

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**MOLEKULÁRIS EPIDEMIOLÓGIAI ÉS DIAGNOSZTIKAI  
VIZSGÁLATOK CISZTÁS FIBRÓZISBAN**

**Dr. Ivády Gergely**

**Témavezető: Dr. Balogh István**



**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2019**

# **MOLEKULÁRIS EPIDEMIOLÓGIAI ÉS DIAGNOSZTIKAI VIZSGÁLATOK CISZTÁS FIBRÓZISBAN**

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

Írta: Dr. Ivády Gergely általános orvos, laboratóriumi szakorvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris sejt- és immunbiológia doktori iskolája  
keretében

Témavezető: Dr. Balogh István

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora  
tagok: Prof. Dr. Széll Márta, az MTA doktora  
Prof. Dr. Méhes Gábor, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet könyvtára  
2019. április 2. (kedd) 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Török Olga, az orvostudomány kandidátusa  
Prof. Dr. Raskó István, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora  
tagok: Dr. Török Olga, az orvostudomány kandidátusa  
Prof. Dr. Raskó István, az MTA doktora  
Prof. Dr. Széll Márta, az MTA doktora  
Prof. Dr. Méhes Gábor, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme  
2019. április 2. (kedd) 12:30 óra

## **BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS**

### ***A cisztás fibrózis***

A cisztás fibrózis (CF), másnéven mukoviszcidózis, az egyik leggyakoribb monogénes öröklődő betegség a kaukázusi populációban, hozzávetőlegesen minden 27. egyén heterozigóta valamelyik kóroki mutációra nézve. A megbetegedés egy kloridion-csatorna zavar következményeként jön létre, melyet a cisztás fibrózis transzmembrán-konduktancia regulátor fehérje génjét (*CFTR*) érintő mutációk okoznak. Az epitheliális folyadéktranszportban résztvevő nátrium-, klorid- és bikarbonát ionok akadályozott mozgása miatt sűrű, viszkózus szekrétumok keletkeznek az érintett exokrin mirigyek kivezetőcsöveiben, az izzadtságmirigyek váladékát magas sótartalom jellemzi. A klinikai kép rendkívül változatos, progresszív és az adott betegre jellemző. A kórlefolyás elsősorban a szervi érintettségtől és annak mértékétől függ. A kórkép autoszomális recesszív öröklésmentet mutat.

### **A CF epidemiológiája**

Világszerte a megbetegedés kb. 70.000 embert érint. A WHO adatai szerint az Európai Unióban átlagosan minden 2.000 - 3.000 terhességből születik egy beteg gyermek. Az adott ország egészségügyi fejlettségével és a népesség életszínvonalával összefüggésben a mortalitás igen változó. A várható élettartam az utóbbi négy évtizedben jelentős mértékben emelkedett, pillanatnyilag Kanadában a legmagasabb, ahol meghaladja a 47,7 évet. Korábban a betegség magyarországi előfordulásával kapcsolatban kevés információ állt rendelkezésre és ezek közül a legfrissebb is 1996-ra datálható. A European Cystic Fibrosis Society (ECFS) 2017-ben publikált adatai szerint hazánkban jelenleg 558 regisztrált CF beteget tartanak számon. A közeljövőben azonban az újszülöttkori szűrés elterjedésével és fejlődésével, így a betegség enyhébb formáinak egyre gyakoribb felismerésével az incidencia adatokban előbb emelkedés, majd a prenatális és preimplantációs diagnosztika bevezetésével csökkenés prognosztizálható. A prevalencia viszont hosszútávon emelkedni fog a betegség egyre komplexebb terápiájának és a hatékonyabb gondozásnak köszönhetően.

## A CFTR szerkezete és funkciója

A CFTR protein az ABC (ATP Binding Cassette) fehérjecsaládba tartozó, cAMP-függő klorid ( $\text{Cl}^-$ ) / bikarbonát ( $\text{HCO}_3^-$ ) csatorna, mely a légutak, a bélrendszer, a hasnyálmirigy, a máj és a reproduktív szervek sejtjeinek apikális plazmamembránjában található. Két homológ részből épül fel, melyeket egy-egy hexahelikális transzmembrán domén (TMD1 és 2) és egy-egy intracelluláris nukleotidkötő domén (NBD1 és 2) alkot. A két fél egy intracelluláris szabályozó (R) doménon keresztül kapcsolódik egymáshoz. Bioszintézise és érése a hagyományos endoplazmatikus retikulum – Golgi útvonalon történik, majd fiziológiás szerepét a sejtmembránba kerülve tölti be. Internalizálódása után a fehérje végül az endoszómákba jut, ahol többnyire újrahasznosul. A molekula féléletideje átlagosan 12-14 óra. A hámszövetekben a CFTR által kontrollált iontranszport számít az anion szekréció sebességmeghatározó lépésének, így ez határozza meg a transzepithelialis folyadékmozgás mértékét, ezáltal az epithel borítású lumenfelszín hidráltási fokát és pH-ját is. A csatorna működésének köszönhetően alakul ki többek között a pancreasnedv, a verejték és a légutakban található folyadék végleges ionkoncentrációja és mennyisége is. Mivel a fenti szekréciók kulcsszerepet töltenek be az emésztésben, a testhőmérséklet szabályozásában és pl. a tüdők természetes immunvédekezésében, így csökkent mennyiségük és megváltozott összetételük nagyon korán súlyos szövődémmenyekkel jár.

## A CF pathogenezise

A betegség első tünetei leggyakrabban csecsemő- és kisdédkorban jelentkeznek. A CFTR-t expresszáló szövetek (pancreas, tüdő, gastrointestinális és a hepatobiliáris rendszer, valamint a reproduktív traktus) funkcióromlással kísért cisztás, kötőszövetes elfajulása következik be. A működészavart elsődlegesen a viszkózus nyák okozta obstrukció miatt kialakuló szervkárosodás idézi elő. A *CFTR* gén a 7. kromoszóma hosszú karján található (7q31.2), mérete 230 kb és 27 exonban 1480 aminosavat kódol. A *CFTR*-ben leírt genetikai variánsok száma a gén 1989-es klónozása óta folyamatosan bővül, jelenleg több, mint 2000 eltérés szerepel a hivatalos adatbázisokban. Noha a mutációk döntő többsége igen ritka – mindössze 20 darab éri el világviszonylatban a 0,1%-os allélfrekvenciát – közülük 1524 bizonyítottan patogén természetű. A súlyos eltérések mellett természetesen előfordulnak változó klinikai következményekkel járó, enyhe, ismeretlen jelentőségű és CF-t nem okozó, tünetmentes mutációk is. A közelmúltban megújított ECFS ajánlás szerint az számít patogén mutációnak, ami egy másik ismert, és bizonyosan *transz* helyzetű patogén mutációval együtt

klínikailag megerősített CF kialakulásához vezet. A változó klinikai következményekkel járó kategóriába sorolt mutációkkal (MVCC) rendelkező betegek esetében további kivizsgálás szükséges az erre alkalmas speciális CF központokban, rekurrens/krónikus idiopathiás pancreatitis, veleszületett bilaterális vas deferens hiány (CBAVD) és bronchiectasia irányába. Pathofiziológiai szempontból a betegség kialakulásában szerepet játszó mutációk hat osztályba sorolhatók. Az I. osztályba tartozó eltérések között olyan nonszensz, splicing zavart okozó (splice site) és olvasási keret eltolódást eredményező (frameshift) mutációkat találunk, amelyek korai stop kodont eredményeznek (pl. c.3484C>T, c.3846G>A, c.1657C>T, c.1679+1.6kbA>G és c.1624G>T). A II. osztályba sorolt mutációk következtében a fehérje poszttranszlációs módosítása vagy sejtmembránba történő transzportja szenved zavart (pl. c.1521\_1523delCTT és c.3909C>G), míg az V. osztály mutációi esetében promóter vagy splicing zavart okozó abnormalitások miatt csökkent transzkripció figyelhető meg (pl. c.2657+5G>A, c.1364C>A, c.2988+1G>A). A VI. típusba soroljuk, ha a fehérje működőképes, de instabil, ezért annak turnover a plazmamembránban fokozott (pl. c.-12\_10del23, c.859A>T, c.4147\_4148insA). Tehát az I., II., V. és VI. csoport mutációi súlyosan csökkent sejt felszíni CFTR expresszióval járnak. Ezzel szemben a III. és IV. osztályba tartozó genetikai defektusok esetén a protein mennyisége megfelelő és a funkció az, ami károsodott. A III. osztály mutációi a kloridcsatorna alacsony nyitási valószínűségét vagy annak elmaradását okozzák (pl. c.1652G>A, c.1651G>A, c.4046G>A), a IV. csoportban pedig a csatorna struktúrális változása vezet a konduktancia hiányához (c.350G>A, c.1000C>T, c.1040G>C).

### **A CF szűrése és diagnosztikája**

Az újszülöttkori szűrés 1979-ben Új-Zélandon történt indulása óta egyre több országban kerül bevezetésre. Köszönhető ez annak is, hogy a betegség korai terápiás beavatkozási lehetőségei rohamos fejlődésen mennek keresztül. A szűrés két, gyakrabban három szintű és hibrid technikákat használ, melyek jellemzően az immunoreaktív tripszinogén és a pancreatitis-asszociált protein meghatározásán kívül valamilyen DNS alapú szűrőmódszert foglalnak magukban. A kombinációktól és a választott cut-off értékektől függően az újszülöttkori szűrések pozitív prediktív értéke 9-19,7%, szenzitivitása 87-99% között változik, míg specificitásuk rendszerint eléri a 99%-ot. A CF mutációs státusz meghatározását lehetővé tevő molekuláris genetikai vizsgálatoknak a CF diagnosztikájában jelenleg jól körülhatárolt helyük és egyértelmű szerepük van. A betegség gyanúját a pozitív

újszülöttkori szűrőteszt mellett felvetheti még a családi anamnézis vagy egyes jellegzetes tünetek, rendellenességek megjelenése is (pl. diffúz bronchiectasia, exokrin pancreas elégtelenség, sóvesztő szindróma, obstruktív azoospermia, pozitív köpettenyésztés – elsősorban *P. aeruginosa*, stb.) A jelenleg használatos algoritmus szerint a diagnózis felállításához mindezek mellett szükség van egy pozitív verejték klorid tesztre ( $\geq 60$  mmol/L), vagy ennek nem egyértelmű eredménye esetén két (*transz* helyzetben lévő) CF-okozó mutáció jelenlétének genetikai vizsgálattal történő igazolására, esetleg a CFTR diszfunkció bizonyítására. Ez utóbbi esetén az NPD (nasal potential difference) vagy az ICM (intestinal current measurement) tekinthető elfogadott módszereknek, melyek azonban nehézkesen kivitelezhetők és emiatt széleskörűen nem terjedtek el. Az ECFS legújabb gyakorlati útmutatója javaslatot tesz arra nézve is, hogy milyen felszereltséggel és adottságokkal rendelkező laboratóriumok végezhetnek CF irányú genetikai vizsgálatokat. Ezen kritériumokból fontos kiemelni, hogy a vizsgálni kívánt populációra specifikus mutációspektrum meghatározása elengedhetetlen, elsősorban a szűrővizsgálatként használt molekuláris genetikai vizsgálatok esetén. Ennek oka, hogy a mutációk területi eloszlása rendkívül változatos képet mutat, emiatt a régióban nagyobb gyakorisággal előforduló patogén, CF-okozó eltérések azonosítása megkerülhetetlen egy optimális teljesítményű szűrőpanel felállításához.

### **Terápiás lehetőségek CF-ben**

Bár a morbiditási/mortalitási mutatók az utóbbi évtizedekben jelentős javulást mutatnak, a CF-ben szenvedő betegek többsége még mindig légzési elégtelenség következtében hal meg. Emiatt továbbra is a tüdőkárosodás progressziójának lassítása jelenti a terápia elsődleges célját. A folyamatosan újraképződő nyákdugók miatt a mukociliáris öntisztulás nem tud kellő hatékonysággal működni, ez pedig szekunder infekciók kialakulásához vezet. A leggyakoribb patogének a *Staphylococcus aureus* és a *Pseudomonas aeruginosa*. A neutrophil granulocyták közreműködésével fenntartott krónikus gyulladást akut exacerbációk tarkítják és a tüdőfunkció képtelen az alapértékre visszaállni. A hagyományos gyógyítás ennek megfelelően antibiotikum profilaxist és az exacerbációk prompt, agresszív kezelését foglalja magába. Ezt gyakran kiegészítik bronchodilatátorokkal, DNáz és neutrophil-elasztáz inhibitor kezeléssel a légutak átjárhatósága végett, emellett a szekrérum kiürülésének sebessége is fokozható mellkasi fizioterápiával. Bizakodásra ad okot, hogy a betegség hátterének részletes megismerésével és a molekuláris diagnosztika fejlődésével új,

célzott terápiás lehetőségek előtt nyílik meg az út. Ilyen szempontból úttörőnek számított az ivacaftor (VX-770) 2012-es megjelenése, mely elsőként tette elérhetővé a CFTR funkciót genotípus-specifikusan befolyásolni képes terápiát. A betegek egy szubpopulációjának (akik legalább egy c.1652G>A alléllal rendelkeztek) állapotában elért szignifikáns javulás sikere további kutatásokat alapozott meg. Napjainkban CF-ben a célzott terápiás fejlesztéseknek három fő iránya van: a potencírozó, a korrektor és az olvasást segítő („read-through”) molekulák keresése. A potencírozószer (pl. ivacaftor) a már sejt felszínen expresszált CFTR hatékonyságát javítja, így a III. és IV. osztályú mutációk esetén a legeredményesebb az alkalmazásuk. A korrektor molekulák (pl. lumacaftor és tezacaftor) a II. osztályba sorolt mutációk eredményezte mutáns CFTR protein processzáálásában és membránba juttatásában nyújthatnak segítséget. A harmadik csoportba tartozó vegyületek (pl. ataluren) elősegítik a korai stop kodon „átugrását”, ezáltal az I. osztályú mutációkkal rendelkező betegekben kevesebb trunkált CFTR fehérje képződik. A II. osztályba tartozó c.1521\_1523delCTT (p.Phe508del) mutációt - populációtól függően - a betegek kb. fele-kétharmada hordozza. Az ő esetükben a nem megfelelően módosított fehérje javarészt lebomlik mielőtt a sejtmembránt elérné, de amennyiben mégis kis mennyiségben kijut, akkor a patomechanizmus már valójában egy „gating”, azaz III-as típusú eltérésnek tekinthető. Talán ez magyarázza, hogy a c.1521\_1523delCTT betegek esetén a kombinált terápia (korrektor+potencírozó) hatékonysága jóval meghaladja a monoterápiában adott luma- vagy tezacaftorét, így nem meglepő, hogy a 12 év feletti vagy a c.1521\_1523delCTT homozigóták esetén ma már ez a javasolt regimen. Becslések szerint a fent részletezett modulátor terápiák segítségével a CF-ben szenvedő betegek közel felét lehet a korábbiakhoz képest egyértelműen kedvezőbb eredménnyel kezelni, így a megbízható és minél több genetikai eltérést lefedő mutációanalízis jelentősége vitathatatlan. A génszabási technikák egyelőre még kísérleti stádiumban tartanak, ezek taglalására az értekezés nem tér ki.

### ***A piroszekvenálás elve és korlátai***

Az új generációs DNS szekvenálási (next generation sequencing, NGS) technikák rövid idő alatt és alacsony költségekkel nyújtanak korábban soha nem látott áteresztőképességet a DNS bázisrendjének meghatározásában. Emiatt felhasználásuk a tudományos kutatás mellett a molekuláris genetikai diagnosztikai vizsgálatok körében is rohamosan terjed. Számos módszer ismert, melyek közül kezdetben a piroszekvenálás és az ion-szemikonduktor technológia biztosította a lehetőséget hosszabb szekvenciák

meghatározására, de az olvasás minőségével a mai napig akadnak problémák. A piroszekvenálás egy biolumineszcencia detektáláson alapuló NGS módszer, melynek során az egyszálú DNS templáthoz enzimatikusan egy komplementer szálát szintetizálunk. A reakcióterbe egy ciklusban szigorúan csak egyféle dNTP adagolása történik, melynek a növekvő szálba való bekötődését a DNS polimeráz enzim a komplementaritás elve szerint katalizálja. A nukleotidok beépülése során pirofoszfát keletkezik, és ennek mennyiségét egy kapcsolt luciferáz enzimreakció segítségével, fényfelvillanás formájában tesszük láthatóvá és mérhetővé. Az egyes dezoxinukleotidok felváltva, meghatározott sorrendben, egymástól mosási lépésekkel elválasztva kerülnek a rendszerbe. Így nyomon követhető, hogy a lánchosszabbodás során milyen dNTP és mekkora mennyiségben inkorporálódott, hiszen a detektált fény intenzitása elviekben ezzel egyenes arányosságban áll. A piroszekvenátor szoftvere az analízis befejeztével ún. flowgramokat generál, melyek kiértékelésével jutunk a szekvenálási eredményeihez. Manapság már közzismert, hogy piroszekvenáláskor/ion-szemikonduktor szekvenáláskor a gyakorlat nem minden esetben követi az elméletet. A beépült nukleotidok száma és az emittált fény intenzitása között fennálló, kezdetben lineáris összefüggés a beépülő nukleotidok számának emelkedésével elenyészik. Ennek következtében nagy számban ismétlődő bázisok meghatározásakor a módszer rendszeresen hibát vét, ami al- vagy fölélmérések formájában jelentkezik. Egyéb korlátai is vannak az eljárásnak, pl. előfordulhat, hogy a hozzáadott dNTP nem elegendő mennyiségű (inkomplett extenziót eredményez) vagy a nem megfelelő mosás a „carry-forward” jelenséget idézheti elő (egy ciklusban többféle dNTP is beépül egymás után), de ezeket a rendszer a nagyszámú párhuzamos mérésnek köszönhetően sokkal könnyebben tudja azonosítani és kiszűrni.

## **A homopolimerek**

A genomikában homopolimernek (HP) vagy másnéven mononukleotid mikroszatellitának nevezzük az olyan szekvenciát, amely egymást követő azonos bázisokból áll. A humán exom megközelítőleg 1,43 millió olyan homopolimert tartalmaz, amely 4-ertől hosszabb. Ezek túlnyomó része (96,7%-uk) méretét tekintve a 4-mer és 6-mer közötti tartományba esik. Szerepük nagy valószínűséggel a rekombinációban és a transzkripció szabályozásában van. A humán genomban a G:C homopolimerek számához képest az A:T párok feltűnően felülreprezentáltak. Bár mindkét pár szerkezete viszonylag stabil, ezek a lókuszok mégis különösen hajlamosak mutálódni, tulajdonképpen „length change” mutációs

forrópontoknak tekinthetők, ami feltehetőleg hozzájárult ahhoz, hogy számuk az exomban az idők során lényegesen redukálódott.

## **Bioinformatikai megoldások**

Lévén, hogy a HP-ek az egyéb DNS szakaszokhoz képest sokkal inkább ki vannak téve az inzercióknak és delécióknak (indel mutációknak), a piroszekvenálás fentebb részletezett problémája hatványozottan fog érvényesülni a HP-t tartalmazó DNS fragmentek elemzésekor. Tovább súlyosbítja a helyzetet, hogy a diagnosztikus célra használt molekuláris genetikai módszerek alkalmazásakor a valós genetikai eltérések megkülönböztetése az artefaktumoktól (azaz a fals pozitív ráta alacsonyan tartása) kiemelt jelentőséggel bír. Nem véletlen, hogy ennek kiküszöbölésére azóta számos bioinformatikai eszköz született. Ezen algoritmusok egy része a flowgramok csoportosítását végzi el, a Denoiser pl. a rangszám szerint rendezett relatív gyakoriságok alapján, vagy a PyroNoise/AmpliconNoise, ami empirikusan meghatározott hibaeloszlás alapján számolja a valószínűséget. Az Acacia elnevezésű szoftver elsősorban a HP régiókra koncentrálnak és az egyes bázisleolvasások („readek”) sorbarendezésekor egy dinamikusan változó konszenzus szekvenciát vesz figyelembe. A Coral és az ECHO hibajavító algoritmusok mellett említésre méltó még a HECTOR, utóbbi a HP spektrumok alapján több lépcsőben végzi el a korrekciót. Szintén hasznos alkalmazás a FlowClus, ami visszajelzéssel szolgál a zajmentesítés folyamatáról, lehetővé téve így a felhasználó számára, hogy az adott adathalmaznak leginkább megfelelő paramétereket alkalmazza a számítások során. A NoDe (Noise Detector) és a DUDE-Seq a legfrissebb eszközöknek számítanak és amellet, hogy ezek dolgoznak a legkisebb hibaszázalékkal, még kifejezetten gyorsak is. Ugyanakkor hiába javul drámaian a piroszekvenálás pontossága a szofisztikált hibajavító programoknak köszönhetően, azok minden igyekezet ellenére sem tudják a problémát tökéletesen áthidalni. Következésképpen a diagnosztikai célra használt piroszekvenátorok és az azonos kémiai elven működő, de pH változást detektáló Ion Torrent készülékek beállításakor mindig célszerű felmérni az adott műszer analitikai képességeit, különös tekintettel arra, hogy az analizátor milyen méretű HP szakaszokat képes még nagy biztonsággal meghatározni.

## **Homopolimerek a *CFTR* génben**

A *CFTR* gén kódoló régiója összesen 24 HP-t tartalmaz 17 exonban. Hasonlóan a teljes genomhoz, a T és A homopolimerek száma jóval meghaladja a G és C homopolimerekét: 14 timin, 8 adenin, 2 guanin HP található a génben, citozinból álló nem fordul elő. Ezek közül diagnosztikai szempontból a 14. exonban elhelyezkedő 7A szakasz a leginkább problémás (c.2046\_2052), mivel itt több, egyébként bizonyos populációkban gyakorinak számító patogén mutációt is leírtak. A mutáns allélokon létrejövő poli-A szegmensek száma változó, a c.2051\_2052delAAinsG mutáció öt adenin, a c.2052delA hat adenin, míg a hazánkban elterjedt (ld. később) c.2052\_2053insA (p.Gln685Thrfs\*4) mutáció nyolc adenin hosszúságú HP szakasz kialakulását eredményezi a lókuszbán.

## CÉLKITŰZÉSEK

PhD munkám során céljaim a következők voltak:

1. Előzetesen gondosan szelektált, klasszikus CF beteganyagon a Kelet-Magyarországon előforduló mutációk típusainak, gyakoriságának és eloszlásának a meghatározása,
2. Az eredmények alapján egy régió-specifikus, racionális és költséghatékony, többlépcsős genetikai CF mutáció detektáló diagnosztikai panel kialakítása,
3. Újabb betegek bevonásával a mutációspektrum felmérésének kiterjesztése hazánk további területeire, törekedve országos érvényességű adatok gyűjtésére,
4. A kombinált mutációspektrum birtokában a korábbi CF mutációpanel felülvizsgálata és tesztelése,
5. A pirosekvenálás elvű Roche 454 NGS rendszer analitikai teljesítményének meghatározása, különös tekintettel a készülék homopolimer detektáló képességeire,
6. Egy NGS alapú CF diagnosztikai módszer kifejlesztése és annak validálása, mely ezáltal a molekuláris genetikai vizsgálatok közé beilleszthető, valamint segítséget nyújthat egy jövőbeni újszülöttkori és/vagy heterozigóta (hordozó) szűrés genetikai analízis moduljának felállításában.

## BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

### *A kelet-magyarországi mutációspektrum felmérése*

#### **A betegek kiválasztása**

A régiós mutációspektrum vizsgálatához egy 40 főből álló reprezentatív betegcsoportot állítottunk össze (átlagéletkor  $\pm$  SD:  $14,4 \pm 8,7$  év), akik a betegség klasszikus klinikai képét mutatták. A tünetek megállapítása és a CF gyanús betegek beválogatása klinikusi kollaborációval történt. A klinikai beválogatási szempontok között a betegek anamnézisében a leggyakoribb tünetek a következők voltak: légzőszervi eredetűek (tachypnoe, elhúzódó köhögés, mellkasröntgen elváltozások, recidiváló obstructív bronchitis, recidiváló pneumonia, bronchiectasia, stb.), emésztőrendszert érintő (malabsorptio, súly- és hossznövekedési zavar, hypoproteinaemia-oedema, pancreas károsodás jelei, meconium ileus, stb.) reproduktív traktus eltérései (késői pubertás, vas deferensek korai elzáródása, azoospermia, stb.) és pozitív vagy határérték körüli klorid verejtékteszt ( $\geq 60$  mmol/L). A verejtékminták gyűjtéséhez Macroduct Sweat Collection System (Wescor - ELITechGroup, Logan, UT) eszközt, a verejték klorid koncentráció meghatározásához Sweat Chek Conductivity Analyzer (Wescor - ELITechGroup, Logan, UT) és/vagy Sanasol SM-01 verejték analizátort (Sanasol, Zalaegerszeg, Magyarország) használtunk. A betegek állandó lakhely szerinti eloszlását az 5. ábrán tüntettem fel, klinikusi jelzések alapján a rokoni kapcsolatban álló betegek nem kerültek beválogatásra.

#### **Molekuláris genetikai módszerek**

A betegektől nyert EDTA antikoagulált perifériás vérminta fehérvérsejtjeiből a DNS extrakciót QIAgen Blood Mini Kit-tel (Qiagen, Hilden, Németország) végeztük el. A patogén CF-okozó mutációk azonosítása háromlépcsős megközelítésben történt, a nemzetközi ajánlásoknak megfelelően. Az analitikai módszerek használatával addig haladtunk tovább a következő szintre, amíg az adott betegnél eredményesnek nem bizonyult mindkét allél kimutatása. Az analízis lépcsői az alábbi sorrend szerint követték egymást:

1. Elucigene CF29v2 Kit (Tepnel Diagnostics, Manchester, Egyesült Királyság). Ez a kereskedelmi forgalomban kapható kit a kaukázusi populáció és az askenázi zsidó diaszpóra 29 leggyakoribb oki mutációját fedi le, melyek a következők: c.3454G>C

(p.Asp1152His), c.1585-1G>A (1717-1G>A), c.1624G>T (p.Gly542\*), c.3846G>A (p.Trp1282\*), c.3909C>G (p.Asn1303Lys), c.1521\_1523delCTT (p.Phe508del), c.3717+12191C>T (3849+10kbC>T), c.262\_263delTT (p.Leu88Ilefs\*22), c.489+1G>T (621+1G>T), c.3752G>A (p.Ser1251Asn), c.1652G>A (p.Gly551Asp), c.350G>A (p.Arg117His), c.3484C>T (p.Arg1162\*), c.1000C>T (p.Arg334Trp), c.1364C>A (p.Ala455Glu), c.2657+5G>A (2789+5G>A), c.178G>T (p.Glu60\*), c.3528delC (p.Lys1177Serfs\*15), c.2051\_2052delAAinsG (p.Lys684Serfs\*38), c.1766+1G>A (1898+1G>A), c.2988+1G>A (3120+1G>A), c.1657C>T (p.Arg553\*), c.579+1G>T (711+1G>T), c.948delT (p.Phe316Leufs\*12), c.1519\_1521delATC (p.Ile507del), c.1040G>C (p.Arg347Pro), c.254G>A (p.Gly85Glu), c.2052delA (p.Lys684Asnfs\*38), c.1679G>C (p.Arg560Thr). A módszer egy multiplex allél-specifikus amplifikáció (ARMS: Amplification Refractory Mutation System), mely csak a mutáns allél jelenlétében eredményez PCR terméket, amit végül 3%-os agaróz gélben futtatva detektálhatunk és a termék mérete alapján azonosíthatunk. Egyetlen kivétel a magasan leggyakoribb c.1521\_1523delCTT mutáció, melynél a vad és a mutáns allél is amplifikálódik, így lehetőségünk nyílik a hetero- és homozigótáság megítélésére is.

2. A *CFTR*dele2,3(21kb), másnéven „szláv deléció” vizsgálata. Ennek a Közép- és Kelet-Európában igen gyakori, hatalmas méretű (21kb, 2 exont és 3 introni régiót érintő) deléciónak a kimutatása az irodalomban közölt metodikának megfelelően történt. A kimutatást egy, a mutációs forró pontra tervezett primerpárral végeztük. A mutáció homo- illetve heterozigóta formájának megállapításához a *CFTR* 3. exonjának amplifikálására is szükség volt.
3. A *CFTR* teljes kódoló régiójának szekvenálása, melyhez szintén irodalmi adatokat használtunk fel. A közleményben leírt módszertől csak egy helyen tértünk el; a jelenlegi nomenklatúra szerinti 7. exon (korábban 6b) amplifikációját módosított primerpárral kiviteleztük: 6BF (5'-CTG TAC AGC GTC TGG CAC AT-3') és 6BR (5'-CAA ACA TCA AAT ATG AGG TGG AA-3'). A DNS szekvenáláshoz a PCR termékeket ultrafiltrációs oszlopokon tisztítottuk meg (Microcon YM-100, Millipore, Burlington, MA). A megtisztított termékek szekvenálásához BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitet használtunk (Applied Biosystems, Foster City, CA). A be nem épült nukleotidok gélfiltrációs eltávolítása után (DyeEx Kit, Qiagen, Hilden, Németország) a kapilláris gélelektroforézis ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) készüléken történt.

4. Végül az intragénikus *CFTR* átrendeződéseket (copy number variations, CNV) ellenőriztük, melyeket multiplex ligáció függő próba amplifikációval (MLPA) mutattunk ki, SALSA MLPA KIT P091-B1 *CFTR* (MRC-Holland, Amszterdam, Hollandia). Az MLPA olyan multiplex PCR technika, ahol a templát DNS-hez hibridizált, majd összeligált próbákat amplifikáljuk. A próbák töltelék szekvenciáinak köszönhetően a termékek csak néhány nukleotidban különböznek egymástól, így a *CFTR* exonok párhuzamosan vizsgálhatók. A termékek fluoreszcencia intenzitása (csúcsmagassága) a kezdeti kópiaszám függvénye, melyet a referencia (normál kontroll) mintákban kapott relatív csúcsmagasságokhoz viszonyítunk (deléción: <0,7; duplikáció: >1,3).

### ***A mutációspektrum országos vizsgálata***

#### **További betegek bevonása**

Hasonlóan a korábbi felméréshez, itt is válogatott beteganyaggal dolgoztunk. Ehhez a munkához magyarországi CF központoktól kaptunk segítséget, elsősorban Budapestről, Szegedről és Debrecenből érkeztek a minták. Kollaborációs partnereink olyan páciensek mintáit küldték el, akik a betegség fent részletezett, klasszikus tüneteit mutatták és a CF lehetősége komolyan felmerült. Huszonkét férfi és 23 nő, azaz összesen 45 beteg perifériás vérmintáját dolgoztunk fel, (átlagéletkor  $\pm$  SD: 10,1  $\pm$  8,1 év). A minták gyűjtése 2010-2014 között zajlott.

#### **A genetikai tesztek sorrendjének felülvizsgálata**

Korábbi eredményeink fényében az eddig használt többlépcsős genetikai kivizsgálás menetét némileg újra kellett gondolni. A minta típusa és a DNS kivonása a leukocytákból nem változott, de a protokollban helyenként kisebb módosításokat eszközöltünk. A mutációanalízisre használt módszerünk frissített változata a következőképpen alakult:

1. Az elsővonalbeli teszt továbbra is az Elucigene CF29v2 Kit maradt. Amennyiben ezzel csak egyetlen patogén eltérést sikerült kimutatni, a mutációt tartalmazó régió Sanger szerinti szekvenálását még ebben a lépésben elvégeztük, hogy megtudjuk egy vagy mindkét allél érintett. Ez alól természetesen kivételt képez a c.1521\_1523delCTT

mutáció. Ha a mutáció heterozigóta formában volt jelen, akkor a CFTRdele2,3(21kb) vizsgálata következett a korábban leírt módszert alkalmazva.

2. A szűrés második szintje a *CFTR* szekvenálása volt, de itt egyes génszakaszok prioritást élveztek. Az elsőként szekvenálendő exonok (e4, e6, e11, e14, e15 és e20) azok közül kerültek ki, ahol korábbi vizsgálataink szerint Kelet-Magyarországon prevalens mutációk helyezkednek el; pl. c.2052\_2053insA (p.Gln685Thrfs\*4), c.302T>G (p.Leu101\*) és c.3276C>A (p.Tyr1092\*). Negatív eredmény esetén folytattuk a szekvenálást a fennmaradó exonokkal.
3. Ha Sanger szekvenálással sem találtuk meg mindkét kóroki eltérést, akkor az MLPA módszer következett, a már ismertetett módon kivitelezve.
4. Egy esetben, amikor az MLPA egy exont érintő, nagyméretű átrendeződést detektált, további megerősítő vizsgálatra volt szükség. A betegnél kimutatott CFTRdele2, c.54-5811\_164+2186del273+6780\_273+6961inv mutáció jelenlétét allélspecifikus PCR és az exon-intron határok bidirekcionális szekvenálásával erősítettük meg, amit az irodalomban leírt módszernek megfelelően végeztünk el.

### ***A piroszekvenátor tesztelése és módszerfejlesztés***

Ebben a kísérletsorozatban vizsgálatainkat az intézetünkben használt NGS piroszekvenátor, a Roche 454 (Life Sciences, Penzberg, Németország) készüléken folytattuk. Mivel az eszközön a mérések multiplexálhatók, a készülék analitikai képességeinek felmérése és egy új generációs CF mutáció detektáló módszer fejlesztése párhuzamosan folyt. A vizsgálatokhoz két tesztrendszert használtunk. Az egyikben plazmid rendszer segítségével állapítottuk meg annak a homopolimer szakasznak a hosszát, amit a készülék még nagy pontossággal detektálni képes. A másikban humán mintákon teszteltük az általunk tervezett primerek hatékonyságát, majd a mérési eredmények birtokában optimalizáltuk azokat. A már korábban említett nehezen kezelhető poli-A régió (e14) vizsgálatára külön figyelmet fordítottunk.

### **A plazmid rendszer**

Összesen 12 db plazmid vektor készült, melyek a négy nukleotid 4-mer, 5-mer és 6-mer szakaszait tartalmazták. Templátként pcDNA3.1 szolgált (Invitrogen - Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), a mutagenézist Quikchange II kittel (Agilent

Technologies, Santa Clara, CA) végeztük el, a gyártó utasításainak megfelelően. A transzformáció XL1-Blue szuperkompetens sejtek felhasználásával történt. Annak érdekében, hogy a plazmidok replikációja és a HP-t tartalmazó fragmentek amplifikációja során elkerüljük a „length-change” mutációk kialakulását PicoMaxx DNS polimerázt alkalmaztunk (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), mely „proofreading”, azaz az enzim által esetlegesen elkövetett hibát javító aktivitással rendelkezik. Klónonként két kolóniát Sanger-szekvenálással ellenőriztünk, hogy valóban a megfelelő HP szegmenseket tartalmazzák-e. A plazmid rendszerben készült minden homopolimer szakaszt három primerpárral piroszekvenáltunk. Ennek oka az a hipotézisünk volt, hogy a piroszekvenálási reakció első fázisában még alacsonyabb a zaj aránya, mint a reakció előrehaladtával és ez pontosabb HP hossz meghatározást tesz lehetővé. A primereket emiatt a következőképpen terveztük meg:

- a vizsgálni kívánt HP régió a forward amplifikáló/szekvenáló primer 3' végéhez közel helyezkedjen el (proximalis típus),
- a HP lehetőleg az amplikon középső részén helyezkedjen el („mid” típus),
- a HP szakaszhoz a reverse amplifikáló/szekvenáló primer 3' vége legyen minél közelebb (distalis típus).

Az HP klónok mérete 366-387 bp között mozgott.

### **A *CFTR* gén szekvenálása**

A kísérlet második részében humán mintákat használtunk. Ezek összesen 17 ismert CF betegről származtak, akik mutációs státuszát már korábban meghatároztuk (Elucigene CF29v2 Kit segítségével és Sanger szekvenálással). A homopolimert tartalmazó exonok (HP-exonok) esetében a primerek tervezése a plazmid rendszerénél leírtakhoz volt hasonló, annyi különbséggel, hogy itt „mid” típusú primerpárokat nem használtunk. Itt meg kell jegyezni, hogy egyes exonok esetében (e3, e14, e15 és e24) a homopolimerek közötti távolság olyan kicsi, hogy több HP is egy amplikonba került, így összesen betegenként 33 amplikon került piroszekvenálásra. A primerek összeállításánál az ismert SNP-eket is figyelembe vettük és ezekre „lebegő” bázisokat terveztünk, vagyis a vad típusú és a polimorf bázisszekvenciájú primerek fele-fele arányban fordultak elő a primermixben. Erre a primerbekötődés hatékonyságának maximalizálása és az allélvesztés megakadályozása miatt volt szükség, ami egy korábbi tesztrendszerénél problémákat okozott. Természetesen a HP szakaszt nem

tartalmazó (non-HP) exonokat is amplifikáltuk és piroszekvenáltuk, de exononként már csak egy primerpárral. A vizsgálatokhoz hat-hat beteg mintáit használtuk fel. A piroszekvenálás a GS Junior Titanium emPCR (Lib-A) és GS Junior Titanium Sequencing Kit (Life Sciences – Roche, Branford, CT) felhasználásával történt, a gyártó utasításainak megfelelően. A gén legkritikusabb poli-A szegmensét (c.2046\_2052) még egy további lépésben vizsgáltuk, a plazmid rendszerben leírtaknak megfelelően, három primerpár segítségével (proximalis, mid, distalis). Itt a készülék analitikai teljesítőképességére voltunk kíváncsiak, vagyis hogy hogyan birkózik meg a piroszekvenálás egy 8A hosszúságú homopolimerrel. E célból négy vad típusú és hét c.2052\_2053insA (p.Gln685Thrfs\*4) heterozigóta DNS mintát szekvenáltunk meg és hasonlítottuk össze az eredményeket. A minták amplifikálásakor a PicoMaxx enzimet használtuk és az amplikonokat Sanger szekvenálással ellenőriztük.

### **Mutáció nomenklatúra**

A *CFTR* exonok elnevezésénél a legfrissebb ajánlást vettük figyelembe (Ensembl ENSG0000001626). A mutációk esetén a Human Genome Variation Society (HGVS) által megadott cDNS alapú nomenklatúrát használtuk, de zárójelben a protein alapú neveket, ezek hiányában a hagyományos elnevezéseket is feltüntettük.

### **Etikai engedélyek**

Minden vizsgálatban résztvevő beteg beleegyezett a diagnosztikus célú genetikai kivizsgálásba. A minták anoním módon, sorszám szerint kerültek analízisra, összhangban a Helsinki Nyilatkozat legújabb revíziójában foglaltakkal. A laboratórium ÁNTSZ működési engedélyének a száma 094025024. A vizsgálatokat a jelölt a Laboratóriumi Medicina Intézet Molekuláris Genetika részlegének munkatársai segítségével végezte el.

### **Statisztikai analízis**

A piroszekvenálás során keletkező individuális leolvasások (readek) kiértékelése az Amplicon Variant Analyzer szoftver segítségével történt (Life Sciences – Roche, Branford, CT). A HP szakaszokról származó readek között megkülönböztettünk „proximalis”, „mid” és „distalis” típusúakat, attól függően, hogy a HP milyen távolságra helyezkedett el az amplifikáló/szekvenáló primertől. A genotipizálás pontosságát a valid leolvasások arányával

jellemeztük az összes read számához képest (elfogadhatónak vettük, ha >75%). Az eredmények statisztikai elemzéséhez a GraphPad Prism (v5.03) programot használtuk (GraphPad Software, La Jolla, CA). A normalitás ellenőrzése Shapiro-Wilk teszttel történt, nem-normál eloszlás esetén a readek közötti összehasonlítást Kruskal-Wallis teszttel, majd az ezt követő Dunn's post-hoc teszttel végeztük (szignifikancia szintek  $P < 0,05$  és  $P < 0,01$ ).

## EREDMÉNYEK

### *A kelet-magyarországi mutációspektrum*

A mutációspektrum felmérése a kelet-magyarországi régióval kezdődött. A betegek verejtéktesztjei során 55-173 mmol/L közötti kloridion koncentrációkat mértünk (átlag: 108 mmol/L), ez egyedül egy páciens esetében nem érte el a kritériumrendszer által javasolt 60 mmol/L-es határértéket. A szűrés első lépcsőjeként alkalmazott Elucigene CF29v2 Kittel az alábbi mutációkat mutattuk ki a vizsgált 80 CF allélen:

- 56 allél (70,0%) hordozta a c.1521\_1523delCTT (p.Phe508del) mutációt,
- 4 allél (5,0%) a c.3909C>G (p.Asn1303Lys),
- 3 allél (3,75%) a c.1624G>T (p.Gly542\*),
- 1 allél (1,25%) a c.1585-1G>A (1717-1G>A) és
- 1 allél (1,25%) a c.1040G>C (p.Arg347Pro) patogén eltérést.

Ezt követően elvégeztük a „szláv” deléció vizsgálatát, amivel 4 (5,0%) CFTRdele2,3(21kb) allélt tudtunk azonosítani. Mivel az első két módszerrel 11 betegből származó mintában csak egy kóroki mutációt találtunk, a vizsgálatokat ezen betegek szekvenálásával folytattuk. Az ő esetükben a *CFTR* teljes kódoló régiójának Sanger szekvenálásával kimutatott eltérések:

- 4 (5,0%) c.2052\_2053insA (p.Gln685Thrfs\*4),
- 2 (2,5%) c.302T>G (p.Leu101\*),
- 1 (1,25%) c.658C>T (p.Gln220\*),
- 1 (1,25%) c.1397C>A (p.Ser466\*),
- 1 (1,25%) c.3276C>G (p.Tyr1092\*) és
- 1 (1,25%) c.2491G>T (p.Glu831\*).

A 11 szekvenálásra került beteg közül egy páciensnél nem sikerült mindkét CF allélt megtalálni. Emiatt szükség volt MLPA elvégzésére is, ami szintén negatív eredménnyel zárult. A betegek között összesen 19 összetett (compound) heterozigóta volt, 12 esetben nyílt

lehetőségünk a családtagok vizsgálatára, melyek eredményei az mutatták, hogy a detektált CF-okozó mutációk minden betegnél *transz* helyzetűek. A mutációspektrum felmérése az ajánlásoknak megfelelően kaszkád rendszerben zajlott. Az első vonalbeli genetikai teszt a betegség háttérben álló eltérések 81,25%-át tárta fel. Ha ezt kiegészítettük a CFTRdele2,3(21kb) vizsgálatával, a panel érzékenység 86,25%-ra nőtt. A többi mutáció csak génszekvenálással volt kimutatható. Ha a szekvenálást csak a 4. és 14. exonokkal végeztük el, ahol két gyakoribb mutáció helyezkedik el (c.2052\_2053insA és c.302T>G), azzal a találati arány már 90% feletti lett. A teljes *CFTR* bázissorrendjének meghatározásával a detektálási arány végül 98,75%-nak adódott, a 80 allélből 79-et sikerült kimutatni.

### ***Az országos mutációspektrum***

A Magyarországon előforduló CF-okozó mutációk felmérésére irányuló próbálkozásainkat további betegek bevonásával folytattuk. Ennél a lépésnél felhasználtuk az előző kísérlet tapasztalatait és egy átalakított, hatékonyabb mutáció-detektáló algoritmus szerint jártunk el. A vizsgálat során összesen 27 különböző mutációt azonosítottunk. Legtöbbször a c.1521\_1523delCTT (p.Phe508del) allélt mutattuk ki, ami a betegek 53,3%-ánál volt detektálható. Gyakoriságban ezt a c.3846G>A (p.Trp1282\*), c.3909C>G (p.Asn1303Lys), CFTRdele2,3(21kb) és a c.2052\_2053insA (p.Gln685Thrfs\*4) mutációk követték, egységesen 4,4%-os előfordulási aránnyal. Említésre méltó még négy további allél, melyek egynél több példányban voltak detektálhatók: c.1624G>T (p.Gly542\*), c.3276 C>A (p.Tyr1092\*), c.489+1G>T (621+1G>T) és c.2012delT (p.Leu671\*). Az eredmények kiértékelése során két, addig az adatbázisokban - pl. Human Gene Mutation Database vagy [cftr2.org](http://cftr2.org) - és az irodalomban nem szereplő mutációval is találkoztunk: a c.1394C>T (p.Thr465Ile) és a c.1037\_1038insA (p.Leu346Hisfs\*17). Mindkét újonnan detektált mutáció valószínűleg patogén. Ez a c.1037\_1038insA esetében szinte biztosra vehető, hiszen az az olvasási keret eltolódását okozza, aminek következtében 17 aminosavval később egy korai stop kodon keletkezik (p.Leu346Hisfs\*17). A c.1394C>T kóroki voltát az alábbiak támogatják:

- i. a mutációban érintett aminosav reziduum egy filogenetikailag magasan konzervált pozícióban van, ortológjai több fajban megtalálhatók (*Bos taurus*, *Equus caballus*, *Felis catus*, *Mus musculus* stb.),

ii. az American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) ajánlása alapján a variáns „valószínűleg patogénnek” interpretálható (IV.) melyhez a következők járulnak hozzá:

- a mutáció az NBD1 funkcionális doménben található (PM1),
- az eltérés a kontroll személyeknél hiányzik az 1000 Genomes Project, Exome Aggregation Consortium és az Exome Sequencing Project esetében (PM2),
- recesszív öröklésmenetű betegség esetén *transz* helyzetű patogén variáns detektálható. Ez jelen esetben a c.1521\_1523delCTT, melyet a gyermek az édesanyjától örökölt (PM3). (A családtagok vizsgálatának eredménye: édesanya c.1521\_1523delCTT hordozó, édesapa c.1394C>T hordozó),
- az eltérés egy olyan új misszensz mutáció, mely ismert, bizonyítottan patogén misszensz mutációval azonos aminosav reziduumot érint: C.1394C>A vagy p.Thr465Asn (PM5),
- *in silico* tanulmányok eredményei (SIFT analízis) károsodott fehérjefunkció mellett szólnak (PP3),
- monogénes megbetegedéseknél a fenotípus az adott betegségre jellegzetes (PP4).

#### ***A magyarországi mutációkat felmérő vizsgálatok egyesített eredményei***

A 2011-ig és 2014-ig gyűjtött beteganyagban, két lépésben elvégzett vizsgálatok eredményei végül összesítésre kerültek. A kombinált adatok alapján a kereskedelmi forgalomban is elérhető assay (Elucigene CF29v2) a mutációk több, mint háromnegyedét volt képes detektálni. A CFTRdele2,3(21kb) nagyméretű delécióra tervezett allélspecifikus PCR segítségével további 4,7%-os emelkedést tapasztaltunk a mutációk azonosításában. A *CFTR* 14. exonjának célzott szekvenálásával kimutatható volt a c.2052\_2053insA mellett két másik ritka mutáció is (c.2012delT és c.2002C>T) 4,7%-os, 1,2%-os és 0,6%-os aránnyal. A többi eltérés már döntően a fennmaradó *CFTR* exonok szekvenálásával került felderítésre, a 2. exon deléciójának kivételével, melynek jelenlétére MLPA vizsgálat hívta fel a figyelmet. Ez utóbbi eltérés megerősítése allélspecifikus PCR és Sanger szekvenálással történt. Az összevont adatbázis lehetőséget adott a mutációk földrajzi eloszlásának feltérképezésére is. A már ismert tendenciák mellett (pl. a c.1521\_1523delCTT esetében az észak–déli irányú gradiens) novumként volt megfigyelhető, hogy a nálunk gyakori CFTRdele2,3(21kb) mutáció és c.2052\_2053insA szintén területi halmozódást mutat. Mindkét mutáció döntően az északi

ország részben fordul elő, ami a c.2052\_2053insA esetén még inkább az északkeleti régióra korlátozódik. Ez utóbbi a mutáció Nyugat-Ukrajnában leírt gyakoriságát tekintve már nem is annyira meglepő. Természetesen ez annak a ténynek is köszönhető, hogy a vizsgált minták legnagyobb része Magyarország északi és keleti részéből érkezett.

### ***Az új generációs szekvenálási kísérletek eredményei***

#### **Minőségbiztosítási szempontok**

Mivel az NGS kísérletek egyik részében a rendelkezésünkre álló piroszekvenátor analitikai korlátait céloztuk megállapítani, elengedhetetlen volt egy minőségbiztosítási lépés beiktatása. Ahogy korábban részletezésre került, ezt az NGS készülékkel feldolgozandó templátok/amplikonok előzetes Sanger szekvenálása jelentette, amit a plazmidok esetén duplikátumban végeztük el. Nem volt diskrepancia az elvárt és a szekvenálással ellenőrzött DNS bázissorrendek között, azaz a minták ezt követő NGS analízisekor biztosnak vehettük, hogy a mérések esetleges pontatlanságai a módszer inherens hibájára vezethetők vissza és a készülék valós képességeit mutatják.

#### **A homopolimer tartalmú plazmidok analízise**

A célzott mutagenézissel létrehozott 4-mer, 5-mer és 6-mer HP szakaszokat tartalmazó plazmidok piroszekvenálásakor az átlagos lefedettség  $479 \pm 145$  volt. Itt egyértelmű negatív korrelációt figyeltünk meg a vizsgálandó HP hossza és a leolvasás pontossága között. A megfelelően genotipizált readok aránya a 4-merek esetén átlagosan 95,8%, az 5-mereknél 87,4%, míg a 6-mereknél 72,1% volt és a HP szakaszok hosszának növekedésével egyre szélesebb tartományban mozgott (4-mer: 79,6-99,3%, 5-mer: 36,9-98,4%, 6-mer: 14,5-93,8%). Az is látható, hogy amíg a rendszer a poli-A 6-mereket még megbízhatóan detektálja, addig a valid leolvasások átlaga 75% alá esik a poli-C, poli-G és poli-T 6-merek esetén (átlagértékek: 71,5%, 68,3% és 63,4%). Annak ellenére, hogy általánosságban a hosszabb HP szakaszok detektálása kevésbé volt megfelelő, egyes amplikonok szekvenálása még így is igen pontos eredményt adott (pl. 97% az 5A-merek és 92,7% a 6A-merek esetében), ami felhívja a figyelmet a primerpárok optimalizálásának fontosságára. A primerek

és a HP közötti távolság (proximalis, mid, distalis elhelyezkedés) azonban nem mutatott összefüggést a piroszekvenálás hatékonyságával.

### **A humán DNS minták piroszekvenálása**

A *CFTR* gén kódoló régiói és az exon-intron határok piroszekvenálása ismert mutációstátuszú CF betegek DNS mintáin történt meg. A mérés során az átlagos lefedettség  $263 \pm 178$  read volt, az alacsony olvasási számmal rendelkező amplikonok (<40 read) kizárásra kerültek az értékelésből. Annak ellenére, hogy a helyes leolvasások aránya széles skálán mozgott (52,2-99,1%), a genotípusok pontos meghatározása átlagosan 89,3%-ban sikeres volt. A saját tervezésű primereket használó módszer mind a 18 féle kis-skálájú eltérést kimutatta (szinoním, misszensz, nonszensz, splice site mutációk, frameshift/in-frame deléciók és inzerciók), amelyeket korábban Sanger szekvenálással már meghatároztunk. A 24 db vizsgált HP szakasz tekintetében a saját fejlesztésű módszer megfelelő teljesítményt nyújtott, a piroszekvenálással készült genotipizálás a leolvasások több, mint 80%-ában megfelelt a Sanger szerinti szekvenciáknak. Egyetlen kivétel adódott, a már korábban említett 7A hosszúságú HP szakasz (c.2046\_2052), ahol ez az érték átlagosan csak 52,2% volt. A problémás régiót további elemzésnek vetettük alá először négy vad típusú minta felhasználásával. A kritikus génszakasz amplifikációja a korábban leírtaknak megfelelően három primerpár segítségével történt (A1, A2, A3), igen változó eredménnyel. A readeket mindkét irányból külön kiértékelve előfordult több olyan eset is, ahol nem vagy alig kaptunk a 7A-nak megfelelő jelet, míg más amplikonokban ez a 80%-ot is meghaladta. Végül hét olyan összetett heterozigóta beteget válogattunk ki, akiknél az egyik mutáns allél a c.2052\_2053insA (p.Gln685Thrfs\*4) variánst hordozta, ehhez csehországi kollaborációs partnerünk is szolgáltatott DNS mintákat (Prof. Dr. Milan Macek Jr., Károly Egyetem, Prága). A mutáció az adott allélen egy 8 adeninből álló homopolimert eredményez, így ezen betegek mintáinál ideális esetben a piroszekvenálásnak 50-50%-ban kellett volna 7A és 8A HP szakaszokat detektálnia. Itt szintén három féle amplikont szekvenáltunk, mint az előző esetben és mindkét irányból megvizsgáltuk a leolvasásokat. Az alkalmazott primerek közül két pár teljesítménye elégtelen volt, a téves nukleotid jelek aránya itt elérte a 45-50%-ot. A harmadik párral amplifikált termékek piroszekvenálása ehhez képest némi javulást mutatott (átlagosan 27% téves leolvasással), de még ez sem volt képes a 8-merek biztos azonosítására, ha a primer mintegy 200 bp távolságra helyezkedett el a HP szakasztól.

## MEGBESZÉLÉS

A cisztás fibrózis egy gyakori, komplex autoszomális recesszív öröklődésű betegség, melynek diagnosztikája még napjainkban is tartogat kihívásokat, annak ellenére is, hogy 1938-as első leírása óta a rendelkezésünkre álló információ megsokszorozódott mind a fenotípusjegyek, mind a genetikai háttér tekintetében. Az újszülöttkori szűrőprogramok adatai, a betegregiszterek, a klinikai adatbázisok és a funkcionális kutatások nagyban hozzájárultak ahhoz, hogy teljesebb képet kapjunk a *CFTR* génről és a betegség természetéről, de egyben további feladatok elé is állítják a molekuláris genetikai laboratóriumi diagnosztikát. Munkám során egyrészt a cisztás fibrózis magyarországi epidemiológiájával és a megbetegedést okozó hazai patogén mutációk felderítésével foglalkoztam. Az eredmények segítségével kísérletet tettünk egy többlépcsős, „kaszkád”-típusú vizsgálati rendszer kialakítására, amely költséghatékonyan képes a genetikai eltérések széleskörű azonosítására. Végül egy új generációs szekvenáló technika alkalmazásával igyekeztünk a molekuláris genetikai kivizsgálást leegyszerűsíteni, abban a reményben, hogy az esetleg egy jövőbeni újszülöttkori szűrés genetikai moduljának alapjául is szolgálhat.

### *A kelet-magyarországi CF mutációk*

Ez a vizsgálat a Debreceni Egyetemen vizsgált CF betegek (minták) egy részének bevonásával, részint retrospektíve történt. Ezzel sok éves hiányt igyekeztünk pótolni, hiszen a hazai mutációspektrumra vonatkozó legfrissebb közlemények is az 1990-es évek közepén születtek. Figyelembe véve korábbi európai és észak-amerikai populációkat leíró genetikai tanulmányok eredményeit is feltételezzük, hogy az általunk meghatározott allélfrekvenciák jó közelítéssel az ország többi részére is applikálhatók. Kelet-Magyarország lakossága 2 millió főre tehető. A különböző populációk keveredése nagymértékben felgyorsult, amikor egymást követően román pásztorok, flamand és szlovák telepések érkeztek a régióba, többnyire a szomszédos területekről. Egy 1910-es helyi felmérés adatai alapján a lakosság 54,5%-a volt magyar, 16,1%-a román, 10,7%-a szlovák és 10,2%-a német származású, számos egyéb kisebbség mellett. Azért nyúlunk vissza ehhez a korai adathoz, mert a múlt században az etnikumok nyilvántartása jelentős változáson átesve egyedül saját bevalláson alapulóvá vált. Így például az, hogy a 2001-es népességnylvántartás szerint a lakosság 94%-a vallja magát magyar származásúnak, számunkra kevésbé releváns és a mutációk földrajzi eloszlásának értelmezésében nem ad kézzelfogható segítséget. A válogatott betegcsoportban a

mutációanalízis a nemzetközileg is javasolt „kaskád-rendszerben” történt: a leggyakoribb eltérések panelben történő vizsgálatát génszekvenálás és nagyobb genomiális átrendeződések keresése követte. Az Elucigene CF29v2 módszer a patogén mutációk 81,25%-át derítette fel, ami a CFTRdele2,3(21kb) mutáció kimutatásával 86,25%-ra emelkedett. A többi variánst már csak Sanger szekvenálás segítségével tudtuk azonosítani, mellyel végül 98,75%-os szenzitivitást értünk el. Egyetlen betegnél nem sikerült mindkét patogén mutációt megtalálnunk, akinél valószínűleg egy általunk nem vizsgált promóter régiót érintő vagy mély introni mutáció áll a null allél hátterében. Általánosságban elmondható, hogy a detektált mutációk gyakorisága összhangban áll a korábbi közép-európai tanulmányok eredményeivel, az előfordulási arányok döntően a publikált észak- és dél-európai adatok közé esnek. Minden általunk észlelt CF-okozó eltérés már leírásra került kelet-németországi, askenázi zsidó vagy egyéb balkáni populációk elemzésekor és ennek megfelelően már szerepelt az interneten elérhető adatbázisokban is. Összesen hat mutáció prevalenciája haladta meg az 1,25%-ot (több, mint egy esetben fordult elő), ezek csökkenő allélfrekvencia szerinti sorrendben: c.1521\_1523delCTT (p.Phe508del), c.3909C>G (p.Asn1303Lys), c.54-5940\_273+10250del21kb [CFTRdele2,3(21kb)], c.2052\_2053insA (p.Gln685Thrfs\*4), c.1624G>T (p.Gly542\*) és c.302T>G (p.Leu101\*). Mivel elsődlegesen nem szláv populációt vizsgáltunk, meglepő volt számunkra, hogy a CFTRdele2,3(21kb) szláv eredetű mutációt az allélok 5%-ában tudtuk kimutatni. Ez az adat a Cseh Köztársaság (6,37%) és Oroszország (5,69%) után a harmadik legmagasabb prevalenciának számít Közép- és Kelet-Európában. A magas előfordulási arányt a Kelet-Magyarország területén élő szláv törzsek honfoglalás utáni, a betelepülő populációba történő asszimilációja magyarázhatja. További váratlan eredmény, hogy a c.2052\_2053insA (p.Gln685Thrfs\*4) olvasási keret eltolódást eredményező mutációt ugyancsak magas gyakorisággal detektáltuk (5%). Ennek interpretálásában Makukh és munkatársainak közleménye volt a segítségünkre, mely a fenti eltérést az Ukrajnában második leggyakoribb mutációként írja le (7,2%). Valószínű tehát, hogy hosszútávra visszatekintő ukrán és magyar populációk közötti történelmi kapcsolatban keresendő az emelkedett prevalencia oka. Emellett adataink megerősítik a mutáció galíciai eredéről szóló feltételezéseket is. Érdekes lenne a jövőben a kelet-szlovákiai, délkelet-lengyelországi, fehéroroszországi és északnyugat-romániai mutációs spektrum felmérése és összesítése is, amelyek hozzájárulhatnának ennek a feltehetően „alapító hatásnak” az alátámasztásához. Igen érdekes lenne a két mutáció előfordulását felmérni az összes magyar CF beteg esetében, erre a jelenleg is folyó, az összes beteget magában foglaló genetikai revízió lehetőséget fog adni.

## *Az országos mutációspektrum*

Vizsgálataink második részében a mutációanalízis országos kiterjesztésére került sor. Itt a korábbi, kelet-magyarországi vizsgálat eredményei alapján némileg módosított, de továbbra is többlépcsős, „kaskád” megközelítést alkalmaztunk, melynek részletes ismertetése a Módszerek fejezetben található. Ezzel összesen 90 db eltérést azonosítottunk 27 különböző mutáció formájában. Köztük két új, nagy valószínűséggel patogén variáns is leírásra került: a c.1394C>T (p.Thr465Ile) és a c.1037\_1038insA (p.Leu346Hisfs\*17), mely az adatbázisokban és az irodalomban korábban nem szerepelt. Az eltérések kóroki voltát alátámasztja, hogy a c.1037\_1038insA az olvasási keret eltolódását okozza, aminek következtében 17 aminosavval később egy korai stop kodon keletkezik (p.Leu346Hisfs\*17); míg a c.1394C>T mutációval megegyező aminosav reziduumot érintő másik patogén mutáció már régebb óta ismert (C.1394C>A vagy p.Thr465Asn), az érintett aminosav reziduum egy filogenetikailag magasan konzervált pozícióban van, a SIFT analízis várhatóan károsodott fehérjefunkcióval számol és az ACMG ajánlása alapján a variáns valószínűleg patogénnek interpretálható (IV.), ahogyan ezt korábban részleteztük. A frissen nyert prevalencia adatainkat a megelőző kelet-magyarországiakkal összesítve jutottunk az országos mutációspektrumhoz (n=85). A két felmérésben összesen 31 patogén mutációt mutattunk ki, melyek közül 11 haladta meg az 1%-os előfordulási arányt. A 104/170 allélen jelen lévő c.1521\_1523delCTT (p.Phe508del) mutáció a csehországi adatokhoz képest alacsonyabb (61,2% vs. 67,4%), viszont a lengyelországiakhoz képest magasabb (61,2% vs. 54,5%) frekvenciával volt kimutatható, ami csak részben felel meg az irodalomban leírt É-D irányban csökkenő mutációs gradiensnek. A c.1521\_1523delCTT után gyakoriságban a „mediterrán” c.3909C>G (p.Asn1303Lys), a „szláv” c.54-5940\_273+10250del21kb [CFTRdele2,3(21kb)] és a „galíciai” c.2052\_2053insA (p.Gln685Thrfs\*4) mutációk következtek, egyaránt 4,7%-ban. A c.1624G>T (p.Gly542\*) variánst 2,9%-ban, az „izraeli” c.3846G>A (p.Trp1282\*) variánst 2,4%-ban detektáltuk. Egyéb, viszonylag frekvens mutációk voltak még a c.3276C>A (p.Tyr1092\*) és c.302T>G (p.Leu101\*) a betegek 1,8%-ában; valamint a c.489+1G>T (621+1G>T), a c.1397C>G (p.Ser466\*) és a c.2012delT (p.Leu671\*) a páciensek 1,2%-ában. MLPA vizsgálat hívta fel a figyelmet egy kiterjedt génátrendezésre: c.54-5811\_164+2186del273+ 6780\_273+6961inv (CFTRdele2), ez egy beteget érintett (0,6%), a mutációt allélspecifikus PCR és az exon-intron határok bidirekcionális szekvenálásával erősítettük meg, az irodalmi ajánlásoknak megfelelően. Az ország különböző területeit felölelő vizsgálatból megállapított előfordulási gyakoriságok alapján elmondható, hogy hazánkban a kereskedelmi forgalomban lévő

Elucigene CF29v2 assay a CF-okozó mutációk 75,9%-ának azonosítására volt képes. Ehhez a 14. exon szekvenálása 6,5%-os, a CFTRdele2,3(21kb) vizsgálata 4,7%-os javulást tudott hozni. A fentiekhez az MLPA 0,6%-kal, a CFTR további exonjainak szekvenálása 11,8%-kal járult hozzá. Összességében az előzetesen kiválogatott beteganyagban a kaszkád-szűrés 99,5%-os érzékenységet produkált. Az eredményekből látható, hogy a „szláv deléción” és a c.2052\_2053insA területi halmozódást mutatott. A CFTRdele2,3(21kb) kizárólag az északi országrészben fordult elő, a „galíciai” c.2052\_2053insA pedig elsősorban az északkeleti régióban koncentrálódott. Az első esetben a szláv törzsek első millenniumvégi vándorlásának lehet szerepe, míg a másodikban annak, hogy Kárpátalja mintegy ezer évig Magyarország része volt és a mutáció Ukrajna nyugati részén szintén gyakorinak számít. Ahogy a mutációk „ragadványnevei” is mutatják, korábbi közlések már foglalkoztak a fenti variánsok eloszlásának földrajzi sajátosságaival, melyekkel a mi eredményeink is összhangban vannak. Az egyesített eredmények alapján azt gondoljuk, hogy az általunk alkalmazott többlépcsős megközelítés nagy hatékonysággal használható hazánkban. Sőt, elképzeléseink szerint jó teljesítményt nyújtana a magyar diaszpóra esetében is, aminek jelentőségét mutatja, hogy több, mint 2 millió magyar származású egyén él határainkon túl Európában és Észak-Amerikában. Végezetül szeretném kiemelni, hogy genetikai laboratóriumunk az ECFS által 2018-ban támasztott diagnosztikai kritériumok mindegyikét teljesíti. Fontosnak tartjuk azt is megjegyezni, hogy az általunk meghatározott mutációs spektrum ismerete ugyanúgy alapvető követelménye egy két-, esetleg háromszintű újszülöttkori szűrőprogram, mint egy heterozigóta-szűrőpanel kialakításának. Jelenlegi álláspontunk szerint az Elucigene CF29v2 módszer, a c.2052\_2053insA és a CFTRdele2,3(21kb) kombinált vizsgálatával 85-90%-os érzékenységgel lehetne az újszülöttkori szűrést követő genetikai analízist elvégezni, ezt az elképzelésünket a legújabb irodalmi adatok is támogatják.

### ***A cisztás fibrózis modern laboratóriumi diagnosztikája***

A cisztás fibrózis esetében számos országban szűrőprogramot vezettek be és a monogénes megbetegedések közül a CF a leggyakoribb indikációja a prenatális és preimplantációs genetikai teszteknek. A diagnosztikai technikák fejlődése az utóbbi húsz évben drámai változásokon ment keresztül, ami még napjainkban is zajlik. A hagyományos Sanger szekvenálástól eljutottunk a nagy teljesítményű NGS technológiákig, melyek a teljes CFTR lókuszt és egyéb, a betegség klinikai megjelenését befolyásoló tényezőket gyors és

hatékony kivizsgálását teszik lehetővé. Amennyiben a legújabb módszerek által szolgáltatott eredmények interpretálásához rendelkezésre áll a megfelelő bioinformatikai háttér és megismerjük az egyes variánsok biológiai jelentőségét is, a betegellátásban és terápiás döntéshozatalban komoly előrelépések várhatók. A munkánk harmadik szakaszában egy új generációs készülék rutin laboratóriumi diagnosztikába történő beállítását tűztük ki célul. Az általunk használt NGS készülék a piroszekvenálás elvén működik. A módszer kezdetektől ismert, inherens hibája, hogy a 4-5 bázispárt meghaladó méretű homopolimer szakaszok hosszát nem megfelelő pontossággal azonosítja. Bár a kereskedelmi forgalomban elérhető CF mutáció detektáló CE IVD kit (CFTR MASTR Dx, Multiplicom, Agilent Technologies) az Illumina NGS platformon hatékonynak bizonyult, előzetes vizsgálataink azt mutatták, hogy a piroszekvenálás esetén nem nyújt elfogadható eredményeket, tekintettel a génben található nagyszámú HP szakaszra, melyek sokszor egyes gyakori mutációk predilekciós helyei is egyben. A fentiek miatt a készülék képességeit először egy mesterséges plazmid kísérleti rendszeren teszteltük. A mutagenézis során négy, öt és hat azonos bázisból álló homopolimereket építettünk a plazmidokba, mind a négy bázis esetén. A transzformáció és plazmidok replikációját követően a homopolimer tartalmú szakaszokat három különböző primerpárral amplifikáltuk és ezután került sor a termékek ellenőrzésére, végül a piroszekvenálásukra. Ahogy arra számítani lehetett, az NGS szekvenálás során a 4-merek meghatározása volt a legpontosabb, az 5-merek és 6-merek analízisekor a módszer megbízhatósága fokozatosan csökkent. Azt is megfigyeltük, hogy az egyes bázis típusok között is van különbség, a rendszer leginkább az adenin, legkevésbé a timin tartalmú nukleotidok detektálásakor volt sikeres. Korábbi tapasztalataink alapján feltételeztük, hogy a piroszekvenálás kezdeti szakaszában magasabb a jel/zaj arány, leginkább az alacsonyabb zajszint miatt. Ennek vizsgálata miatt volt szükség a három amplifikáló primerpárra, amivel befolyásolni szeretnénk volna, hogy a homopolimer a szekvenálási reakció kezdeti, középső vagy késői szakaszában kerüljön leolvasásra. A plazmid rendszerünk eredményei ezt a hipotézist nem erősítették meg, nem volt szignifikáns különbség a „proximalis”, „mid” és „distalis” típusú readok között. A kísérlet ezen részéből említést érdemel, hogy az igen változó pontosság ellenére a detektálás hatékonysága egyes hosszabb HP tartalmú amplikonok esetén is elérte az általunk megkövetelt szintet (>75% helyes read), ami a módszerfejlesztés során a körültekintő primertervezés és optimalizálás fontosságára hívja fel a figyelmet. Az NGS kísérletek második részében egy, a cisztás fibrózis laboratóriumi diagnosztikájában hasznosítani kívánt molekuláris genetikai módszer fejlesztésére, optimalizálására és tesztelésére koncentráltunk. Célunk egy olyan módszer beállítása volt,

amely a hazánkban előforduló mutációkat nagy érzékenységgel, gyorsan és költséghatékonyan képes kimutatni, így az mind az újszülöttkori, mind a heterozigótaszűrésben is használható lenne. Ennek érdekében egyéni tervezésű *CFTR* amplikonok piroszekvenálását végeztük el. A rendszer megbízhatóságának maximalizálása végett a HP régiókat jellemzően több, 2-3 primerpárral amplifikáltuk. A módszer a korábban Sanger szekvenálással azonosított kis skálájú eltérések mindegyikét kimutatta (szinoním, misszensz, nonszensz, splice site mutációk, frameshift/in-frame deléciók és inzerciók). Noha a readek pontossága itt is viszonylag széles tartományban mozgott, az átlagosan 89,3%-os helyes leolvasási arányt elfogadhatónak tartjuk. A génben előforduló HP szakaszok tekintetében a saját fejlesztésű módszer többnyire megfelelő teljesítményt nyújtott, a piroszekvenálással készült leolvasások több, mint 80%-ban megfeleltek a Sanger szerinti szekvenciáknak. Ez alól a kivételt a 14. exonban található 7A hosszúságú HP szakasz jelentette (c.2046\_2052), ahol ez az érték átlagosan csak 52,2% volt. Ezzel ellentétben a *CFTR* 1. exonban elhelyezkedő 7-ment (7T) a readek 83%-ában helyesen határozta meg a rendszerünk, így feltételezzük hogy a HP detektálás pontossága nem egyedül a HP hosszától, hanem egyéb tényezőktől is függ. Ezek közé sorolhatjuk az adott HP mikrokörnyezetét a DNS szekvenciában, de akár a szekvenáló gyöngyök eltérő elhelyezkedését is (centrálisan vs. perifériás részeken) a mérés során használt PicoTiter lemezeken. A HP szakaszokban található kisméretű deléciók és inzerciók pontos kimutatása a *CFTR* esetében különösen fontos. A fent említett 7A régióban (c.2046\_2052) pl. több mutáció is előfordul, ezek közül a c.2052delA (2184delA) és a c.2051\_2052delAAinsG (2183AA>G) detektálása nem okozott gondot. Ez nem is annyira meglepő, hiszen a fenti mutációk esetében 5A és 6A homopolimerek jönnek létre. Annál kritikusabb a helyzet, ha a beteg a c.2052\_2053insA (p.Gln685Thrfs\*4) variánst hordozza, mert az ilyenkor kimutatandó adenin HP nyolc nukleotid hosszúságú. Tovább súlyosbítja a problémát, hogy eredményeink alapján a c.2052\_2053insA allél frekvenciája hazánkban magas, a prevalenciája 4,7%-ra tehető, amivel a c.1521\_1523delCTT után a 2. leggyakoribb mutációk között van. Ezt a fajsúlyos kérdést, azaz, hogy a c.2052\_2053insA nagy biztonsággal kimutatható-e piroszekvenálással, további betegminták bevonásával vizsgáltuk. A három különböző amplikon szekvenálásával kapott eredmények azt mutatják, hogy a mutációt hordozó betegek azonosítása piroszekvenálással nem minden esetben reprodukálható. Mindezek fényében ki kell jelentenünk, hogy bár az általunk fejlesztett módszer az esetek döntő többségében megbízható szekvenciákat szolgáltat, a c.2052\_2053insA (p.Gln685Thrfs\*4) meghatározása hagyományos technikával (pl. a 14. exon Sanger szerinti szekvenálásával) továbbra is elengedhetetlen a betegek laboratóriumi diagnosztikája során.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Az értekezés két fő témára összpontosít: a cisztás fibrózist okozó mutációk típusának és gyakoriságának felmérésére Magyarországon és a betegség korszerű molekuláris genetikai diagnosztikájára. A magyarországi mutációspektrum meghatározása több lépésben, összesen 85 beteg bevonásával történt. A vizsgálatokat kaszkád-rendszerben végeztük, melynek finomítása fokozatosan zajlott. Ennek végső formájában a CF mutációanalízist a következő sorrendben végeztük: Elucigene CF29v2 assay (eltérés esetén az adott exon célzott szekvenálása a c.1521\_1523delCTT kivételével) és a CFTRdele2,3(21kb) vizsgálata, az e4, e6, e11, e14, e15 és e20, majd a *CFTR* további exonjainak szekvenálása, végül MLPA analízis. Az összesített eredmények alapján 169/170 allél került meghatározásra, melyeken 31 féle CF-okozó variánst azonosítottunk. Ezek között két új mutáció is szerepelt, (c.1394C>T és c.1037\_1038insA), melyek minden valószínűség szerint kóroki eltéréseknek tekinthetők. A mutációk földrajzi eloszlásában több jellegzetességet is kimutattunk, ezek az irodalomban leírtakkal összhangban vannak. A rendelkezésünkre álló piroszekvenátor tesztelése egy plazmid rendszer segítségével kezdődött. Itt elsősorban a készülék homopolimer detektáló képességeire koncentráltunk. A kísérlet az 5-merek és 6-merek kevésbé megbízható azonosíthatóságát mutatta ki. A vizsgálatok nem támogatták azt az elképzelésünket, hogy a szekvenáló reakció elején a homopolimer detektálás pontosabban zajlana, mint később. Ezután humán minták tesztelése következett, melyek 17 páciensből származtak. Az eredmények alapján az általunk használt készülék alkalmasnak bizonyult a CF gyanújával érkező betegek vizsgálatára, annyi megköttéssel, hogy egy gyakorinak mondható, mégis nehézkesen detektálható eltérést továbbra is Sanger szekvenálással vagyunk kénytelenek megerősíteni. Végezetül úgy gondoljuk, hogy eredményeink érdemben járulnak hozzá hazánkban a cisztás fibrózis laboratóriumi diagnosztikájához és reményeink szerint segítséget nyújthatnak az újszülöttkori szűrés/heterozigóta-szűrés bevezetésében is.

A disszertáció az alábbi támogatás segítségével jött létre:

Gazdaságfejlesztési és Innovációs Operatív Program (GINOP-2.3.2-15-2016-00039).



**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/136/2018.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Ivády Gergely  
Neptun kód: TWPPFH  
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10037475

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Ivády, G.**, Madar, L., Dzsudzsák, E., Koczok, K., Kappelmayer, J., Krulisova, V., Macek, J. M., Horváth, A., Balogh, I.: Analytical parameters and validation of homopolymer detection in a pyrosequencing-based next generation sequencing system. BMC Genomics. 19, 1-8, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-018-4544-x>  
IF: 3.729 (2016)
2. **Ivády, G.**, Koczok, K., Madar, L., Gombos, É., Tóth, I., Győri, K., Balogh, I.: Molecular Analysis of Cystic Fibrosis Patients in Hungary - an Update to the Mutational Spectrum. J. Med. Biochem. 34, 1-6, 2015.  
IF: 0.742
3. **Ivády, G.**, Madar, L., Nagy, B., Gönczi, F., Ajzner, É., Dzsudzsák, E., Dvorakova, L., Gombos, É., Kappelmayer, J., Macek, J. M., Balogh, I.: Distribution of CFTR mutations in Eastern Hungarians: relevance to genetic testing and to the introduction of newborn screening for cystic fibrosis? J. Cyst. Fibros. 10 (3), 217-220, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2010.12.009>  
IF: 3.19





### További közlemények

4. Szánthó, E., Kárai, B., **Ivány, G.**, Bedekovics, J., Szegedi, I., Petrás, M., Ujj, G., Ujfalusi, A., Kiss, C., Kappelmayer, J., Hevessy, Z.: Comparative Analysis of Multicolor Flow Cytometry and Immunohistochemistry for the Detection of Disseminated Tumor Cells. *Appl. Immunohistochem.* [Epub ahead of print], 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/PAI.0000000000000519>  
IF: 1.634 (2016)
5. Oláh, A., Asztalos, L., **Ivány, G.**, Varga, É., Kovács, M. Á., Kappelmayer, J., Varga, J.: Monitoring of mycophenolic acid and kidney function during combined immunosuppressive therapy. *Clin. Chem. Lab. Med.* 49 (11), 1849-1853, 2011.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/cclm.2011.678>  
IF: 2.15
6. **Ivány, G.**, Bekéné Debreceni, I., Kissné, S. V., Hevessy, Z., Kappelmayer, J.: A timidin kináz aktivitás összehasonlító elemzése egyéb prognosztikai markerekkel krónikus lymphocytás leukémiában. *Klin. Kísér. Lab. Med.* 33 (2), 7-11, 2008.
7. Oláh, A., **Ivány, G.**, Kappelmayer, J.: Kényes paraméterek a kardiovaszkuláris betegségek diagnosztikájában. *Metabolizmus.* 6 (Suppl.), 91-94, 2008.
8. Antal-Szalmás, P., **Ivány, G.**, Molnár, A., Hevessy, Z., Kissné, S. V., Oláh, A., Lenkey, Á., Kappelmayer, J.: "Turnaround time": a laboratóriumi eredménykiadás hatékonyságának új paramétere. *Orv. Hetil.* 148 (28), 1317-1327, 2007.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2007.28087>

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 11,445**

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

7,661

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

Debrecen, 2018.05.07.

