M opszint, melyet a probandnak örökölt át.

A homozigóta *NEUROD1* null mutációhoz társuló progresszív pálcika-csap dystrophiában szenvedő nőbeteg szemészeti vizsgálatának eredményei

A 21 éves neonatalis diabetesszel diagnosztizált nőbeteg részletes szemészeti vizsgálatkor az elülső szegmentum alaki eltérést nem mutatott. A Scheimpflug képalkotás során a cornea az átlagostól vastagabb volt, centrálisan 600 µm. Irregularis astigmia, keratoconus nem volt detektálható. A pupillatágításos fundus vizsgálaton a lencse és az üvegtest tisztának mutatkozott. A szemfenéki képen kiterjedt chorioretinális atrophia, a hátsó póluson molyrágás-szerű PE atrophia volt detektálható. Retinitis pigmentosára jellemző csontsejt formájú pigment rögök nem voltak láthatóak. A papilla a normálistól ugyan kissé halványabb volt, de egyéb tekintetben normál megjelenést mutatott; tehát nem a retinitis pigmentosában jellegzetes viaszsárga, halvány papillát találtunk. Az artériák normál átmérőjűek voltak, mely szintén eltér a retinitis pigmentosában található hajszálvékony

érhálózattól. A vizsgálati periódus alatt a páciensnél nem láttunk diabeteszes retinopathiát.

Az autofluoreszcens fundus fotókon a macula dystrophiákra jellemző karakterisztikus jegy, a foveát körülvevő hiperreflektív gyűrű ábrázolódott. A magasabb chorioideális autofluoreszcencia a hátsó póluson detektált molyrágásszerű PE atrophianak volt a következménye. Lipofuszcinn lerakódás nem volt detektálható. Az OCT a retina vastagságának progresszív csökkenését mutatta a maculában. Az OCT felvételeken a külső három retina réteg (fotoreceptor külső szegmentum, külső határoló membrán, fotoreceptor belső szegmentum) teljes hiánya volt észlelhető a foveán kívül eső fotoreceptorok esetén. A három külső réteg alkotta abnormálisan hiperreflektív lemez fokozatos zsugorodását találtuk a 2009 és 2014 közötti vizsgálati periódus alatt a foveában az OCT képeken. Ez bizonyítja a pálcika fotoreceptorok korai életkorban bekövetkezett pusztulását és a csap fotoreceptorok progresszív, periféria felől a fovea centruma felé tartó pusztulását. A fotoreceptorok (csapok és pálcikák) elektromos aktivitásának vizsgálatakor a sötét-adaptált 0.01 ERG (pálcika válasz), a sötét-adaptált 3.0 ERG (maximális kombinált csap-pálcika válasz), a sötét-adaptált 3.0 oszcillatórikus potenciál és fény-adaptált 3.0 ERG (single-flash fotopikus) esetén sem lehetett elektromos aktivitást detektálni. Minimális aktivitást a fény-adaptált 3.0 flicker ERG-nél (30Hz flicker) lehetett megfigyelni.

Oculodentodigitális dysplasiával diagnosztizált beteg szemészeti és genetikai vizsgálatának eredményei

A 28 éves oculodentodigitális dysplasiában szenvedő betegnél az elülső szegmentum vizsgálatakor a cornea átmérő a 9.51 mm (jobb szem) és 9.56 mm (bal szem) volt, mely egyértelműen microcorneára utalt mindkét oldalon. Legjobban korrigált látásélessége 1.0 volt mindkét szemben. A refrakciós hiba -6Dsph+3.0Dcyl a jobb szemben és -5.0Dsph+2.5Dcyl a bal szemben. A tengelyhossz (jobb szem: 22.63 mm és bal szem: 22.49 mm) a cornea vastagság (jobb szem: 542 µm és bal szem: 544 µm) és a szemnyomás (14 Hgmm) normál volt. A látóidegfő mindkét szem esetén normál megjelenést mutatott. Az elülső csarnok mélység 2.34 mm (jobb szem) és 2.26 mm (bal szem), az elülső csarnok szöge 23.8°-26.7° (jobb szem) és 22.9°-25.4° (bal szem) volt, mely értékek egyértelműen sekély elülső csarnokra és szűk elülső csarnokzugi szögére utalnak. A gonioszkópia szintén szűk csarnokzugot igazolt, habár a csarnokzug elérte a Schaffer klasszifikáció szerinti 3. fokozatot. A fundus mindkét szemnél normális megjelenésű volt. A beteg szülei egészségesek voltak,

nem mutattak oculodentodigitális dysplasiára jellemző tüneteket. Az édesanya közepes fokú myopiával rendelkezett (SE jobb szem: -6.0D, SE bal szem: -4.5D). Az anyai nagyapánál nagyfokú myopia (SE jobb szem: -18.0D, SE bal szem: -20.0D) volt detektálható. A *GJA1* gén molekuláris genetikai vizsgálata a korábban egy betegben már leközölt, c.413G>A, p.Gly138Asp heterozigóta missense mutációt igazolta a 2-es exonban.

MEGBESZÉLÉS

A munkánk során feltárt új genotípus-fenotípus összefüggések

LVAVA/MVAVA opszin génekben detektált ritka interchange haplotípusokhoz kapcsolódó nagyfokú myopia és késői kezdetű progresszív csap dystrophia

2008-ban, egy nagyfokú rövidlátásban szenvedő férfi beteg jelentkezett tompa szemsérülés miatt a debreceni Szemklinika ügyeletén. A páciens elmondása szerint családjában több férfi beteg is nagyfokú rövidlátásban szenvedett. A proband segítségével elkészítettünk egy hat generációt felölelő családfát, mely alapján egyértelműen megállapítható volt az X kromoszómához kötött recesszív öröklésmenet. Mivel a nagyfokú rövidlátáson kívül más szemészeti eltérést nem találtunk, ezért X kromoszómán öröklődő nem szindrómás myopia gyanúja merült fel. Igaz ugyan, hogy a proband ERG vizsgálata csökkent pálcsika és hiányzó csap választ mutatott, de a rendkívül nagy tengelyhossz miatt az ERG vizsgálati eredményt nem tekintettük megbízhatónak. Az ERG vizsgálat alapján azonban természetesen felmerült egy X kromoszómához kötött csap dystrophia lehetősége is, melyet a többi családtag vizsgálatával és a proband genetikai vizsgálatával terveztünk bizonyítani vagy kizárni. A gyanúkat megerősítette az idősebb családtagok vizsgálata, akiknél a fundusvizsgálat, az OCT, az ERG és a fundus autofluoreszcens vizsgálat is megerősítette a progresszív macula dystrophia klinikai diagnózisát. Szintén csak az idősebb családtagokban találtunk progresszív zöld és vörös színlátás zavart, mely a legidősebb családtagban a vörös és zöld szín látásának teljes elvesztéséhez, vagyis kék monokromáziához vezetett.

Az X-hez kötött csap dystrophiák 70%-ért felelős lókuszon, az *RPGR* gén ORF15 exonjában nem találtunk patogén mutációt. A nagy felbontású X kromoszóma specifikus arrayCGH segítségével sem kromoszómális átrendeződést sem kópiaszámbeli eltérést nem sikerült azonosítani a probandnál. A klinikai exom szekvenálással három potenciálisan patogén variánst találtunk: a *CACNA1F* génben egy missense mutációt (c.1843G>T, p.Ala615Ser) és az *OPN1LW* valamint *OPN1MW* gének 3-as exonjában található ritka interchange LVAVA és MVAVA haplotípusokat. A *CACNA1F*-ben lévő eltérés patogenitása eleve kérdéses volt, ugyanis a genotípushoz társuló fenotípusos jegyek nem mutatnak egyezést a családban detektált tünetekkel. A variáns betegséget okozó hatását kizárta, hogy a Sanger szekvenálás nem igazolta az eltérést a további családtagoknál. Ezzel szemben megerősítette az LVAVA és MVAVA haplotípust minden érintett férfi esetében. Irodalmi közlemények alapján az LVAVA-t, mint patogén genetikai eltérést először két családban, a Bornholm Eye Disease (BED) háttérben azonosították. Míg a Bornholm betegséget veleszületett, stacioner csökkentlátás és színlátászavar jellemzi, addig az általunk vizsgálat családban 40 éves korig a látásélesség és színlátás is normális volt, és csak a 40 évesnél

idősebb családtagokban kezdődött el a progresszív folyamat, mely kék monokromáziához és macula dystrophia kialakulásához vezetett. A ritka opszin *interchange* haplotípusokkal kapcsolatban ilyen fenotípust korábban még nem közöltek az irodalomban. Az általunk közölt genotípus-fenotípus összefüggés két fontos új információra világít rá: először is arra, hogy ez az *interchange* haplotípus a Bornholm betegség eredeti leírásával ellentétben nem kizárólag stationer állapottal járó, hanem igenis progresszív retina dystrophiával járó betegséget is tud okozni. Másodszer pedig arra világít rá, hogy ez a haplotípus a nem szindrómás myopiát leíró esetekkel ellentétben mégis szindrómás állapot, csak megfelelő életkorú betegeket kell ahhoz vizsgálni, hogy kiderüljön, mit is okoz ez a haplotípus.

A homozigóta NEURODI null mutációhoz kapcsolódó új szindrómás progresszív pálcika-csap dystrophia

A *NEURODI* génről ismert, hogy részt vesz az endokrin pancreas valamint különböző neuronális elemek, így a retina fejlődésében is. A *NEURODI* gén funkciójáról szerzett ismereteink nagy része állatmodellekből származik, melyek alapján fontos szerepet tölt be a fotoreceptorok normál struktúrájának és működésének fenntartásában. Hiányában súlyos retina dystrophia alakul ki. Kutatásunk során elsőként karakterizáltuk a homozigóta *NEURODI* null mutációhoz tartozó kórkép részletes szemészeti fenotípusát emberben. Egy olyan súlyos pálcika-csap dystrophiát diagnosztizáltunk, mely elektrofiziológiai tulajdonságaiban hasonlít a retinitis pigmentosára, viszont a fundusképe és a macula OCT képe minden más, eddig ismert retina dystrophiától megkülönbözteti. Ezek a jegyek a következők: relatíve megkímélt RPE réteg, normál megjelenésű papilla és érhálózat, az extrafoveális fotoreceptorok teljes hiánya, illetve a fotoreceptorok alkotta hiperreflektív lemez a foveában. A szakirodalomban először írtuk le a *NEURODI* gén teljes funkcionális kiesésének hatását az emberi szemre, egyúttal először igazoltuk, hogy a *NEURODI* gén és fehérje a retina normál homeosztázisában elengedhetetlen szerepet játszik.

Relatív anterior microphthalmus oculodentodigitális dysplasiában

Az oculodentodigitális dysplasia egy ritka veleszületett rendellenesség, amelyért a connexin 43 proteint kódoló *GJA1* gén mutáció felelősek. Az általunk vizsgált 28 éves férfi beteg az oculodentodigitális dysplasiára jellemző tipikus dysmorphiás jegyeket mutatta. A részletes szemészeti vizsgálat microcorneát, sekély elülső csarnokot és szűk csarnokzugi szöveget igazolt. A betegnél ugyanakkor normál tengelyhosszt és refraktív myopiát találtunk mindkét szemén, mely azt mutatja, hogy a normálistól kisebb elülső szegmentumhoz normál

hosszúságú hátsó szegmentum társul, mely állapotot relatív anterior microphthalmusnak nevezzük. A genetikai analízis alátámasztotta a klinikai diagnózist. A *GJAI* génben azonosítottunk egy, a betegség hátterében korábban egy esetben már leközölt heterozigóta missense mutációt (c.413G>A, p.Gly138Asp). Az általunk közölt beteg normál tengelyhossza viszont különbözik az eddig a szakirodalomban közölt összes oculodentodigitális dysplasiás betegétől. Ez az első eset, melyben relatív anterior microphthalmos és myopia egyszerre társul oculodentodigitális dysplasiához. Eredményeink igazolták, hogy a microphthalmus nem kötelező tünete a betegségnek, vagyis a microcornea társulhat normál tengelyhosszal is oculodentodigitális dysplasiában. Megfigyeléseink hozzájárultak az oculodentodigitális dysplasia fenotípusos spektrumának kiterjesztéséhez, valamint segíthetik a szem tengelyhosszát befolyásoló genetikai faktorok szerepének megértését.

A PHD értekezés új eredményei

1. Kihhasználva a Debreceni Egyetem Szemklinikájának és a Laboratóriumi Medicina Intézet Klinikai Genetikai Tanszékének interdiszciplináris együttműködését, ritka örökletes szemészeti kórképek részletes genotípus-fenotípus meghatározását végeztük el. Sikerral ötvöztünk hagyományos genetikai vizsgálatokat és újgenerációs vizsgálóeljárásokat, klasszikus szemészeti vizsgálatokat modern képalkotó és elektrofiziológiai vizsgálatokkal a betegségek genetikai okainak és pontos fenotípusának feltárásában.
2. Az irodalomban elsőként detektáltuk az LVAVA/MVAVA opszin interchange haplotípus együttes előfordulását és elsőként írtuk le az ehhez tartozó szemészeti fenotípust.
3. A toxikus haplotípusok által okozott X-hez kötött nagyfokú myopiával járó, késői életkorban jelentkező progresszív csap-pálcika dystrophia korábban ismeretlen volt. Így hozzájárultunk a ritka exon 3 interchange haplotípusokhoz kapcsolódó genotípus-fenotípus összefüggések pontosabb megismeréséhez.
4. Megfigyeltük, hogy az általunk diagnosztizált LVAVA/MVAVA haplotípushoz kapcsolódó progresszív csap dystrophia tünetei (látásélesség csökkenés, színlátászavar) csak késői életkorban jelentkeznek, mely a részletes családvizsgálat fontosságára hívja fel a figyelmet, és óva inti a klinikust az elhamarkodott diagnózisalkotástól.
5. Eredményeink elsőként bizonyították in vivo, hogy a színlátászavar nem az LVAVA/MVAVA haplotípus miatt alakul ki a betegekben, hanem a késői életkorban jelentkező csap dystrophia következménye.
6. Eredményeink megkérdőjelezik, hogy a korábban közölt esetekben valóban nem szindrómás myopiát okozott-e az LVAVA haplotípus, ezzel újra nyitottá tettük a kérdést, hogy létezik-e nem szindrómás, X-kromoszómához kötötten öröklődő myopia.

7. A *NEURODI* gén kieséséhez társuló szemészeti fenotípus emberben korábban ismeretlen volt. Jelen munka során részletesen meghatároztuk egy, a *NEURODI* génben lévő homozigóta null mutáció (c.427_428delCT) által okozott szemészeti fenotípust egy permanens neonatalis diabetessel és súlyos neurológia rendellenességekkel rendelkező beteg esetében. Ezzel a szakirodalomban elsőként közöltük a *NEURODI* gén homozigóta null mutációjának hatását az emberi szemre. Először igazoltuk, hogy *NEURODI* hiánya az állatkísérletekhez hasonlóan emberben is súlyos retina dystrophiát okoz.

8. Egy ismert *GJAI* mutáció által okozott oculodentodigitális dysplasiában szenvedő páciensnél az irodalomban először írtuk le relatív anterior microphthalmus és myopia együttes előfordulását. Ezzel igazoltuk, hogy a microphthalmus nem szükségszerű velejárója a szindrómának, és a microcornea járhat együtt normál tengelyhosszal is oculodentodigitális dysplasiában.

A PhD értekezés alapjául szolgáló in extenso közlemények



**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/5/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Orosz Orsolya
Neptun kód: Q6WCCD
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10062098

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Orosz, O., Fodor, M., Balogh, I., Losonczy, G.: Relative anterior microphthalmos in oculodentodigital dysplasia.
Indian J. Ophthalmol. 66 (2), 334-336, 2018.
IF: 0.835 (2016)
2. Orosz, O., Rajta, I., Vajdas, A., Takács, L., Csutak, A., Fodor, M., Kolozsvári, B. L., Resch, M. D., Sényi, K., Lesch, B., Szabó, V., Berta, A., Balogh, I., Losonczy, G.: Myopia and Late-Onset Progressive Cone Dystrophy Associate to LVAVA/MVAVA Exon 3 Interchange Haplotypes of Opsin Genes on Chromosome X.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 58 (3), 1834-1842, 2017.
IF: 3.303 (2016)
3. Orosz, O., Czeglédi, M., Kántor, I., Balogh, I., Vajdas, A., Takács, L., Berta, A., Losonczy, G.: Ophthalmological phenotype associated with homozygous null mutation in the NEUROD1 gene.
Mol. Vis. 5 (21), 124-130, 2015.
IF: 2.11

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 6,248

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):

6,248

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

Debrecen, 2018.03.07.

