

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Orosz Orsolya

Új genotípus-fenotípus összefüggések örökletes szemészeti kórképekben

DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2018

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Új genotípus-fenotípus összefüggések örökletes szemészeti kórképekben

Orosz Orsolya

Témavezető: Dr. Losonczy Gergely



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2018

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	3
1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1. A leggyakoribb örökletes vagy genetikailag meghatározott szembetegségek	8
2.2. Az értekezés alapjául szolgáló betegségek irodalmi áttekintése	11
2.2.1. <i>A szem fénytörési hibáinak genetikája</i>	11
2.2.2. <i>Létezik-e X kromoszómához kötött nem szindrómás nagyfokú rövidlátás?</i>	13
2.2.3. <i>Az örökletes myopia egyik lehetséges oka: színlátászavarral járó csap dystrophia - stationer vagy progresszív betegség a Bornholm szembetegség?</i>	14
2.2.4. <i>Örökletes diabetes és retina dystrophia - a NEUROD1 gén etiológiai szerepe es feltételezett hatása</i>	18
2.2.5. <i>Oculodentodigitális dysplasia</i>	20
3. CÉLKITŰZÉSEK	21
4. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK	24
4.1. Betegek	24
4.1.1. <i>Esetismertetés I.</i>	24
4.1.2. <i>Esetismertetés II.</i>	25
4.1.3. <i>Esetismertetés III.</i>	25
4.2. Szemészeti vizsgálatok	26
4.3. Molekuláris genetikai módszerek	27
4.3.1. <i>Genomiális DNS izolálása.</i>	27
4.3.2. <i>Array CGH analízis</i>	27
4.3.3. <i>RPGR gén ORF15 exonjának bidirekcionális Sanger szekvenálása</i>	27
4.3.4. <i>Klinikai exom szekvenálás</i>	28
4.3.5. <i>OPN1LW, OPN1MW és CACNA1F génekben detektált eltérések validálása szegregációs analízissel</i>	30

4.3.6. <i>GJA1</i> gén bidirekcionális Sanger szekvenálása	31
5. EREDMÉNYEK	34
5.1. Az X kromoszómához kötött nagyfokú myopiával és késői életkorban kialakuló csap dystrophiával diagnosztizált család szemészeti vizsgálatainak eredményei	34
5.2. Az X kromoszómához kötött nagyfokú myopiával és késői kezdetű csap dystrophiával diagnosztizált család molekuláris genetikai vizsgálatainak eredményei	40
5.3. A homozigóta NEUROD1 null mutációhoz társuló progresszív pálcika-csap dystrophiában szenvedő nőbeteg szemészeti vizsgálatainak eredményei	46
5.4. Oculodentodigitális dysplasiával diagnosztizált beteg szemészeti és genetikai vizsgálatának eredményei.....	50
6. MEGBESZÉLÉS	53
6.1. A munkánk során feltárt új genotípus-fenotípus összefüggések	54
6.1.1. <i>LVAVA/MVAVA</i> opszin génekben detektált ritka interchange haplotípusokhoz kapcsolódó nagyfokú myopia és késői kezdetű progresszív csap dystrophia	54
6.1.2. A homozigóta NEUROD1 null mutációhoz kapcsolódó új szindrómás progresszív pálcika-csap dystrophia	60
6.1.3. Relatív anterior microphthalmus oculodentodigitális dysplasiában	64
6.1.4. Új eredmények és gyakorlati jelentőség	65
7. ÖSSZEFOGLALÁS	69
8. IRODALOMJEGYZÉK	73
9. TÁRGYSZAVAK	92
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	93
11. PUBLIKÁCIÓS LISTA	94
12. FÜGGELÉK	95

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ArrayCGH: komparatív genomi hibridizációs array

BED: Bornholm eye disease, Borholm szembetegség

bHLH: basic helix-loop-helix transcription factor, bázikus hélix-hurok-hélix transzkripciósfaktor

CACNA1F: calcium voltage-gated channel subunit alpha1F

cKO: conditional knockout, kondicionális knockout

CNV: copy number variaton, kópiaszámbeli eltérések

D: dioptria

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

ERG: elektroretinográfia

FDA: Food and Drug Administration

FAF: fundus autofluoreszcencia

ISCEV: International Society for Clinical Electrophysiology of Vision

KO: knockout

LCR: locus control region, lókuszkontroll régió

LIAVA: Leucin, Isoleucin, Alanin, Valin, Alanin

LIAVS: Leucin, Isoleucin, Alanin, Valin, Szerin

LIVVA: Leucin, Isoleucin, Valin, Valin, Alanin

LVAIS: Leucin, Valin, Alanin, Isoleucin, Szerin

LVAVA: Leucin, Valin, Alanin, Valin, Alanin

MAF: minor allél frekvencia

MAC: microphthalmia, anophthalmia, coloboma

MIAVA: Metionin, Isoleucin, Alanin, Valin, Alanin

MODY: Maturity Onset Diabetes of the Young

MVAIA: Metionin, Valin, Alanin, Izoleucin, Alanin

MVVVA: Metionin, Valin, Valin, Valin, Alanin

ORF15: open reading frame 15, nyitott olvasási keret 15

PNDM: permanens neonatalis diabetes mellitus

PCR: polimeráz láncreakció

RPE: retina pigment epithelium

SD-OCT: spektrál domén optikai koherencia tomográfia

1. BEVEZETÉS

A szemészet és a genetika tudománya szoros kapcsolatban állnak egymással. 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. Genetikai vizsgálat leggyakrabban az alábbi szemészeti betegségekben történik: anophthalmia, microphthalmia, coloboma, anterior szegmens diszgenezis, különböző cornea dystrophiák, kongenitális cataracta és glaucoma, a színlátászavarok különböző formái és a különböző retina dystrophiák (leggyakrabban retinitis pigmentosa). Az öröklődő szemészeti kórképek klinikai diagnosztikájában a legnagyobb kihívást a genetikai és klinikai heterogenitás, valamint a betegségekért felelős gének változó expresszivitása és penetranciája jelenti. A klinikai diagnózis pontosítása érdekében az öröklődő szemészeti eltérések diagnosztikájában a klasszikus szemészeti vizsgálatok (látásélesség, látótér, színlátás, réslámpás és fundus vizsgálat) mellett modern képalkotó eljárásokra (optikai koherencia tomográfia, fluoreszcein angiográfia) és elektrofiziológiai módszerekre (standardizált elektroretinográfia) is szükség van. Azonban nemcsak a klinikai vizsgálat, de sokszor a genetikai diagnosztika is nagy kihívást jelent e betegségekben. A fenotípus háttérében álló nukleotidszintű eltérések meghatározásában a hagyományos Sanger típusú szekvenálási metodika mellett egyre nagyobb hangsúlyt kapnak a nagy teljesítményű, újgenerációs szekvenálási technikák, melyek különösen nagy segítséget nyújtanak az ismeretlen eredetű illetve a nagyfokú heterogenitással rendelkező kórképek diagnosztikájában. Az elmúlt 15

évben mintegy 500 gén szerepét igazolták valamilyen szemészeti eltérés hátterében. Az ilyen új genotípus-fenotípus kapcsolat felderítése és az ismeretlen eredetű betegségek sikeres genetikai vizsgálatának előfeltétele a minél részletesebb klinikai fenotípus meghatározás, valamint a részletes és alapos családvizsgálat.

A korai és precíz diagnózis elengedhetetlenül fontos a prevenció, a prognózis, a genetikai hordozók azonosítása és a prenatális vagy a preimplantációs diagnosztika szempontjából is. Emellett a molekuláris diagnózis meghatározása egyre nagyobb szerepet kap a genetikai diagnózison alapuló génterápiás eljárások fejlesztésében. A génterápiás eljárások pedig, bár fejlesztésük a várakozásoknál lassabban halad, előbb-utóbb biztosan elérhetővé válnak a genetikai betegségekben. Mivel a szemészetben rengeteg genetikai betegség ismert és mert a szembe könnyen, szisztémás mellékhatások nélkül juttathatók a génterápiás eszközök, ezért a szemészet az ilyen irányú fejlesztések kedvelt területe. Példaként említhetjük az *RPE65* génhez kapcsolódó retina dystrophia génterápiás kezelését, mely mára valósággá vált. Példaként említhetjük az *RPE65* génhez kapcsolódó retina dystrophia (Leber congenitális amaurozis) génterápiás kezelését, mely mára valósággá vált. 2017-ben Russell és munkatársai közölték az első hármas fázisú klinikai kísérleti eredményt, mely igazolja a LUXTURNA (voretigene neparvovec, AAV2-hRPE65v2) szignifikáns hatékonyságát homozigóta *RPE65* mutációhoz kapcsolódó örökletes retina dystrophiában. A tanulmányba 21 vírus vektorral kezelt és tíz kezeletlen egyént vontak be, akik legjobban korrigált látásélessége 20/60 vagy ennél alacsonyabb volt. Az intervenció bilaterálisan $1,5 \times 10^{11}$ vírusvektorral (0,3 ml) történt. A terápia hatékonyságát specifikus multi-luminance mobility teszttel (MLMT) ellenőrizték egy éves követési periódussal. A kezelt betegek 65%-a teljesítette az MLMT tesztet a legalacsonyabb fényerőnél (1 lux), míg a kezeletlen csoportból egy sem (1). 2018-tól a LUXTURNA FDA (Food and Drug Administration) által elfogadott *in vivo* génterápiás készítmény. A diagnosztikai kihívások megoldásában, a

korábban ismeretlen genotípus-fenotípus korrelációk minél pontosabb meghatározásában a különböző szakterületeken dolgozó szakemberek szoros kollaborációjára van szükség. Egyetemünkön erre a Debreceni Egyetem Szemklinikája és Laboratóriumi Medicina Intézet Klinikai Genetikai Tanszékének szoros együttműködése teremt lehetőséget, melynek keretében évek óta zajlanak szemészeti genetikai diagnosztikai vizsgálatok és szemészeti genetikai kutatások.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A leggyakoribb örökletes vagy genetikailag meghatározott szembetegségek

Irodalmi adatok szerint a szem organogenezisében több ezer génnek lehet szerepe. E gének mutációi által kialakított klinikai kép súlyossága változhat a látásélesség enyhe csökkenésétől a teljes vaksággal járó kórképekig (2-4). Mivel a legtöbb betegség esetében nem áll rendelkezésre adekvát terápia, ezért fő feladat az egyes kórképek hátterében álló genetikai tényezők feltárása, ezáltal a betegség patogenezisének pontos megismerése. Mindezek alapul szolgálnak a megfelelő állatmodellek, később a humán klinikai kísérletek kidolgozásához (5).

A technológia gyorsütemű fejlődése (gén panelek, teljes exom és genom szekvenálás) egyre több eddig nem megoldott vagy ismeretlen eredetűnek vélt monogénes, szindrómás, nem szindrómás, familiáris, sporadikus kórkép diagnózisát teszi lehetővé. Az irodalomban számos új genotípus-fenotípus összefüggés került leírásra, melyek a fenotípus spektrum szélesítése mellett segítik az adott szemészeti kórkép molekuláris szintű megértését is (6).

Az alábbiakban néhány példa szemlélteti, hogy az elmúlt években miként segítették a hagyományos és újgenerációs genetikai vizsgálatok a korábban ismeretlen genetikai eredetű mendeli vagy multifaktoriális betegségek okainak feltárását, és vezettek új genotípus-fenotípus összefüggések megismeréséhez.

A mendeli kórképek közül megemlíthetők a szem struktúrális fejlődését érintő eltérések, mint a *microphthalmia*, *anophthalmia* és *coloboma* (MAC). E rendellenességek előfordulhatnak izolált formában, de általában valamilyen malformációs szindróma részeként jelentkeznek. Az esetek 60%-ért a *SOX2* és az *OTX2*, míg 15%-ért a *VSX2* gének mutációi felelősek (3). 2015-ben 32 anophthalmia/ microphthalmiával és egyéb szemet érintő fejlődési rendellenességgel diagnosztizált betegben exom szekvenálással az ismert *OTX2* génen kívül a *RARB*, *GDF6*, *STRA6*, *COL4A1*, és a *PNPT1* génekben sikerült kóroki mutációt azonosítani

(7).

Az elmúlt időszakban szintén több gén szerepét hozták kapcsolatba *microcorneával*. Néhány szindrómás eset háttérében (vitreoretinopathia, colobomatous macrophtalmia *microcorneával*) a *GJA8* és *BEST1* gének mutációit azonosították (8, 9). 2012-ben Wang és munkatársai elsőként igazolták a *PAX6* gén szerepét izolált *microcornea* kialakulásában (10). Az elülső szegmentum diszgenezisével járó, autoszomális domináns módon öröklődő *Axenfeld-Rieger szindróma* háttérében először Gould és munkatársai azonosították a *FOXC1* génben patogén mutációt (11). Strungaru és munkatársai a *PITX2* kóroki szerepét írták le a betegség háttérében (12).

Az utóbbi években több mint 100 gént hoztak kapcsolatba *kongenitális cataractával*, mely a gyermekkori látáskárosodások kb. 10%-áért felelős világszerte (13). Az esetek 50%-ában a *CRYGD* gén mutációi azonosíthatók (14), 25%-nál a gap junction génekben figyelhető meg eltérés (3). 2014-ben *cataractával/microcorneával*, Peters anomáliával és MAC-el diagnosztizált 11, egymástól független családon elvégzett teljes exom szekvenálás öt kóroki mutációt igazolt négy különböző génben (*GJA8*, *CRYGC*, *PAX6* és *CYP1B1*) (15).

A teljes vakságban szenvedő esetek 0,01-0,04%-ért felelős *primer kongenitális glaucoma* háttérében a *CYP1B1*, *MYOC*, *FOXC1* és *TEK* gének kóroki szerepét bizonyították (3, 16). 2016-ban Micheal és munkatársai *primer kongenitális glaucomával* rendelkező *CYP1B1* negatív esetekben végeztek teljes genom szekvenálást, mely az *LTPBP2* génben igazolt két új és a *PXDN* génben egy új mutációt (17).

A mendeli öröklődésű retina dystrophiák különböző típusai több mint két millió embert érintenek világszerte. Az egyes betegségek pontos diagnózisának felállítását megnehezíti a rájuk jellemző nagyfokú genetikai és fenotípusos variabilitás, sőt a tünetek átfedést mutatnak az egyes kórképek között (4). Nem véletlen, hogy az öröklődő szemészeti kórképek területén zajló az exom és genom szekvenálások elsődlegesen erre a csoportra

fókuszálnak, különösen a retinitis pigmentosára. 2011-ben Zücker és munkatársai egy askenázi zsidó családban az ismert retinitis pigmentosa gének analízisének negatív eredménye miatt teljes exom szekvenálást végeztek, mellyel a *DHDDS* génben azonosítottak új mutációt, melyről kiderült, hogy az adott populációra jellemző alapító mutáció is egyben (18). A nagyfokú genetikai heterogenitással járó Stargardt macula dystrophia diagnosztikájában is nagy segítséget nyújtanak az újgenerációs technikák. 2012-ben Strom és munkatársai kilenc Stargardt betegségben szenvedő, egymástól független probandon végzett exom szekvenálással négy új mutációt igazoltak a betegségért felelős *ABCA4* génben. Emellett három, a kórképpel korábban nem azonosított génben (*RDS/PRPH2*, *ELOVL*, *CRB1*) detektáltak valószínűleg patogénnek ítéltető mutációt (19). Irodalmi adatok alapján több mint 100 gén hozható összefüggésbe a retina megbetegedéseinek szindrómás és nem szindrómás típusaival, ezek közül néhány - természetesen a nem szindrómás esetekben leírtak (*ABCA4*, *GNAT2*, *GUCY2D*) - állatmodelleken tesztelt génterápiás célpont. A Léber-féle kongenitális vakságot okozó *RPE65* gén mutációira kidolgozott génterápiát sikerrel alkalmazták már klinikai vonatkozásban is (20-22).

A molekuláris genetikai kutatások másik célterülete a multifaktoriális betegségek patomechanizmusának és etiológiájának megértése. Ismert, hogy az ilyen rendellenességek kialakulásában a környezeti hatások mellett a genetikai hajlamosító tényezőknek is kiemelt szerepe van. A multifaktoriális kórképek közül kiemelendő a cornea dystrophiát okozó *keratoconus*. A betegség gyakorisága ellenére etiológiája nem teljesen tisztázott, ezért a jelenleg zajló teljes genom szekvenálások egyik központi érdeklődési területének számít (23). Több lókuszt is azonosítottak a kórképpel összefüggésben, de eddig mindössze két génről (*VSX1* és *SOD1*) vélik, hogy szerepük lehet a *keratoconus* patogenezisében (24, 25). Az irodalomban egyre több a *keratoconus* kialakulására hajlamosító környezeti tényező (UV sugárzás, életkor, atópia) kerül leírásra (26). A szemészeti genetikai kutatások központjában

álló legismertebb multifaktoriális kórkép az időskori maculadegeneráció, mely az 50 év feletti populációban a visszafordíthatatlan vakság leggyakoribb oka (27). Gyakori kórkép, a fejlett országokban a 65 év feletti lakosság 15%-a szenved az időskori macula degeneráció száraz vagy nedves formájában. A betegség etiológiájáról viszont nagyon keveset tudunk, bár kialakulásában és progressziójában több gén polimorfizmusának tulajdonítanak központi szerepet, melyek főként az immunrendszer komplement rendszerének szabályozásában (*CFH* gén Tyr204His mutációja, *CFB*, *C3*, *C2*, *C5*) vesznek részt (28, 29). Intenzív kutatások zajlanak az angiogenezis útvonalában résztvevő gének polimorfizmusainak vizsgálatában is (*VEGF* géncsalád), melyek a súlyosabb exsudatív forma kialakításáért felelősek, ugyanakkor a betegség terápiájában alkalmazott anti-VEGF terápia hatékonyságát is befolyásolják (30).

2.2. Az értekezés alapjául szolgáló betegségek irodalmi áttekintése

2.2.1. A szem fénytörési hibáinak genetikája

A szem fénytörési hibái a korrigálható látásromlás leggyakoribb okai közé tartoznak, világszerte kb. 2 milliárd ember érintenek. A refrakciót a különböző okuláris biometriai paraméterek (cornea törőerő, elülső csarnok mélység, lencsevastagság, tengelyhossz) együttes hozzájárulása határozza meg. Ismert, hogy a szem fénytörését meghatározó képletek kialakításáért genetikai és környezeti hatások egyaránt felelősek. Számos irodalmi közlemény vizsgálta a szem biometriai paramétereinek öröklődését, melyek bizonyítják azok genetikai meghatározottságát (31-34). A szem biometriai paramétereinek és az ebből adódó refrakciós hibáknak a heritabilitása, vagyis, hogy a genetikai státusz milyen arányban felelős az adott fenotípusban látható különbségek kialakulásáért, az alábbiak: a tengelyhossz 40-94%, a cornea törőerő 60-95%, az elülső csarnokmélység 70-94%, a lencsevastagság 90-93%, a szférikus ekvivalens 58-85% (31, 32, 34-36). Ezek alapján egyértelműnek tűnik, hogy a rövidlátás, mint refrakciós hiba létrejöttében a genetikai státusznak központi szerepe van. A

myopia az egyik leggyakoribb szemészeti betegség világszerte. Számos epidemiológiai tanulmány utal arra, hogy a nagyfokú myopia és annak szövődményei következtében a populáció 0,08-0,1% vakságtól, 0,21%-a pedig súlyos látásélesség csökkenéstől (0,1 alatti látásélesség) szenved (37-40). A myopia prevalenciája az életkorral emelkedést mutat. Európában a 18-35 év közötti lakosoknál 25-40% az előfordulása. A fejlett oktatású társadalmakban a myopia prevalenciája az elmúlt 40 évben meredek emelkedést mutat, pl. az Egyesült Államokban 1970 óta 20%-ról 40%-ra emelkedett a myopiában szenvedő lakosok száma (41). Ennek ellenére a rövidlátás etiológiájáról keveset tudunk. Kialakulásában környezeti (fejlett oktatás, sok tanulás és közelre fókuszálás) és genetikai faktorok is szerepet játszanak. A genetikai tényezőknek különösen a nagyfokú rövidlátásban van kitüntetett szerepük (42). A genetikai státusz jelentőségét igazolja az egypetéjű ikrekben kimutatható magasabb konkordancia arány a kétpetéjű ikrekhez képest (32, 43, 44). Irodalmi adatok alapján a mendeli nagyfokú myopia öröklődhet autoszomális recesszív (AR), autoszomális domináns (AD) és nagyon ritkán X-hez kötött recesszív (XLR) módon, de előfordulnak sporadikus esetek is (42). Kapcsoltsági analízissel több lókuszt (MYP1-13, MYP15, MYP16, MYP18) azonosítottak mendeli öröklődésű nagyfokú myopia háttérében. Ezek többsége (MYP2-5, MYP11, MYP12, MYP15, MYP16) az AD módon öröklődő, a MYP18 az AR módon, a MYP1 és MYP13 lókuszt az XLR módon öröklődő nagyfokú myopiával állnak összefüggésben (45-49,50-53). Az első AR módon öröklődő nagyfokú myopia kialakulásáért felelős mutációt (c.1523G>T, p.Gly508Val) a *LEPRELI* génben egy izraeli beduin családban azonosították 2011-ben, teljes genom szekvenálással (54). A *LEPRELI* gén a kollagének hidroxilálását végző prolyl 3-hydroxylase 2 (P3H2) enzimet kódolja. Shi és munkatársai egy Han kínai családban az AD nagyfokú myopia háttérében álló *ZNF644* génben detektáltak mutációt (c.2154A>G, p.Ser672Gly) exom szekvenálással (55). A *ZNF644* gén a zinc finger protein 644 1-es isoformáját kódolja, mely a retinában és pigment epitheliumban

expresszáló transzkripció faktor és a szem fejlődésének irányításában vesz részt. 2013-ban szintén exom szekvenálással egy európai családban az *SCO2* génben detektáltak mutációt (c.157C>T, p.Gln53*) nagyfokú nem szindrómás AD öröklésmentű myopia háttérében. Az *SCO2* gén az Sco2 cytochrome c oxidáz (COX) proteint kódolja, mely a retinában, a pigment epitheliumban és a sclerában lokalizálódik. Szerepét a rövidlátás kialakulásában bizonyítja, hogy az *SCO2* mRNS szignifikáns expresszió csökkenést mutatott myopiás egerek retinájában (56).

2.2.2. Létezik-e X kromoszómához kötött nem szindrómás nagyfokú rövidlátás?

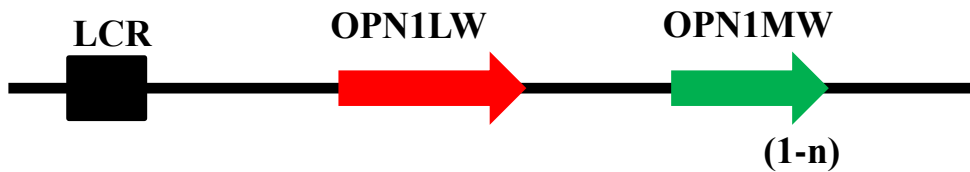
Haim és munkatársai 1988-ban egy dán családban kapcsoltági analízissel azonosították először az X kromoszómán (Xq28) található MYP1 lókuszt szindrómás nagyfokú myopiában, melyhez csapdiszfunkció és deutan színlátászavar társult. Mivel a betegséget egy, a Dániához tartozó Bornholm szigeten élő családban azonosították, ezért a szerzők azt Bornholm szembetegségnek (Bornholm Eye Disease, BED) nevezték el (57, 58). 2010-ben Guo és munkatársai szintén ezt a lókuszt írták le nem szindrómás X-hez kötött nagyfokú rövidlátásban (59). Ez volt az első közlemény, melyben közelebb kerültünk a nem szindrómás X-hez kötött öröklődő nagyfokú myopia genetikai háttérének megismeréséhez, bár a konkrét gén és mutáció még ismeretlen volt. 2013-ban McClements és munkatársai azonosították először a MYP1 lókuszon lévő *OPNILW* génben olyan egyedi haplotípusokat, (LIAVA, LVAVA), melyek az X-hez kötött szindrómás myopia, jelen esetben a Bornholm szembetegség kialakulásáért felelősek (60). Ezzel ellentétben nem volt olyan ismert gén vagy mutáció mely X-hez kötött nagyfokú nem szindrómás rövidlátást okozott volna. 2015-ben Li és munkatársai érdekes megállapítást közöltek két független családvizsgálat során, miszerint az *OPNILW* génben található LVAVA haplotípus (LVAVA) a nem szindrómás X-hez kötött nagyfokú myopia patogenezisében is szerepet játszik, és közleményük szerint ezzel a világon elsőként fejtették meg a nem szindrómás, X-hez kötött myopia genetikai háttérét (61). A

családok részletes vizsgálata azonban érdekes kérdéseket vetett fel, ami elbizonytalanított bennünket, hogy valóban a nem szindrómás myopia genetikai okát találták-e meg. Nem mehetünk el szó nélkül amellett, hogy a közlemény alapjául szolgáló első családban a legidősebb érintett családtag 75 éves volt, aki gyermekkor óta nagyfokú myopiában szenvedett, látásélessége fényérzés volt, viszont időskori szürkehályogra hivatkozva kizárták a további vizsgálatokból. Mivel a második legidősebb családtag mindössze 37 éves volt, ezért a legidősebb családtag kizárása megnehezíti a betegség időskori manifesztációinak, így progressziójának megítélését. Arra kérdésre, hogy miért nem operálták meg a beteg szürkehályogját, a cikkben nem térnek ki. Mindenesetre a világ bármely pontján a szürkehályogműtét indikációját jelentené, ha egy szürkehályogban szenvedő beteg látásélessége mindössze fényérzés volna. Ezen kívül más megfigyelések is megkérdőjelezzik, hogy valóban nem szindrómás myopiát találtak-e ebben a két családban. Egy betegnél protanomáliát állapítottak meg (59), a második család érintett férfi tagjainak látásélessége 0,1 és 0,2 között változott (61), három betegnél pedig az ERG vizsgálat enyhe és közepes csapválasz csökkenést detektált. Ezek a megállapítások azt mutatják, hogy a haplotípushoz társítható kórképről nem állapítható meg minden kétséget kizáróan, hogy az valóban X-hez kötött nem szindrómás nagyfokú myopia volna. A közleményekben szereplő adatok alapján nem lehet teljes bizonyossággal kizárni egy lassan progrediáló csap dystrophia lehetőségét.

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

A hosszú és közepes hullámhosszúságú fény érzékeléséért felelős L és M opszin fehérjéket kódoló gének (*OPNILW*, *OPNIMW*) az X kromoszómán (Xq28) helyezkednek el szorosan egymás után (62). A két gén szekvenciája 98%-ban homológ. A szekvencia homológia és a gének közelsége miatt gyakori az ún. intra-és intergénikus rekombinációjuk, mely a fotopigmentek nagyfokú variabilitásához vezet. Ebben a génkonverciónak is fontos

szerpepe van, mely stabilizálhatja a szekvencia azonosságot, de létrehozhat ritka ún. *interchange* haplotípusokat (63). Egy normál X kromoszóma array felépítése a következő: lókuszkontroll régió (LCR) régió, egy L opszin gén, melyet egy vagy több M opszin követ [1. ábra].



1. ábra. A normál X kromoszóma array felépítése: Szabályozó lókuszkontroll régió (LCR), melyet az L és M opszin fehérjéket kódoló *OPN1LW* és *OPN1MW* gének követnek.

Ezek közül csak az első két pozícióban lévő gén expresszálódik a cisz regulatórikus LCR közelsége miatt (64-67). Az LCR, L- (*OPN1LW*) és M- (*OPN1MW*) opszin génekben bekövetkező mutációk különféle, X kromoszómához kötött, csapokat érintő betegségek kialakulásához vezetnek: vörös-zöld színlátászavar, X-hez kötött csap diszfunkciók, Bornholm szembetegség (BED), kék csap monokromázia és X-hez kötött csap dystrophia (58, 64, 66, 68-86). 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. Az elnevezésük egy mozaikszóval történik, melyek a fent említett aminosav pozíciókban lévő aminosavak egybetűs rövidítéseiből állnak. 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). Ezeket a haplotípusokat tekintjük tehát a génekben előforduló normál haplotípusnak. A betegséget okozókat kóros vagy toxikus haplotípusnak nevezi a szakirodalom. Az eddigi publikációs adatok alapján az opszin génekhez kapcsolt

betegségekben az alábbi toxikus haplotípusok fordultak elő: LVAVA, LIAVA, LIAVS, LIVVA, MVVVA, MIAVA (60, 66, 73, 75, 87-90). Az irodalomban a toxikus exon 3 *interchange* haplotípusok legtöbbször Bornholm betegséggel (Bornholm Eye Disease) kapcsolatban kerültek leírásra (57, 59-61, 89). A BED-et, mint stationer csap diszfunkciót elsőként egy, a dániai Bornholm szigetről származó családban diagnosztizálták (57). A második családot Minnesotában írták le, akik szintén dán származásúak voltak (76). 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 lokuszán elhelyezkedő opszin gének valamelyikében detektált LVAVA toxikus haplotípus volt (60). Gardner és munkatársai szintén az LVAVA haplotípus kóroki szerepét igazolták az előzőekhez hasonló tünetekkel, valamint protan vagy deutan színlátászavarral járó betegségben, négy egymástól független családban (89).

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 transzlációjának 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 (89, 91). 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 (60). 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 tünetének, a myopiának a kialakulásában van domináns szerepe (60). Ezt a következtetést leginkább két kínai kutatócsoport által közölt publikáció támasztja alá, melyek az LVAVA kóroki szerepét állapították meg két, nem szindrómás myopiával diagnosztizált családban (59, 61). Érdekesség, hogy bár a BED nem progresszív retina betegség, és természetesen a nem szindrómás myopiában sem írtak le progresszív retina dystrophiát, más esetben viszont az LVAVA haplotípussal mégis igazoltak progresszív csap dystrophiát. Carroll és mtsai (2012) 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: a retina vastagságának csökkenését, molyrágás szerű pigment epithel atrophiát a fotoreceptor belső szegmentumon valamint a retina belső és külső nukleáris rétegének strukturális zavarát. Mindez közvetett bizonyíték arra, hogy az LVAVA haplotípus progresszív degeneratív elváltozásokat okoz nemcsak a mutáns opszin expresszáló, de a szomszédos fotoreceptor sejtekben is. Ráadásul a Carroll által közölt két beteg BED-re jellemző fenotípusos tünetei viszonylag későn, általános iskolás korban kezdődtek, ellentétben az eddig leírt esetekkel, melyek mindegyikében veleszületett, stacioner állapotról számoltak be. Az utóbbi évek során a BED-ről mint egy stacioner, színlátási zavarral járó kórképről alkotott elképzeléseink az

irodalomban megjelent genotípus-fenotípus korrelációk alapján kezdenek új irányt venni. Az újabb közlemények szerint az LVAVA haplotípusú csap fotoreceptor sejtek korai életkorban normál funkciót mutatnak, majd az életkor előrehaladtával elindul egy degeneratív folyamat (59, 61, 88, 89, 91). Közvetlen bizonyíték azonban eddig nem áll rendelkezésre arról, hogy a BED, vagy a ritka *interchange* haplotípusokhoz társuló egyéb kórképek progresszív retina dystrophiával járnának.

2.2.4. 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 (92-94). A *NEURODI* génről és a gén hiányában kialakuló kórképről szerzett ismereteink kizárólag állatkísérletekből származnak, ugyanis emberben ezidáig nem írtak le *NEURODI* null mutációval – vagyis a gén teljes funkcióvesztésével - járó genotípust. Lee és mtsai, (1995) *NEURODI* expressziót mutattak ki egerek és békák differenciálódott neuronjaiban, emellett igazolták, hogy képes az ektodermális sejteket differenciálódott neuronokká alakítani *Xenopus*-ban. Megfigyelték a differenciálódott neuronok *NEURODI* expresszióját a felnőtt *Xenopus* különböző agyi struktúráiban is (hippocampus, cerebellum, bulbus olfactorius) (95). Egerekben a *NEURODI* teljes funkcióvesztésével járó mutációja letális, ezért egyszerű *knockout* kísérletben nem vizsgálható a hatása. Ugyanakkor az inzulin promóter mögé illesztett *NEURODI* transzgénnel (96) vagy a null mutáció más genetikai háttérrel való visszakeresztesésével (97) életben tarthatóak a *NEURODI* homozigóta mutáns egerek. Ezek különböző idegrendszeri tüneteket mutatnak: ataxia, egyensúlyzavar, cerebelláris hypoxia, epilepszia, súlyos hallás- és látáskárosodás (96-100). Morrow és munkatársai (1999) vizsgálták a *NEURODI* expresszióját egér és patkány retinában. Megállapították, hogy az

expresszió elsősorban a nem differenciálódott retina sejtekben, a fejlődő amakrin interneuronokban és fotoreceptorokban figyelhető meg, sőt az expresszió a terminálisan differenciálódott fotoreceptor sejtekben is megmaradt (99). Egy másik kutatócsoport szintén igazolta a *NEURODI* szerepét a fotoreceptorok fejlődésében. Megfigyelésük alapján a gén expressziójának szuppressziója súlyosan akadályozza a fotoreceptorok fejlődését csirke retinában (101). A *NEURODI* gén retinában betöltött funkciójának meghatározására Ochocinska és munkatársai (2012) 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 pálcska és csap válasz csökkenését mérték, a szövettani vizsgálatokkal pedig a retina külső szegmentumának dezorganizáltságát találták. Idősebb korban a fotoreceptorok teljes hiányát detektálták. A microarray vizsgálat két gén expressziójának csökkenését mutatta: az *Aipl1* génét, mely a retina degeneratív folyamatainak negatív szabályozója, valamint a retina külső szegmentumában expresszálandó *Ankrd33* génét. Ez a kísérleti eredmény azt igazolta, hogy a *NEURODI* gén nemcsak a retina fejlődésében, de a fotoreceptorok homeosztázisának fenntartásában is fontos szerepet játszik (102). Cho és munkatársai (2007) a *NEURODI* expresszióját az egér retina három rétegben mutatták ki, vagyis a külső nukleáris, a belső nukleáris és a ganglion sejtek rétegében. Ugyanakkor, a gén kikapcsolása csak a fotoreceptorok rétegében okozott degenerációt (103). Acharya és kutatócsoportja (1997) bizonyította, hogy a *NEURODI* transzkripciója és immunreaktivitása főleg a külső szegmentumban volt látható felnőtt egerek retinájában (104). Emberben a *NEURODI* homozigóta funkcióvesztő mutációja sokáig nem volt ismert, aminek oka a kutatók feltételezése szerint az volt, hogy a mutáció az állatkísérletekből ismert módon emberben is letális lehetett. 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 (105-108).

2010-ben ugyanakkor nagy meglepetésre mégis leközöltek két egymástól független beteget, akikben a *NEURODI* funkcióvesztéssel járó mutációját homozigóta formában találták meg. Egyikőjükénél egy bázist érintő duplikációval (c.364dupG, p.Asp122Glyfs*12) a másik betegnél két nukleotid deléciójával (c.427_428delCT, p.Leu143Alafs*55) járó mutációt találtak, melyek egyaránt az olvasási keret eltolódását majd egy transzaktivációs domént nem tartalmazó trunkált fehérje létrejöttét eredményezték (109). 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.

2.2.5. Oculodentodigitális dysplasia

Az Oculodentodigitális dysplasia, egy ritka veleszületett autoszomális domináns módon öröklődő szindróma melyből eddig mindössze kb. 300 esetet közöltek a világon (110). Kialakulásáért a szem fejlődésében szerepet játszó connexin 43 proteint kódoló, *GJA1* gén (6q21-23) hibája felelős (111). A betegség főként az arcot, az ujjakat (kéz és láb egyaránt) és a szemet érinti (112). Tipikus eltérés a hosszú keskeny orr, kiemelkedő orrhíddal, hypoplasticus alae nasi, vékony, ritka haj és szemöldök. Kicsi fogak, zománc hypopláziával. Jellemző digitális malformáció a IV-V-ös ujj syndactyliája és az V-ös ujjat érintő

campodactylia (113). Az irodalomban néhány betegnél hallásvesztést és neurológiai eltéréseket is megfigyeltek (112, 114). A szemészeti eltérések közül a leggyakrabban előforduló tünetek a microphthalmia és a microcornea, mely minden esetben együtt jár. Ezen kívül jelentkezhet iris atrophia, cataracta és optikus atrophia. A betegségben a glaucoma kialakulásának kockázata fokozott. Az irodalomban eddig több mint 60 mutációt közöltek a betegséggel összefüggésben, ennek ellenére több patogén eltérés esetén is hiányzik a részletes fenotípus karakterizálás (112, 115).

3. 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 ismerünk, 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 új generációs 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 oculodentodigitális dysplasiás esetekkel illetve egyéb, microphthalmussal járó állapotokkal.

4. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

4.1. 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 Laboratórumi 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.

4.1.1. 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) [3. ábra].

4.1.2. 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 gyermekkorától szenved nyctalopiától, fokozódó látótérszűkülettel, egyre csökkenő látásélességtől. Legjobban korrigált látásélessége a vizsgálati periódus alatt mindkét szemben 20/25-ről 15/25-re csökkent. A refrakciós hiba nem változott a vizsgálatok között: -7.5D szférikus és +3.0D cylinder mindkét szemben. 2013-ban mindkét oldalon centrális 30 fokos látótérszűkület 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. 2010-ben, kollaborációs együttműködés révén, az exeteri egyetemen (Institute of Biomedical and Clinical Science, Peninsula Medical School, University of Exeter, Exeter, UK) végzett genetikai vizsgálat a *NEUROD1* gén c.427_428delCT (p.Asp143Alafs*55) homozigóta funkcióvesztéssel járó mutációját igazolta (109). Részletes szemészeti vizsgálat korábban a páciensnél nem történt.

4.1.3. 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. 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.

4.2. Szemészeti vizsgálatok

Az örökletes nagyfokú myopiával diagnosztizált család tagjainál, a 21 éves *NEURODI* mutációval rendelkező nőbetegnél és a 28 éves oculodentodigitális dysplasiával rendelkező férfi betegnél részletes szemészeti vizsgálatok történtek. A szemfenéki képet színes fundusfotókon rögzítettük, melyek ZK-5 színes szenzorral (Allied Vision Technologies GmbH, Stadtroda, 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 (116). 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 teszttel (X-Rite Pantone, MI, USA) és Nagel II-es típusú anomaloszkóppal történt.

4.3. Molekuláris genetikai módszerek

4.3.1. 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.

4.3.2. Array CGH analízis

Az X-hez kötött nagyfokú myopia és késői életkorban kialakuló csap dystrophia háttérében 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.

4.3.3. 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. Az ORF15 egy alternatív 3' terminális exon (117). Ez ugyanis az X-kromoszómához kötötten öröklődő myopiával társuló csap dystrophiák háttérében 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 (118) és saját tervezésű primerpárokat alkalmaztunk [1. táblázat]. 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 (15/5F és 15/5R primer által közrefogott szakasz): 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 manuálisan, két független személy által.

4.3.4. 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 folyamat főbb lépései a következők:

1. Genomiális DNS fragmentálása és tagmentálása: A könyvtárkészítés egy transzpozázos emésztéssel kezdődött, amely során 50 ng genomiális DNS megfelelő méretű (300bp) fragmentációja, majd annak amplifikációját végző primerek hibridizációjához szükséges szekvenciák ligálása történt. A primerek tartalmazzák az index szekvenciákat (kódokat), melyek segítségével a különböző

betegektől származó DNS fragmentek biztonsággal elkülöníthetők egymástól, és a szekvenáló reakcióhoz szükséges adaptereket (P5, P7).

2. PCR amplifikáció. A következő lépésben az index szekvenciákkal ellátott, tisztított fragmentumok amplifikációját végeztük el. A PCR reakció paramétereit a gyártó által javasolt protokoll alapján állítottuk be: 72°C, 3 perc; 98°C, 30 másodperc; 10 cikluson keresztül: 98°C, 10 másodperc; 60°C, 30 másodperc; 72°C, 30 másodperc; 72°C, 5 perc, majd a reakciót 10°C-on tartottuk.
3. Az amplifikált DNS tisztítása a könyvtárkészítő kitben lévő mágneses alapú tisztítógyöngyökkel történt (Sample Purification Bead).
4. Majd ezt követte a minták összekeverése (poolozása).
5. Denaturálás. A *poolozott* DNS könyvtár denaturálása.
6. A hibridizációs lépés során a biotinnal jelölt próbák hibridizációja történt a vizsgálni kívánt gének megfelelő régióihoz. A hibridizációs PCR reakció paramétereit szintén a gyártó által előírt protokoll alapján adtuk meg: 95°C, 10 perc; 18 cikluson keresztül 1 perces inkubálások segítségével 94°C-ról 2°C-ként csökkentettük a hőmérsékletet 58°C-ig; majd a reakciót 58°C-on tartottuk egy éjszakán át. A reakció során a PCR készülék tetejét 100°C-on tartottuk.
7. A capture alapú dúsítás során sztreptavidin alapú mágneses gyöngyök segítségével a hibridizációs próbákhoz kötött specifikus szekvenciákat elkülönítettük a nem specifikus fragmentumoktól.
8. A következő lépésben a DNS szekvenciák eluálását végeztük a mágneses gyöngyökről.
9. Hibridizáció, capture és az elució ismétlése.
10. Végül a kész DNS könyvtár amplifikációját szintén a gyártó által előírt körülmények szerint végeztük: 98°C, 30 másodperc; 10 cikluson keresztül:

98°C, 10 másodperc; 60°C, 30 másodperc; 72°C, 30 másodperc; 72°C, 5 perc;
majd a reakciót 10°C-on tartottuk.

11. Az amplifikált könyvtár tisztítása mágneses alapú tisztítógyöngyökkel (Sample Purification Bead) történt.
12. A szekvenálási reakció előtt a kész könyvtárat denaturáltuk.

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>) ExAC (<http://exac.broadinstitute.org>) és dbSNP (<http://ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) adatbázisokat használtuk.

4.3.5. 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 (1. táblázat). 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.

4.3.6. *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 *GJA1P1* pszeudogénnel (111). A *GJAI* gén 2-es exonjának amplifikációjához saját tervezésű primereket használtunk [1. táblázat]. 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 *GJA1P1* 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* 2/2 R), melyek specifikusan csak a *GJAI* gén e régióját tudják amplifikálni, mivel a 2/1F primer 3' vége nem egyezik meg a pszeudogén szekvenciájával [2. ábra]. A szekvencia egyezés megítélésre BLASTN programot használtunk. 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 *GJA1* gén referencia szekvenciájához (NM_000165) hasonlítottuk manuálisan, két független személy által.

1. táblázat. A PCR reakciókhoz alkalmazott primerpárok és hibridizációs hőmérsékleteik

Gén	Exon	Primer szekvenciák	Hibridizációs hőmérséklet (°C)
RPGR	15/1	Forward: 5'-ATCCAAATCCATGGCAAAGT-3'	55
		Reverz: 5'-GCCTTCACTCACCTCTGCTT-3'	
	15/2	Forward: 5'-AGGAAGGAGCAGAGGATTCA-3'	55
		Reverz: 5'-CCCTTCTTCCATTCTTCC-3'	
	15/3	Forward: 5-'GGGGAGAAAGACAAGGGTAG-3'	55
		Reverz: 5'-TCCTTTCCCTCCTCTACTT-3'	
	15/4	Forward: 5'-GGAAGAAGGAGACCAAGGAG-3'	55
		Reverz: 5'-CCCATTTCCTGTGTGTTAG-3'	
15/5	Forward: 5'-GCAGGATGGAGAGGAGTACA-3'	60	
	Reverz: 5'-GAGAGAGGCCAAAATTTACCA-3'		
<i>OPNILW/OPNIMW</i>	3	Forward: 5'-TAAGCAGGACAGTGGGAAGC-3' Reverz: 5'-GGCCCAGAGAAAGGAAGTG-3'	55
CACNA1F	14	Forward: 5'-GCCTCTCTCCCCACAGAGTA-3' Reverz: 5'-TGCTCAATGAATGGTGAAGC-3'	55
GJA1	2/1	Forward: 5'-TGGTAGTATTTTACTATCACCTGAA-3'	55
		Reverz: 5'-CACCATCAGTTTGGGCAAA-3'	
	2/2	Forward: 5'-TGGGTCCTGCAGATCATATTT-3'	55
		Reverz: 5'-AGCATGAAGATGATGAAGATGG-3'	
2/3	Forward: 5'-GCTTGAGTGCTGTTTACACTT G-3'	55	
	Reverz: 5'-TTGTTGTAATTGCGGCAAGA-3'		
2/4	Forward: 5'-ACCAACCGCTCCCTCTC-3'	55	
	Reverz: 5'-TTAACACCTGGTGCACCTTCT-3'		

GJA1 gén

Tagatcttttcttctgtggcaaaaatgggacaggaagagttgcacttggtttttgtgaaagaatgtagaaatacgtgaaacc
gttgtagtatttggactatcactgaaagggtactaaatgttaaactagtaatttgcaatctgtgatccttgaattgtctctttgtt
tctttcag

2.exon
GTGGTGCCAGGCAACATGGGTGACTGGAGCGCCTTAGGCAAACCTCTTGACAAGGTTCAAGC
CTACTCAACTGCTGGAGGGAAGGTGTGGCTGTGACTACTTTTCATTTCCGAATCCTGCTGCTGG
GGACAGCGGTTGAGTCAGCCTGGGGAGATGAGCAGTCTGCCTTTCGTTGTAACACTCAGCAAC
CTGGTTGTGAAAATGTCTGCTATGACAAGTCTTCCCAATCTCTCATGTGCGCTTCTGGGTCTGC
AGATCATATTTGTGTCTGTACCCACACTCTTGACCTGGCTCATGTGTTCTATGTGATGCGAAAAGGA
AGAGAACTGAACAAGAAAGAGGAAGAACAAGGTTGCCCAAACCTGATGGTGTCAATGTGGA
CATGCACTGAAGCAGATTGAGATAAAGAAGTTCAAGTACGGTATTGAAGAGCATGGTAAAGGTG
AAAATGCGAGGGGGGTTGCTGCGAACCTACATCATCAGTATCCTCTTCAAGTCTATCTTTGAGGT
GGCCTTCTGTGATCCAGTGGTACATCTATGGATTAGCTTGAGTGCTGTTTACACTTGCAAAAAG
AGATCCCTGCCACATCAGGTGGACTGTTTCTCTCTCGCCCCACGGAGAAAAACCATCTTCATCAT
CTTCATGCTGGTGGTGTCTTGGTGTCCCTGGCCTTGAATATCATTGAACTCTTCTATGTTTCTTC
AAGGG

GJA1P1 pseudogén

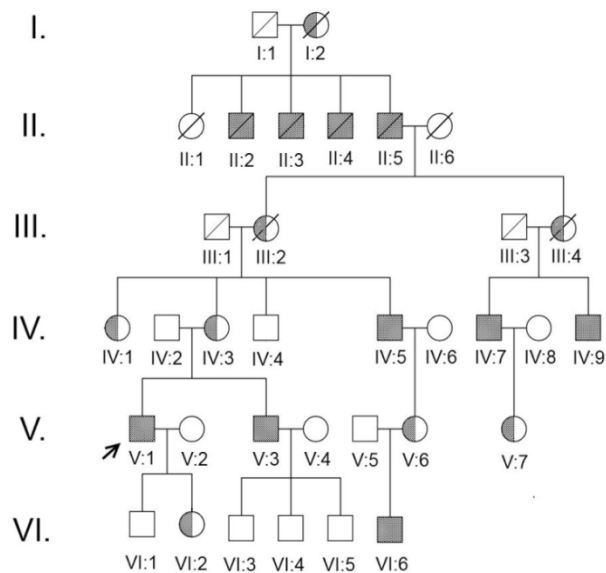
attccacactgcaaacagccttaggaaaatttagcaaaatctacttgtagacagaatttgaatggcctcccaaag
atgtcctactctaatacctggatccctatgagtgaagtactactcataatatttctatcatgtacattggaccttaaaata
agattatccaggtgtcctgatctaatacacaagcccttttaaaagtagagagtagcagcttttacgaggtatcagcact
tttctttcattgggggaaggtgtgaggaaagtaacaacagcagcggagtttaaaccttaaatagacaggtctgagtg
ctgaatttgccttttacttcatctccaaggagttcaatcacctggcgtgacttcaactcttttaagcaaaaagagtg
tgcccaggcaacATGCGTGACTGGAGCACTTAGGCAAACCTCTTGACAAGGTTCAAGCCTACT
2.exon
TAAGTCTGAGGGAAGGTGTGGCTGTGACTTTTCATTTCCAAATCCTGCTGCTGAAG
ACAGTGGTTGAGTCAGCCTGGGGAGATGAGCAGTCTGCCTTTCGTTGTAACACTCAGCAAC
CTGTTGTGAAAATGTCTGCTATGACAAGTCTTCCCAATCTCTCATGTGCGCTTCTGGGTCT
GCAGATCATATTTGTGTCTGTACCCACTCTTGACCTGGCTCATGTGTTCTATGTGATGCAAA
AGGAAGAGAACTGAACAAGAAAGAGGAGGAACCTCAAGGTTGCCCAAACCTGATGGTGT
AATGTGGAGATGCACTTGAAGCAGATTGAGATAAAGAAGTTCAAGTACGGTATTGAAGAGC
ATGTAAGGTGAAAATGCAAGGGGGGTTGCTGCGAACCTACATCATCAGTATCCTCTTCAAG
TCTATCTTTGAGGTGACCTTGCTGATCCAGTGGTACATCTATGGATTAGCTTGAGTGCTGTT
ACACTTGCAAAAAGAGATCCCTGCCACATCAGGTGGACTGCTTCTCTTGGCCCCATGGAG
AAACCATCTTCATCATCTTCATGCTAGGTGGTGTCCCTGGTGTCCCTGGCCTTGAATATCATTG
AACTCTTCTACGTTTTCTCAAGGGCGTTAAGGATTGGGTTAAGGGAAAGAGCGACCCTTAC
CATGCGACCACTGGCCCGCTGAGCCCCGCCAAAGACTGTGGG

2. ábra. A *GJA1* gén 2-es exonjának mutáció specifikus régióját a 2/1F (kék színnel jelölt) és 2/2R (zöld színnel jelölt) primerekkel végeztük. A 2/1F primer 3' végén elhelyezkedő nukleotidok különböznek a *GJA1* gén és a *GJA1P1* pseudogén között, így a primer pár specifikusan csak a *GJA1* gént amplifikálja. A feltételezett mutáció helyét piros szín jelzi.

5. EREDMÉNYEK

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

Az X-hez kötötten öröklődő nagyfokú myopiában szenvedő családban több különböző életkorú férfi családtag vizsgálatát végeztük el [3. ábra]. A hosszú távú követési periódus (a családfában az V:1 sorszámú jelölt probandnál nyolc év) és a legidősebb családtag (IV:5) szemészeti előzményeinek retrospektív elemzése a betegség késői tüneteinek és a progresszió ütemének megismerését tette lehetővé. A vizsgált családtagok részletes szemészeti vizsgálatainak eredményeit a 2. táblázat foglalja össze kronológiai sorrendben. 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.



3. ábra. Az X kromoszómához kötött nagyfokú myopiával rendelkező hat generációs család. A nyíl az L-opszin LVAVA és M-opszin MVAVA haplotípussal rendelkező probandot (V:1) jelöli.

2. táblázat. Az X kromoszómához kötött nagyfokú myopiában szenvedő család szemészeti vizsgálatának eredményei

Azonosító	Életkor (év)	Refrakció	BCVA	Színlátás	ERG	Fundus/OCT	Tengelyhossz
IV:5	40*	OD -4.25DS-0.5DC	20/20	nem vizsgált	nem vizsgált	normál fundus O.U.	OD 25.16 mm
		OS -5.25DS-1.5DC	20/20				OS 25.51 mm
	57	OD+1.75DS	20/25	deuteranomália	nem vizsgált	enyhe PE degeneráció O.U.	nem vizsgált
		OS+1.0DS	20/40				
	62	OD+1.5DS+1.5DC	20/25	protan/deutan színvakság	hiányzó csap válasz, csökkent pálcika válasz	mérsékelt macula PE atrophia, külső retina réteg vastagságának csökkenése O.U.	nem vizsgált
		OS+1.0DS+2.0DC	20/40				
IV:7	51	OD-5.75DS-2.0DC	20/50	protan/deutan színvakság	hiányzó csap válasz, csökkent pálcika válasz	enyhe és mérsékelt macula PE atrophia/külső retina réteg vastagságának csökkenése O.U.	OD 27.82 mm
		OS-6.5DS-0.5DC	20/33				OS 27.57 mm
V:1	32	nem vizsgált	20/20 20/20	nem vizsgált	nem vizsgált	normál macula, periférián myopiás fundussal	OD 31.44 mm OS 30.72mm
	38	OD-20.0D SE	20/20	normál	nem vizsgált	enyhe macula PE atrophia, periférián myopiás fundussal	nem vizsgált
		OS -18.0D SE	20/20				
46	OD -21.0DS-4.0DC	20/20	protan/deutan defektusok†	hiányzó csap válasz, csökkent pálcika válasz	mérsékelt macula PE atrophia, periférián myopiás fundussal	OD 33.11 mm	
	OS -19.75DS-2.5DC	20/25				OS 32.28mm	
V:3	42	OD-22.5DS+2.0DC	20/20	protan/deutan defektusok†	nem vizsgált	normál macula, periférián myopiás fundussal / normál OCT	OD 31.35 mm
		OS-24.5DS+2.0DC	20/20				OS 32.49 mm
VI:6	11	OD-6.25DS-3.75DC	‡20/40	normál	csökkent csap válasz, normál pálcika válasz	normál fundus	nem vizsgált
		OS-6.5DS-3.5DC	20/20				

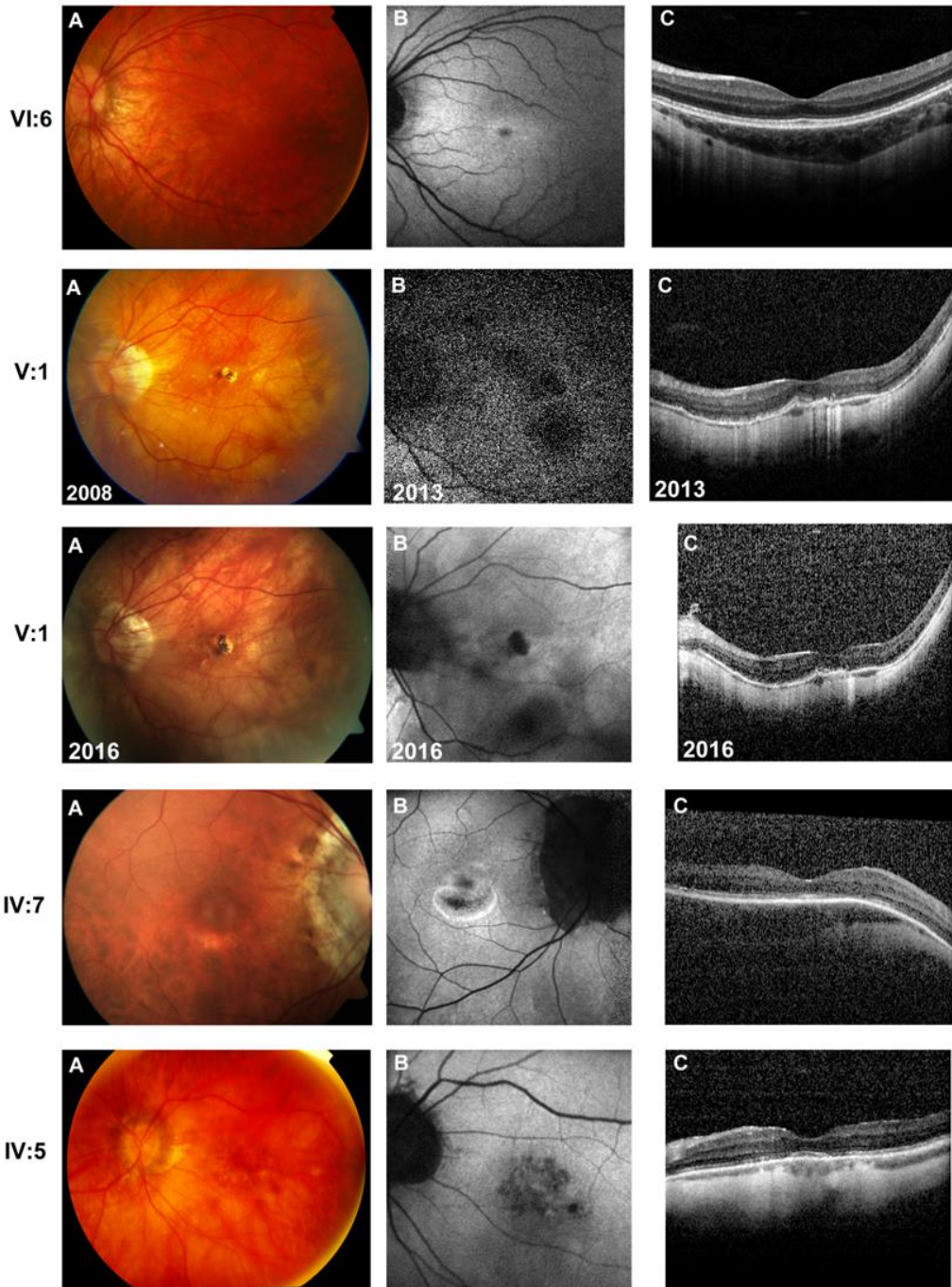
* A IV:5 beteg a corneát érintő refraktív sebészeti műtéten esett át 40 éves korában. A refrakciós értékek a preoperatív adatokat mutatják.

† Normál színlátás FM 100 Hue teszttel és Nagel anomaloszkóppal, a pszeudoizokromatikus teszt protan és deutan defektust mutat.

‡ A VI:6 beteg jobb szeme tompalátó.

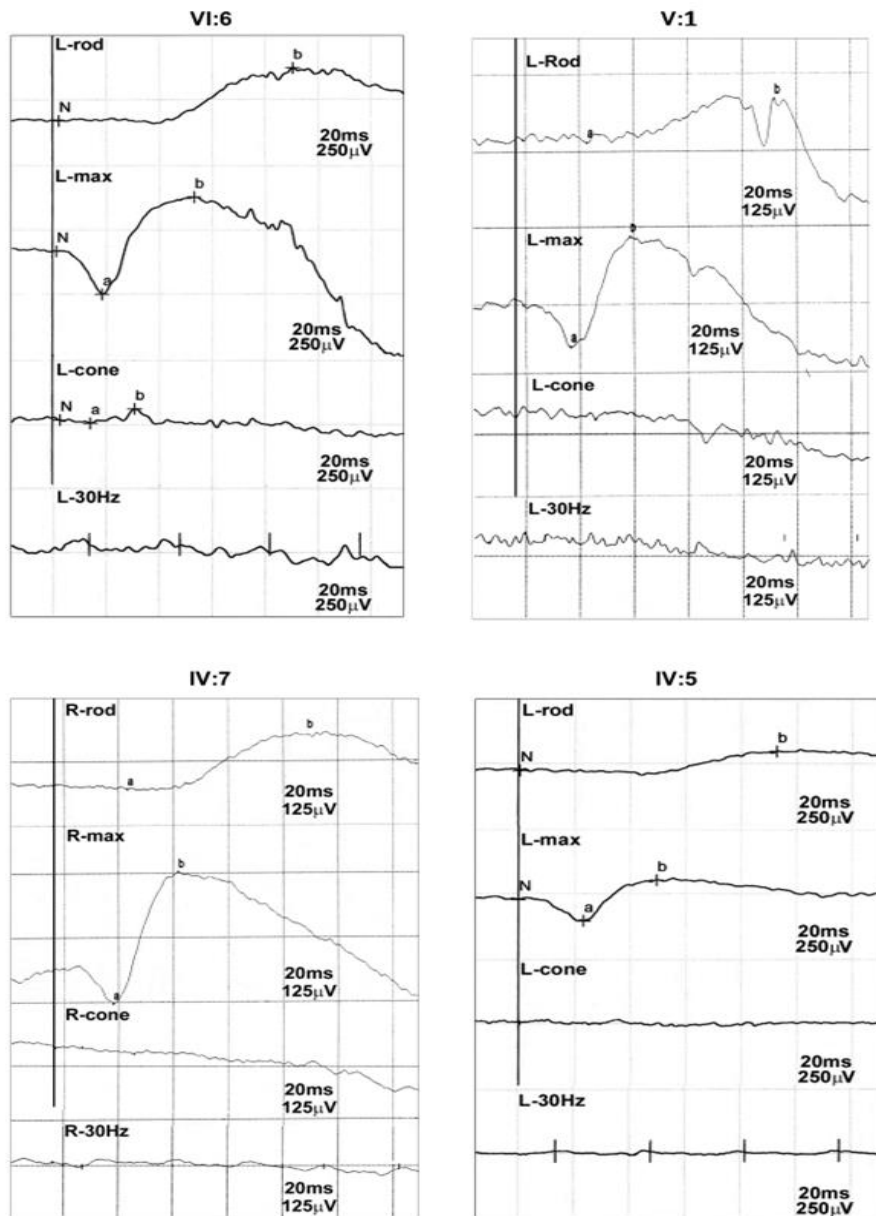
Az érintettek, a legfiatalabb családtag (VI:6) kivételével fotofóbiáról és egyre fokozódó színlátászavarról számoltak be. A kevert színek illetve a színárnyalatok megkülönböztetése egyre nehezebbé vált. Éjszakai látási nehézségről (farkasvakság) és a látásélesség csökkenéséről nem panaszkodtak. Még a 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 pseudoizokromatikus 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 [4. ábra].



4. ábra. A szemészeti képalkotói eljárások eredményei a X-hez kötött nagyfokú myopiával rendelkező család férfi tagjainál. Színes fundus fotók (A) autofluoreszcens fundus fotók (B) és az OCT vizsgálatok (C) képei a VI:6, V:1, IV:5 betegeknél a bal szemről, a IV:7 betegnél a jobb szemről. A VI:6, 11 éves betegnél normál fundus, míg a 38 évnél idősebb (V:1, IV:7, IV:5) betegeknél myopiás fundus elváltozás és enyhe vagy mérsékelt PE atrophia detektálható. A VI:6 és IV:7 páciensek fundus fotóin hiperreflektív gyűrű látható.

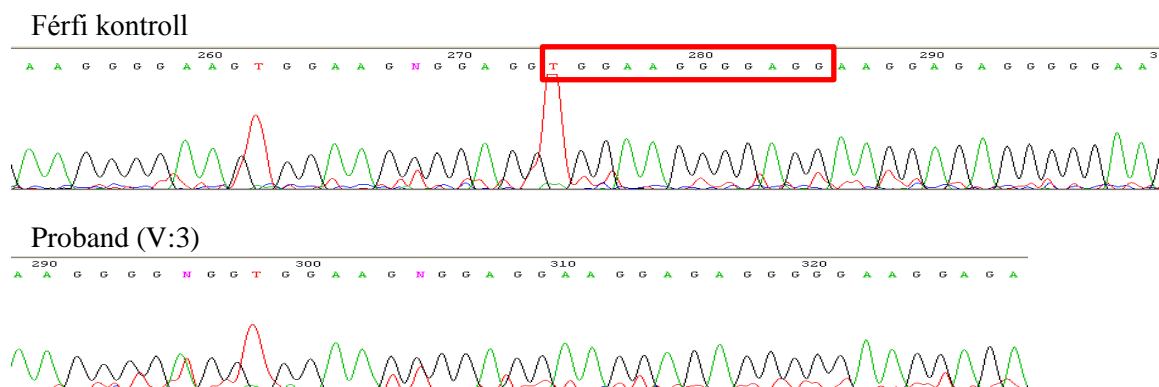
Az 11 éves érintett fiúgyermek ERG vizsgálata normál scotopikus pálcika választ, a maximális scotopikus ingerléskor (ERG 3.0) pedig enyhén csökkent választ mutatott. Mérsékelten csökkent amplitudó volt regisztrálható a *single* fotopikus stimulációkor és enyhén csökkent csap válasz látszott a fotopikus 30 Hz flicker stimuláció esetén. A proband (V:1) és a IV:7 beteg ERG-je súlyosan csökkent pálcika választ, a maximális scotopikus ingerléskor mérsékelten csökkent amplitudót, 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 [5. ábra].



5. ábra. X-hez kötött nagyfokú myopiával rendelkező férfi családtagok Glanzfeld (full-field) ERG vizsgálatának eredményei. Sötét-adaptált 0.01 ERG (pálcika válasz, L-Rod, R-Rod); sötét-adaptált 3.0 ERG (maximális kombinált pálcika-csap válasz, L-max, R-max), fény-adaptált 3.0 ERG (single-flash fotopikus ERG, L-cone, R-cone) fény-adaptált 3.0 flicker ERG (30Hz flicker, L-30Hz, R-30Hz). Az ERG hullámok amplitúdói az életkor előrehaladtával fokozatosan csökkenő értékeket mutatnak, ami a fotoreceptorok fényingerlésre adott elektromos válaszainak az életkor előrehaladtával bekövetkező gyengülését és funkciójuk károsodását jelzi. A legfiatalabb (VI:6) páciens normál pálcika, és csökkent csap választ mutat, az idősebb betegemél enyhén vagy mérsékelt csökkent pálcikaválasz és mérsékelt vagy súlyos csapdiszfunkció detektálható.

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

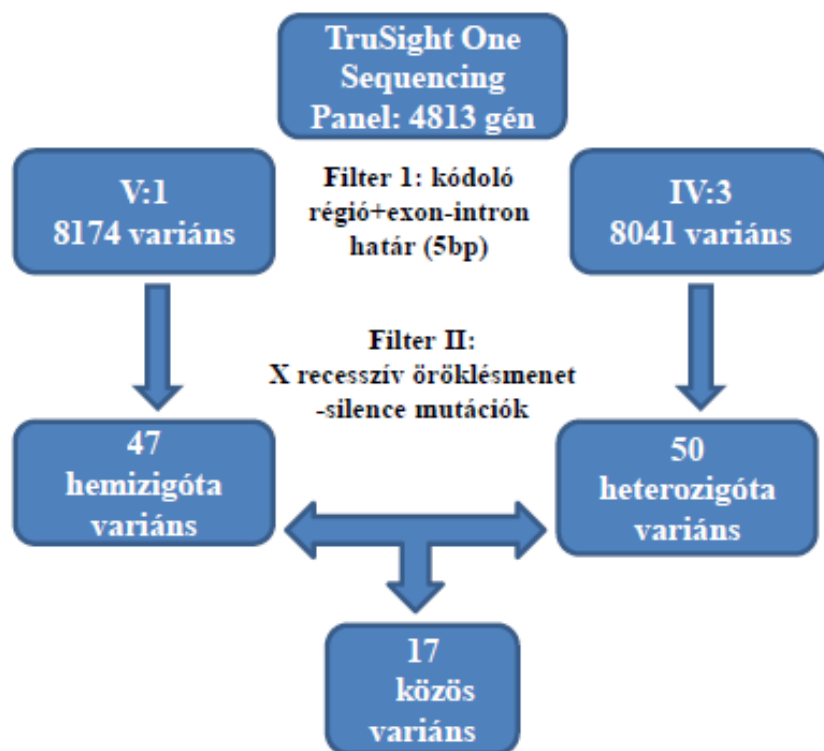
Az elsőként elvégzett genetikai vizsgálat nem vezetett eredményre, ugyanis a nagy felbontású X kromoszóma specifikus komparatív genomai hibridizáció (arrayCGH) analízis során sem az X kromoszómát érintő strukturális átrendeződést, sem kópiaszámbeli eltérést nem tudtunk detektálni. Az X kromoszómához kötött csap dystrophiák másik leggyakoribb genetikai okai az *RPGR* ORF15 exonjában előforduló mutációk lehetnek (119, 120). Az ORF15 bidirekcionális szekvenálását követően egy 12 nukleotidos, kereteltolódást nem okozó deléciót detektáltunk, mely négy aminosav eliminációját okozza (rs201134185, c.3074_3085delTGGAAGGGGAGG, p.Val1025_Glu1028del) [6. ábra]. Patogenitását tekintve az adatbázisok alapján egyértelműen benignus polimorfizmusnak minősül.



6. ábra. Az *RPGR* gén mutációját (rs201134185, c.3074_3085delTGGAAGGGGAGG, p.Val1025_Glu1028del) szemléltető elektroferogram részlet.

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. 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 ± 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 [7. ábra].



7. ábra. A klinikai exom szekvenálás bioinformatikai analizisének algoritmusá

Ezeket a 3. táblázatban foglaljuk össze. 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 (121). 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 (122, 123). 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 nukleotidtriplett felel. Az *OPN1MW*-ben Leucint, az *OPN1LW* génben pedig Metionint kódoló nukleotidtriplett egy nukleotidban tér el egymástól, melyet a Sanger szekvenálás során magunk is detektáltunk az L és M opszinok szekvenciájának megfelelően [8. ábra]. 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 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 a módszer sajátosságának következménye, hiszen hemizigóta egyénnél csak azonos allérről 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.

3. táblázat. A klinikai exom szekvenálás által detektált variánsok a IV:3 és V:1 családtag esetében

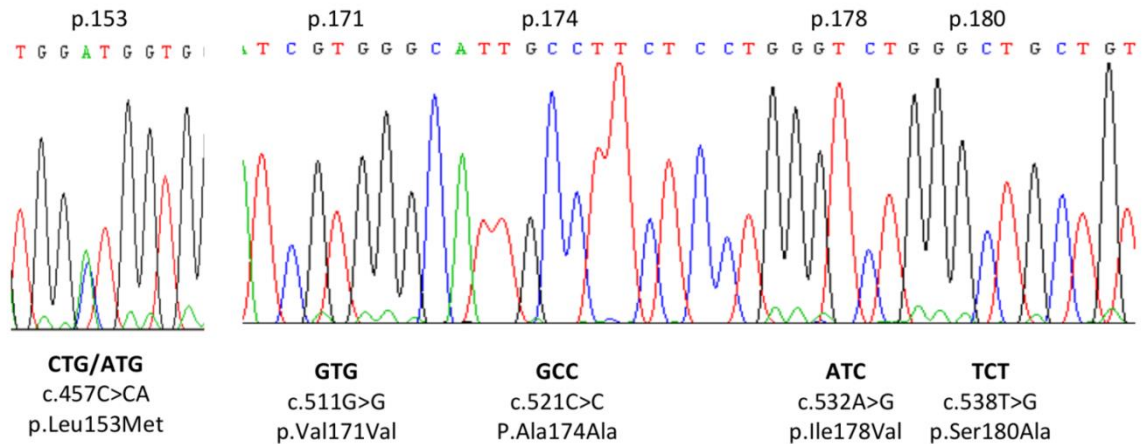
Gén	Lefedettségek		SNP azonosító	Nukleotid csere	Aminosav csere	MAF
	IV:3	V:1				
VCX	61	6	rs75562767	c.209C>G	p.Ala70Gly	0.67
	104	15	rs80291436	c.311T>C	p.Leu104Pro	0.46
	117	29	rs78342118	c.581C>T	p.Pro194Leu	0.42
CACNA1F*	31	12	rs150417702	c.1843G>T	p.Ala615Ser	<0.01
SLC16A2	45	15	rs6647476	c.97T>C	p.Ser33Pro	0.66
KIAA2022†	143	57	rs41306133	c.2801A>G	p.Asn934Ser	0.01
MAGT1	90	18	rs145245774	c.1028T>G	p.Val343Gly	0.13
DIAPH2‡	150	55	rs20361	c.1275C>A	p.Phe425Leu	<0.01
RBMXL3	29	13	rs6643947	c.3145A>G	p.Arg1049Gly	0.11
LOC644717	25	17	rs6528273	c.1714G>T	p.Val572Phe	0.66
SAGE1	66	23	rs4829799	c.2414T>C	p.Leu805Ser	0.22
CSAG1	91	45	rs2515848	c.185A>G	p.Lys62Arg	0.42
TMEM187	106	34	rs2266890	c.422C>T	p.Ser141Leu	0.31
	111	34	rs7350355	c.445A>G	p.Met149Val	0.37
OPN1LW§	135	55	rs145009674	c.532A>G	p.Ile178Val	0.02
	132	55	rs949431	c.538T>G	p.Ser180Ala	0.2
OPN1MW§	418	96	rs375538821	c.532A>G	p.Ile178Val	0.02

*Fenotípusok: Aland Island betegség, X-hez kötött kongenitalis stationer farkasvakság

† X-hez kötött mentális retardáció

‡ Korai petefészek elégtelenség

§ Vörös-zöld színlátászavar, BED, X-hez kapcsolt csap dystrophia, Kék csap monokromázia, X-hez kötött nem szindrómás myopia



8. ábra. Az opszin génekben (*OPN1LW* és *OPN1MW*) detektált eltéréseket szemléltető elektroferogram az V:1 probandnál.

Az új generációs és a hagyományos Sanger szekvenálás eredményeinek összevetésével megállapítottuk, hogy az LVAVA és MVAVA haplotípusok szegregálódtak a betegséggel a családban. Az *OPN1LW* és *OPN1MW* génekben egyéb polimorfizmust vagy mutációt nem detektáltunk. Az édesanya (IV:3) esetében a klinikai exom szekvenálás egy második M opszin gént (*OPN1MW2*) is azonosított. A két M opszin megkülönböztetése egy exoni (*OPN1MW*, c.849A és *OPN1MW2*, c.849C) és egy introni (*OPN1MW*, c.984+59 és *OPN1MW2*, c.984+59C) eltérés alapján történt. Az édesanya (IV:3) szekvenciájában a megfelelő pozíciókban *OPN1MW2* specifikus nukleotidokat is detektáltunk. A probandnál nem láttunk *OPN1MW2* specifikus nukleotidokat, a lefedettség ezekben a pontokban 0X-os volt, vagyis a proband nagy valószínűséggel nem rendelkezett *OPN1MW2* 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.

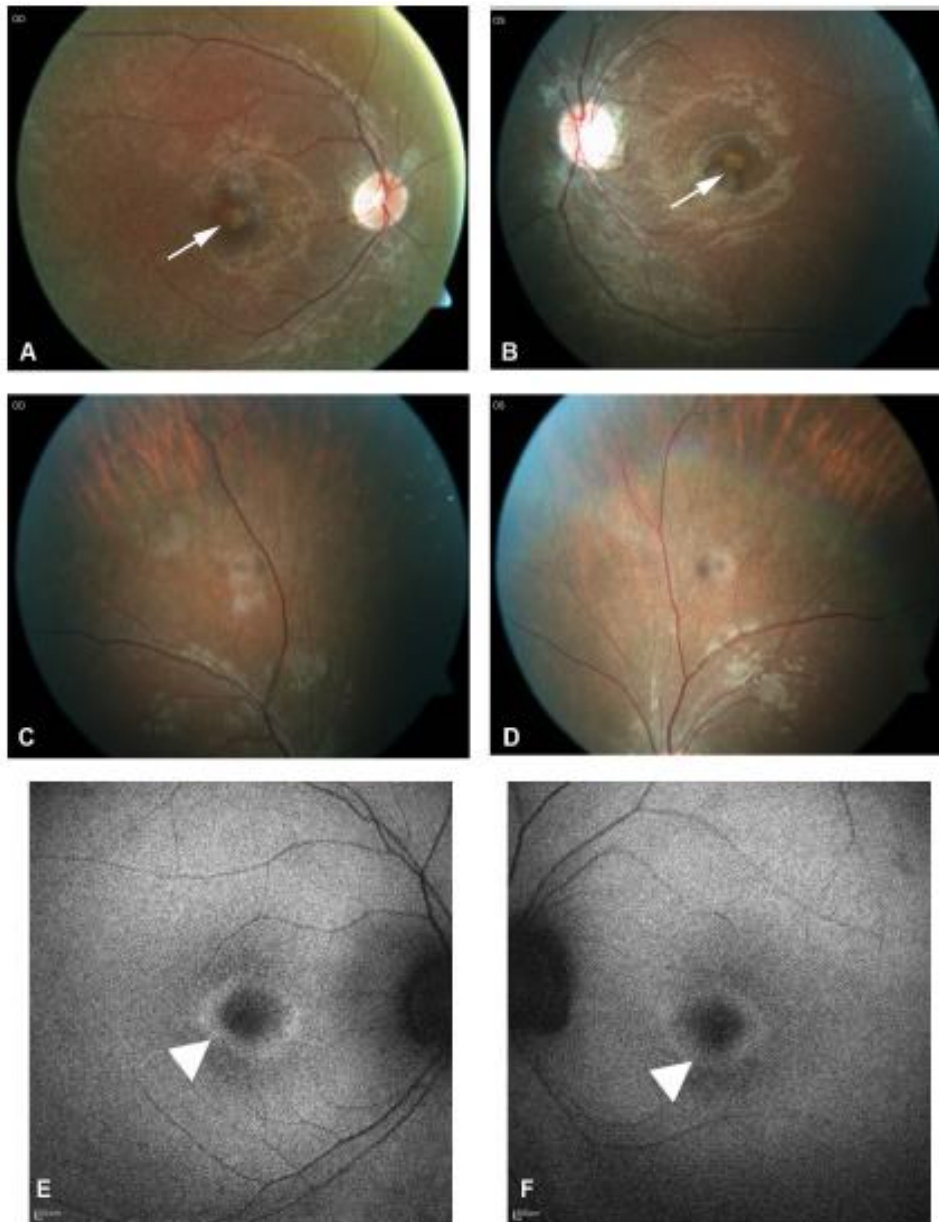
5.3. A homozigóta *NEURODI* null mutációhoz társuló progresszív pálcika-csap dystrophiában szenvedő nőbeteg szemészeti vizsgálatának eredményei

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 . Irreguláris astigmia, keratoconus nem volt detektálható. A pupillatágítós fundus vizsgálaton a lencse és az üvegtest tisztának mutatkozott.

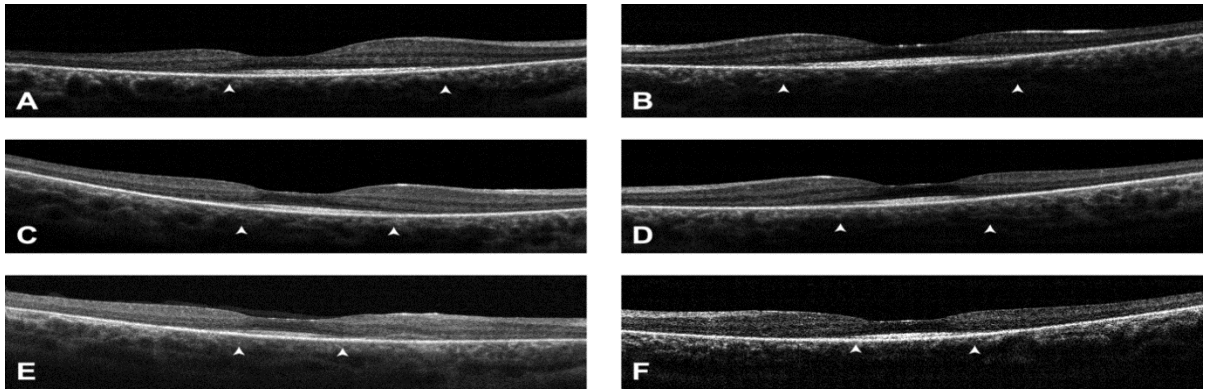
A szemfenéki képen kiterjedt chorioretinális atrophia, a hátsó póluson molyrágás-szerű PE atrophia volt detektálható [9. ábra]. Retinitis pigmentosára jellemző csontsejt formájú pigment rögök nem voltak láthatóak. A papilla a normálistól ugyan kissé halványabb volt, de egyéb tekintetben normál megjelenést 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 [9. ábra]. A magasabb chorioideális autofluoreszcencia a hátsó póluson detektált molyrágásszerű pigment epithel atrophianak volt a következménye. Lipofuszcín lerakódás nem volt detektálható. Az OCT a retina vastagságának progresszív csökkenését mutatta a maculában [10. ábra]. 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. [10. ábra]. Ez bizonyítja a pálcika fotoreceptorok korai életkorban

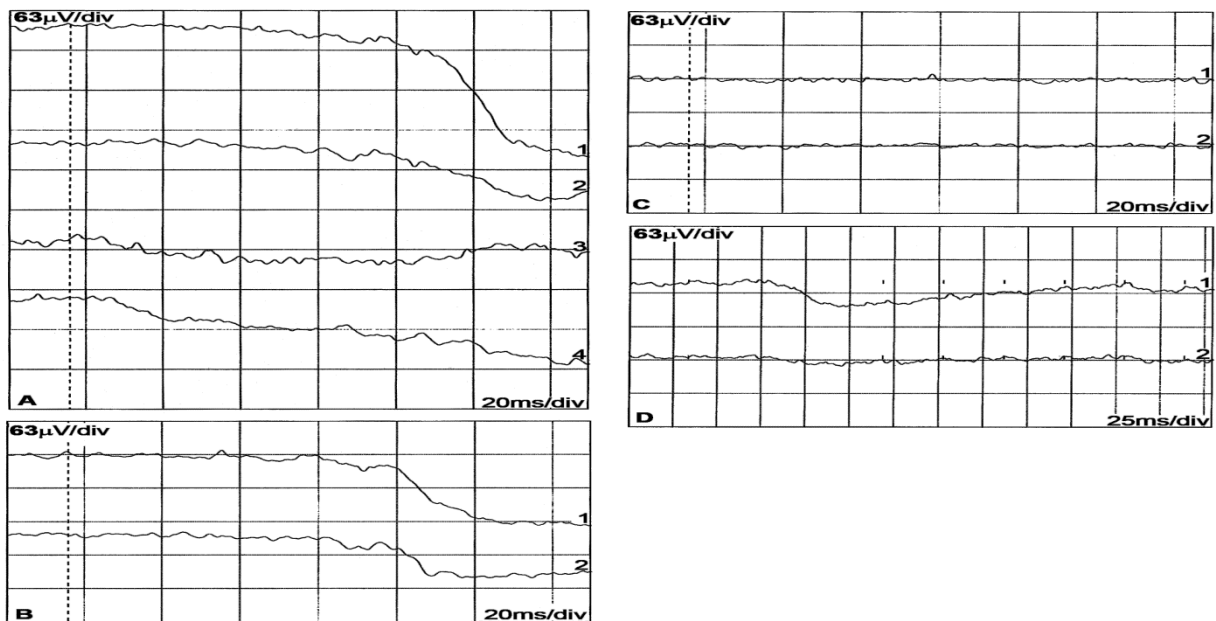
bekövetkezett pusztulását és a csap fotoreceptorok progresszív, periféria felől a fovea centruma felé tartó pusztulását. A fotoreceptorok (csapok és pálcikák) elektromos aktivitásának vizsgálatakor a sötét-adaptált 0.01 ERG (pálcika válasz), a sötét-adaptált 3.0 ERG (maximális kombinált csap-pálcika 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 [11. ábra].



9. ábra. A 21 éves *NEUROD1* null mutációval rendelkező nőbeteg fundus fotói. Hátsó pólus (A, jobb szem; B, bal szem) és a periféria (C, jobb szem; D, bal szem) színes fundus fotói. A színes képeken az RPE réteg atrophija látszik a macula területén és a periférián. A nyilak a megnagyobbodott foveát jelölik a fotoreceptorok alkotta lemeznek megfelelően. A hátsó pólus autofluoreszcens fundus képein (E, jobb szem; F, bal szem) a fokozott szemcsés autofluoreszcencia szintén az RPE réteg atrophiját mutatja. A nyilak a retina dystrophiákra jellemző karakterisztikus jegyet, a hiperreflektív gyűrűt mutatják.



10. ábra. A neonatlis diabetesszel diagnosztizált beteg OCT képei. Az OCT vizsgálatok eredményei 2009, 2011 és 2014 (A, C, E jobb szem; B, D, F bal szem) között. A nyilak a fotoreceptorok alkotta korong alakú lemezt mutatják a foveában. Megfigyelhető a fotoreceptor réteg progresszív csökkenése a foveában és ennek a rétegnek a teljes hiánya a foveán kívüli területen. A képeken látható, hogy a foveán kívüli retina mindössze hat rétegből épül fel.



11. ábra. A 21 éves női beteg Ganzfeld (full-field) ERG vizsgálatának eredményei. **A:** 1: sötét-adaptált 0.01 ERG (pálcika válasz), jobb szem; 2: sötét adaptált 0.01 ERG (pálcika válasz), bal szem; 3: sötét-adaptált 3.0 ERG (maximális kombinált pálcika-csap válasz), jobb szem; 4: sötét-adaptált 3.0 ERG (maximális kombinált pálcika-csap válasz), bal szem. **B:** 1: fény-adaptált 3.0 ERG (single-flash fotopikus ERG), jobb szem; 2: fény-adaptált 3.0 ERG (single-flash fotopikus ERG), bal szem. **C:** 1: sötét-adaptált 3.0 oszcillatórikus potenciál, jobb szem; 2: sötét-adaptált 3.0 oszcillatórikus potenciál, bal szem. **D:** 1: fény-adaptált 3.0 flicker ERG (30 Hz flicker), jobb szem; 2: fény-adaptált 3.0 flicker ERG (30 Hz flicker), bal szem.

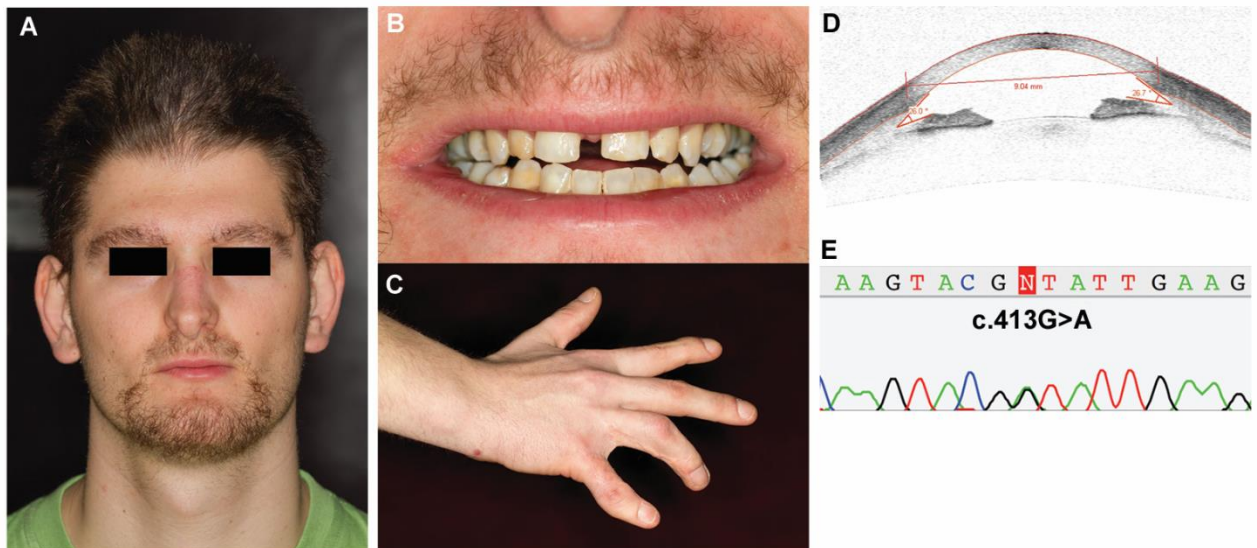
5.4. Oculodentodigitális dysplasiával diagnosztizált beteg szemészeti és genetikai vizsgálatának eredményei

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 szemén. A refrakciós hiba $-6\text{Dsph}+3.0\text{Dcyl}$ a jobb szemén és $-5.0\text{Dsph}+2.5\text{Dcyl}$ a bal szemén. 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 szögre utalnak [4. táblázat]. 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 édesapa a szemészeti vizsgálatot nem vállalta, de a családtagok elmondása alapján nála korábban semmilyen fénytörési hiba nem volt detektálható, sosem hordott szemüveget. Ezzel szemben 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 *GJAI* gén molekuláris genetikai vizsgálata a korábban egy betegben már leközölt, c.413G>A, p.Gly138Asp heterozigóta missense mutációt igazolta a 2-es exonban, mely a connexin 43 fehérje citoplazmatikus *loop*-ját érinti (124). A fenotípusos jegyek és a genetikai vizsgálat eredményei a 12. ábrán láthatóak. A szemészeti vizsgálati eredményeket a 4. táblázatban összesítettük.

4. táblázat. Az oculodentodigitális dysplasiával rendelkező beteg szemészeti vizsgálatának eredményei.

	Jobb szem	Bal szem
Refrakció	-6.0DS+3.0DC	-5.0DS+2.5DC
Legjobban korrigált látásélesség	1.0	1.0
Tengelyhossz	22.63 mm	22.49 mm
Centrális cornea vastagság	542 um	544 um
Elülső csarnok mélység	2.34 mm	2.26 mm
Keratometria 1	46.81 D	46.79 D
Keratometria 2	50.05 D	50.26 D
Cornea átmérő (white-to-white distance)	9.51 mm	9.56 mm
Elsülső csarnok szög	23,8°-26,7°	22.9°-25.4°

Az elülső csarnok szög mérése Visante anterior segment OCT (Carl Zeiss Meditec, Inc., Dublin, California, USA) készülékkel történt. A többi paramétert Lenstar (Haag-Streit Diagnostics, Bern, Switzerland) készülékkel mértük.



12. ábra. A 28 éves férfi beteg klinikai és genetikai vizsgálatának eredményei. A beteg a következő oculodentodigitális dysplasiára jellemző dysmorphiás tüneteket mutatta: hosszú keskeny orr, alacsonyan futó hajvonal, vékonyzájú haj és arcszőrzet (A), abnormális fogazat (B), IV-V-ös ujj syndactylia (C). Jobb szem anterior szegement OCT képe (D). A *GJA1* génben detektált missense mutáció elektroferogramja (E).

6. MEGBESZÉLÉS

A szem organogenezisében becslések szerint több ezer gén vesz részt. E génekben bekövetkező mutációk okozzák a szem egészének vagy egyes alkotórészeinek veleszületett vagy későbbi életkorban jelentkező örökletes rendellenességeit. E kórképek klinikailag és genetikailag is heterogén betegségcsoportot alkotnak. Előfordulhatnak a szemre lokalizálódó úgynevezett nem-szindrómás formában, vagy valamilyen szindróma részeként. A szemet érintő rendellenességek diagnózisának pontos felállítását nemcsak a genetikai és klinikai heterogenitás nehezíti, de számolnunk kell a változó expresszivitással és penetranciával is. A diagnózis felállításában a hagyományos szemészeti vizsgálóeljárások mellett fontosak a modern képalkotó és elektrofiziológiai módszerek, ám a definitív diagnózis legtöbbször csak genetikai vizsgálattal állítható fel. Az ismeretlen eredetű öröklődő szemészeti betegségek esetén a diagnózis felállítása épp a genetikai diagnózis bizonyosságának hiánya miatt nagyon nehéz. Ilyenkor az ismeretlen genetikai háttér tisztázása jelent tudományos kihívást, enélkül ugyanis lehetetlen mind a diagnózis felállítása, mind az új genotípus-fenotípus korreláció meghatározása. Ilyen jellegű kutatómunka korábban szinte megoldhatatlan kihívást jelentett, és a mutációk felkutatására kizárólag a betegségek patomechanizmusában feltételezett gének Sanger szekvenálása állt rendelkezésre. Mivel az új genotípus-fenotípus összefüggések gyakran új gének kóroki szerepét is feltárják, belátható, hogy ez a megközelítés sokszor nem vezetett eredményre. Néhány éve azonban rendelkezésünkre állnak olyan újgenerációs szekvenálási technikák, melyek a teljes emberi kódoló génállományt egyszerre képesek megszekvenálni. Ilyenkor a hatalmas mennyiségű genetikai adatból a megfelelő algoritmusok alkalmazásával kiszűrhetők a potenciális kóroki mutációk, ám ennek az adatbázis szűkítési munkának az informatikai megoldása egyelőre nagy kihívást jelent a kutatóknak. Még ha sikerül is kezelhetően kiszámúra csökkenteni a lehetséges patogén mutációk számát, az új mutációk vagy gének kóroki szerepének bizonyítása sokszor még így is nehéz feladat. Az

ilyen jellegű genetikai kutatómunka eredményeként viszont megismerhetjük ismeretlen eredetű betegségek pontos genetikai hátterét, új genotípus-fenotípus összefüggéseket tárhatunk fel vagy kideríthetjük egyes gének korábban ismeretlen biológiai szerepét. A munka klinikai jelentőségét az adja, hogy definitív genetikai diagnózishoz jutunk (illetve juttatjuk a pácienseket), illetve a genetikai diagnózis birtokában lehetőség nyílik a tünetmentes családtagok szűrésére. A betegségek megfelelő időben történő felismerése, a betegség prognózisának előrejelzése, a genetikai tanácsadás sarkalatos pontjai. A génterápiás eljárások száma egyre szaporodik, és erre csak a pontos genotípus és fenotípus ismeretének birtokában lesz lehetősége a betegeknek. Munkám célja a Debreceni Egyetem Szemklinikáján diagnosztizált ritka, örökletes szemészeti eltérésekkel rendelkező betegek, családok, genotípus-fenotípus összefüggéseinek megállapítása valamint a prognózisra vonatkozó adatok összegzése volt, ezáltal segítve új genotípus-fenotípus összefüggések feltárását valamint a betegek és családtagjaik genetikai tanácsadását. E munka kivitelezésében és a molekuláris genetikai vizsgálatok elvégzésében a Debreceni Egyetem Szemklinikájának és Laboratóriumi Medicina Intézetének Klinikai Genetikai Tanszékének interdiszciplináris együttműködése adott lehetőséget. Eredményeink hozzájárulnak az öröklődő szemészeti rendellenességek genotípus-fenotípus összefüggéseinek megértéséhez és mély betekintést nyújtnak e kórképek patomechanizmusának megismerésébe. Emellett célpontjai lehetnek az egyre inkább előtérbe kerülő génterápiás eljárásoknak.

6.1. A munkánk során feltárt új genotípus-fenotípus összefüggések

6.1.1. 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 pálcika 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-kromoszómán öröklődő csap dystrophia genetikai vizsgálatát a legnagyobb valószínűségű genetikai okokkal kezdtük, ám az X-hez kötött csap dystrophiák 70%-ért felelős lókuszon, az *RPGR* gén ORF15 exonjában nem találtunk patogén mutációt (119, 120). A következő legvalószínűbb ok az X kromoszómát érintő kromoszómaátrendeződés vagy kópiaszámbeli eltérés volt. A nagy felbontású X kromoszóma specifikus arrayCGH segítségével azonban sem kromoszómális átrendeződést sem kópiaszámbeli eltérést nem sikerült azonosítani a probandnál. Ezzel elfogytak a célzottan vizsgálható feltételezett genetikai okok. A betegség hátterében feltételezésünk szerint egy ismert vagy ismeretlen gén korábban nem ismert, új mutációja állhatott. Ennek kiderítésére csak a nagy áteresztőképességű, teljes exomot felölelő genetikai vizsgálatok alkalmasak. A klinikai exom szekvenálás vizsgálati panelja ugyan kizárólag a bizonyítottan patogén mutációkat hordozó

géneket tartalmazza, de így is csaknem a teljes exomot lefedi, és jó eséllyel tudja azonosítani a célzott genetikai vizsgálattal nem felderíthető ritka vagy új mutációkat. 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, bizonyítva, hogy kizárólag ezek a toxikus haplotípusok felelősek a betegség kialakításáért. Normál haplotípust egyik szekvenálási módszerrel sem detektáltunk, ami arral utal, hogy az X kromoszóma array csak mutáns opszinokat tartalmazott minden érintett egyénben. Irodalmi közlemények alapján az LVAVA-t, mint patogén genetikai eltérést először két családban, a Bornholm Eye Disease (BED) háttérben azonosították. Ezt követően több esetet is közöltek ugyanezzel a genetikai háttérrel és hasonló klinikai megjelenéssel (57, 76, 88, 89). Az általunk vizsgált betegek klinikai tünete és megjelenése azonban szembetűnő különbségeket mutatott az irodalomban leírtaktól. Míg a Bornholm betegséget veleszületett, stationer csökkentlátás és színlátászavar jellemzi, addig az általunk vizsgált 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. Ismert, hogy ezek a ritka toxikus haplotípusok exon 3 skippingen keresztül olvasási kereteltolódást, ezáltal korai stop kodon kialakulását eredményezik (89, 91). A LIAVA haplotípus az adott opszin mRNS teljes hiányához vezet, ezzel szemben az MVAVA és LVAVA eltérések esetén, kis mennyiségben ugyan, de normál, teljes hosszúságú opszin mRNS is termelődik (89). Ez a kísérleti eredmény egyértelműen bizonyítja, hogy a LIAVA direkt opszin inaktiváción keresztül kongenitális színlátási rendellenesség kialakulását eredményezi, míg az LVAVA önmagában nem okoz színlátási defektust. Az LVAVA genotípusú betegeknél jelentkező veleszületett protanopiát vagy deuteranopiát sokkal inkább az array első és második pozíciójában elhelyezkedő L vagy az M gén valamelyikének hiánya okozza, tehát független az LVAVA haplotípus jelenlététől (58, 60, 125). Ez a megfigyelés magyarázza a normál színlátást az általunk vizsgált fiatal egyéneknél. Ugyanakkor nem csak mi igazoltuk, hogy az LVAVA haplotípus normális színlátáshoz társult. 2015-ben bizonyították, hogy az LVAVA haplotípus nem szindrómás nagyfokú myopiát eredményez, tehát sem színlátászavart, sem progresszív macula dystrophiát nem okoz (59, 61). Ez utóbbi állítás azonban ellentmond a mi saját megfigyeléseinknek, ugyanis a mi betegeink egyértelműen progresszív macula dystrophiában szenvedtek.

Az LVAVA a progresszió tekintetében is eltér a többi *interchange* haplotípus viselkedésétől. Ismert, hogy először a BED, egy nem progresszív betegség háttérében azonosították. Ezzel szemben SD-OCT és adaptív optikai scanning oftalmoszkópiás vizsgálatok progresszív macula degenerációt igazoltak LVAVA haplotípusú betegeknél, melyet a csap fotoreceptor mozaicizmus zavara, valamint a macula degeneratív változásai bizonyítottak (88, 125). Két kínai családban az LVAVA haplotípust, mint patogén eltérést nem szindrómás nagyfokú myopia háttérében igazolták (59, 61). Az első kínai családban a

legidősebb, 75 éves férfi betegnél totális időskori szürkehályogot állapítottak meg, a beteg látásélessége mindkét szemén fényérzés volt. A totális szürkehályog miatt a betegnél további szemészeti vizsgálatokat nem végeztek és a vizsgálatból kizárták [13. ábra].

Table 1. Clinical Data of the Family Members Who Participated in the Study

Patient ID/ Sex/Age, y	Education, y	Status	Age at First Symptom, y	Visual Acuity		Refraction		Fundus OD/OS	Axial Length OD/OS, mm
				Uncorrected (Corrected)		OD	OS		
				OD	OS				
II:1/F/68	1	Unaffected	...	HM/10 cm	0.25	NA ^a	-2.00 DS-0.50 DC	NA/Unaffected	
II:2/M/70	2	Unaffected	...	0.8	1	0.50 DS-0.75 DC	0.75 DS-0.50 DC	Unaffected	
II:3/M/78	3	Unaffected	...	0.4 (0.8)	0.4 (0.8)	-1.25 DS-0.75 DC	-0.50 DS-2.00 DC	Unaffected	
II:5/M/75	6	Affected	<7	LP	LP	NA ^a	NA ^a	NA	
III:1/F/43	9	Unaffected	...	1.2	1.2	-0.25 DC	0	Unaffected	
III:3/F/37	9	Unaffected	...	1.2	1.2	-0.50 DC	-0.50 DS	Unaffected	
III:4/M/37	2	Unaffected	...	1.2	1.2	-0.50 DS	-0.50 DS	Unaffected	
III:5/F/33	5	Unaffected	11	0.3 (0.9)	0.1 (0.3)	-3.25 DS-0.75 DC	-6.25 DS-1.00 DC	Unaffected/myopic	24.75/25.30
III:6/M/30	9	Unaffected	...	1.2	1.2	-0.50 DS	-0.50 DC	Unaffected	
III:7/M/22	7	Unaffected	...	1.5	1.5	-0.50 DC	-0.50 DC	Unaffected	23.29/23.35
III:8/F/48	4	Unaffected	...	1.2	1.5	0.50 DS	0.5 DS	Unaffected	
III:10/M/26	9	Unaffected	...	1.5	1.5	0	0	Unaffected	
IV:1/M/19	9	Affected	<7	0.1 (0.8)	0.03 (0.6)	-6.00 DS-3.25 DC	-6.25 DS-3.25 DC	Myopic	27.27/26.85
IV:2/M/12	5	Affected	<7	0.2 (0.6)	0.1 (0.8)	-8.25 DS-2.25 DC	-9.00 DS-1.25 DC	Myopic	
IV:3/M/12	5	Affected	<7	0.1 (0.5)	0.1 (0.5)	-9.25 DS-1.25 DC	-9.25 DS-0.75 DC	Myopic	
IV:4/M/6	0	Affected	<6	0.2	0.3	-10.50 DS-1.25 DC	-10.50 DS-1.75 DC	Myopic	
IV:5/M/31	6	Affected	<6	0.05 (0.7)	0.02 (0.5)	-15.00 DS-1.50 DC	-15.00 DS-1.75 DC	Myopic	
IV:6/M/29	3	Unaffected	...	1.5	1.5	-0.50 DC-0.50 DC		Unaffected	
IV:7/M/14	8	Affected	<6	0.1 (0.6)	0.1 (0.6)	-9.25 DS-1.25 DC	-10.25 DS-1.50 DC	Myopic	27.66/27.91

Abbreviations: DC, diopters of cylinder; DS, diopters of sphere; ellipses, no myopia symptom; HM, hand movement; LP, light perception; NA, not available.
^aUnable to measure owing to senile cataract.

13. ábra. Guo és munkatársai 2010-ben közzölt X-hez kötött nem szindrómás nagyfokú rövidlátásban szenvedő betegeknek klinikai adatai. A legidősebb beteg (II:5) 75 éves volt, akinek látásélessége mindkét szemén fényérzés volt, azonban szemészeti státuszáról szürkehályogja miatt nem tudtak meg többet a szerzők. (Forrás: Guo és munkatársai; 2010)

A második legidősebb családtag viszont mindössze 37 éves volt [13. ábra]. Ez megnehezíti a szemészeti vizsgálatok eredményeinek életkor függvényében történő értékelését a családban, de felvet más fontos kérdést is, pl.: miért nem operálták meg a totális szürkehályogban szenvedő vak beteget, megoldva ezzel (az elvileg) nem szindrómás myopiában szenvedő beteg látásproblémáját, és lehetővé téve a beteg további vizsgálatát. A szerzőkkel sikertelenül próbáltuk meg felvenni a kapcsolatot, ezért erre a kérdésre választ nem kaptunk, és csak feltételezéseink lehetnek az okot illetően. Azonban a többi betegnél is találunk érdekes fenotípusos jegyeket a két kínai közleményben: egy betegnél protanomáliát

állapítottak meg (59), illetve a második család érintett férfi tagjainak látásélessége 0,1 és 0,2 között változott (61). Három betegnél az ERG vizsgálatkor enyhe és közepes csap válasz csökkenést detektáltak. Ezek a megállapítások és saját eredményeink azt mutatják, hogy az opszin génekben detektált LVAVA és MVAVA exon 3 *interchange* haplotípusok ugyan fiatal korban látszólag nem szindrómás myopiát okoznak, de idősebb korban késői kezdetű progresszív csap dystrophiához vezetnek. Ennek megfelelően a kínai családokban a kezdődő színlátási defektusok és az ERG eltérések prognosztikai faktorai lehetnek a későbbi klinikai tüneteknek – amelyeket ők nem vizsgáltak. Az általunk vizsgált fiatal férfi családtagok normál színlátása jelzi, hogy mindkét haplotípus esetén átíródik bizonyos mennyiségű normál opszin mRNS, melyről funkcióképes opszin fehérje keletkezik. Progresszív macula dystrophia csak a 40 év feletti betegeknél detektálható, mely végül vörös és zöld színvakság kialakulását eredményezte a két legidősebb családtagnál. Ezek az adatok egyértelműen bizonyítják, hogy a színlátászavar a csap dystrophia következménye és nem az LVAVA/MVAVA haplotípusok direkt opszin inaktivációjának eredménye. Mindezek tükrében Guo és Li azon állítását, miszerint az LVAVA haplotípus nem szindrómás nagyfokú myopiát okozna, nem látjuk bizonyítottnak, és úgy gondoljuk, hogy eddig nem sikerült X kromoszómán öröklődő nagyfokú nem szindrómás rövidlátást igazolni a szakirodalomban senkinek.

Eredményeinkkel elsőként szolgáltatunk klinikai bizonyítékot arra, hogy az LVAVA és MVAVA haplotípusok nem okoznak színlátászavart vagy látáskárosodást fiatal egyéneknél, 40 éves kor felett viszont késői kezdetű progresszív csap dystrophia kialakulását okozzák, melynek következménye a látásélesség csökkenése és színlátászavar megjelenése. Olyan új fenotípust írtunk le, mely korábban nem szerepelt az irodalomban a ritka exon 3 *interchange* haplotípusokkal összefüggésben. Az LVAVA genotípushoz tartozó fenotípusos variabilitást

feltehetőleg egyéb genetikai módosító tényezők valamint a főleg mutáns opszint és kis mennyiségű, de normál opszint expresszáló csapok száma határozza meg.

Az új eredményekkel hozzájárultunk a ritka exon 3 haplotípusokhoz tartozó genotípus-fenotípus korrelációk megértéséhez. Vizsgálataink bizonyítják, hogy az opszinokban előforduló LVAVA/MVAVA exon 3 *interchange* haplotípusokhoz tartozó kórkép csak késői életkorban manifesztálódik. Mindazonáltal a betegség lefolyásának tisztázására további, a bemutatott betegektől idősebb egyének részletes vizsgálatára van szükség. Ennek a genotípus-fenotípus összefüggésnek a megfelelő időben történő felismerése kiemelten fontos, hiszen az opszin *interchange* haplotípusokra vonatkozó génterápiás eljárások kifejlesztése már elkezdődött. Ez a genotípus központi érdekelttségű lehet az ilyen terápiák szempontjából, hiszen a betegek sokáig aszimptomatikusak, ezáltal esetükben széles terápiás ablak áll rendelkezésre.

6.1.2. A homozigóta NEUROD1 null mutációhoz kapcsolódó új szindrómás progresszív pálcika-csap dystrophia

A *NEUROD1* génről ismert, hogy részt vesz az endokrin pancreas valamint különböző neuronális elemek, így a retina fejlődésében is. A fehérje funkcionális szerepe elsősorban állatmodellekből ismert. Irodalmi adatok szerint a *NEUROD1 knockout* egerek a születést követő néhány nappal súlyos diabetes következtében elpusztulnak. Emiatt a gén elvesztésének hosszútávú hatásait, így a gén szerepét különböző szervek fejlődésében, működésében sokáig nem tudták vizsgálni. Erre akkor nyílt lehetőség, amikor egyes kutatócsoportok a *knockout* állatok élettartamát sikeresen meghosszabbították (97, 100). Pennesi és munkatársai (2003) olyan speciális *knockout* egereket használtak, melyek túlélési rátája magasabb és így egyes egerek elérik a felnőttkort. Megfigyelték, hogy a 2-3 hónapos homozigóta null mutáns egerek ERG-je csökkent pálcika és csap választ mutatott, emellett szövettani vizsgálattal a

fotoreceptor réteg külső szegmentumának, a külső nukleáris és a külső plexiform rétegeknek a degenerációja látszott. Ugyanakkor a belső nukleáris, a belső plexiform és a ganglionsejtek rétege semmilyen degeneratív elváltozást nem mutatott. Az idősebb, 18 hónapos *NEURODI* null mutáns egerekben a szövettan a fotoreceptor réteg teljes hiányát mutatta (100). Ochocinska és munkatársai a *knockout* gén expressziójának kiesését sikeresen korlátozták a retinára cKO egerekben (102). Ily módon sikeresen tudták vizsgálni a *NEURODI* szerepét felnőtt egerek retinájában. Esetükben a retina szövettani morfológiája a retina külső szegmentumának elvékonyodását és dezorganizáltságát mutatta. Az ERG vizsgálaton a csap és pálcika válasz drasztikus csökkenését detektálták már a 2 hónapos egereknél is. Az idősebb egyedekben a fotoreceptorok teljes hiánya látszott. A degeneratív folyamat egyenlő mértékben érintette a pálcikákat és csapokat. Az előző munkacsoportnál leírtakhoz hasonlóan a belső nukleáris, a belső plexiform és a ganglionsejtek rétege itt sem mutatott semmilyen morfológiai változást. Ezen kísérleti megfigyelések azt mutatják, hogy a *NEURODI* gén kiemelten fontos szerepet játszik a fotoreceptorok funkcionális és struktúrális integritásának fenntartásában. A *NEURODI* null mutáns egereknél a fotoreceptorok teljes pusztulása látható. Mivel az állatmodellek egyértelműen bizonyították, hogy a homozigóta *NEURODI* funkcióvesztéssel járó mutáció súlyos, az élettel összeegyeztethetetlen fenotípus kialakulásához vezet, így jogosan sokáig azt gondolták, hogy emberben azért nem találtak még homozigóta null mutációt, mert az valószínűleg az emberben is élettel összeegyeztethetetlen következményekkel járhat (100). Ez a nézet megdőlt, amikor Cabezas és munkatársai 2010-ben két, egymástól független, homozigóta *NEURODI* mutációval rendelkező beteget közöltek le. Mindkét páciens neonatális diabétessel és neurológiai problémákkal küzdött, úgy, mint cerebelláris hypoplasia, megkésett fejlődés, súlyos hallás- és látáskárosodás (109). A páciensek részletes szemészeti fenotípusa azonban sajnos nem került leírásra, így a mutáció pontos szemészeti következménye továbbra is ismeretlen maradt.

Ugyanakkor a Cabezas és munkatársai által közölt egyik páciens szemészeti eltéréseit 5 éven keresztül követtük, melynek során számos, a betegséggel összefüggő kérdést tudtunk megválaszolni. A homozigóta delécióval (c.427_428delCT) azonosított 21 éves páciens gyermekkorától éjszakai látási nehézségtől, egyre fokozódó látótér szűkülettől szenvedett, a centrális látásélessége megtartott volt. Ezek a tünetek egyértelmű átfedést mutatnak egy tipikus pálcika-csap dystrophia (pl.: a retinitis pigmentosa) jellemző fenotípusos sajátjaival. Az OCT vizsgálat a tüneteknek megfelelő eltérést igazolt: a fotoreceptorok teljes hiányát a fovean kívüli területeken és egy fotoreceptorok alkotta korong alakú hiperreflektív lemezt a foveában. Az ERG-n sem fotopikus sem scotopikus válaszok nem voltak detektálhatók, ami a pálcikák teljes hiányával és a csap fotoreceptorok számának csökkenésével és súlyos funkcionális károsodásával magyarázható. A súlyosan csökkent retina funkcióval szemben, a funduson detektált anatómiai eltérések különböznek a RP-ban látható tipikus eltérésektől. Bár az RPE a hátsó póluson molyrágás szerű képletet mutatott, csontsejtformájú pigmentrögök nem voltak detektálhatók. Az RP-ra jellemző halványsárga, viaszos megjelenésű papilla és retina erek attenuációja nem volt megfigyelhető. A FAF képek megnövekedett autofluoreszcenciát és parafoveális hiperreflektív gyűrűt mutattak. Ez a jelenség RP-ban (126-129) pálcika-csap dystrophiákban (130) és egyéb öröklődő retina dystrophiákban (130-132) jellemzően megtalálható. A legkézenfekvőbb magyarázat szerint a működésükben károsodott csap fotoreceptorok szomszédságában elhelyezkedő és még működő fotoreceptorok fokozott metabolikus aktivitása okozza az FAF képeken a parafoveális hiperreflektív gyűrűt. Esetünkben a hiperreflektív gyűrű valóban a funkcionáló és funkció nélküli retina határán volt látható. Eredményeink alátámasztják azt az irodalmi feltételezést, miszerint a hiperreflektív gyűrű a macula diszfunkció prognosztikus faktora (126, 128, 133, 134), mely átmeneti zónaként jelenik meg a funkcionáló és nem funkcionáló retina határán (126, 133-135).

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 (100, 104).

Kutatásunk során elsőként karakterizáltuk a homozigóta *NEUROD1* 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.

Mindezek alapján, vizsgálataink eredményeként új genotípus-fenotípus korrelációt írtunk le, mely ezen túlmenően egy korábban ismeretlen megjelenésű retina dystrophiát is jelent. A szakirodalomban először írtuk le a *NEUROD1* gén teljes funkcionális kiesésének hatását az emberi szemre, egyúttal először igazoltuk, hogy a *NEUROD1* gén és fehérje a retina normál homeosztázisában elengedhetetlen szerepet játszik. Először mutattuk be a *NEUROD1* kieséséhez társuló retinális elváltozásokat, egyúttal a hosszú követési periódusnak köszönhetően azt is igazoltuk, hogy a betegség emberben progresszív. Eredményeinkkel először igazoltuk azt, hogy a *NEUROD1* gén funkciójának kiesése hasonló tüneteket okoz emberben, mint az egérmodellekben. Megfigyeléseink igazolják a Neurod1 fehérje retina homeosztázisában betöltött fontos szerepét emberben. Bár eddig nem volt ismert olyan retina dystrophia, melyet a *NEUROD1* gén mutációja okozott volna, nem zárhatjuk ki, hogy a *NEUROD1*-nek szerepe lehet az eddig ismeretlen eredetű, nem szindrómás retina dystrophiák hátterében is. Érdekesség, hogy cikkünk megjelenésével szinte egyidőben valóban leírták az első ilyen retina dystrophiát, egy nem szindrómás autoszomális recesszíven öröklődő retinitis pigmentosát, melyet a *NEUROD1* gén homozigóta missense mutációja okozott (136). Az általunk leírt új genotípus-fenotípus korreláció hozzájárulhat további *NEUROD1*-hez

kapcsolódó retina dystrophiák diagnózisához valamint információt nyújt a betegség prognózisának előrejelzésében.

6.1.3. Relatív anterior microphthalmus oculodentodigitális dysplasiában

Az oculodentodigitális dysplasia egy ritka veleszületett rendellenesség, amelyért a connexin 43 proteint kódoló *GJA1* gén mutáció felelősek. E fehérje fontos szerepet játszik a szem fejlődésében. A betegség általában autoszomális domináns módon öröklődik, bár autoszomális recesszív és sporadikus eseteket is leírtak az irodalomban (112). A betegség klinikai megjelenése változó, de a tünetek főként az arcot, a fogakat, a szemet és az ujjakat érintik. A szindróma tipikus jegyei a következők: IV-V-ös ujj syndactylia, lábujj anomáliák, keskeny orr, alacsony hajvonal, vékony selymes haj és arcszőrzet. A legfőbb szemészeti eltérések a microcornea, microphthalmia, néhány esetben a glaucoma (111, 113, 115). Az irodalomban több mint 60 kóroki mutációt írtak le a szindrómával kapcsolatban. E mutációk többségénél azonban nem ismert a részletes genotípus-fenotípus összefüggés (111, 115). A microphthalmia és microcornea együttes előfordulása az oculodentodigitális dysplasia egyik fenotípusos jegye, melyet először egy négy generációs olasz családban írtak le (137, 138). Ugyanakkor a microcornea és myopia szimultán jelenléte irodalmi ritkaságnak számít akár sporadikusan fordul elő, akár bármilyen szindróma részeként (139). Oculodentodigitális dysplasiában eddigi irodalmi adatok alapján még soha nem került leírásra sem relatív anterior microphthalmus, sem myopia. 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 *GJA1* génben azonosítottunk egy, a betegség

háttérben korábban egy esetben már leközölt heterozigóta missense mutációt (c.413G>A, p.Gly138Asp). Ennek a mutációnak a patogenetikai szerepét a szakirodalomban másodikként közöltük le és így elsőként erősítettük meg. 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 dyslapsiában. Megfigyeléseink hozzájárultak az oculodentodigitális dysplasia fenotípusos spektrumának kiterjesztéséhez, valamint segíthetik a szem tengelyhosszát befolyásoló genetikai faktorok szerepének megértését.

6.1.4. Új eredmények és gyakorlati jelentőség

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. Sikerrel 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 diabetesszel 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 munka gyakorlati jelentősége

1. Az új genotípus-fenotípus összefüggések részletes leírása segíti a beteget ellátó szemész orvosok, valamint a genetikával foglalkozó szakemberek és a genetikai tanácsadáson dolgozók munkáját.
2. Elsőként igazoltuk, hogy az LVAVA/MVAVA haplotípus infantilis nagyfokú myopiát és késői életkorban kezdődő progresszív csap-pálcika dystrophiát okoz, ezért X-kromoszómához kötötten öröklődő nagyfokú rövidlátás esetén gondolni kell rá. A betegség korai felismerése felhívja a figyelmet az rendszeres szemészeti vizsgálatok szükségességére, a betegség prognózisának előrejelzésére. Mindemellett a mutáció azonosításával célzottan kereshetjük a társuló tüneteket (színlátászavar, látásélesség csökkenése).
3. Az opszin génekben detektált ritka interchange haplotípusok területén elkezdődtek a génterápiás kísérletek. Az általunk detektált LVAVA/MVAVA haplotípushoz társult késői életkorban kezdődő progresszív csap dystrophia e terápiákban központi

jelentőségű lehet, ugyanis a betegség jellemző tüneteinek késői életkorban való manifesztálódása miatt a génterápiás ablak igen nagy.

4. A *NEURODI* mutáció részletes fenotípusának leírásával elősegíthetjük a *NEURODI* génhez kapcsolódó retina dystrophiák diagnosztikáját, egyúttal bizonyítottuk, hogy a *NEURODI* gén fontos szerepet játszik nemcsak a retina fejlődésében, de működésének fenntartásában is. A genotípus-fenotípus összefüggés tisztázása, valamint a progresszió leírása segítséget nyújthat a jövőbeni esetleges betegek genetikai tanácsadásában, a betegség diagnózisának felállításában és prognózisának előrejelzésében.

5. Az oculodentodigitális dysplasiában leírt új fenotípusos jegyekkel hozzájárultunk a betegség fenotípus spektrumának bővítéséhez, valamint a szemtengelyhosszat befolyásoló genetikai faktorok megértéséhez.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A szem organogenezisében résztvevő gének mutációi felelősek a szem veleszületett rendellenességeinek kialakulásáért. Előfordulhatnak izolált formában vagy szindrómák résztüneteként. A klinikai kép súlyossága, lefolyása, illetve a betegség által érintett szövetek mind nagy változatosságot mutatnak. Munkám célja: ritka vagy eddig az irodalomban nem ismert, örökletes szemészeti rendellenességek klinikai és genetikai vizsgálata, új genotípus-fenotípus korrelációk részletes meghatározása, így segítve kutatók, szemész szakorvosok és genetikával foglalkozó szakemberek munkáját.

Egy X kromoszómához kötött nagyfokú myopiával rendelkező családban újgenerációs klinikai exom szekvenálással a vörös és zöld opszin génekben toxikus interchange haplotípust (L-opszin/LVAVA, M-opszin/MVAVA) detektáltunk. A proband hosszú távú követésével és az idősebb férfi családtagok klinikai és genetikai vizsgálatával egyértelművé vált, hogy a nagyfokú myopiához későbbi, 40 év feletti életkorban progresszív csap dystrophia társul. Megállapítottuk, hogy az érintett férfiak színlátása és látásélessége 40 éves korig normális, majd 40 év felett látásélesség csökkenése és deutan/protan színlátászavar alakul ki. Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a színlátászavar nem közvetlenül a toxikus haplotípus, hanem a következményes csap dystrophia eredménye. Az LVAVA/MVAVA haplotípus kombináció az opszin interchange haplotípusokkal kapcsolatban zajló génterápiás kutatásokban kiemelten fontos lehet, a betegség tüneteinek késői megjelenése miatt.

Egy permanens neonatalis diabetest, neurológiai eltéréseket, súlyos látáskárosodást okozó homozigóta és teljes funkcióvesztéssel járó *NEURODI* mutáció (c.427_428delCT, p.Leu143A1afs*55) esetében elsőként végeztünk részletes szemészeti fenotípus meghatározást és írtunk le a betegséghez társuló progresszív retina dystrophiát. Bár a betegség a tünettanában, a retina funkcionális károsodásában és az ERG vizsgálati eredményében is emlékeztet retinitis pigmentosára, a jellegzetes szemfenéki és OCT kép segítségével attól és

más retina dystrophiától teljesen elkülöníthető. Jellemzői a relatíve megkímélt RPE réteg, normál papilla és érhalózat, a pálcikák teljes hiánya, valamint egy éles határú, fotoreceptorok alkotta, korong alakú, kompaktálódott, hiperreflektív képlet a foveában. Elsőként igazoltuk, hogy a homozigóta *NEURODI* mutáció az állatkísérletekhez hasonlóan emberben is súlyos retina dystrophiát okoz. Megállapítottuk a mutáció anatómiai és funkcionális következményeit humán retinában. Oculodentodigitális dysplasiában szenvedő férfi beteg esetében igazoltunk egy korábban egy esetben már leírt missense mutációt a *GJA1* génben (c.413G>A, p.Gly138Asp). Az eddigi esetektől eltérően a részletes szemészeti vizsgálattal egy új fenotípust igazoltunk a betegségben, nevezetesen relatív anterior microphthalmus és myopia együttes előfordulását. Az általunk detektált új genotípus-fenotípus korrelációk megállapítása fontos diagnosztikai és prognosztikai értékkel bír, valamint lehetőséget nyújtanak az egyes betegségek patomechanizmusának mélyebb megértésére.

SUMMARY

Mutations responsible for inherited eye disorders are often found in genes which play a crucial role in the development of the eye or in maintaining its function. These abnormalities can occur isolated or as a part of a multiorgan syndrome. The severity of the clinical manifestation, the progression and the tissues which are affected by the disease show a high diversity. The aim of my work was to clinically and genetically examine rare inherited eye diseases, and to determine in detail their new genotype-phenotype correlation, in order to get a deeper view in their pathogenesis and to provide essential information about these diseases for the researchers, ophthalmologists and clinical geneticists.

Toxic interchange haplotypes in exon 3 of the red and green opsin genes (L-opsin/LVAVA, M-opsin/MVAVA) were detected in a family with X-linked high myopia by clinical exome sequencing. However, the long term follow-up and the clinical and genetic investigation of the older affected family members revealed that the high myopia associated with progressive cone-dystrophy in patients older than 40 years. We found that affected males have normal color vision and visual acuity until their forties, but visual acuity started to decline thereafter, along with the development of deutan/protan color vision defects. Our results confirmed that the color vision defect is not the direct consequence of the toxic haplotype, it is due to the cone dystrophy. The effect of the combination of the LVAVA/MVAVA haplotype was described for the first time in the literature. Our findings indicate, the rare exon 3 interchange haplotype in the opsin genes can cause a late onset progressive cone dystrophy, representing a new genotype-phenotype correlation. Moreover, based on our results the diagnosis of a previously reported non-syndromatous X-linked high myopia should be reconsidered. We performed the first detailed ophthalmological description of a progressive retinal dystrophy caused by a homozygous *NEUROD1* null mutation (c.427_428delCT, p.Leu143Alafs*55) in a patient with permanent neonatal diabetes,

neurological defects and severe visual impairments. Although it resembles retinitis pigmentosa in aspects of symptoms, retinal functional impairment and ERG results, it can be clearly distinguished from any already known retinal dystrophies by characteristic OCT and fundus appearance. The characteristic hallmarks of the disease are the relatively spared pigmented epithelial layer, the normal appearance of the optic disc and retinal vessel, and the hyperdens disc-shaped remnant of cone photoreceptors in the fovea. We are the first to report that the *NEURODI* null mutation causes severe retinal dystrophy in humans similar to that seen in animal experiments. We determined in detail the anatomical and functional consequences of the homozygous *NEURODI* mutation in the human retina. We detected a previously described missense mutation in the *GJAI* gene (c.413G>A, p.Gly138Asp) in a patient with oculodentodigital dysplasia. A new phenotype was revealed by detailed ophthalmological examination, namely the simultaneous presence of anterior microphthalmos and myopia. Our new genotype-phenotype correlations have important diagnostic and prognostic value and add to the deeper understanding of the pathomechanism of these inherited eye disorders.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Russell S, Bennett J, Wellman JA, Chung DC, Yu ZF, Tillman A, et al. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2017;390(10097):849-60.
2. Harada T, Harada C, Parada LF. Molecular regulation of visual system development: more than meets the eye. *Genes Dev*. 2007;21(4):367-78.
3. Verma IC, Paliwal P, Singh K. Genetic Testing in Pediatric Ophthalmology. *Indian J Pediatr*. 2017.
4. Berger W, Kloeckener-Gruissem B, Neidhardt J. The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Prog Retin Eye Res*. 2010;29(5):335-75.
5. Young TL. Ophthalmic genetics/inherited eye disease. *Curr Opin Ophthalmol*. 2003;14(5):296-303.
6. Gupta S, Chatterjee S, Mukherjee A, Mutsuddi M. Whole exome sequencing: Uncovering causal genetic variants for ocular diseases. *Exp Eye Res*. 2017;164:139-50.
7. Slavotinek AM, Garcia ST, Chandratillake G, Bardakjian T, Ullah E, Wu D, et al. Exome sequencing in 32 patients with anophthalmia/microphthalmia and developmental eye defects. *Clin Genet*. 2015;88(5):468-73.
8. Devi RR, Vijayalakshmi P. Novel mutations in GJA8 associated with autosomal dominant congenital cataract and microcornea. *Mol Vis*. 2006;12:190-5.

9. Yardley J, Leroy BP, Hart-Holden N, Lafaut BA, Loeys B, Messiaen LM, et al. Mutations of VMD2 splicing regulators cause nanophthalmos and autosomal dominant vitreoretinopathopathy (ADVIRC). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(10):3683-9.
10. Wang P, Sun W, Li S, Xiao X, Guo X, Zhang Q. PAX6 mutations identified in 4 of 35 families with microcornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(10):6338-42.
11. Gould DB, Mears AJ, Pearce WG, Walter MA. Autosomal dominant Axenfeld-Rieger anomaly maps to 6p25. *Am J Hum Genet.* 1997;61(3):765-8.
12. Strungaru MH, Dinu I, Walter MA. Genotype-phenotype correlations in Axenfeld-Rieger malformation and glaucoma patients with FOXC1 and PITX2 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(1):228-37.
13. Musleh M, Hall G, Lloyd IC, Gillespie RL, Waller S, Douzougou S, et al. Diagnosing the cause of bilateral paediatric cataracts: comparison of standard testing with a next-generation sequencing approach. *Eye (Lond).* 2016;30(9):1175-81.
14. Stephan DA, Gillanders E, Vanderveen D, Freas-Lutz D, Wistow G, Baxevanis AD, et al. Progressive juvenile-onset punctate cataracts caused by mutation of the gammaD-crystallin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(3):1008-12.
15. Prokudin I, Simons C, Grigg JR, Storen R, Kumar V, Phua ZY, et al. Exome sequencing in developmental eye disease leads to identification of causal variants in GJA8, CRYGC, PAX6 and CYP1B1. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(7):907-15.
16. Bejjani BA, Lewis RA, Tomey KF, Anderson KL, Dueker DK, Jabak M, et al. Mutations in CYP1B1, the gene for cytochrome P4501B1, are the predominant cause

- of primary congenital glaucoma in Saudi Arabia. *Am J Hum Genet.* 1998;62(2):325-33.
17. Micheal S, Siddiqui SN, Zafar SN, Iqbal A, Khan MI, den Hollander AI. Identification of Novel Variants in LTBP2 and PXDN Using Whole-Exome Sequencing in Developmental and Congenital Glaucoma. *PLoS One.* 2016;11(7):e0159259.
 18. Zuchner S, Dallman J, Wen R, Beecham G, Naj A, Farooq A, et al. Whole-exome sequencing links a variant in DHDDS to retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet.* 2011;88(2):201-6.
 19. Strom SP, Gao YQ, Martinez A, Ortube C, Chen Z, Nelson SF, et al. Molecular diagnosis of putative Stargardt Disease probands by exome sequencing. *BMC Med Genet.* 2012;13:67.
 20. Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med.* 2008;358(21):2231-9.
 21. Cideciyan AV, Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Schwartz SB, Boye SL, et al. Human RPE65 gene therapy for Leber congenital amaurosis: persistence of early visual improvements and safety at 1 year. *Hum Gene Ther.* 2009;20(9):999-1004.
 22. Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Jr., Mingozzi F, Bennicelli J, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med.* 2008;358(21):2240-8.
 23. Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med.* 2010;363(2):166-76.

24. Al-Muammar AM, Kalantan H, Azad TA, Sultan T, Abu-Amero KK. Analysis of the SOD1 Gene in Keratoconus Patients from Saudi Arabia. *Ophthalmic Genet.* 2015;36(4):373-5.
25. Saeed-Rad S, Hashemi H, Miraftab M, Noori-Dalooi MR, Chaleshtori MH, Raoofian R, et al. Mutation analysis of VSX1 and SOD1 in Iranian patients with keratoconus. *Mol Vis.* 2011;17:3128-36.
26. Gordon-Shaag A, Millodot M, Shneor E, Liu Y. The genetic and environmental factors for keratoconus. *Biomed Res Int.* 2015;2015:795738.
27. Scholl HP, Fleckenstein M, Charbel Issa P, Keilhauer C, Holz FG, Weber BH. An update on the genetics of age-related macular degeneration. *Mol Vis.* 2007;13:196-205.
28. Sivaprasad S, Chong NV. The complement system and age-related macular degeneration. *Eye (Lond).* 2006;20(8):867-72.
29. Gold B, Merriam JE, Zernant J, Hancox LS, Taiber AJ, Gehrs K, et al. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2006;38(4):458-62.
30. Grisanti S, Tatar O. The role of vascular endothelial growth factor and other endogenous interplayers in age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 2008;27(4):372-90.
31. Teikari J, O'Donnell JJ, Kaprio J, Koskenvuo M. Genetic and environmental effects on oculometric traits. *Optom Vis Sci.* 1989;66(9):594-9.

32. Lyhne N, Sjolie AK, Kyvik KO, Green A. The importance of genes and environment for ocular refraction and its determiners: a population based study among 20-45 year old twins. *Br J Ophthalmol*. 2001;85(12):1470-6.
33. Hammond CJ, Snieder H, Gilbert CE, Spector TD. Genes and environment in refractive error: the twin eye study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(6):1232-6.
34. Hammond CJ, Andrew T, Mak YT, Spector TD. A susceptibility locus for myopia in the normal population is linked to the PAX6 gene region on chromosome 11: a genomewide scan of dizygotic twins. *Am J Hum Genet*. 2004;75(2):294-304.
35. Wong TY, Foster PJ, Ng TP, Tielsch JM, Johnson GJ, Seah SK. Variations in ocular biometry in an adult Chinese population in Singapore: the Tanjong Pagar Survey. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(1):73-80.
36. Zhu G, Hewitt AW, Ruddle JB, Kearns LS, Brown SA, Mackinnon JR, et al. Genetic dissection of myopia: evidence for linkage of ocular axial length to chromosome 5q. *Ophthalmology*. 2008;115(6):1053-7 e2.
37. Dandona R, Dandona L. Refractive error blindness. *Bull World Health Organ*. 2001;79(3):237-43.
38. Kocur I, Resnikoff S. Visual impairment and blindness in Europe and their prevention. *Br J Ophthalmol*. 2002;86(7):716-22.
39. Saw SM, Husain R, Gazzard GM, Koh D, Widjaja D, Tan DT. Causes of low vision and blindness in rural Indonesia. *Br J Ophthalmol*. 2003;87(9):1075-8.
40. Bamashmus MA, Al-Barrag AO. Eye camps in Yemen--providing medical coverage to the underprivileged. *Med Sci Monit*. 2008;14(11):PH41-5.

41. Kempen JH, Mitchell P, Lee KE, Tielsch JM, Broman AT, Taylor HR, et al. The prevalence of refractive errors among adults in the United States, Western Europe, and Australia. *Arch Ophthalmol*. 2004;122(4):495-505.
42. Zejmo M, Forminska-Kapuscik M, Pieczara E, Filipek E, Mrukwa-Kominek E, Samochowiec-Donocik E, et al. Etiopathogenesis and management of high myopia. Part II. *Med Sci Monit*. 2009;15(11):RA252-5.
43. Teikari JM, O'Donnell J, Kaprio J, Koskenvuo M. Impact of heredity in myopia. *Hum Hered*. 1991;41(3):151-6.
44. Sorsby A, Leary GA, Fraser GR. Family studies on ocular refraction and its components. *J Med Genet*. 1966;3(4):269-73.
45. Yang Z, Xiao X, Li S, Zhang Q. Clinical and linkage study on a consanguineous Chinese family with autosomal recessive high myopia. *Mol Vis*. 2009;15:312-8.
46. Zhang Q, Guo X, Xiao X, Jia X, Li S, Hejtmancik JF. Novel locus for X linked recessive high myopia maps to Xq23-q25 but outside MYP1. *J Med Genet*. 2006;43(5):e20.
47. Lam CY, Tam PO, Fan DS, Fan BJ, Wang DY, Lee CW, et al. A genome-wide scan maps a novel high myopia locus to 5p15. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(9):3768-78.
48. Nallasamy S, Paluru PC, Devoto M, Wasserman NF, Zhou J, Young TL. Genetic linkage study of high-grade myopia in a Hutterite population from South Dakota. *Mol Vis*. 2007;13:229-36.

49. Zhang Q, Guo X, Xiao X, Jia X, Li S, Hejtmancik JF. A new locus for autosomal dominant high myopia maps to 4q22-q27 between D4S1578 and D4S1612. *Mol Vis.* 2005;11:554-60.
50. Paluru P, Ronan SM, Heon E, Devoto M, Wildenberg SC, Scavello G, et al. New locus for autosomal dominant high myopia maps to the long arm of chromosome 17. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(5):1830-6.
51. Paluru PC, Nallasamy S, Devoto M, Rappaport EF, Young TL. Identification of a novel locus on 2q for autosomal dominant high-grade myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(7):2300-7.
52. Young TL, Ronan SM, Alvear AB, Wildenberg SC, Oetting WS, Atwood LD, et al. A second locus for familial high myopia maps to chromosome 12q. *Am J Hum Genet.* 1998;63(5):1419-24.
53. Naiglin L, Gazagne C, Dallongeville F, Thalamas C, Idder A, Rascol O, et al. A genome wide scan for familial high myopia suggests a novel locus on chromosome 7q36. *J Med Genet.* 2002;39(2):118-24.
54. Mordechai S, Gradstein L, Pasanen A, Ofir R, El Amour K, Levy J, et al. High myopia caused by a mutation in LEPREL1, encoding prolyl 3-hydroxylase 2. *Am J Hum Genet.* 2011;89(3):438-45.
55. Shi Y, Li Y, Zhang D, Zhang H, Li Y, Lu F, et al. Exome sequencing identifies ZNF644 mutations in high myopia. *PLoS Genet.* 2011;7(6):e1002084.

56. Tran-Viet KN, Powell C, Barathi VA, Klemm T, Maurer-Stroh S, Limviphuvadh V, et al. Mutations in *SCO2* are associated with autosomal-dominant high-grade myopia. *Am J Hum Genet.* 2013;92(5):820-6.
57. Haim M, Fledelius HC, Skarsholm. X-linked myopia in Danish family. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1988;66(4):450-6.
58. Schwartz M, Haim M, Skarsholm D. X-linked myopia: Bornholm eye disease. Linkage to DNA markers on the distal part of Xq. *Clin Genet.* 1990;38(4):281-6.
59. Guo X, Xiao X, Li S, Wang P, Jia X, Zhang Q. Nonsyndromic high myopia in a Chinese family mapped to *MYP1*: linkage confirmation and phenotypic characterization. *Arch Ophthalmol.* 2010;128(11):1473-9.
60. McClements M, Davies WI, Michaelides M, Young T, Neitz M, MacLaren RE, et al. Variations in opsin coding sequences cause x-linked cone dysfunction syndrome with myopia and dichromacy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(2):1361-9.
61. Li J, Gao B, Guan L, Xiao X, Zhang J, Li S, et al. Unique Variants in *OPN1LW* Cause Both Syndromic and Nonsyndromic X-Linked High Myopia Mapped to *MYP1*. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(6):4150-5.
62. Nathans J, Thomas D, Hogness DS. Molecular genetics of human color vision: the genes encoding blue, green, and red pigments. *Science.* 1986;232(4747):193-202.
63. Buena-Atienza E, Ruther K, Baumann B, Bergholz R, Birch D, De Baere E, et al. De novo intrachromosomal gene conversion from *OPN1MW* to *OPN1LW* in the male germline results in Blue Cone Monochromacy. *Sci Rep.* 2016;6:28253.

64. Nathans J, Piantanida TP, Eddy RL, Shows TB, Hogness DS. Molecular genetics of inherited variation in human color vision. *Science*. 1986;232(4747):203-10.
65. Nathans J. The evolution and physiology of human color vision: insights from molecular genetic studies of visual pigments. *Neuron*. 1999;24(2):299-312.
66. Nathans J, Davenport CM, Maumenee IH, Lewis RA, Hejtmancik JF, Litt M, et al. Molecular genetics of human blue cone monochromacy. *Science*. 1989;245(4920):831-8.
67. Wang Y, Macke JP, Merbs SL, Zack DJ, Klaunberg B, Bennett J, et al. A locus control region adjacent to the human red and green visual pigment genes. *Neuron*. 1992;9(3):429-40.
68. Hayashi T, Motulsky AG, Deeb SS. Position of a 'green-red' hybrid gene in the visual pigment array determines colour-vision phenotype. *Nat Genet*. 1999;22(1):90-3.
69. Deeb SS. The molecular basis of variation in human color vision. *Clin Genet*. 2005;67(5):369-77.
70. Gardner JC, Webb TR, Kanuga N, Robson AG, Holder GE, Stockman A, et al. X-linked cone dystrophy caused by mutation of the red and green cone opsins. *Am J Hum Genet*. 2010;87(1):26-39.
71. Winderickx J, Sanocki E, Lindsey DT, Teller DY, Motulsky AG, Deeb SS. Defective colour vision associated with a missense mutation in the human green visual pigment gene. *Nat Genet*. 1992;1(4):251-6.

72. Jagla WM, Jagle H, Hayashi T, Sharpe LT, Deeb SS. The molecular basis of dichromatic color vision in males with multiple red and green visual pigment genes. *Hum Mol Genet.* 2002;11(1):23-32.
73. Crognale MA, Fry M, Highsmith J, Haegerstrom-Portnoy G, Neitz M, Neitz J, et al. Characterization of a novel form of X-linked incomplete achromatopsia. *Vis Neurosci.* 2004;21(3):197-203.
74. Kellner U, Wissinger B, Tippmann S, Kohl S, Kraus H, Foerster MH. Blue cone monochromatism: clinical findings in patients with mutations in the red/green opsin gene cluster. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2004;242(9):729-35.
75. Neitz M, Carroll J, Renner A, Knau H, Werner JS, Neitz J. Variety of genotypes in males diagnosed as dichromatic on a conventional clinical anomaloscope. *Vis Neurosci.* 2004;21(3):205-16.
76. Young TL, Deeb SS, Ronan SM, Dewan AT, Alvear AB, Scavello GS, et al. X-linked high myopia associated with cone dysfunction. *Arch Ophthalmol.* 2004;122(6):897-908.
77. Michaelides M, Johnson S, Bradshaw K, Holder GE, Simunovic MP, Mollon JD, et al. X-linked cone dysfunction syndrome with myopia and protanopia. *Ophthalmology.* 2005;112(8):1448-54.
78. Gardner JC, Michaelides M, Holder GE, Kanuga N, Webb TR, Mollon JD, et al. Blue cone monochromacy: causative mutations and associated phenotypes. *Mol Vis.* 2009;15:876-84.

79. Aboshiha J, Dubis AM, Carroll J, Hardcastle AJ, Michaelides M. The cone dysfunction syndromes. *Br J Ophthalmol*. 2016;100(1):115-21.
80. Mizrahi-Meissonnier L, Merin S, Banin E, Sharon D. Variable retinal phenotypes caused by mutations in the X-linked photopigment gene array. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(8):3884-92.
81. Wang Y, Smallwood PM, Cowan M, Blesh D, Lawler A, Nathans J. Mutually exclusive expression of human red and green visual pigment-reporter transgenes occurs at high frequency in murine cone photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(9):5251-6.
82. Smallwood PM, Wang Y, Nathans J. Role of a locus control region in the mutually exclusive expression of human red and green cone pigment genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(2):1008-11.
83. Nathans J, Maumenee IH, Zrenner E, Sadowski B, Sharpe LT, Lewis RA, et al. Genetic heterogeneity among blue-cone monochromats. *Am J Hum Genet*. 1993;53(5):987-1000.
84. Ladekjaer-Mikkelsen AS, Rosenberg T, Jorgensen AL. A new mechanism in blue cone monochromatism. *Hum Genet*. 1996;98(4):403-8.
85. Ayyagari R, Kakuk LE, Bingham EL, Szczesny JJ, Kemp J, Toda Y, et al. Spectrum of color gene deletions and phenotype in patients with blue cone monochromacy. *Hum Genet*. 2000;107(1):75-82.

86. Michaelides M, Johnson S, Simunovic MP, Bradshaw K, Holder G, Mollon JD, et al. Blue cone monochromatism: a phenotype and genotype assessment with evidence of progressive loss of cone function in older individuals. *Eye (Lond)*. 2005;19(1):2-10.
87. Carroll J, Neitz M, Hofer H, Neitz J, Williams DR. Functional photoreceptor loss revealed with adaptive optics: an alternate cause of color blindness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(22):8461-6.
88. Carroll J, Dubra A, Gardner JC, Mizrahi-Meissonnier L, Cooper RF, Dubis AM, et al. The effect of cone opsin mutations on retinal structure and the integrity of the photoreceptor mosaic. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(13):8006-15.
89. Gardner JC, Liew G, Quan YH, Ermetal B, Ueyama H, Davidson AE, et al. Three different cone opsin gene array mutational mechanisms with genotype-phenotype correlation and functional investigation of cone opsin variants. *Hum Mutat*. 2014;35(11):1354-62.
90. Neitz J, Neitz M. The genetics of normal and defective color vision. *Vision Res*. 2011;51(7):633-51.
91. Ueyama H, Muraki-Oda S, Yamade S, Tanabe S, Yamashita T, Shichida Y, et al. Unique haplotype in exon 3 of cone opsin mRNA affects splicing of its precursor, leading to congenital color vision defect. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;424(1):152-7.
92. Bernardo AS, Hay CW, Docherty K. Pancreatic transcription factors and their role in the birth, life and survival of the pancreatic beta cell. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;294(1-2):1-9.

93. Lee JK, Cho JH, Hwang WS, Lee YD, Reu DS, Suh-Kim H. Expression of neuroD/BETA2 in mitotic and postmitotic neuronal cells during the development of nervous system. *Dev Dyn.* 2000;217(4):361-7.
94. Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, et al. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev.* 1997;11(18):2323-34.
95. Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N, Weintraub H. Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science.* 1995;268(5212):836-44.
96. Miyata T, Maeda T, Lee JE. NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev.* 1999;13(13):1647-52.
97. Liu M, Pleasure SJ, Collins AE, Noebels JL, Naya FJ, Tsai MJ, et al. Loss of BETA2/NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(2):865-70.
98. Liu M, Pereira FA, Price SD, Chu MJ, Shope C, Himes D, et al. Essential role of BETA2/NeuroD1 in development of the vestibular and auditory systems. *Genes Dev.* 2000;14(22):2839-54.
99. Morrow EM, Furukawa T, Lee JE, Cepko CL. NeuroD regulates multiple functions in the developing neural retina in rodent. *Development.* 1999;126(1):23-36.
100. Pennesi ME, Cho JH, Yang Z, Wu SH, Zhang J, Wu SM, et al. BETA2/NeuroD1 null mice: a new model for transcription factor-dependent photoreceptor degeneration. *J Neurosci.* 2003;23(2):453-61.

101. Yan RT, Wang SZ. Requirement of neuroD for photoreceptor formation in the chick retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(1):48-58.
102. Ochocinska MJ, Munoz EM, Veleri S, Weller JL, Coon SL, Pozdeyev N, et al. NeuroD1 is required for survival of photoreceptors but not pinealocytes: results from targeted gene deletion studies. *J Neurochem.* 2012;123(1):44-59.
103. Cho JH, Klein WH, Tsai MJ. Compensational regulation of bHLH transcription factors in the postnatal development of BETA2/NeuroD1-null retina. *Mech Dev.* 2007;124(7-8):543-50.
104. Acharya HR, Dooley CM, Thoreson WB, Ahmad I. cDNA cloning and expression analysis of NeuroD mRNA in human retina. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;233(2):459-63.
105. Gonsorcikova L, Pruhova S, Cinek O, Ek J, Pelikanova T, Jorgensen T, et al. Autosomal inheritance of diabetes in two families characterized by obesity and a novel H241Q mutation in NEUROD1. *Pediatr Diabetes.* 2008;9(4 Pt 2):367-72.
106. Kristinsson SY, Thorolfsdottir ET, Talseth B, Steingrimsson E, Thorsson AV, Helgason T, et al. MODY in Iceland is associated with mutations in HNF-1alpha and a novel mutation in NeuroD1. *Diabetologia.* 2001;44(11):2098-103.
107. Liu L, Furuta H, Minami A, Zheng T, Jia W, Nanjo K, et al. A novel mutation, Ser159Pro in the NeuroD1/BETA2 gene contributes to the development of diabetes in a Chinese potential MODY family. *Mol Cell Biochem.* 2007;303(1-2):115-20.

108. Malecki MT, Jhala US, Antonellis A, Fields L, Doria A, Orban T, et al. Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet.* 1999;23(3):323-8.
109. Rubio-Cabezas O, Minton JA, Kantor I, Williams D, Ellard S, Hattersley AT. Homozygous mutations in NEUROD1 are responsible for a novel syndrome of permanent neonatal diabetes and neurological abnormalities. *Diabetes.* 2010;59(9):2326-31.
110. Aminabadi NA, Ganji AT, Vafaei A, Pourkazemi M, Oskouei SG. Oculodentodigital dysplasia: disease spectrum in an eight-year-old boy, his parents and a sibling. *J Clin Pediatr Dent.* 2009;33(4):337-41.
111. Paznekas WA, Boyadjiev SA, Shapiro RE, Daniels O, Wollnik B, Keegan CE, et al. Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet.* 2003;72(2):408-18.
112. Loddenkemper T, Grote K, Evers S, Oelerich M, Stogbauer F. Neurological manifestations of the oculodentodigital dysplasia syndrome. *J Neurol.* 2002;249(5):584-95.
113. Gorlin RJ, Miskin LH, St GJ. Oculodentodigital dysplasia. *J Pediatr.* 1963;63:69-75.
114. Gutmann DH, Zackai EH, McDonald-McGinn DM, Fischbeck KH, Kamholz J. Oculodentodigital dysplasia syndrome associated with abnormal cerebral white matter. *Am J Med Genet.* 1991;41(1):18-20.

115. Paznekas WA, Karczeski B, Vermeer S, Lowry RB, Delatycki M, Laurence F, et al. GJA1 mutations, variants, and connexin 43 dysfunction as it relates to the oculodentodigital dysplasia phenotype. *Hum Mutat.* 2009;30(5):724-33.
116. Marmor MF, Fulton AB, Holder GE, Miyake Y, Brigell M, Bach M, et al. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update). *Doc Ophthalmol.* 2009;118(1):69-77.
117. Vervoort R, Lennon A, Bird AC, Tulloch B, Axton R, Miano MG, et al. Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa. *Nat Genet.* 2000;25(4):462-6.
118. Meindl A, Dry K, Herrmann K, Manson F, Ciccodicola A, Edgar A, et al. A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Nat Genet.* 1996;13(1):35-42.
119. Demirci FY, Rigatti BW, Wen G, Radak AL, Mah TS, Baic CL, et al. X-linked cone-rod dystrophy (locus COD1): identification of mutations in RPGR exon ORF15. *Am J Hum Genet.* 2002;70(4):1049-53.
120. Yang Z, Peachey NS, Moshfeghi DM, Thirumalaichary S, Chorich L, Shugart YY, et al. Mutations in the RPGR gene cause X-linked cone dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2002;11(5):605-11.
121. Bione S, Sala C, Manzini C, Arrigo G, Zuffardi O, Banfi S, et al. A human homologue of the *Drosophila melanogaster* diaphanous gene is disrupted in a patient with premature ovarian failure: evidence for conserved function in oogenesis and implications for human sterility. *Am J Hum Genet.* 1998;62(3):533-41.

122. Jalkanen R, Bech-Hansen NT, Tobias R, Sankila EM, Mantyjarvi M, Forsius H, et al. A novel CACNA1F gene mutation causes Aland Island eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(6):2498-502.
123. Strom TM, Nyakatura G, Apfelstedt-Sylla E, Hellebrand H, Lorenz B, Weber BH, et al. An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet.* 1998;19(3):260-3.
124. Fenwick A, Richardson RJ, Butterworth J, Barron MJ, Dixon MJ. Novel mutations in GJA1 cause oculodentodigital syndrome. *J Dent Res.* 2008;87(11):1021-6.
125. Patterson EJ, Wilk M, Langlo CS, Kasilian M, Ring M, Hufnagel RB, et al. Cone Photoreceptor Structure in Patients With X-Linked Cone Dysfunction and Red-Green Color Vision Deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57(8):3853-63.
126. Fleckenstein M, Charbel Issa P, Fuchs HA, Finger RP, Helb HM, Scholl HP, et al. Discrete arcs of increased fundus autofluorescence in retinal dystrophies and functional correlate on microperimetry. *Eye (Lond).* 2009;23(3):567-75.
127. Murakami T, Akimoto M, Ooto S, Suzuki T, Ikeda H, Kawagoe N, et al. Association between abnormal autofluorescence and photoreceptor disorganization in retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol.* 2008;145(4):687-94.
128. Lima LH, Cella W, Greenstein VC, Wang NK, Busuioc M, Smith RT, et al. Structural assessment of hyperautofluorescent ring in patients with retinitis pigmentosa. *Retina.* 2009;29(7):1025-31.

129. Robson AG, El-Amir A, Bailey C, Egan CA, Fitzke FW, Webster AR, et al. Pattern ERG correlates of abnormal fundus autofluorescence in patients with retinitis pigmentosa and normal visual acuity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(8):3544-50.
130. Wabbels B, Demmler A, Paunescu K, Wegscheider E, Preising MN, Lorenz B. Fundus autofluorescence in children and teenagers with hereditary retinal diseases. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2006;244(1):36-45.
131. Robson AG, Michaelides M, Luong VA, Holder GE, Bird AC, Webster AR, et al. Functional correlates of fundus autofluorescence abnormalities in patients with RPGR or RIMS1 mutations causing cone or cone rod dystrophy. *Br J Ophthalmol.* 2008;92(1):95-102.
132. Robson AG, Michaelides M, Saihan Z, Bird AC, Webster AR, Moore AT, et al. Functional characteristics of patients with retinal dystrophy that manifest abnormal parafoveal annuli of high density fundus autofluorescence; a review and update. *Doc Ophthalmol.* 2008;116(2):79-89.
133. Lenassi E, Troeger E, Wilke R, Hawlina M. Correlation between macular morphology and sensitivity in patients with retinitis pigmentosa and hyperautofluorescent ring. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(1):47-52.
134. Popovic P, Jarc-Vidmar M, Hawlina M. Abnormal fundus autofluorescence in relation to retinal function in patients with retinitis pigmentosa. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2005;243(10):1018-27.
135. Aizawa S, Mitamura Y, Hagiwara A, Sugawara T, Yamamoto S. Changes of fundus autofluorescence, photoreceptor inner and outer segment junction line, and visual

- function in patients with retinitis pigmentosa. *Clin Exp Ophthalmol*. 2010;38(6):597-604.
136. Wang F, Li H, Xu M, Li H, Zhao L, Yang L, et al. A homozygous missense mutation in *NEUROD1* is associated with nonsyndromic autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;56(1):150-5.
137. Vingolo EM, Steindl K, Forte R, Zompatori L, Iannaccone A, Sciarra A, et al. Autosomal dominant simple microphthalmos. *J Med Genet*. 1994;31(9):721-5.
138. Vitiello C, D'Adamo P, Gentile F, Vingolo EM, Gasparini P, Banfi S. A novel *GJA1* mutation causes oculodentodigital dysplasia without syndactyly. *Am J Med Genet A*. 2005;133A(1):58-60.
139. Sohajda Z, Hollo D, Berta A, Modis L. Microcornea associated with myopia. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2006;244(9):1211-3.

9. TÁRGYSZAVAK/ KEYWORDS

X-hez kötött nagyfokú myopia/ X-linked high myopia

Csap dystrophia/ Cone dystrophy

LVAVA/MVAVA haplotípus/ LVAVA/MVAVA haplotype

NEURODI null mutáció/ *NEURODI* null mutation

Retina dystrophia/ Retinal dystrophy

Hiperreflektív parafoveális gyűrű/ Hyperreflective parafoveal ring

Relatív anterior microphthalmus/ Relative anterior microphthalmos

Oculodentodigitális dysplasia/ Oculodentodigital dysplasia

10. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Losonczy Gergelynek**, a Debreceni Egyetem, Szemészeti Tanszékének volt egyetemi adjunktusának, aki mind az elméleti, mind a gyakorlati kérdésekben sokoldalú tanácsokkal látott el. Nagy segítséget nyújtott a betegek szemészeti fenotípusának jellemzésében, ötleteivel és kritikáival hozzájárult az értekezés, valamint az értekezés alapjául szolgáló publikációk elkészítéséhez.

Köszönettel tartozom **Dr. Balogh István** egyetemi docensnek, a Klinikai Genetika Tanszék vezetőjének, aki megteremtette a munkám elvégzéséhez szükséges feltételeket, emellett szakmai segítséget nyújtott a molekuláris genetikai vizsgálatok kivitelezésében, és az értekezés alapjául szolgáló közlemények elkészítésében. Köszönöm a segítséget a **Klinikai Genetikai Tanszék valamennyi munkatársának**.

Hálás vagyok **Dr. Kappelmayer János** professzor úrnak a Laboratóriumi Medicina Intézet vezetőjének, hogy lehetővé tette, hogy munkámat a Laboratóriumi Medicina Intézetben végezhessem. Köszönettel tartozom **Dr. Berta András** professzor úrnak, a Szemészeti Tanszék és a Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola vezetőjének, aki a szemészeti vizsgálatok elvégzéséhez szükséges feltételeket megteremtette.

11. PUBLIKÁCIÓS LISTA



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/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., Vajas, 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., Vajas, 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 közzé tett folyóiratok összesített impakt faktora: 6,248

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

6,248

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

Debrecen, 2018.03.07.



12. FÜGGELÉK

A függelék az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények különlenyomatait tartalmazza.

