

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Ivády Gergely

**Molekuláris epidemiológiai és diagnosztikai vizsgálatok
cisztás fibrózisban**

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2019

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**MOLEKULÁRIS EPIDEMIOLÓGIAI ÉS
DIAGNOSZTIKAI VIZSGÁLATOK
CISZTÁS FIBRÓZISBAN**

Dr. Ivády Gergely

Témavezető: Dr. Balogh István



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2019

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK	3
1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
1.1. A cisztás fibrózis	4
1.1.1. A CF epidemiológiája	4
1.1.2. A CFTR szerkezete és funkciója	5
1.1.3. A CF pathogenezise	6
1.1.4. A CF szűrése és diagnosztikája	8
1.1.5. Terápiás lehetőségek CF-ben	10
1.2. A piroszekvenálás	11
1.2.1. A piroszekvenálás elve és korlátai	12
1.2.2. A homopolimerek	13
1.2.3. Bioinformatikai megoldások	13
1.3. Homopolimerek a <i>CFTR</i> génben	14
2. CÉLKITŰZÉSEK	16
3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK	17
3.1. A kelet-magyarországi mutációspektrum felmérése	17
3.1.1. A betegek kiválasztása	17
3.1.2. Molekuláris genetikai módszerek	18
3.2. A mutációspektrum országos vizsgálata	21
3.2.1. További betegek bevonása	21
3.2.2. A genetikai tesztek sorrendjének felülvizsgálata	22
3.3. A piroszekvenátor tesztelése és módszerfejlesztés	23
3.3.1. A plazmid rendszer	24
3.3.2. A <i>CFTR</i> gén szekvenálása	26
3.4. Mutáció nomenklatúra	35
3.5. Etikai engedélyek	35
3.6. Statisztikai analízis	35
4. EREDMÉNYEK	36
4.1. A kelet-magyarországi mutációspektrum	36
4.2. Az országos mutációspektrum	39
4.3. A magyarországi mutációkat felmérő vizsgálatok egyesített eredményei	42
4.4. Az új generációs szekvenálások eredményei	45

4.4.1.	Minőségbiztosítási szempontok	45
4.4.2.	A homopolimer tartalmú plazmidok analízise	45
4.4.3.	A humán DNS minták piroszekvenálása	47
5.	MEGBESZÉLÉS	51
5.1.	A kelet-magyarországi CF mutációk	51
5.2.	Az országos mutációspektrum	53
5.3.	A cisztás fibrózis modern laboratóriumi diagnosztikája	55
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	59
7.	SUMMARY	60
8.	IRODALOMJEGYZÉK	61
9.	PUBLIKÁCIÓS LISTA	70
10.	TÁRGYSZAVAK	72
11.	KEYWORDS	72
12.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	73
13.	TÁMOGATÁS	74
14.	FÜGGELÉK	75

RÖVIDÍTÉSEK

ABC	ATP Binding Cassette (ATP-kötő kazetta)
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
cAMP	Ciklikus Adenozin-Monofoszfát
CBAVD	Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens (veleszületett bilaterális vas deferens hiány)
CF	Cisztás Fibrózis
CFTR	Cisztás Fibrózis Transzmembrán-Konduktancia Regulátor
CFSPID	Cystic Fibrosis Screen Positive, Inconclusive Diagnosis (CF szűrőteszt pozitív, inkonklúzív diagnózis)
CRMS	CFTR-Related Metabolic Syndrome (CFTR-hez köthető metabolikus szindróma)
ECFS	European Cystic Fibrosis Society
EQA	External Quality Assurance (külső minőségbiztosítási rendszer)
HGVS	Human Genome Variation Society
HP	Homopolimer
ICM	Intestinal Current Measurement
IRT	Immunoreaktív Tripszinogén
MLPA	Multiplex Ligáció Független Próbák Amplifikáció
MVCC	Mutation of Varying Clinical Consequence (változó klinikai következményekkel járó mutáció)
NGS	Next Generation Sequencing (új generációs szekvenálás)
NBD	Nucleotide Binding Domain (nukleotidkötő domén)
NPD	Nasal Potential Difference
PAP	Pankreatitisz-Asszociált Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction (polimeráz láncreakció)
SNP	Single-Nucleotide Polymorphism (egy nukleotidot érintő polimorfizmus)
TMD	Transmembrane Domain (transzmembrán domén)

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. 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 [1]. A kórkép autoszomális recesszív öröklésmenetet mutat.

1.1.1. A CF epidemiológiája

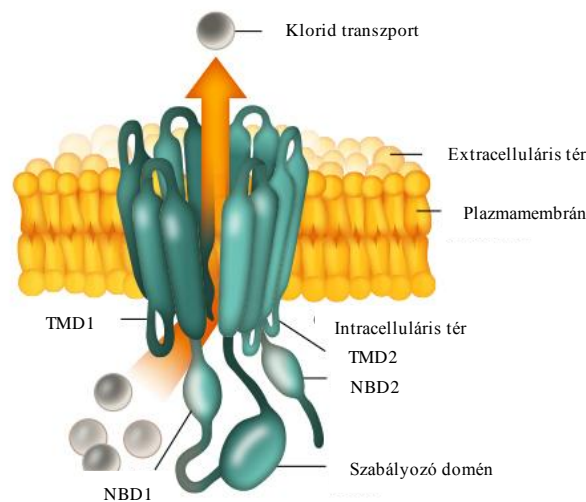
Világszerte a megbetegedés kb. 70.000 embert érint. A WHO adatai szerint az Európai Unióban átlagosan minden 2.000 - 3.000 terhességből születik egy beteg gyermek. Az adott ország egészségügyi fejlettségével és a népesség életszínvonalával összefüggésben a mortalitás igen változó. A várható élettartam az utóbbi négy évtizedben jelentős mértékben emelkedett, pillanatnyilag Kanadában a legmagasabb, ahol meghaladja a 47,7 évet [2].

Korábban a betegség magyarországi előfordulásával kapcsolatban kevés információ állt rendelkezésre és ezek közül a legfrissebb is 1996-ra datálható [3-5]. A European Cystic Fibrosis Society (ECFS) 2017-ben publikált adatai szerint hazánkban jelenleg 558 regisztrált CF beteget tartanak számon [6]. 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. [7].

1.1.2. A CFTR szerkezete és funkciója

A CFTR protein az ABC (ATP Binding Cassette) fehérjecsaládba tartozó, cAMP-függő klorid (Cl^-) / bikarbonát (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 (1. ábra). Bioszintézise és érése a hagyományos endoplazmatikus retikulum – Golgi útvonalon történik, majd fiziológias szerepét a sejtmembránba kerülve tölti be. Internalizálódása után a fehérje végül az endoszómákba jut, ahol többnyire újrahasznosul. A molekula féléletideje átlagosan 12-14 óra.



1. ábra A CFTR sematikus szerkezeti felépítése (forrás: <http://www.cftr.info>)

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 szekrétumok kulcsszerepet töltenek be az emésztésben, a testhőmérséklet szabályozásában és pl. a tüdők természetes immunvédekezésében, így csökkent mennyiségük és megváltozott összetételük nagyon korán súlyos szövődeményekkel jár [8].

1.1.3. A CF pathogenezise

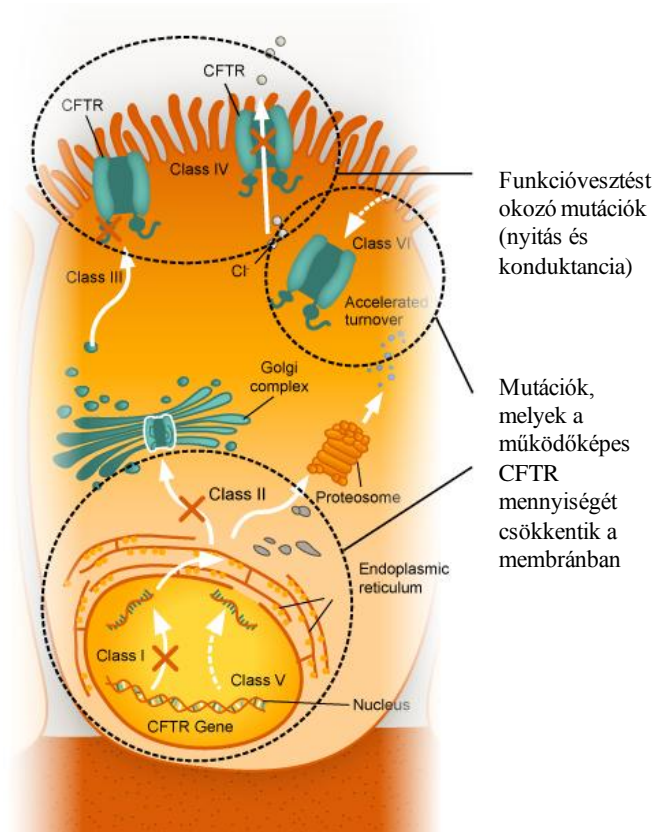
A betegség első tünetei leggyakrabban csecsemő- és kisdedkorban jelentkeznek. A CFTR-t expresszáló szövetek (pancreas, tüdő, gastrointestinális és a hepatobiliáris rendszer, valamint a reproduktív traktus) funkcióromlással kísért cisztás, kötőszövetes elfajulása következik be. A működészavart elsődlegesen 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 [9-11]. Noha a mutációk döntő többsége igen ritka – mindössze 20 darab éri el világviszonylatban a 0,1%-os allélfrekvenciát – közülük 1524 bizonyítottan patogén természetű [9]. A súlyos eltérések mellett természetesen előfordulnak változó klinikai következményekkel járó (MVCC), enyhe, ismeretlen jelentőségű és CF-t nem okozó, tünetmentes mutációk is.

A közelmúltban megújított ECFS ajánlás [12] szerint az számít patogén mutációnak, ami egy másik ismert, és bizonyosan *transz* helyzetű patogén mutációval együtt klinikailag megerősített CF kialakulásához vezet [13, 14]. Az MVCC kategóriába sorolt mutációkkal rendelkező betegek esetében további kivizsgálás szükséges az erre alkalmas speciális CF központokban, rekurrens/krónikus idiopathiás pancreatitis, CBAVD és bronchiectasia irányába [15].

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 turnovera a plazmamembránban fokozott (pl. c.-12_10del23, c.859A>T, c.4147_4148insA). Tehát az I., II., V. és VI. csoport mutációi súlyosan csökkent sejtfelszíni 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 mutációtípusok kóroki szerep szerinti felosztást a 2. ábra mutatja be.

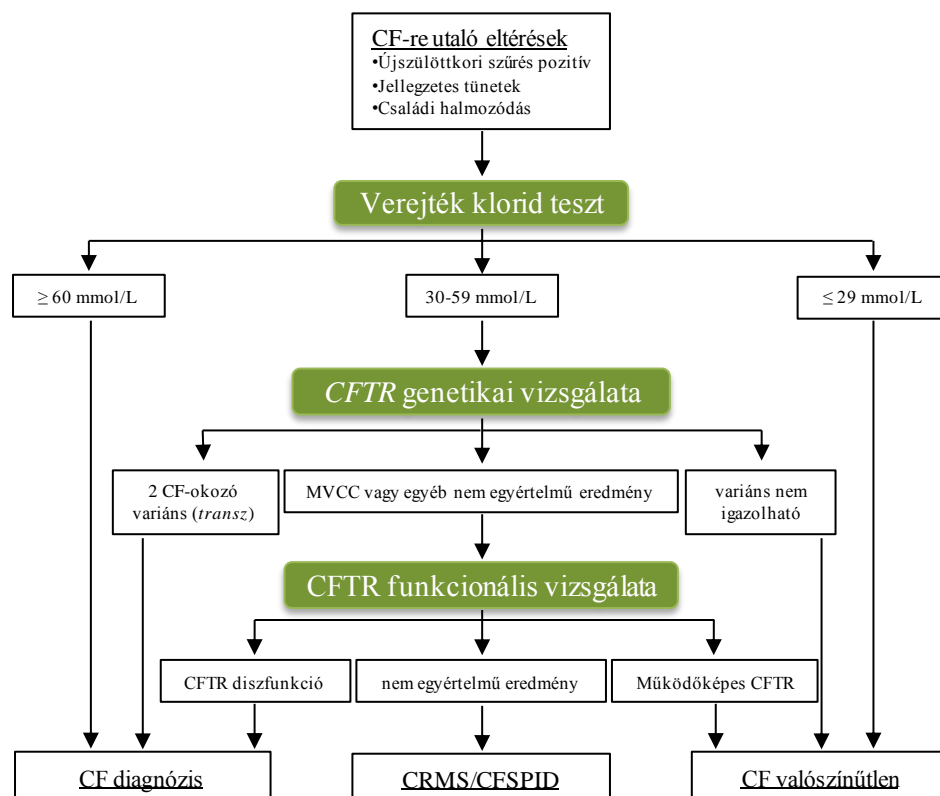


2. ábra A patogén CF mutációk típusai (forrás: <http://www.cftr.info>)

1.1.4. 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 [16-18]. A szűrés két, gyakrabban három szintű és hibrid technikákat használ, melyek jellemzően az immunoreaktív tripszinogén (IRT) és a pancreatitis-asszociált protein (PAP) meghatározásán kívül valamilyen DNS alapú szűrőmódszert foglalnak magukban [19, 20]. 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 (3. ábra).



3. ábra A CF diagnosztikai algoritmus és a genetikai vizsgálatok szerepe. (MVCC: változó klinikai következményekkel járó mutációk, CRMS: CFTR-hez köthető metabolikus szindróma, CFSPID: CF szűrőteszt pozitív, inkonklúzív diagnózis)

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.) [21] A jelenleg használatos algoritmus szerint a diagnózis felállításához mindezek mellett szükség van egy pozitív verejték klorid tesztre (≥ 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 [22-24]. Ez utóbbi esetén az NPD (nasal potential difference) vagy az ICM (intestinal current measurement) tekinthető elfogadott módszereknek [25, 26], 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. Ezek alapján a minimális elvárások [27]:

- a. DNS extrakció beszárított vércseppből, teljes vérből (EDTA) vagy bukkális nyálkahártyatörletből,
- b. részvétel külső minőségbiztosítási programban (EQA), ahol évente legalább egy alkalommal a laboratórium hitelesítése is megtörténik,
- c. a minták analízise heti rendszerességgel,
- d. kötelező a laboratóriumnak olyan *CFTR* mutációs szűrőpanel felállítása, amely az adott populációban élő CF-es betegek több, mint 96%-nál legalább egy abnormális allél azonosítására képes [28],
- e. kiterjesztett DNS szekvenálásra való felkészültség vagy a minta továbbküldésének lehetősége ilyen szolgáltató felé (amennyiben ritka mutációk, nagyméretű deléciók/duplikációk irányában történő további vizsgálatokra van szükség),
- f. a feladatot ellátó részéről nélkülözhetetlen az újonnan felismert variánsok/mutációk bejelentése az e célból létrehozott adatbázisok felé (pl. CFTR2, CFDB, UMD-CFTR, stb.).

A fenti 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.

1.1.5. 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 [29, 30]. 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* [31]. A neutrophil granulocyták közreműködésével fenntartott krónikus gyulladást akut exacerbációk tarkítják és a tüdőfunkció képtelen az alapértékre visszaállni [32]. A hagyományos gyógyítás ennek megfelelően antibiotikum profilaxist és az exacerbációk prompt, agresszív kezelését foglalja magába [33-35]. Ezt gyakran kiegészítik bronchodilatátorokkal, DNáz és neutrophil-elasztáz inhibitor kezeléssel a légutak átjárhatósága végett [36-38], emellett a szekréta kiürülésének sebessége is fokozható mellkasi fizioterápiával [39].

Bizakodásra ad okot, hogy a betegség hátterének részletes megismerésével és a molekuláris diagnosztika fejlődésével új, célzott terápiás lehetőségek előtt nyílik meg az út [40]. Ilyen szempontból úttörőnek számított az ivacaftor (VX-770) 2012-es megjelenése, mely elsőként tette elérhetővé a CFTR funkciót genotípus-specifikusan befolyásolni képes terápiát [41]. A betegek egy szubpopulációjának állapotában (akik legalább egy c.1652G>A alléllal rendelkeztek) 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 [42, 43]. A potencírozószer (pl. ivacaftor) a már sejtfelszínen 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 processzállásában és membránba juttatásában nyújthatnak segítséget [44, 45]. 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 [46].

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 [47-49].

Becslések szerint a fent részletezett modulátor terápiák segítségével a CF-ben szenvedő betegek közel felét lehet a korábbiakhoz képest egyértelműen kedvezőbb eredménnyel kezelni [50], így a megbízható és minél több genetikai eltérést lefedő mutációanalízis jelentősége vitathatatlan. A génszűrés technikák egyelőre még kísérleti stádiumban tartanak, ezek taglalására az értekezés nem tér ki [51, 52], az egyéb célzott terápiás lehetőségeket az 1. táblázat foglalja össze.

Osztály	Patomechanizmus	Terápiás megoldások
I.	Nincs funkcióképes CFTR fehérje	Transzláció javítása (ataluren)
II.	Nincs vagy kevés funkcióképes CFTR fehérje	Korrekción + potencírozás (lumacaftor + ivacaftor, tezacaftor+ ivacaftor)
III.	Klorid-transzport zavar (hibás reguláció vagy kapomechanizmus)	Potencírozás (ivacaftor)
IV.	Csökkent/hiányzó klorid konduktancia	Potencírozás (ivacaftor)
V.	Kis mennyiségű funkcióképes CFTR fehérje	N/A
VI.	Felgyorsult CFTR turnover	N/A

1. táblázat: A patogén mutációk okozta mennyiségi és minőségi eltérések a CFTR fehérjében és azok terápiás lehetőségei. N/A: nem elérhető

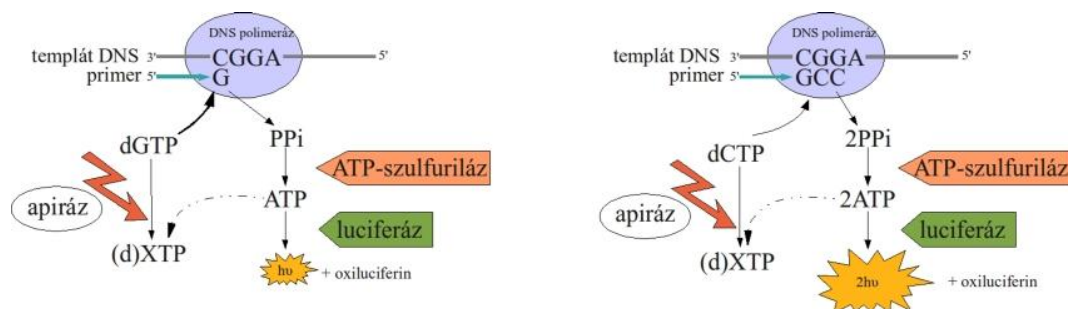
1.2. A piroszekvenálás

Az új generációs DNS szekvenálási (next generation sequencing, NGS) technikák viszonylag 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 [53].

1.2.1. A piroszekvenálás elve és korlátai

A piroszekvenálás egy biolumineszcencia detektáláson alapuló NGS módszer, melynek során az egyszálú DNS templáthoz enzimatikusan egy komplementer szálát szintetizálunk [54]. A reakciótérbe 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 [55]. Az egyes dezoxinukleotidok felváltva, meghatározott sorrendben, egymástól mosási lépésekkel elválasztva kerülnek a rendszerbe [56]. Így nyomon követhető, hogy a lánchosszabbodás során milyen dNTP és mekkora mennyiségben inkorporálódott, hiszen a detektált fény intenzitása elviekben ezzel egyenes arányosságban áll (4. ábra). A piroszekvenátor szoftvere az analízis befejeztével ún. flowgramokat generál, melyek kiértékelésével jutunk a szekvenálási eredményeihez.



4. ábra A piroszekvenálás elve (forrás: <http://elte.prompt.hu>). A detektált fény intenzitása a ciklusban beépült nukleotidok számától függ.

Manapság már közismert, hogy piroszekvenáláskor/ion-szemikonduktor szekvenáláskor a gyakorlat nem minden esetben követi az elméletet [57]. A beépült nukleotidok száma és az emittált fény intenzitása között fennálló, kezdetben lineáris összefüggés a beépülő nukleotidok számának emelkedésével elenyészik [58, 59]. Ennek következtében nagy számban ismétlődő bázisok meghatározásakor a módszer rendszeresen hibát vét, ami alá- vagy fölmérések 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 [60].

1.2.2. A homopolimerek

A genomikában homopolimernek (HP) vagy másnéven mononukleotid mikroszatellitának nevezzük az olyan szekvenciát, amely egymást követő azonos bázisokból áll [61]. A humán exom megközelítőleg 1,43 millió olyan homopolimert tartalmaz, amely 4-mertől 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 [62]. A humán genomban a G:C homopolimerek számához képest az A:T párok feltűnően felülreprezentáltak [63-65]. Bár mindkét pár szerkezete viszonylag stabil [66, 67], 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 [68-70].

1.2.3. Bioinformatikai megoldások

Lévéen, hogy az egyéb DNS szakaszokhoz képest a HP-ek 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 [71]. 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 alacsony tartása) kiemelt jelentőséggel bír [72].

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 [73]. Az Acacia elnevezésű szoftver elsősorban a HP régiókra koncentrál és az egyes bázisleolvasások („readek”) sorbarendezésekor egy dinamikusan változó konszenzus szekvenciát vesz figyelembe [74]. A Coral és az ECHO hibajavító algoritmusok [75] mellett említésre méltó még a HECTOR, utóbbi a HP spektrumok alapján több lépcsőben végzi el a korrekciót [76]. 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 [77]. A NoDe (Noise Detector) és a DUDE-Seq a legfrissebb eszközöknek számítanak és amellett, hogy ezek dolgoznak a legkisebb hibaszázalékkal, még kifejezetten gyorsak is [78, 79].

Ugyanakkor hiába javul drámaian a piroszekvenálás pontossága a szofisztikált hibajavító programoknak köszönhetően, azok minden igyekezet ellenére sem tudják a problémát tökéletesen áthidalni [80, 81]. 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 [82].

1.3. 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 allélok 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 lókuszban.

2. 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.

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

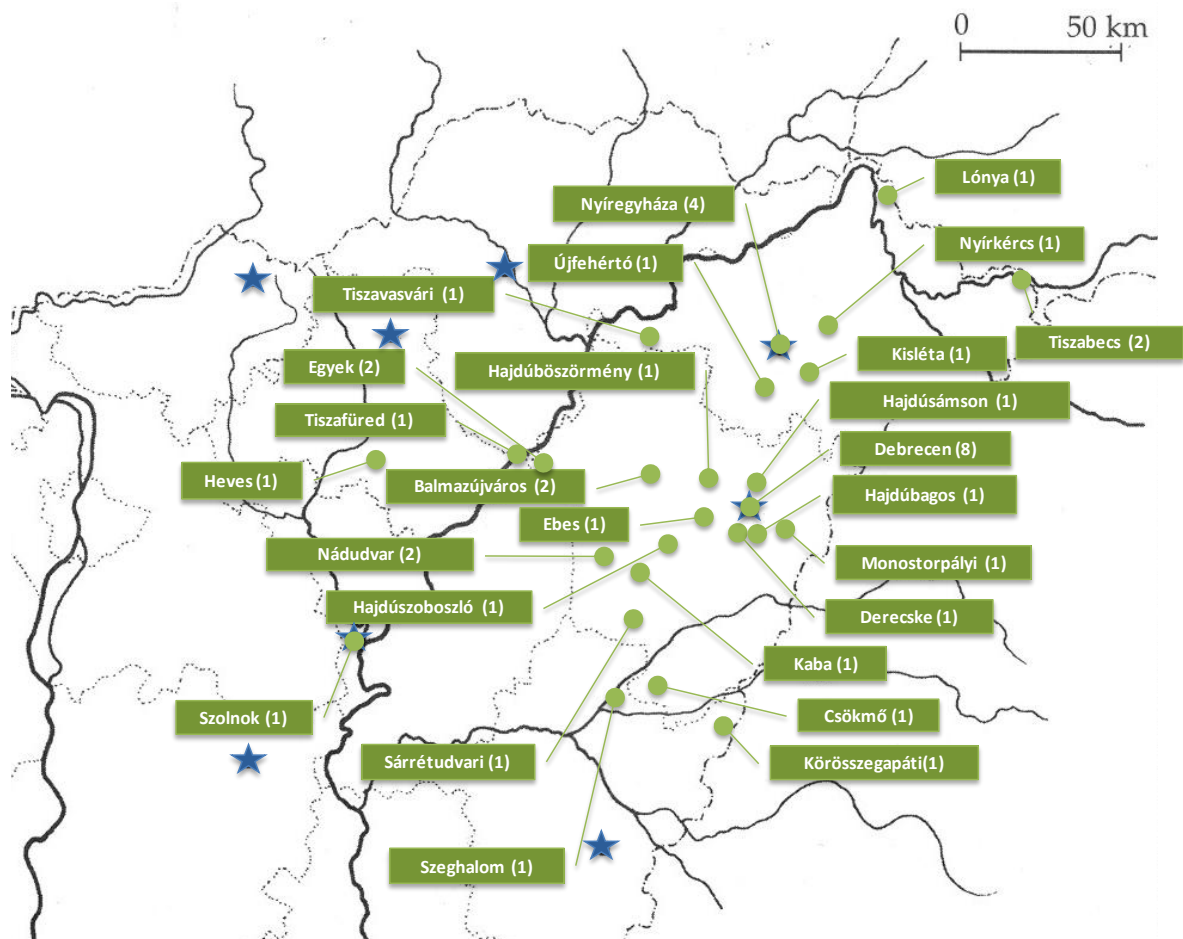
3.1. A kelet-magyarországi mutációspektrum felmérése

3.1.1. 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.) reprodukív traktus eltérései (késői pubertás, vas deferensek korai elzáródása, azoospermia, stb.) és pozitív vagy határérték körüli klorid verejtékteszt (≥ 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.



5. ábra A vizsgált kelet-magyarországi betegpopuláció területi eloszlása. (A megyeszékhelyeket kék csillag jelöli)

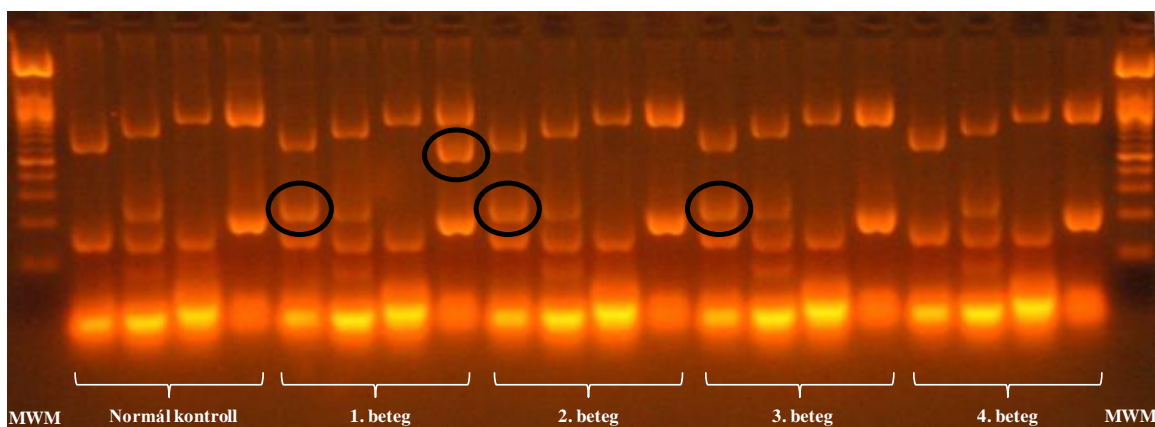
3.1.2. Molekuláris genetikai módszerek

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 [83]. Az analitikai módszerek használatával addig haladtunk tovább a következő szintre, amíg az adott betegnél eredményesnek nem bizonyult mindkét allél kimutatása. Az analízis lépései 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. Ezt a 6. ábra egy reprezentatív gélképpel szemlélteti. 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.

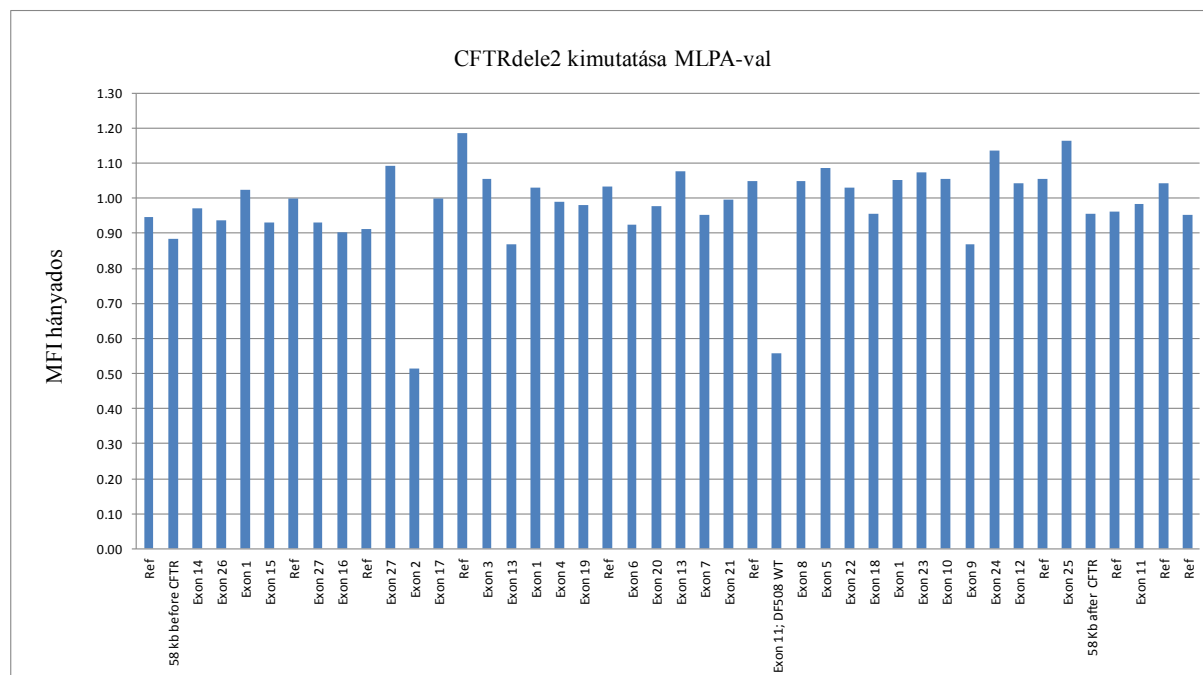
2. A CFTRdele2,3(21kb), másnéven „szláv deléció” vizsgálata. Ennek a Közép- és Kelet-Európában igen gyakori, hatalmas méretű (21kb, 2 exont és 3 introni régiót érintő) deléciónak a kimutatása az irodalomban közölt metodikának megfelelően történt [84]. A kimutatást egy, a mutációs forró pontra tervezett primerpárral végeztük. A mutáció homo- illetve heterozigóta formájának megállapításához a *CFTR* 3. exonjának amplifikálására is szükség volt.



6. ábra Az Elucigene CF29v2 Kittel történő allél-specifikus amplifikáció gélképe. A normál kontroll esetén és a fenti 29 mutációt nem hordozóknál mindössze 8 kontroll sáv és a c.1521_1523delCTT (N) 160 bp-os fragmentje detektálható. Ezzel szemben az 1. betegnél a c.1521_1523delCTT és a 2789+5G>A mutáció összetett heterozigóta, míg a 2. és 3. betegnél a c.1521_1523delCTT mutáció heterozigóta formában mutatható ki. (MWM: molekulatömeg marker)

3. A *CFTR* teljes kódoló régiójának szekvenálása, melyhez szintén irodalmi adatokat használtunk fel [85]. 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 intragenikus *CFTR* átrendeződéseket ellenőriztük (copy number variations, CNV) 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 (deléció: $<0,7$; duplikáció: $>1,3$). A 7. ábrán az egyik betegnél azonosított *CFTRdele2* (c.54-5811_164+2186del273+6780_273+6961inv) deléció látható.



7. ábra A *CFTRdele2* kimutatása MLPA-val. A deléciót hordozó beteg esetében a 2. exon amplifikációja során mért fluoreszcencia intenzitás és a referencia mintánál mért érték hányadosa 0,7 alatti. Ugyanez figyelhető meg a Phe508del mutáció vad típusára tervezett hibridizációs próbák használatakor a 11. exonban is.

3.2. A mutációspektrum országos vizsgálata

3.2.1. 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.

3.2.2. A genetikai tesztek sorrendjének felülvizsgálata

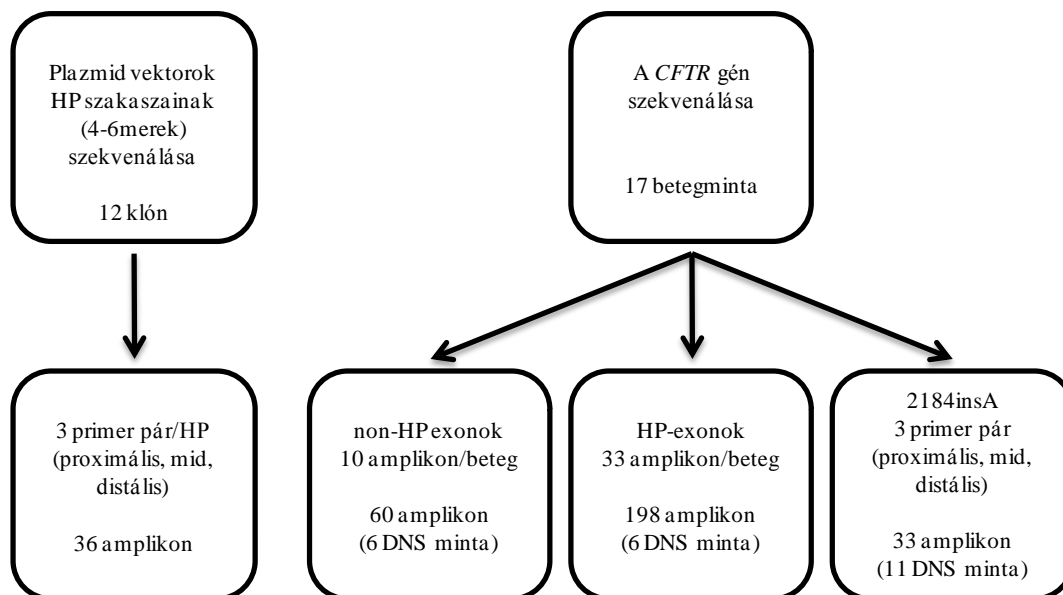
Korábbi eredményeink fényében az eddig használt többlépcsős genetikai kivizsgálás menetét némileg újra kellett gondolni. A minta típusa és a DNS kivonása a leukocytákból nem változott, de a protokollban helyenként kisebb módosításokat eszközöltünk. A mutációanalízisre használt módszerünk frissített változata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

1. Az elsővonalbeli teszt továbbra is az Elucigene CF29v2 Kit maradt, melynek részletezése a **3.1.2./1** részben található. 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 (**3.1.2/2**).
2. A szűrés második szintje a *CFTR* szekvenálása volt, de itt egyes génszakaszok prioritást élveztek. Az elsőként szekvenálandó 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. Az alkalmazott módszer lépéseit a **3.1.2/3** taglalja.
3. Ha Sanger szekvenálással sem találtuk meg mindkét kóroki eltérést, akkor az MLPA módszer következett, a már ismertetett módon kivitelezve (**3.1.2/4**).

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 [86].

3.3. A piroszekvenátor tesztelése és módszerfejlesztés

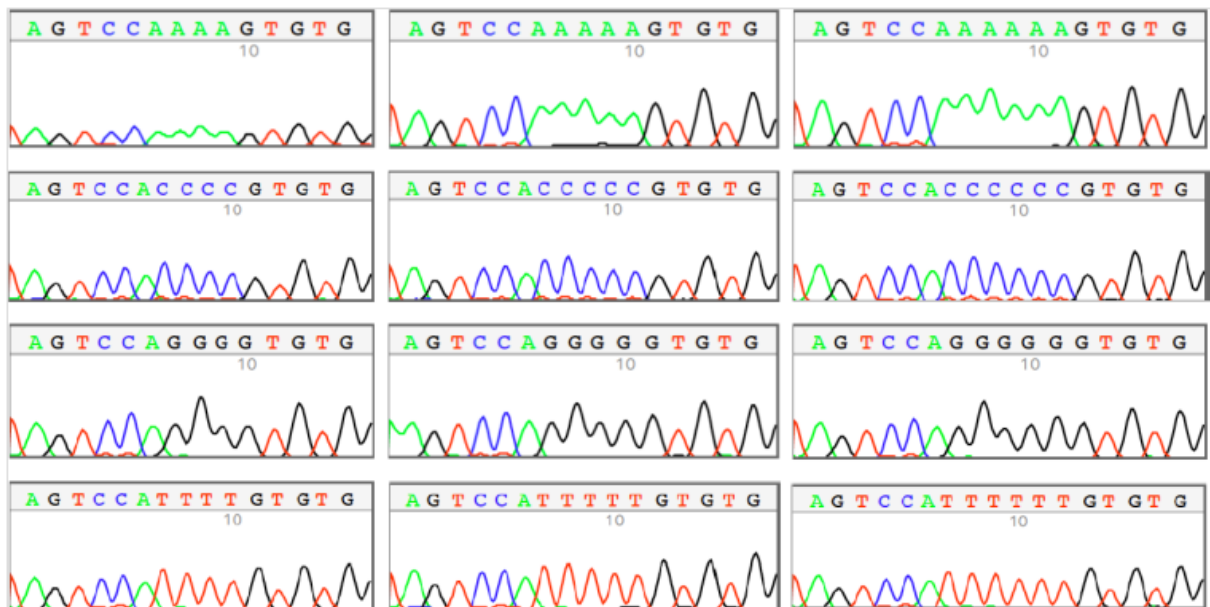
Ebben a kísérletsorozatban vizsgálatainkat az intézetünkben használt NGS piroszekvenátor, a Roche 454 (Life Sciences, Penzberg, Németország) készüléken folytattuk. Mivel az eszközön a mérések multiplexálhatók, a készülék analitikai képességeinek felmérése és egy új generációs CF mutáció detektáló módszer 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 kísérlet felépítését a 8. ábra mutatja be.



8. ábra Az új generációs szekvenálón végzett kísérletek menete

3.3.1. 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 9. ábra egy-egy reprezentatív elektroferogramot mutat be minden plazmid esetében.



9. ábra: A plazmidok HP tartalmának ellenőrzése (reprezentatív Sanger-elektroferogramok).

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 mutagenézishez, amplifikációhoz és szekvenáláshoz használt primerpárokat a 2. táblázat tartalmazza.

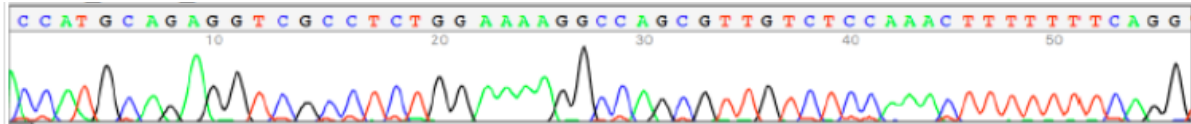
Primer neve	HP	Primer szekvenciája	Primer hossza (bp)
Mutgen 4A F	4A	5'-CGGATCCACTAGTCCAAAAAGTGTGGTGGAAATTCTG-3'	35
Mutgen 4A R		5'-CAGAATTCCACCACACTTTTGGACTAGTGGATCCG-3'	35
Mutgen 5A F	5A	5'-CGGATCCACTAGTCCAAAAAGTGTGGTGGAAATTCTG-3'	36
Mutgen 5A R		5'-CAGAATTCCACCACACTTTTGGACTAGTGGATCCG-3'	36
Mutgen 6A F	6A	5'-CGGATCCACTAGTCCAAAAAAGTGTGGTGGAAATTCTG-3'	37
Mutgen 6A R		5'-CAGAATTCCACCACACTTTTTTGGACTAGTGGATCCG-3'	37
Mutgen 4T F	4T	5'-CGGATCCACTAGTCCATTTTGTGTGGTGGAAATTCTG-3'	36
Mutgen 4T R		5'-CAGAATTCCACCACAAAAATGGACTAGTGGATCCG-3'	36
Mutgen 5T F	5T	5'-CGGATCCACTAGTCCATTTTGTGTGGTGGAAATTCTG-3'	37
Mutgen 5T R		5'-CAGAATTCCACCACAAAAAATGGACTAGTGGATCCG-3'	37
Mutgen 6T F	6T	5'-CGGATCCACTAGTCCATTTTGTGTGGTGGAAATTCTG-3'	38
Mutgen 6T R		5'-CAGAATTCCACCACAAAAAATGGACTAGTGGATCCG-3'	38
Mutgen 4C F	4C	5'-CGGATCCACTAGTCCACCCCGTGTGGTGGAAATTCTG-3'	36
Mutgen 4C R		5'-CAGAATTCCACCACACGGGGTGGACTAGTGGATCCG-3'	36
Mutgen 5C F	5C	5'-CGGATCCACTAGTCCACCCCGTGTGGTGGAAATTCTG-3'	37
Mutgen 5C R		5'-CAGAATTCCACCACACGGGGTGGACTAGTGGATCCG-3'	37
Mutgen 6C F	6C	5'-CGGATCCACTAGTCCACCCCGTGTGGTGGAAATTCTG-3'	38
Mutgen 6C R		5'-CAGAATTCCACCACACGGGGTGGACTAGTGGATCCG-3'	38
Mutgen 4GF	4G	5'-CGGATCCACTAGTCCAGGGGTGTGGTGGAAATTCTG-3'	35
Mutgen 4GR		5'-CAGAATTCCACCACCCCTGGACTAGTGGATCCG-3'	35
Mutgen 5GF	5G	5'-CGGATCCACTAGTCCAGGGGTGTGGTGGAAATTCTG-3'	36
Mutgen 5GR		5'-CAGAATTCCACCACCCCTGGACTAGTGGATCCG-3'	36
Mutgen 6GF	6G	5'-CGGATCCACTAGTCCAGGGGGTGTGGTGGAAATTCTG-3'	37
Mutgen 6GR		5'-CAGAATTCCACCACCCCTGGACTAGTGGATCCG-3'	37
Mutamp 1 F	változó	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA GAGCTCGGATCCACTAGTCC-3'	40
Mutamp 1 R		5'-GCCATCGTCACTGTTCTCCA CCCCAGAATAGAA TGACACC-3'	41
Mutamp 2 F	változó	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA CGTGTACGGTGGGAGGTCTA-3'	40
Mutamp 2 R		5'-GCCATCGTCACTGTTCTCCA CAACAGATGGCTGGCAACTA-3'	40
Mutamp 3 F	változó	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA CACCAAATCAACGGGACTT-3'	40
Mutamp 3 R		5'-GCCATCGTCACTGTTCTCCA GATATCTGCAGAATTCCACCA-3'	41

2. táblázat: A mutagenézishez, amplifikációhoz és szekvenáláshoz használt primerpárok. Az amplifikáló/szekvenáló primerek jelölő (tag) szekvenciáit szóköz választja el.

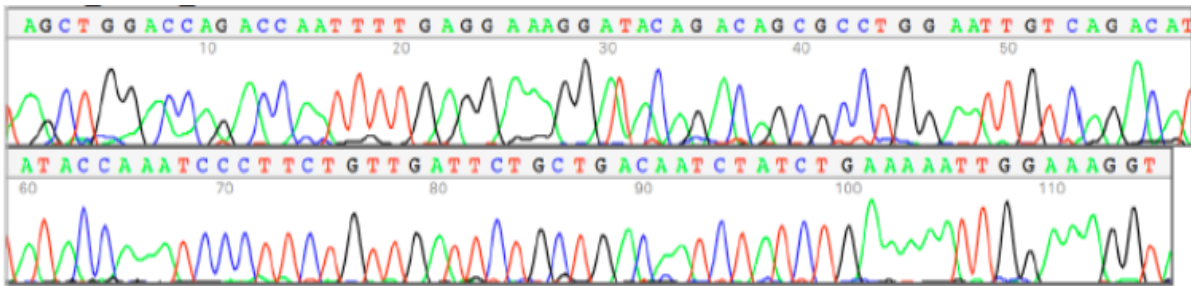
3.3.2. A *CFTR* gén szekvenálása

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 10. ábra a HP-exonok Sanger szekvenálását mutatja be az egyik beteg példáján.

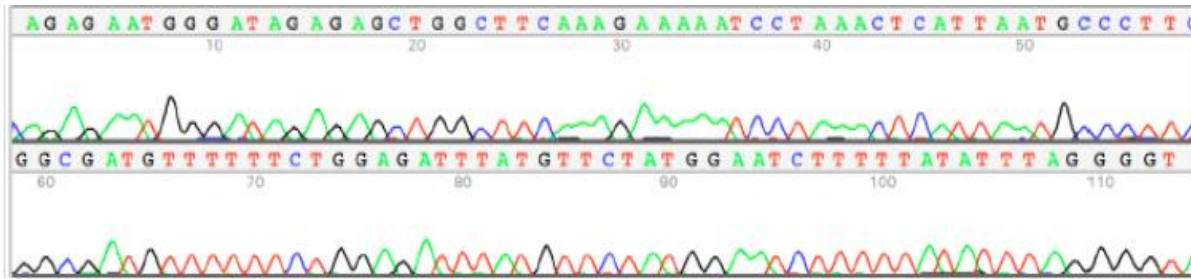
50615_*CFTR*_e1



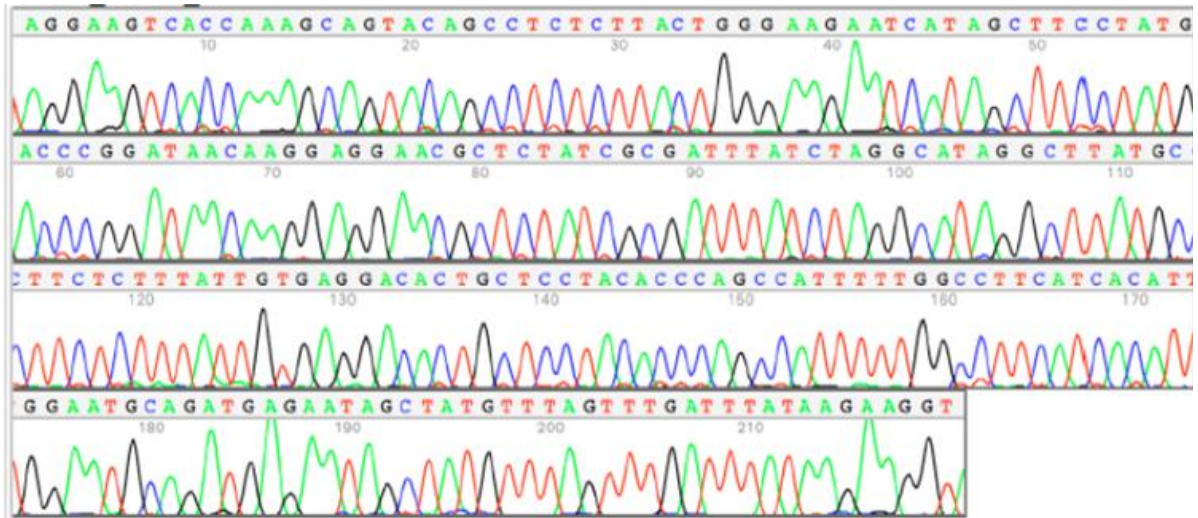
50615_*CFTR*_e2



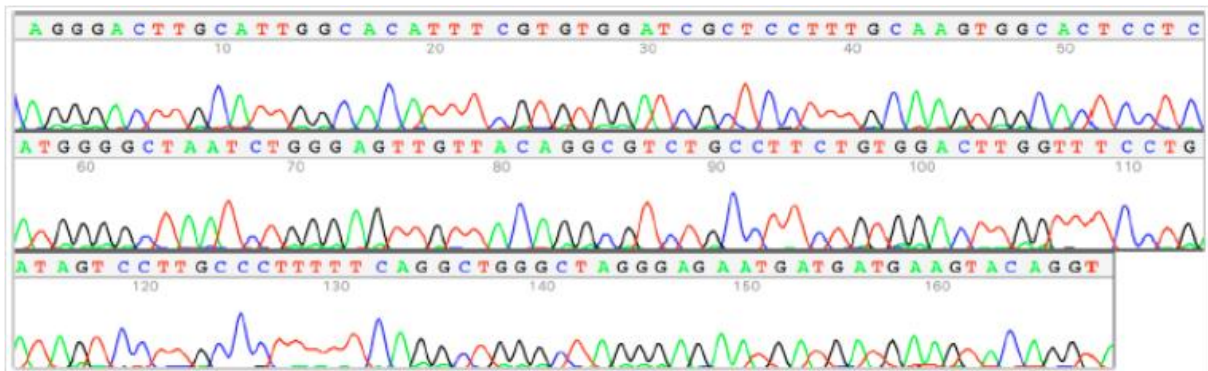
50615_*CFTR*_e3



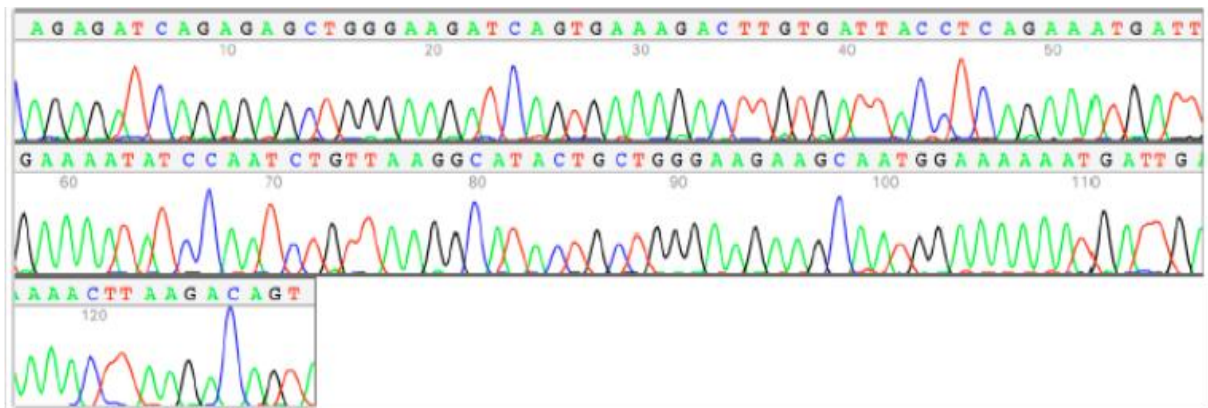
50615_CFTR_e4



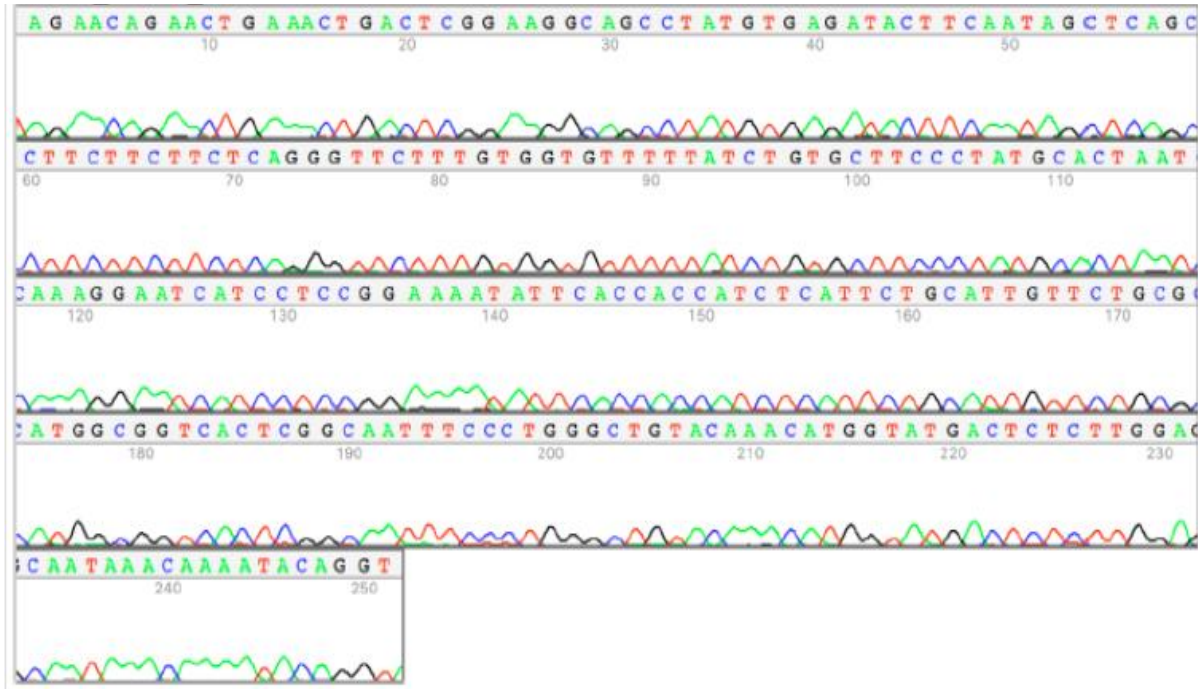
50615_CFTR_e6



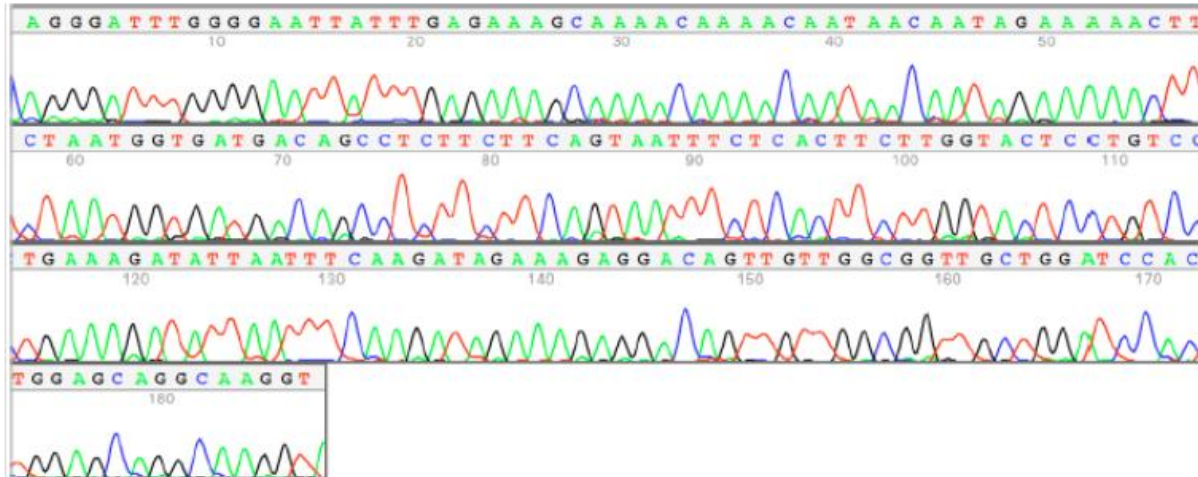
50615_CFTR_e7



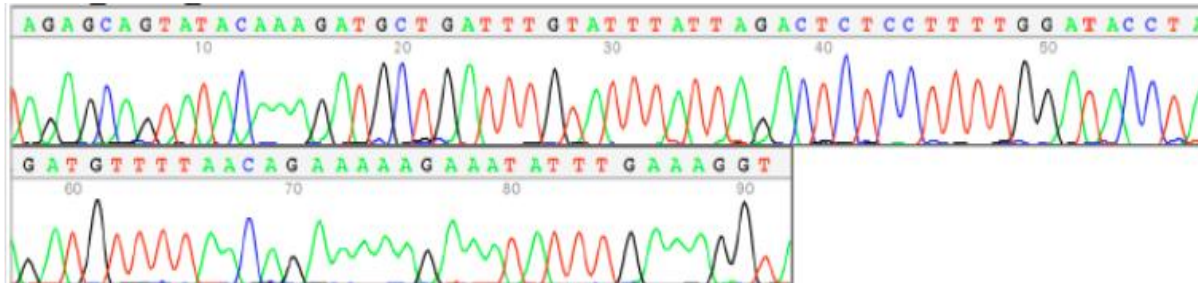
50615_CFTR_e8



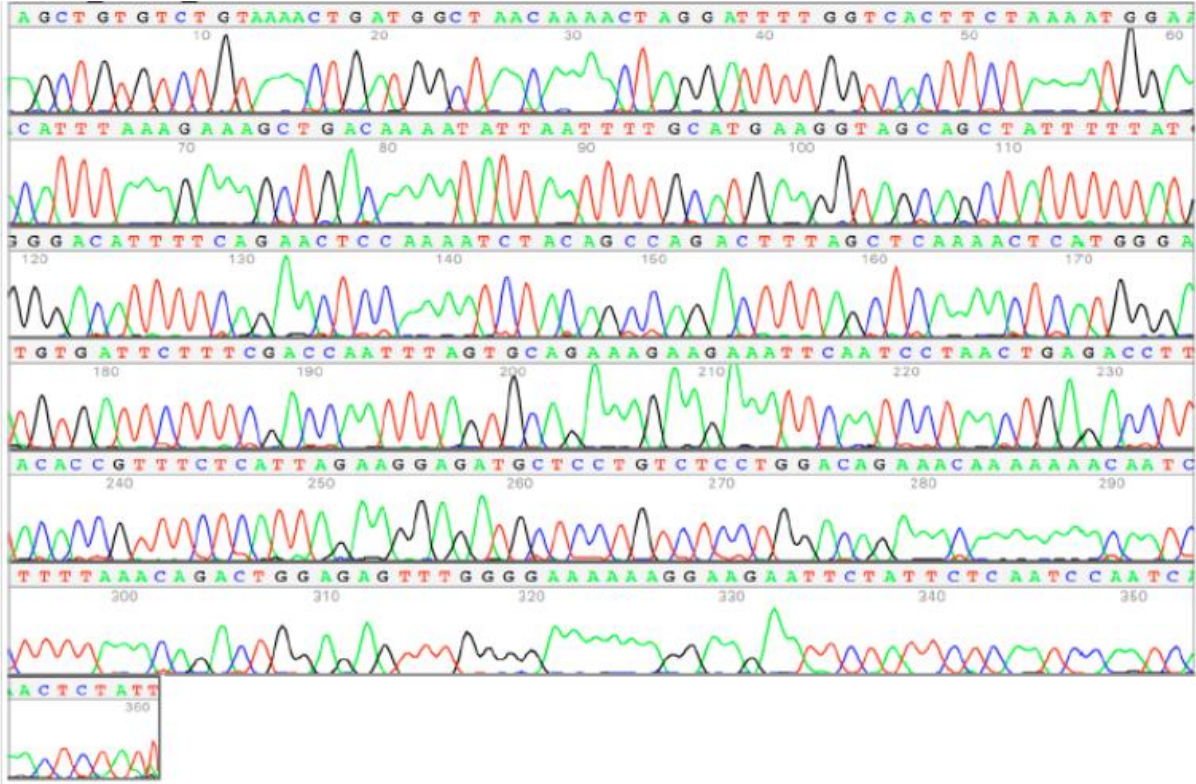
50615_CFTR_e10



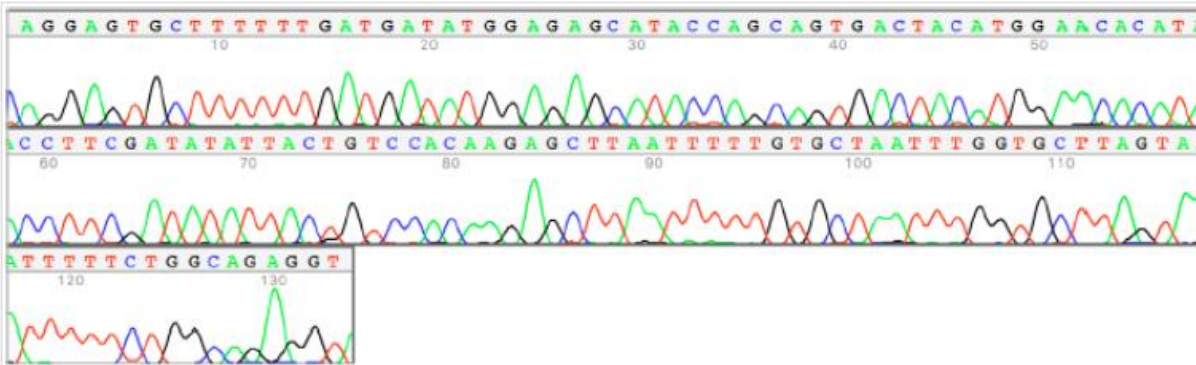
50615_CFTR_e13



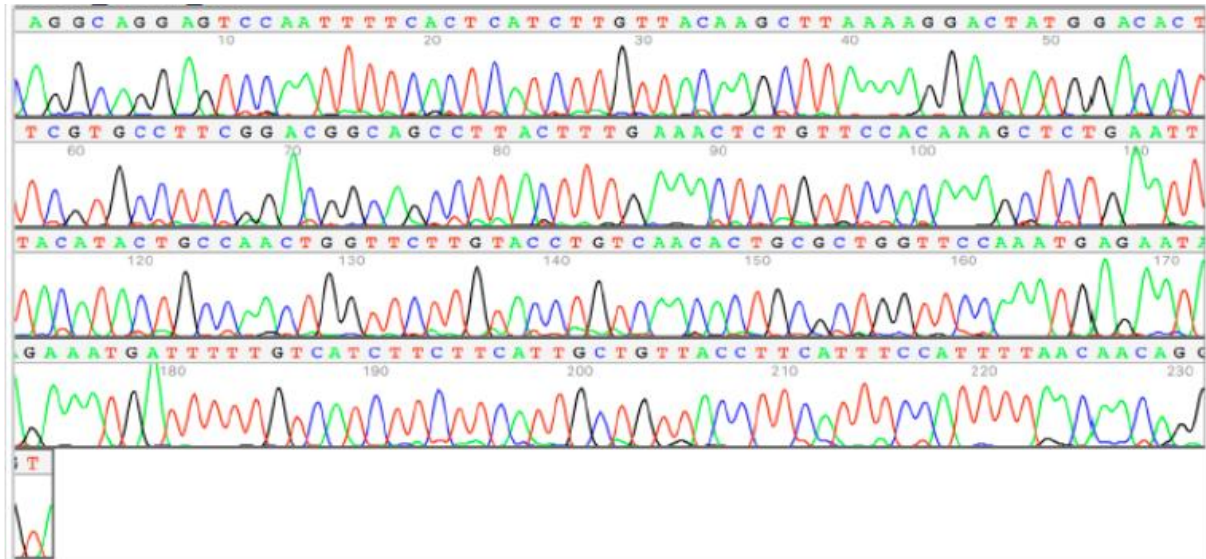
50615_CFTR_e14



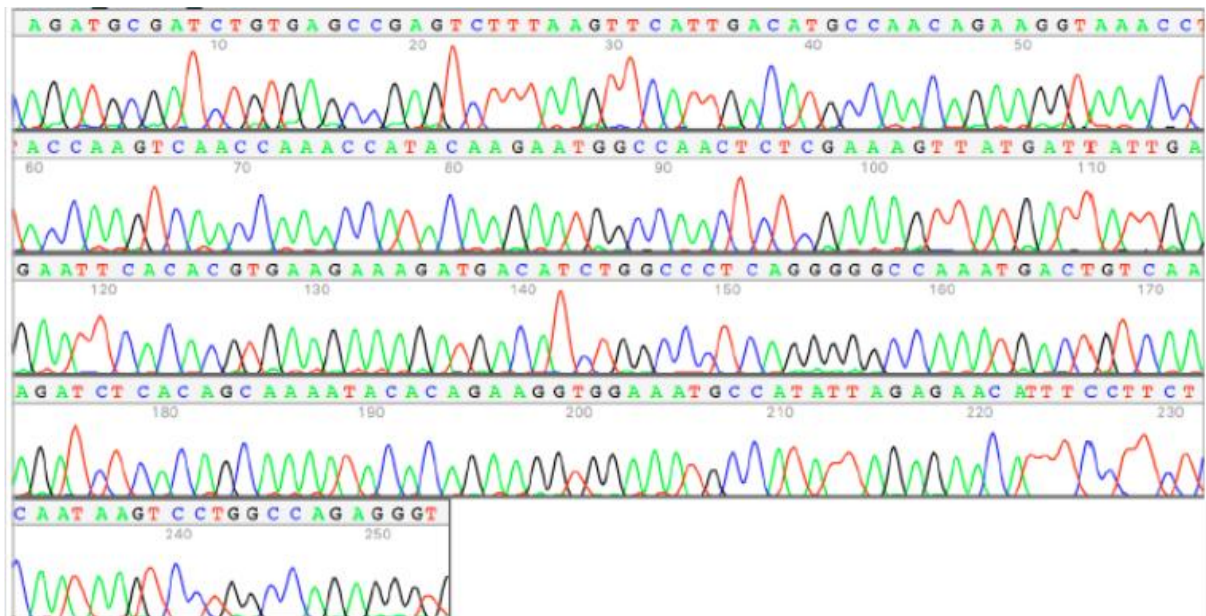
50615_CFTR_e15



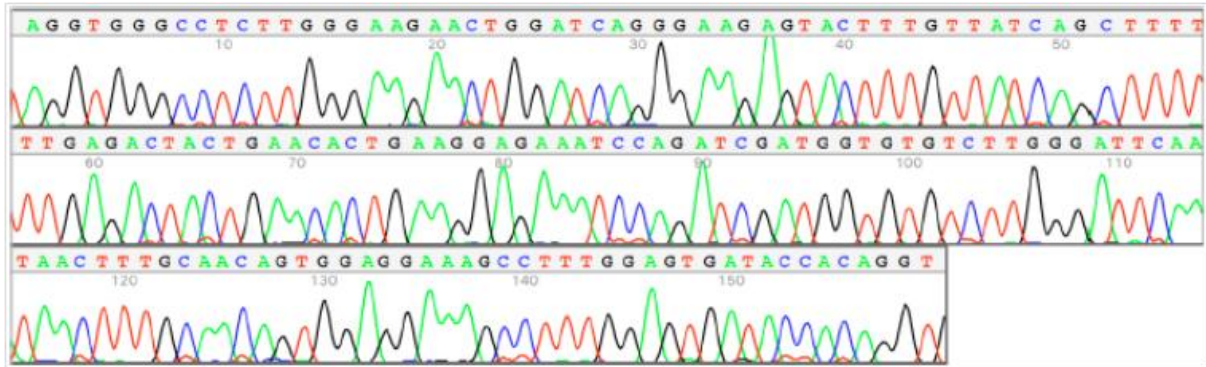
50615_CFTR_e20



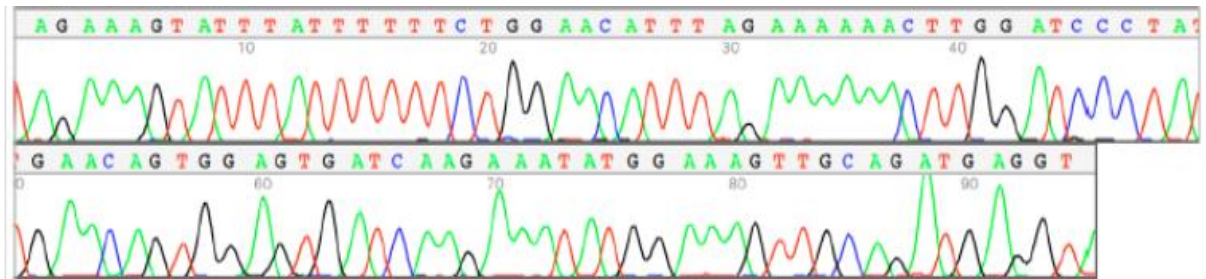
50615_CFTR_e22



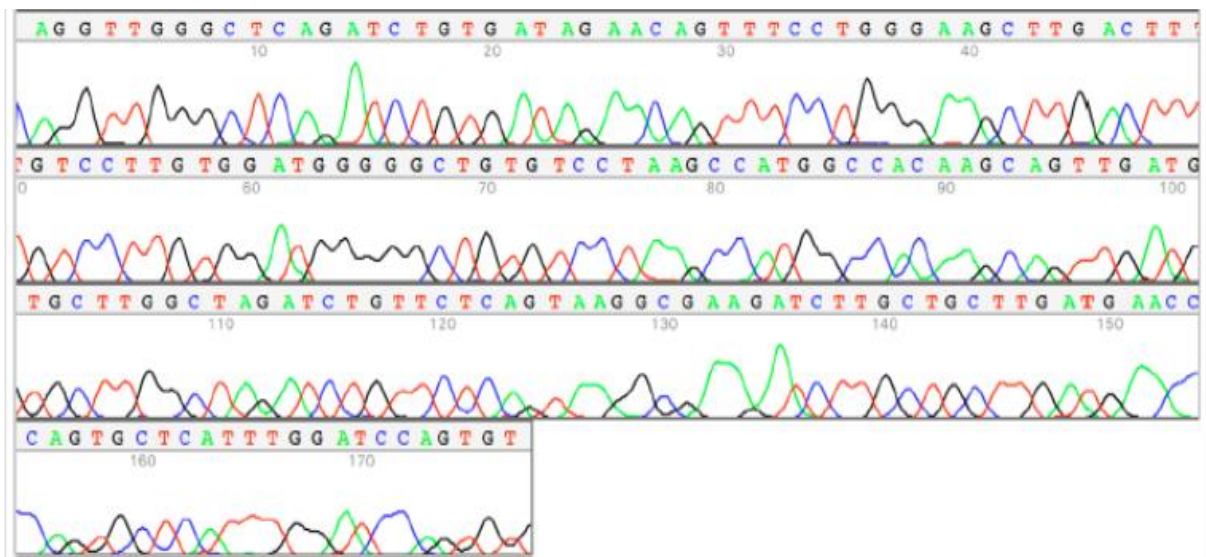
50615_CFTR_e23

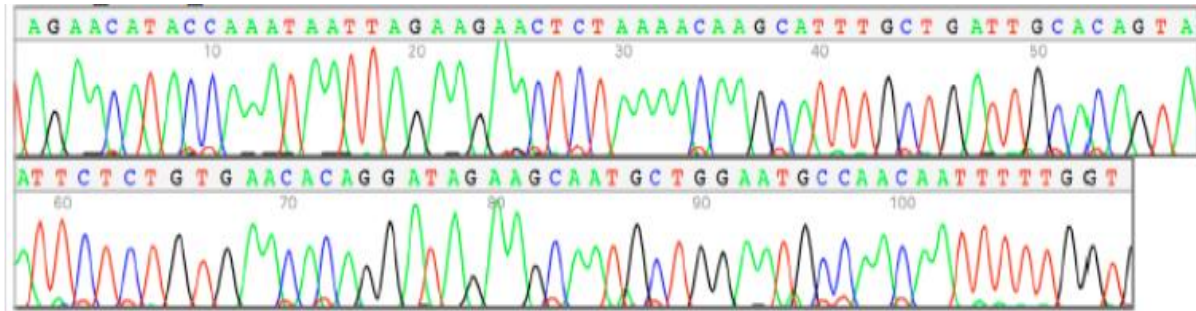


50615_CFTR_e24



50615_CFTR_e25





10. ábra: A humán minták HP-exonjainak ellenőrzése (reprezentatív Sanger-elektroferogramok).

A homopolimert tartalmazó exonok (HP-exonok) esetében a primerek tervezése a plazmid rendszernél leírtakhoz volt hasonló, annyi különbséggel, hogy itt „mid” típusú primerpárokat nem használtunk (3. táblázat).

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 bázisszekvenciát tartalmazó primerek fele-fele arányban fordultak elő a primermixben (a 3. táblázatban zárójelben vannak feltüntetve). Erre a primerbekötődés hatékonyságának maximalizálása és az allélvesztés megakadályozása miatt volt szükség, ami egy korábbi tesztrendszerrel problémákat okozott [87]. Természetesen a HP szakaszt nem tartalmazó (non-HP) exonokat is amplifikáltuk és piroszekvenáltuk, de exononként már csak egy primerpárral, melyeket a 4. táblázatban tüntettem fel. 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.

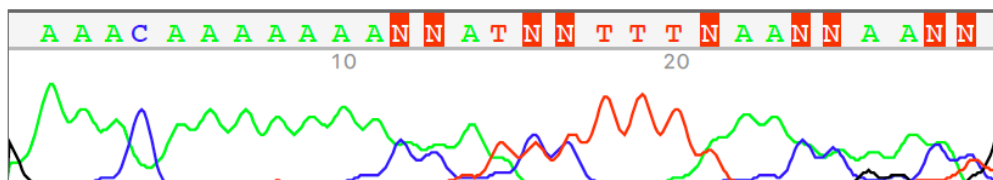
Primer neve	HP c.DNA pozíciója	HP	Távolság a HP-től (bp)	Primer szekvenciája	Primer hossza (bp)
CF e1-1-A F	c.44_50	7T	21	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA GGGAAAGAGCAAAGGAA(G/A)G-3'	40
CF e1-1-A R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA CACGTGTCTTCCGAAAGC(T)C-3'	40
CF e1-1-B F			5	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA AAAA(G/A)GCCAGGTTGTCTC-3'	39
CF e1-1-B R	5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA TCAGCTTCAGTTCATCTCTCCA-3'	42			
CF e2-1-A F	c.152_156	5A	21	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA TTCCATATGCCAGAAAAGTTGA-3'	42
CF e2-1-A R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA TGAA TTTCTCTCT(T/C)CAACTAAAACAATG-3'	47
CF e2-1-B F			5	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA (C/T)TGTTGA(T)TTCTGC(T)TGACAACTCT-3'	42
CF e2-1-B R	5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA CTCTGGTCTCAAGCAATCC-3'	40			
CF e3-123-A F	c.193_197 c.228_233 c.259_263	5A 6T 5T	változó	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA CCTTGGATATACTTGTGTAATCAA-3'	45
CF e3-123-A R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA CATAATGAAATGTAACAAATGAGATCCT-3'	46
CF e3-123-B F				5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA GCAACTTATTGGTCCCACTTTT-3'	42
CF e3-123-B R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA CACCAGATTTCGATGCTTTTCA-3'	42
CF e4-1-A F	c.425_429	5T	12	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA TTTCTCTGTTTTCCCTTTTG-3'	42
CF e4-1-A R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA GCATTCCTAATGTGATGAAAGG-3'	40
CF e4-1-B F			14	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA TGAAGCACTGCTCTACACC-3'	41
CF e4-1-B R	5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA GAGCATTAAATTTCTGCCATTT-3'	44			
CF e6-1-A F	c.704_708	5T	19	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA CTGCCTTCTGTGGACTTGGT-3'	40
CF e6-1-A R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA CACACTGAAAGATCACTGTTCTATGC-3'	45
CF e6-1-B F			19	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA TGCTCAGAACAC(GT)AAGTGT-3'	40
CF e6-1-B R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA TCATCATCTTCTCCTAGCC-3'	41
CF e7-1-A F	c.845_850	6A	0	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA AATAAAATAATGCCACTGTTG-3'	43
CF e7-1-A R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA CAACTTACTGICTTAAAGTTTCAATCA-3'	47
CF e7-1-B F			5	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA GCATCTGCTGGGAAAGAAAC-3'	40
CF e7-1-B R	5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA CCCATGAAAGTGAATTTGTGC-3'	41			
CF e8-1-A F	c.955_959	5T	1	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA TTCCATCCAAAGATCCCTGA-3'	40
CF e8-1-A R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA (A/C)GTGATA(G/C)GGAGCAGACA-3'	40
CF e8-1-B F			0	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA TTCTCAGGGTCTTTGTGGTG-3'	41
CF e8-1-B R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA GCACATTTTGCAGAGTTCA-3'	40
CF e10-1-A F	c.1257_1261	5A	11	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA GGCCATGTGCTTTTCAAAC-3'	40
CF e10-1-A R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA TTA CTGAAAGAGGGCT(G/A)TCATC-3'	43
CF e10-1-B F			9	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA TTTGAAAGCAAACAAACAA-3'	43
CF e10-1-B R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA CCTTCCAGCATCAAACTAGAA-3'	43
CF e13-1-A F	c.1748_1752	5A	8	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA GCTACTTCTGCACCCTTTTGA-3'	42
CF e13-1-A R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA AAGGATTCAAAGAA(C/A)ATACCTTTCA-3'	46
CF e13-1-B F			5	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA TCTCTTTTGGATA(C/T)CTAGATGTTTT-3'	46
CF e13-1-B R	5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA TGAA TCCTGGCCCA GTAGG-3'	39			
CF e14-123 F	c.1874_1878 c.2046_2052 c.2083_2088	5T 7A 6A	változó	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA AATTTTGCATGAAGGTAGCAG-3'	41
CF e14-123 R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA TCGTATAGAGTTGATTGGATT(G/C)AGA-3'	45
CF e14-123C F	c.2046_2052	7A	11	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA TTGCATGAAGGTAAGCAGTATT-3'	42
CF e14-123C R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA CCCCAAACCTCTCCAGTCTGT-3'	40
CF e14-V3 F	c.2046_2052 c.2083_2088	7A 6A	változó	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA GATGCTCCTGTCTCTGGAC-3'	40
CF e14-V3 R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA -CAGGACAGACTGCCTCCTTC-3'	40
CF e15-123 F	c.2497_2502 c.2579_2583 c.2606_2610	6T 5T 5T	változó	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA GCCATAATCTTTTATTCAGGAGTG-3'	45
CF e15-123 R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA TTTACAATAGAACATTTTACCTCT(G/T)C-3'	47
CF e20-1-A F				c.3317_3321	5T
CF e20-1-A R	5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA TGAAAGGTAAC(A/G)GCAAT(G/A)AAGAA-3'	44			
CF e20-1-B F	8	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA CGCTGGTCCAAATGAGAAT-3'	40		
CF e20-1-B R		5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA TGAAATTCAAAGAAATCACTTG-3'	43		
CF e22-1-A F	c.3619_3623	5G	0	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA TTGTGAAATTTGTCTGCCATTTCT-3'	42
CF e22-1-A R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA TGAGATCTTTGACATCA(T/C)TTGG-3'	43
CF e22-1-B F			17	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA TGA GAATT(C/G)ACACG(G/T)AAGAAAG-3'	43
CF e22-1-B R	5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA TGCTTCAGGCTACTGGGATT-3'	40			
CF e23-1-A F	c.3768_3773	6T	19	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA TGTGCAACAAGGTTGAAATGA-3'	41
CF e23-1-A R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA CCAT(C/T)(G/A)ATCTGGAATTTCTCC-3'	40
CF e23-1-B F			6	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA TGGATCAAGGAAAGTACTTT(G/A)TT-3'	44
CF e23-1-B R	5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA TTTCTTGATGACAAAGTATCAAATAGCA-3'	47			
CF e24-12-A F	c.3884_3889 c.3903_3908	6T 6A	változó	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA AAGAATGATACAAGCAGACATGA-3'	45
CF e24-12-A R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA CCACTGTTTATA(G/A)GGATCCAA-3'	41
CF e25-1-A F	c.4024_4028	5G	18	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA TCAAATGGTGGCAGGATGFG-3'	40
CF e25-1-A R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA AGCACAATCAA(C/G)TGCTTGTGG-3'	40
CF e25-1-B F			8	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA TGGAAAGCTTGA(C/T)TTTGTCC-3'	40
CF e25-1-B R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA TCACCATGAAGCAGGCATAA-3'	40
CF e26-1-A F	c.4237_4241	5T	16	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA TTA CTG(T/C)TCTGTGATATTA TGTGTGG-3'	46
CF e26-1-A R				5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA AAGGGCAA TGAGATC(T/G)TAAAGTAAA-3'	44
CF e26-1-B F			10	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA CAGGATAGAAAGCAATGCT(G/A)GA-3'	41
CF e26-1-B R	5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA CACCACATGGCTCAGATCAA-3'	40			

3. táblázat: A *CFTR* HP tartalmú exonjainál használt primerek. A „tagek” szóközzel jelölve.

Primer neve	Primer szekvenciája	Primer hossza (bp)
CF e5 F	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA TGTTGAAATTATCTAACTTTCCATTTT -3'	47
CF e5 R	5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA AGGGAAGCTAGAGCTGAGCA -3'	40
CF e9 F	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA GCTTGGCAAATTAACCTTTAGAACA -3'	44
CF e9 R	5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA CGCCATTAGGATGAAATCCA -3'	40
CF e11 F	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA CAAGTGAATCCTGAGCGTGA -3'	40
CF e11 R	5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA TGGGTAGTGTGAAGGGTTCAT -3'	41
CF e12 F	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA GAAGGAAGATGTGCCTTTCAA -3'	41
CF e12 R	5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA CTAGCCATAAAACCCAGGA -3'	40
CF e16 F	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA GCATGGGAGGAATAGGTGAA -3'	40
CF e16 R	5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA TGCTTGGGAGAAATGAAACA -3'	40
CF e17 F	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA GCTGCCAAATAACGATTTCC -3'	40
CF e17 R	5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA AACCAAGGCCATTGATG -3'	40
CF e18 F	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA TTTGGGTTCTGAATGCGTCT -3'	40
CF e18 R	5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA CAGGACTTCAACCCCTCAATCA -3'	41
CF e19 F	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA GACACACTTTGTCCACTTTGC -3'	41
CF e19 R	5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA TGAGTATCGCACATTCAGTGC -3'	42
CF e21 F	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA GGTTCAATTTACGTCTTTGTGC -3'	42
CF e21 R	5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA TGACAGATACACAGTGACCCCTCA -3'	43
CF e27 F	5'-AAGACTCGGCAGCATCTCCA TTCTGTCCCTGCTCTGGTCT -3'	40
CF e27 R	5'-GCGATCGTCACTGTTCTCCA GAGCAAATGTCCCATGTCAA -3'	40

4. táblázat: A *CFTR* non-HP exonjainál használt primerek. A „tageket” szóköz jelöli.

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 szintén a megbízható PicoMaxx enzimet használtuk és az amplikonokat Sanger szekvenálással ellenőriztük. Egy c.2052_2053insA (p.Gln685Thrfs*4) heterozigóta betegől származó reprezentatív minta elektroferogramja a 11. ábrán látható.



11. ábra c.2052_2053insA heterozigóta beteg elektroferogramja

3.4. Mutáció nómenklatúra

A *CFTR* exonok elnevezésénél a legfrissebb ajánlást vettük figyelembe (Ensembl ENSG0000001626). A mutációk esetén a Human Genome Variation Society (HGVS) által megadott cDNS alapú nómenklatúrát használtuk, de zárójelben a protein alapú neveket, ezek hiányában a hagyományos elnevezéseket is feltüntettük [83].

3.5. 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.

3.6. 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 (ld. **3.3.1**). 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 $P < 0,01$).

4. EREDMÉNYEK

4.1. 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 CFTRdele2,3(21kb) allélt tudtunk azonosítani (5,0%). Mivel az első két módszerrel 11 betegtől 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 genotípusát az 5. táblázatban részletezzük, melyből látható, hogy egy páciensnél nem sikerült mindkét CF allélt megtalálni. Emiatt szükség volt MLPA elvégzésére is, ami szintén negatív eredménnyel zárult.

Genotípus	Betegek száma	Genotípus frekvencia
c.1521_1523delCTT +/- c.2052_2053insA +/-	3	7,5%
c.1521_1523delCTT +/- c.302T>G +/-	2	5,0%
c.1624G>T +/- c.2052_2053insA +/-	1	2,5%
c.1521_1523delCTT +/- ?	1	2,5%
c.1521_1523delCTT +/- c.658C>T +/-	1	2,5%
c.3909C>G +/- c.2491G>T +/-	1	2,5%
c.1521_1523delCTT +/- c.1397C>A +/-	1	2,5%
c.1521_1523delCTT +/- c.3276C>G +/-	1	2,5%

5. táblázat: A szekvenálásra és MLPA analízisre került betegek genotípusa.

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 kelet-magyarországi betegeken végzett mutációspektrum felmérés során kimutatott eltérések megoszlását (összesen 12 féle mutáció) németországi [88], romániai [89], ausztriai [90], szlovákiai [91] és korábbi magyarországi [4] vizsgálatok eredményeivel összevetésben a 6. táblázat mutatja be.

<i>CFTR</i> mutáció	Németország 1994 (n=700)	Románia 2008 (n=256)	Ausztria 1997 (n=126)	Szlovákia 2018 (n=550)	Magyarország 1992 (n=60)	Kelet-Magyarország 2011 (n=80)
<i>c.1521_1523delCTT</i> (<i>p.Phe508del</i>)	72,0%	56,3%	74,6%	60,4%	64,3%	70,0%
<i>c.1652G>A</i> (<i>p.Gly551Asp</i>)	1,0%	N/T	1,6%	0,2%	N/T	N/T
<i>c.1657C>T</i> (<i>p.Arg553*</i>)	2,3%	N/T	N/T	1,5%	2,4%	N/T
<i>c.1624G>T</i> (<i>p.Gly542*</i>)	1,4%	3,9%	2,4%	4,7%	1,2%	3,8%
<i>c.489+1G>T</i> (<i>621+1G>T</i>)	0,1%	0,8%	N/T	0,4%	N/T	N/T
<i>c.1585-1G>A</i> (<i>1717-1G>A</i>)	0,9%	N/T	0,8%	0,5%	1,2%	1,3%
<i>c.3846G>A</i> (<i>p.Trp1282*</i>)	0,7%	2,3%	N/T	1,3%	1,2%	N/T
<i>c.3909C>G</i> (<i>p.Asn1303Lys</i>)	2,3%	0,8%	N/T	2,5%	1,2%	5,0%
<i>c.1040G>C</i> (<i>p.Arg347Pro</i>)	1,6%	N/T	1,6%	0,9%	N/A	1,3%
CFTRdele2,3(21kb)	1,5%*	1,6%	2,6%*	3,5%	N/A	5,0%
<i>c.2052_2053insA</i> (<i>p.Gln685Thrfs*4</i>)	0,6%	N/T	N/T	1,8%	N/A	5,0%
<i>c.302T>G</i> (<i>p.Leu101*</i>)	N/T	N/T	N/T	N/T	N/A	2,5%
<i>c.658C>T</i> (<i>p.Gln220*</i>)	N/T	N/T	N/T	N/T	N/A	1,3%
<i>c.1397C>G</i> (<i>p.Ser466*</i>)	N/T	N/T	N/T	0,2%	N/A	1,3%
<i>c.2491G>T</i> (<i>p.Glu831*</i>)	N/T	N/T	N/T	0,2%	N/A	1,3%
<i>c.3276C>A</i> (<i>p.Tyr1092*</i>)	0,3%	N/T	N/T	N/T	N/A	1,3%

6. táblázat *CFTR* mutációk gyakoriságának összehasonlítása néhány közép-európai ország (Németország [88], Románia [89], Ausztria [90], Szlovákia [91], Magyarország [4]) adataival. N/A: nem analizált; N/T: nem talált, *Dork és mtsai által közölt frekvenciák (2000). Az Elucigene CF29v2 kittel kimutatható eltérések dőlt betűvel szedve, a mutációk hagyományos elnevezései a HGVS nómenklatúra után zárójelben láthatók.

A mutációspektrum felmérése az ajánlásoknak megfelelően kaszkád rendszerben zajlott [83] [92]. Az első vonalbeli genetikai teszt a betegség hátterében álló eltérések 81,25%-át tárta fel. Ha ezt kiegészítettük a CFTRdele2,3(21kb) vizsgálatával, a panel érzékenysége 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 genetikai analízis különböző szintjeinek hatékonyságát a 7. táblázat szemlélteti.

Mutációsűrés szintjei	Detektált CF allélok	
	Száma	%
Elucigene CF 29 v2 assay	65	81,25%
Elucigene CF 29 v2 assay + CFTRdele2,3(21 kb)	69	86,25%
Elucigene CF 29 v2 assay + CFTRdele2,3(21 kb) + c.2052_2053insA + c.302T>G	75	93,75%
Az összes <i>CFTR</i> exon szekvenálása	79	98,75%

7. táblázat A szűrés szintjeinek növekvő hatékonysága a kelet-magyarországi régióban.

4.2. 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 (ld. 3.2.2).

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.3846 G>A (p.Trp1282*), c.3909 C>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.1624 G>T (p.Gly542*), c.3276 C>A (p.Tyr1092*), c.489+1G>T (621+1G>T) és c.2012delT (p.Leu671*). A 45 betegen elvégzett felmérés során kimutatott eltérések megoszlása olasz [93], cseh [94], lengyel [95] és a fentebb bemutatott korábbi kelet-magyarországi vizsgálat eredményeivel összehasonlításban a 8. táblázatban látható.

HGVS nómenklatúra	Közép-Olaszország 2004 (n=580)	Kelet-Magyarország 2011 (n=80)	Cseh Köztársaság 2013 (n=1200)	Lengyelország 2014 (n=1476)	Magyarország 2014 (n=90)
c.1521_1523delCTT	56,4%	70,0%	67,4%	54,5%	53,3%
c.3846G>A	2,6%	0,0%	0,6%	0,6%	4,4%
c.3909C>G	8,8%	5,0%	2,4%	1,2%	4,4%
c.54-5940_273+10250de121kb	N/A	5,0%	5,8%	4,5%	4,4%
c.2052_2053insA	0,0%	5,0%	0,4%	1,0%	4,4%
c.1624G>T	7,2%	3,75%	2,0%	1,7%	2,2%
c.489+1G>T	1,2%	0,0%	0,4%	0,3%	2,2%
c.3276C>A	0,0%	1,25%	0,0%	0,1%	2,2%
c.2012deIT	0,0%	0,0%	0,9%	1,8%	2,2%
c.302T>G	0,0%	2,5%	0,0%	0,1%	1,1%
c.1397C>G	0,0%	1,25%	0,0%	0,1%	1,1%
c.53+1G>T	0,0%	0,0%	0,2%	0,0%	1,1%
c.1394C>T	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,1%
c.1037_1038insA	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,1%
c.2051_2052delAAinsG	0,3%	0,0%	0,1%	0,7%	1,1%
c.2657+5G>A	0,3%	0,0%	0,5%	0,0%	1,1%
c.3717+12191C>T	0,0%	0,0%	1,7%	3,9%	1,1%
c.215C>A	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,1%
c.3454G>C	0,0%	0,0%	0,0%	0,1%	1,1%
c.3731G>A	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,1%
c.1727G>C	0,0%	0,0%	0,0%	0,3%	1,1%
c.3302T>A	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,1%
c.2591_2592deITT	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,1%
c.3822G>A	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,1%
c.2002C>T	0,0%	0,0%	0,0%	0,2%	1,1%
c.325_327deITATinsG	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	1,1%
c.54-5811_164+2186del273+6780_273+6961inv	N/A	0,0%	0,2%	0,0%	1,1%

8. táblázat Az országos betegcsoportban detektált mutációk gyakorisága olasz [93], cseh [94], lengyel [95] és korábbi kelet-magyarországi eredményekkel összehasonlításban.

N/A: nem analizált

Az eredmények kiértékelése során két, addig az adatbázisokban - pl. Human Gene Mutation Database [10] vagy 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 [96] 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 öröklésmentű 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).

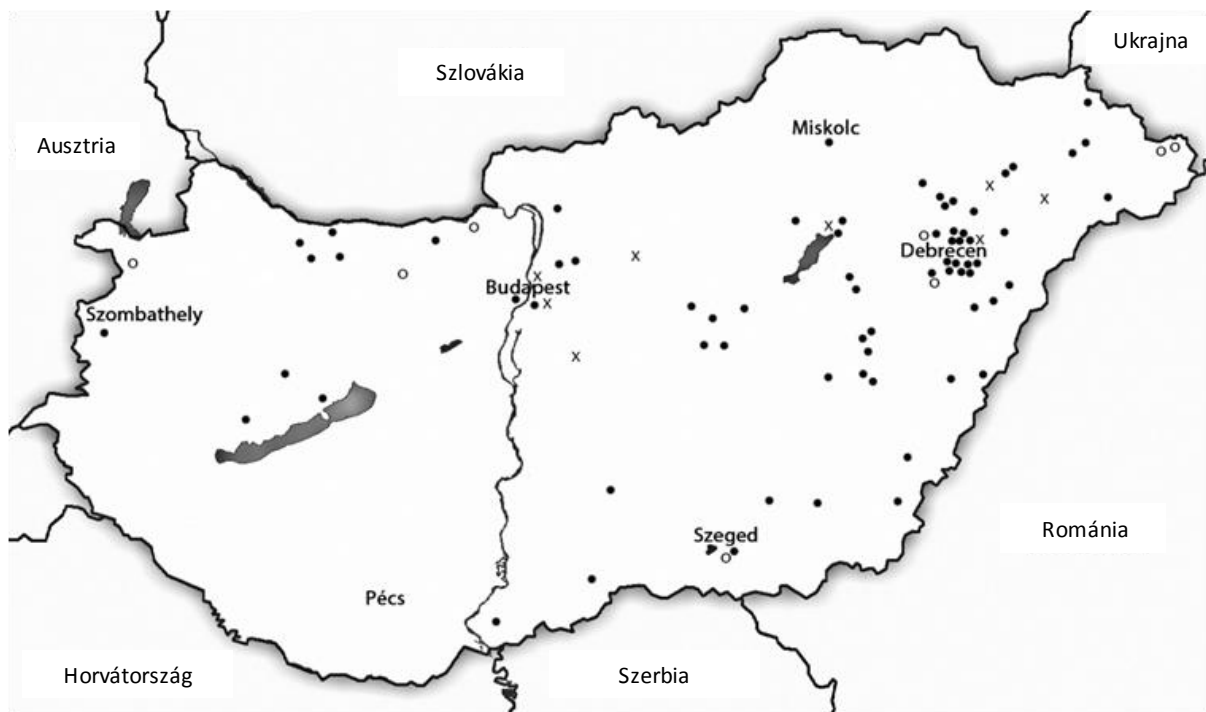
4.3. A magyarországi mutációkat felmérő vizsgálatok egyesített eredményei

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 egyesített mutációs spektrumot és a detektálási kaszkád egyes szintjeinek hatékonyságát a 9. táblázat foglalja össze.

Exon/ intron	HGVS nómenklatúra	Protein név / hagyományos név	Allélok száma (n=170)	Allélok frekvenciaja	Mutáció <i>in trans</i>	Detektálási szint	
e11	c.1521_1523delCTT	p.Phe508del	104	61,2%	változó CF mutációk	Elucigene CF29v.2 75,9%	
e23	c.3846G>A	p.Trp1282*	4	2,4%	változó CF mutációk		
e24	c.3909C>G	p.Asn1303Lys	8	4,7%	változó CF mutációk		
e12	c.1624G>T	p.Gly542*	5	2,9%	változó CF mutációk		
i11	c.1585-1G>A	1717-1G>A	1	0,6%	c.1521_1523delCTT		
e8	c.1040G>C	p.Arg347Pro	1	0,6%	c.1624G>T		
e14	c.2051_2052delAAinsG	p.Lys684Serfs*38	1	0,6%	c.3454G>C		
i16	c.2657+5G>A	2789+5G>A	1	0,6%	c.489+1G>T		
i4	c.489+1G>T	621+1G>T	2	1,2%	c.1521_1523delCTT, c.2657+5G>A		
e21	c.3454G>C	p.Asp1152His	1	0,6%	c.2657+5G>A		
i22	c.3717+12191C>T	3849+10kbC>T	1	0,6%	c.1521_1523delCTT		
i1-i3	c.54- 5940_273+10250del21kb	CFTRdele2,3(21kb)	8	4,7%	változó CF mutációk		"Szláv PCR" 4,7%
e14	c.2052_2053insA	p.Gln685Thrfs*4	8	4,7%	változó CF mutációk	e14 szekvenálása 6,5%	
e14	c.2012delTT	p.Leu671*	2	1,2%	c.1521_1523delCTT		
e14	c.2002C>T	p.Arg668Cys	1	0,6%	c.1727G>C		
e20	c.3276C>A	p.Tyr1092*	3	1,8%	c.1521_1523delCTT	Teljes kódoló régió szekvenálása 11,8%	
e4	c.302T>G	p.Leu101*	3	1,8%	c.1521_1523delCTT, c.2591_2592delTT		
e11	c.1397C>G	p.Ser466*	2	1,2%	c.1521_1523delCTT		
i1	c.53+1G>T	185+1G>T	1	0,6%	c.3909C>G		
e11	c.1394C>T	p.Thr465Ile	1	0,6%	c.1521_1523delCTT		
e8	c.1037_1038insA	p.Leu346Hisfs*17	1	0,6%	c.1521_1523delCTT		
e3	c.215C>A	p.Ala72Asp	1	0,6%	c.3909C>G		
e15	c.2491G>T	p.Glu831*	1	0,6%	c.3909C>G		
e6	c.658C>T	p.Gln220*	1	0,6%	c.1521_1523delCTT		
e23	c.3731G>A	p.Gly1244Glu	1	0,6%	c.1521_1523delCTT		
e13	c.1727G>C	p.Gly576Ala	1	0,6%	c.2002C>T		
e20	c.3302T>A	p.Met1101Lys	1	0,6%	c.1521_1523delCTT		
e15	c.2591_2592delTT	p.Ile864Metfs*31	1	0,6%	c.302T>G		
e23	c.3822G>A	p.Trp1274*	1	0,6%	c.1521_1523delCTT		
e4	c.325_327delTTATinsG	p.Tyr109Glyfs*4	1	0,6%	CFTRdele2,3(21kb)		
i1-i2	c.54-5811_164+2186del273+ 6780_273+6961inv	CFTRdele2	1	0,6%	c.1521_1523delCTT		MLPA 0,6%

9. táblázat Allélfrekvenciák és a detektálási arányok alakulása az egyesített betegcsoportban (n=85). A két újonnan leírt mutáció vastag szedéssel kiemelve látható.

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 országrészben fordul elő, ami a c.2052_2053insA esetén méginkább az északkeleti régióra korlátozódik. Ez utóbbi a mutáció Nyugat-Ukrajnában leírt gyakoriságát tekintve már nem is annyira meglepő [97]. Megfigyeléseinket a 12. ábra szemlélteti. Természetesen ez annak a ténynek is köszönhető, hogy a vizsgált minták legnagyobb része Magyarország északi és keleti részéből érkezett.



12. ábra Az összevont betegcsoportban talált mutációk földrajzi eloszlása.

Jelmagyarázat: o – CFTRdele2,3(21kb) x – c.2052_2053insA • – egyéb mutációk

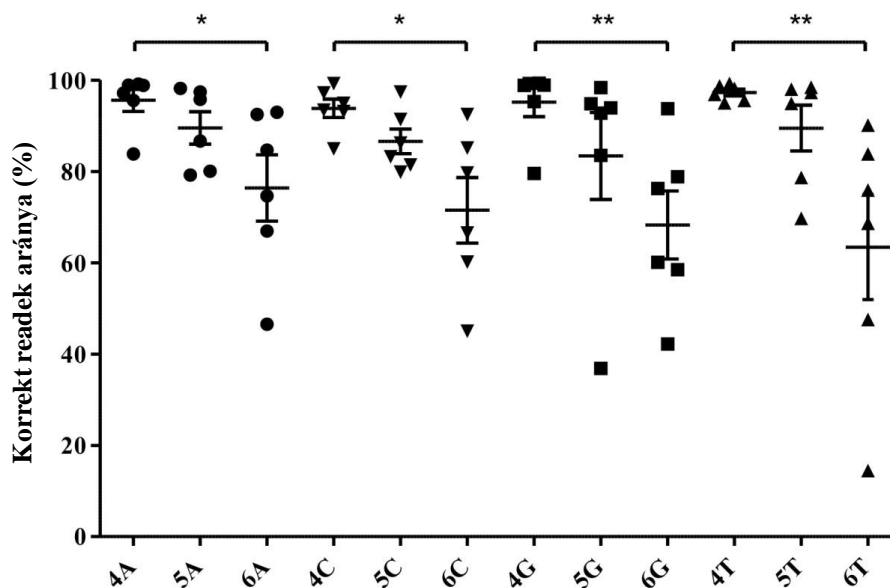
4.4. Az új generációs szekvenálási kísérletek eredményei

4.4.1. 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. A 8. és 9. ábrákon egy-egy reprezentatív elektroferogram segítségével mutatjuk be, hogy 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.

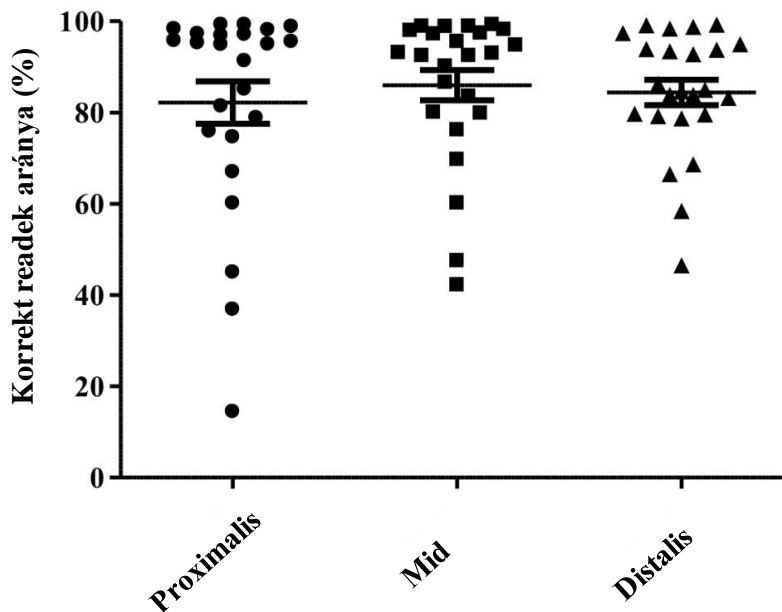
4.4.2. A homopolimer tartalmú plazmidok analízise

A célzott mutagenezissel létrehozott 4-mer, 5-mer és 6-mer HP szakaszokat tartalmazó plazmidok piroszekvenálásakor az átlagos lefedettség 479 ± 145 volt. Itt egyértelmű negatív korrelációt figyeltünk meg a vizsgálandó HP hossza és a leolvasás pontossága között (13. ábra).



13. ábra Homopolimer szakaszok detektálási hatékonysága a plazmid rendszerben. Az olvasás pontosságát a korrekt readek aránya mutatja. (Kruskal-Wallis teszt, majd Dunn's Multiple Comparison teszt, * $P < 0,05$ és ** $P < 0,01$)

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 ampikonok 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 (14. ábra).



14. ábra A szekvenáló primer és a HP távolsága nem befolyásolja a detektálás pontosságát (a korrekt readek arányát). A Kruskal-Wallis teszttel és azt követő Dunn's Multiple Comparison teszttel nem sikerült szignifikáns különbséget kimutatnunk az egyes lokalizációk között.

4.4.3. A humán DNS minták piroszekvenálása

A *CFTR* gén kódoló régiói és az exon-intron határok piroszekvenálása ismert mutációstípusú CF betegek DNS mintáin történt meg. A mérés során az átlagos lefedettség 263 ± 178 read volt, az alacsony olvasási számmal rendelkező ampliconok (<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. Az azonosított mutációk listája a 10. táblázatban található.

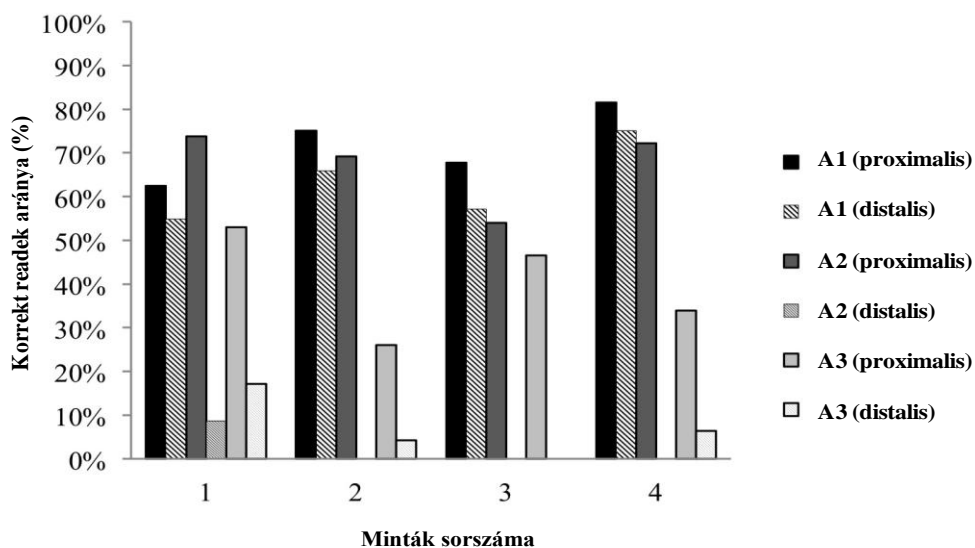
Lokalizáció	cDNS pozíció	Protein név / hagyományos név	Mutáció típusa
i6	c.654-10delAGTT	786-10delAGTT	Splice site
i6	c.743+40A>G	875+40A/G	Splice site
i7	c.869+11C>T	1001+11C>T	Splice site
e8	c.926C>G	p.Ala309Gly	Misszensz
e11	c.1394C>T	p.Thr465Ile	Misszensz
e11	c.1397C>G	p.Ser466*	Nonszensz
e11	c.1521_1523delCTT	p.Phe508del	In-frame deléción*
e12	c.1624G>T	p.Gly542*	Nonszensz*
e14	c.2012deIT	p.Leu671*	Frameshift deléción
e14	c.2051_2052delAAinsG	p.Lys684Serfs*38	Frameshift insdel*
e14	c.2052_2053insA	p.Gln685Thrfs*4	Frameshift inzerción
e14	c.2052delA	p.Lys684Asnfs*38	Frameshift deléción
e15	c.2562T>G	2694T/G	Szinoním
i16	c.2657+5G>A	2789+5G>A	Splice site*
e17	c.2856G>C	p.Met952Ile	Misszensz
e21	c.3454G>C	p.Asp1152His	Misszensz*
e23	c.3846G>A	p.Trp1282*	Nonszensz*
e27	c.4389G>A	4521G/A	Szinoním

10. táblázat A piroszekvenálással azonosított kis skálájú eltérések és azok típusai. (A *-gal jelölt mutációk kimutatására az Elucigene CF29v2 assay is képes.)

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.

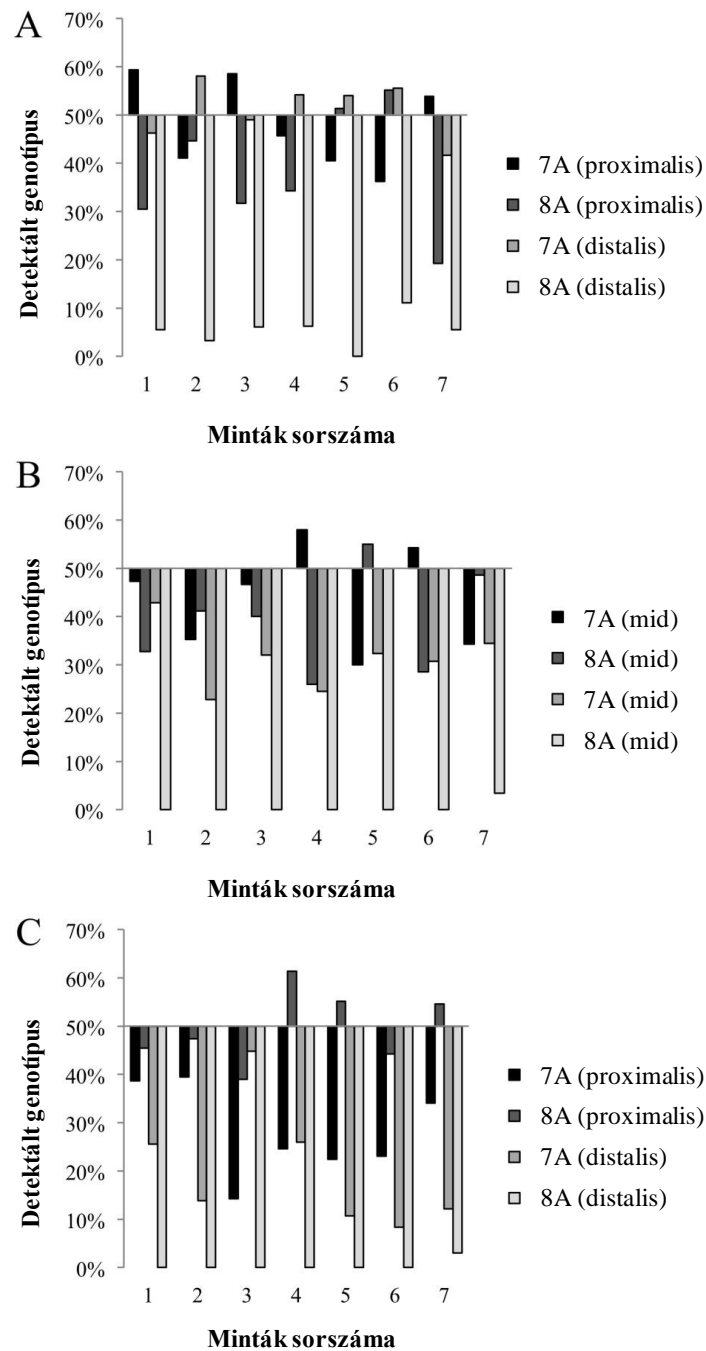
A problémás régiót további elemzésnek vetettük alá először négy vad típusú minta felhasználásával. A kritikus génszakasz amplifikációja a korábban leírtaknak megfelelően három primerpár segítségével történt (A1, A2, A3), igen változó eredménnyel. A readeket

mindkét irányból külön kiértékelve előfordult több olyan eset is, ahol nem vagy alig kaptunk a 7A-nak megfelelő jelet, míg más ampliconokban ez a 80%-ot is meghaladta (15. ábra).



15. ábra A 14. exonban lévő c.2046_2052 vizsgálata négy vad típusú mintán. Látható, hogy a piroszekvenálás igen változó hatékonysággal detektálta az elvárt 7A-nak megfelelő szignált és az is, hogy a primer és a HP szakasz közötti távolság itt sem befolyásolja a HP meghatározás pontosságát.

Végül hét olyan compound 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 amplicont 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 (16. ábra B és C). 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 (16. ábra A).



16. ábra A 14. exonban lévő c.2046_2052 régió vizsgálata hét c.2052_2053insA (p.Gln685Thrfs*4) heterozigóta beteg mintáin, háromféle amplikont szekvenálva (A, B és C). A 7-merek és 8-merek detektálási arányát az összes read százalékában fejeztük ki (teoretikusan 50%-50%).

5. 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 és/vagy heterozigóta szűrés genetikai moduljának alapjául is szolgálhat.

5.1. A kelet-magyarországi CF mutációk

Ez a vizsgálat a Debreceni Egyetemen vizsgált CF betegek (minták) egy részének bevonásával, részint retrospektíve történt. A 6. táblázatban bemutatott eredmények sok éves hiányt igyekeztek pótolni, hiszen a hazai mutációspektrumra vonatkozó legfrissebb közlemények is az 1990-es évek közepén születtek [3-5]. Figyelembe véve korábbi európai és észak-amerikai populációkat leíró genetikai tanulmányok eredményeit is [98-101] 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 [83, 92]: a leggyakoribb eltérések panelben történő vizsgálatát génszekvenálás és nagyobb genomiális átrendeződések keresése követte [102]. 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 [103-105], 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 [9, 11].

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 [84]. 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 [97], 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 [97]. Érdekes lenne a jövőben a kelet-szlovákiai, délkelet-lengyelországi, fehéroroszországi és északnyugat-romániai mutációs spektrum felmérése és összesítése is, amelyek hozzájárulhatnak 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.

5.2. 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, „kaszkád” megközelítést alkalmaztunk, melynek részletes ismertetése a Módszerek fejezetben található. Ezzel összesen 90 db eltérést azonosítottunk 27 különböző mutáció formájában, melyeket a 8. táblázat tartalmazza. 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 az alábbiak támasztják alá: a c.1037_1038insA az olvasási keret eltolódását okozza, aminek következtében 17 aminosavval később egy korai stop kodon keletkezik (p.Leu346Hisfs*17). 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, melyet a 9. táblázat mutat be (n=85). Itt az egyes vizsgálati szintek detektálási hatékonyságát is feltüntettük. 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 [106]. 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 génátrendeződésre: 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 [107, 108].

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 szekvenanciaanalízise 6,5%-os, a CFTRdele2,3(21kb) vizsgálata 4,7%-os javulást tudott hozzatenni. A fentiekhez az MLPA 0,6%-kal, a CFTR további exonjainak szekvenálása 11,8%-kal járult hozzá. Összességében az előzetesen kiválogatott beteganyagban a kaskád-szűrés 99,5%-os érzékenységet produkált.

Az Eredmények fejezet 8. ábráján látható, hogy a „szláv deléció” és a c.2052_2053insA területi halmazódást mutatott. A CFTRdele2,3(21kb) kizárólag az északi országrészben fordult elő, a „galíciai” c.2052_2053insA pedig elsősorban az északkeleti régióban koncentrált. 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 [84, 97], 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 [12]. 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 [109, 110]. 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 [12].

5.3. 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 [111]. 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 tényezők gyors és hatékony kivizsgálását teszik lehetővé [112]. 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 [113].

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 [114], 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 (13. ábra). 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. Ahogy a 10. ábrán is látható, 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 amplitonok 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 heterozigóta-

szűrésben 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), ezt a 10. táblázatban foglaltuk össze. Noha a readok 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-mert (7T) a readok 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 mikrokozonyezetét a DNS szekvenciában, de akár a szekvenáló gyöngyök eltérő elhelyezkedését is (centrálisan vs. perifériás részekben) a mérés során használt PicoTiter lemezekben [115, 116].

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 (p.Lys684Asnfs*38) 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. Az 12. ábrán szereplő, 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.

6. 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.

7. SUMMARY

The dissertation focuses on two topics: the prevalence of cystic fibrosis causing mutations in Hungary and the development of a modern molecular genetic diagnostic approach to the disease.

The Hungarian mutation spectrum was determined in multiple steps. This part of the study included 85 patients altogether. We carried out the investigations in a cascade manner, which was continuously fine-tuned during the process. The final form of our CF mutation analysis was the following: Elucigene CF29v2 assay (targeted sequencing in case of any positive result except for c.1521_1523delCTT) combined with the examination of the CFTRdele2,3(21kb) mutation, sequencing of e4, e6, e11, e14, e15 and e20, followed by sequencing of the remaining *CFTR* exons and finally MLPA analysis of the gene.

During the investigation 169/170 CF alleles were identified, carrying 31 different pathogenic variants. Among these were included two newly found mutations (c.1394C>T and c.1037_1038insA), which are likely to be CF-causing as well. When depicting the geographical distribution of the mutations, we observed distinctive localisation patterns, which have been described in the literature previously.

In the second part of the study we investigated the analytical performance of a pyrosequencing-based NGS instrument. At first, the homopolymer-detecting capabilities were tested using a plasmid system. The results showed decreasing reliability when detecting 5- and 6-mers. Our hypothesis, that the initiation of the sequencing reaction provides more accurate HP detection was not supported by the results.

Thereafter 17 human DNA samples originating from CF patients were examined. We performed the NGS analysis of the *CFTR* gene using different amplification settings. In light of the obtained data, it can be stated that the instrument is applicable in the molecular genetic testing of CF patients, but a few cumbersome alterations must be verified by Sanger sequencing.

At last we think, that our findings may contribute to the laboratory diagnostics of cystic fibrosis and the introduction of the newborn/carrier screening in Hungary in merits.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Hegyi, P., et al., *CFTR: A New Horizon in the Pathomechanism and Treatment of Pancreatitis*. Rev Physiol Biochem Pharmacol, 2016. **170**: p. 37-66.
2. Canadian, C.F.F. *Canadian Cystic Fibrosis Patient Data Registry Report*. 2007; Available from: <http://www.cysticfibrosis.ca/>.
3. Nemeth, K., et al., *Analysis of five CFTR mutations in Hungarian cystic fibrosis patients*. J Inherit Metab Dis, 1996. **19**: p. 378.
4. Nemeti, M., et al., *The occurrence of various non-delta F508 CFTR gene mutations among Hungarian cystic fibrosis patients*. Hum Genet, 1992. **89**: p. 245-6.
5. Nemeti, M., et al., *Molecular analysis of cystic fibrosis in the Hungarian population*. Hum Genet, 1991. **87**: p. 511-2.
6. *ECFS Patient Registry*. (2017. november 1. frissítés alapján); Available from: <https://www.ecfs.eu/ecfspr>.
7. Csecsemő-, é.G.S.K., *Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja a Cystás fibrosisról* Magyar Közlöny, 2008.
8. Stoltz, D.A., *Origins of cystic fibrosis lung disease*. N Engl J Med, 2015. **372**: p. 1574-5.
9. *CFTR2 homepage*. (2017. december 8. frissítés alapján); Available from: <https://www.cftr2.org>.
10. *The Human Gene Mutation Database*. 2017; Available from: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.
11. *Cystic Fibrosis Mutation Database (CFTR1)*. 2010; Available from: <http://genet.sickkids.on.ca>.
12. Castellani, C., et al., *ECFS best practice guidelines: the 2018 revision*. J Cyst Fibros, 2018. **17**: p. 153-78.
13. Sosnay, P.R., et al., *Evaluation of the disease liability of CFTR variants*. Methods Mol Biol, 2011. **742**: p. 355-72.
14. Sosnay, P.R., et al., *Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene*. Nat Genet, 2013. **45**: p. 1160-7.

15. Goubau, C., et al., *Phenotypic characterisation of patients with intermediate sweat chloride values: towards validation of the European diagnostic algorithm for cystic fibrosis*. Thorax, 2009. **64**: p. 683-91.
16. Comeau, A.M., et al., *Population-based newborn screening for genetic disorders when multiple mutation DNA testing is incorporated: a cystic fibrosis newborn screening model demonstrating increased sensitivity but more carrier detections*. Pediatrics, 2004. **113**: p. 1573-81.
17. Currier, R.J., et al., *Genomic sequencing in cystic fibrosis newborn screening: what works best, two-tier predefined CFTR mutation panels or second-tier CFTR panel followed by third-tier sequencing?* Genet Med, 2017. **19**: p. 1159-63.
18. Kharrazi, M., et al., *Newborn Screening for Cystic Fibrosis in California*. Pediatrics, 2015. **136**: p. 1062-72.
19. Rock, M.J., et al., *Newborn screening for cystic fibrosis in Wisconsin: nine-year experience with routine trypsinogen/DNA testing*. J Pediatr, 2005. **147**: p. S73-7.
20. Sommerburg, O., et al., *Five years of experience with biochemical cystic fibrosis newborn screening based on IRT/PAP in Germany*. Pediatr Pulmonol, 2015. **50**: p. 655-64.
21. Wiencek, J.R., et al., *Advances in the Diagnosis and Management of Cystic Fibrosis in the Genomic Era*. Clin Chem, 2018. **64**: p. 898-908.
22. De Boeck, K., et al., *Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms*. Thorax, 2006. **61**: p. 627-35.
23. Farrell, P.M., et al., *Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report*. J Pediatr, 2008. **153**: p. S4-S14.
24. Kerem, E., et al., *Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus*. J Cyst Fibros, 2005. **4**: p. 7-26.
25. Farrell, P.M., et al., *Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation*. J Pediatr, 2017. **181S**: p. S4-S15 e1.
26. Villanueva, G., et al., *Diagnosis and management of cystic fibrosis: summary of NICE guidance*. BMJ, 2017. **359**: p. j4574.
27. Feldmann, D., et al., *CFTR genotypes in patients with normal or borderline sweat chloride levels*. Hum Mutat, 2003. **22**: p. 340.

28. Audrezet, M.P., et al., *Comprehensive CFTR gene analysis of the French cystic fibrosis screened newborn cohort: implications for diagnosis, genetic counseling, and mutation-specific therapy*. Genet Med, 2015. **17**: p. 108-16.
29. MacKenzie, T., et al., *Longevity of patients with cystic fibrosis in 2000 to 2010 and beyond: survival analysis of the Cystic Fibrosis Foundation patient registry*. Ann Intern Med, 2014. **161**: p. 233-41.
30. Sanders, D.B., et al., *Failure to recover to baseline pulmonary function after cystic fibrosis pulmonary exacerbation*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **182**: p. 627-32.
31. Langton Hewer, S.C., et al., *Antibiotic strategies for eradicating Pseudomonas aeruginosa in people with cystic fibrosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2014: p. CD004197.
32. Moore, J.E., et al., *Long-term antibiotic treatment of patients with cystic fibrosis: a commensal organism's view*. Br J Biomed Sci, 2009. **66**: p. 203-5.
33. Ramsey, B.W., et al., *Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis*. Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study Group. N Engl J Med, 1999. **340**: p. 23-30.
34. Saiman, L., et al., *Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with Pseudomonas aeruginosa: a randomized controlled trial*. JAMA, 2003. **290**: p. 1749-56.
35. Rosenfeld, M., et al., *Pseudomonas acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management*. Curr Opin Pulm Med, 2003. **9**: p. 492-7.
36. Deacon, J., et al., *Antimicrobial efficacy of tobramycin polymeric nanoparticles for Pseudomonas aeruginosa infections in cystic fibrosis: formulation, characterisation and functionalisation with dornase alfa (DNase)*. J Control Release, 2015. **198**: p. 55-61.
37. Papayannopoulos, V., et al., *Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving DNase therapy*. PLoS One, 2011. **6**: p. e28526.
38. Polverino, E., et al., *The Role of Neutrophil Elastase Inhibitors in Lung Diseases*. Chest, 2017. **152**: p. 249-62.
39. Battistini, A., et al., *[Respiratory physio-kinesitherapy in cystic fibrosis: the parents' viewpoint]*. Pediatr Med Chir, 1988. **10 Suppl 1**: p. 1-14.

40. Quon, B.S., et al., *New and emerging targeted therapies for cystic fibrosis*. *BMJ*, 2016. **352**: p. i859.
41. Ramsey, B.W., et al., *A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation*. *N Engl J Med*, 2011. **365**: p. 1663-72.
42. Brodlie, M., et al., *Targeted therapies to improve CFTR function in cystic fibrosis*. *Genome Med*, 2015. **7**: p. 101.
43. Ledford, H., *Drug bests cystic-fibrosis mutation*. *Nature*, 2012. **482**: p. 145.
44. Clancy, J.P., et al., *Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation*. *Thorax*, 2012. **67**: p. 12-8.
45. Van Goor, F., et al., *Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**: p. 18843-8.
46. Sermet-Gaudelus, I., et al., *Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. **182**: p. 1262-72.
47. Elborn, J.S., et al., *Response to: 'Lumacaftor/ivacaftor for patients homozygous for Phe508del-CFTR: should we curb our enthusiasm?' by Jones and Barry*. *Thorax*, 2016. **71**: p. 185-6.
48. Taylor-Cousar, J.L., et al., *Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del*. *N Engl J Med*, 2017. **377**: p. 2013-23.
49. Wainwright, C.E., et al., *Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR*. *N Engl J Med*, 2015. **373**: p. 1783-4.
50. Lopes-Pacheco, M., *CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis*. *Front Pharmacol*, 2016. **7**: p. 275.
51. Burney, T.J., et al., *Gene therapy for the treatment of cystic fibrosis*. *Appl Clin Genet*, 2012. **5**: p. 29-36.
52. Schwank, G., et al., *Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients*. *Cell Stem Cell*, 2013. **13**: p. 653-8.
53. Metzker, M.L., *Sequencing technologies - the next generation*. *Nat Rev Genet*, 2010. **11**: p. 31-46.

54. Hyman, E.D., *A new method of sequencing DNA*. Anal Biochem, 1988. **174**: p. 423-36.
55. Ronaghi, M., et al., *A sequencing method based on real-time pyrophosphate*. Science, 1998. **281**: p. 363, 5.
56. Shendure, J., et al., *Next-generation DNA sequencing*. Nat Biotechnol, 2008. **26**: p. 1135-45.
57. Huse, S.M., et al., *Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing*. Genome Biol, 2007. **8**: p. R143.
58. Balzer, S., et al., *Systematic exploration of error sources in pyrosequencing flowgram data*. Bioinformatics, 2011. **27**: p. i304-9.
59. Shendure, J.A., et al., *Overview of DNA sequencing strategies*. Curr Protoc Mol Biol, 2008. **Chapter 7**: p. Unit 7 1.
60. da Fonseca, P.G., et al., *Empirical assessment of sequencing errors for high throughput pyrosequencing data*. BMC Res Notes, 2013. **6**: p. 25.
61. Templeton, A.R., et al., *Recombinational and mutational hotspots within the human lipoprotein lipase gene*. Am J Hum Genet, 2000. **66**: p. 69-83.
62. Brahmachari, S.K., et al., *Polypurine/polypyrimidine sequences as cis-acting transcriptional regulators*. Gene, 1997. **190**: p. 17-26.
63. Dechering, K.J., et al., *Distinct frequency-distributions of homopolymeric DNA tracts in different genomes*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**: p. 4056-62.
64. Denver, D.R., et al., *Abundance, distribution, and mutation rates of homopolymeric nucleotide runs in the genome of Caenorhabditis elegans*. J Mol Evol, 2004. **58**: p. 584-95.
65. Toth, G., et al., *Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis*. Genome Res, 2000. **10**: p. 967-81.
66. Nelson, H.C., et al., *The structure of an oligo(dA).oligo(dT) tract and its biological implications*. Nature, 1987. **330**: p. 221-6.
67. Sen, D., et al., *Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis*. Nature, 1988. **334**: p. 364-6.
68. Denver, D.R., et al., *High direct estimate of the mutation rate in the mitochondrial genome of Caenorhabditis elegans*. Science, 2000. **289**: p. 2342-4.

69. Kunkel, T.A., *The mutational specificity of DNA polymerase-beta during in vitro DNA synthesis. Production of frameshift, base substitution, and deletion mutations.* J Biol Chem, 1985. **260**: p. 5787-96.
70. Tran, H.T., et al., *Hypermutable of homonucleotide runs in mismatch repair and DNA polymerase proofreading yeast mutants.* Mol Cell Biol, 1997. **17**: p. 2859-65.
71. Seneca, S., et al., *Analysis of the whole mitochondrial genome: translation of the Ion Torrent Personal Genome Machine system to the diagnostic bench?* Eur J Hum Genet, 2015. **23**: p. 41-8.
72. Knoppers, B.M., et al., *Return of genetic testing results in the era of whole-genome sequencing.* Nat Rev Genet, 2015. **16**: p. 553-9.
73. Quince, C., et al., *Removing noise from pyrosequenced amplicons.* BMC Bioinformatics, 2011. **12**: p. 38.
74. Bragg, L., et al., *Fast, accurate error-correction of amplicon pyrosequences using Acacia.* Nat Methods, 2012. **9**: p. 425-6.
75. Saha, S., et al., *EC: an efficient error correction algorithm for short reads.* BMC Bioinformatics, 2015. **16 Suppl 17**: p. S2.
76. Wirawan, A., et al., *HECTOR: a parallel multistage homopolymer spectrum based error corrector for 454 sequencing data.* BMC Bioinformatics, 2014. **15**: p. 131.
77. Gaspar, J.M., et al., *FlowClus: efficiently filtering and denoising pyrosequenced amplicons.* BMC Bioinformatics, 2015. **16**: p. 105.
78. Lee, B., et al., *DUDE-Seq: Fast, flexible, and robust denoising for targeted amplicon sequencing.* PLoS One, 2017. **12**: p. e0181463.
79. Mysara, M., et al., *NoDe: a fast error-correction algorithm for pyrosequencing amplicon reads.* BMC Bioinformatics, 2015. **16**: p. 88.
80. Yang, X., et al., *A survey of error-correction methods for next-generation sequencing.* Brief Bioinform, 2013. **14**: p. 56-66.
81. Zeng, F., et al., *PyroHMMsnp: an SNP caller for Ion Torrent and 454 sequencing data.* Nucleic Acids Res, 2013. **41**: p. e136.
82. Feliubadalo, L., et al., *Next-generation sequencing meets genetic diagnostics: development of a comprehensive workflow for the analysis of BRCA1 and BRCA2 genes.* Eur J Hum Genet, 2013. **21**: p. 864-70.

83. Dequeker, E., et al., *Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders--updated European recommendations*. Eur J Hum Genet, 2009. **17**: p. 51-65.
84. Dork, T., et al., *Characterization of a novel 21-kb deletion, CFTRdele2,3(21 kb), in the CFTR gene: a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe*. Hum Genet, 2000. **106**: p. 259-68.
85. Zielenski, J., et al., *Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene*. Genomics, 1991. **10**: p. 214-28.
86. Tomaiuolo, R., et al., *Epidemiology and a novel procedure for large scale analysis of CFTR rearrangements in classic and atypical CF patients: a multicentric Italian study*. J Cyst Fibros, 2008. **7**: p. 347-51.
87. Abou Tayoun, A.N., et al., *A comprehensive assay for CFTR mutational analysis using next-generation sequencing*. Clin Chem, 2013. **59**: p. 1481-8.
88. Dork, T., et al., *Detection of more than 50 different CFTR mutations in a large group of German cystic fibrosis patients*. Hum Genet, 1994. **94**: p. 533-42.
89. Frentescu, L., et al., *The study of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in a group of patients from Romania*. J Cyst Fibros, 2008. **7**: p. 423-8.
90. Stuhmann, M., et al., *Detection of 100% of the CFTR mutations in 63 CF families from Tyrol*. Clin Genet, 1997. **52**: p. 240-6.
91. Soltysova, A., et al., *Comprehensive genetic study of cystic fibrosis in Slovak patients in 25 years of genetic diagnostics*. Clin Respir J, 2018. **12**: p. 1197-206.
92. Castellani, C., et al., *Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice*. J Cyst Fibros, 2008. **7**: p. 179-96.
93. D'Apice, M.R., et al., *Molecular analysis using DHPLC of cystic fibrosis: increase of the mutation detection rate among the affected population in Central Italy*. BMC Med Genet, 2004. **5**: p. 8.
94. Krenkova, P., et al., *Distribution of CFTR mutations in the Czech population: positive impact of integrated clinical and laboratory expertise, detection of novel/de novo alleles and relevance for related/derived populations*. J Cyst Fibros, 2013. **12**: p. 532-7.
95. Zietkiewicz, E., et al., *CFTR mutations spectrum and the efficiency of molecular diagnostics in Polish cystic fibrosis patients*. PLoS One, 2014. **9**: p. e89094.

96. Richards, S., et al., *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*. Genet Med, 2015. **17**: p. 405-24.
97. Makukh, H., et al., *A high frequency of the Cystic Fibrosis 2184insA mutation in Western Ukraine: genotype-phenotype correlations, relevance for newborn screening and genetic testing*. J Cyst Fibros, 2010. **9**: p. 371-5.
98. Heath, S.C., et al., *Investigation of the fine structure of European populations with applications to disease association studies*. Eur J Hum Genet, 2008. **16**: p. 1413-29.
99. Lao, O., et al., *Correlation between genetic and geographic structure in Europe*. Curr Biol, 2008. **18**: p. 1241-8.
100. Li, W., et al., *Understanding the population structure of North American patients with cystic fibrosis*. Clin Genet, 2011. **79**: p. 136-46.
101. Nelis, M., et al., *Genetic structure of Europeans: a view from the North-East*. PLoS One, 2009. **4**: p. e5472.
102. Verlingue, C., et al., *Complete screening of mutations in the coding sequence of the CFTR gene in a sample of CF patients from Russia: identification of three novel alleles*. Hum Mutat, 1995. **5**: p. 205-9.
103. Bobadilla, J.L., et al., *Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations-- correlation with incidence data and application to screening*. Hum Mutat, 2002. **19**: p. 575-606.
104. Devoto, M., *Origin and diffusion of the major CF mutation in Europe. The European Working Group on CF Genetics (EWGCFG)*. Adv Exp Med Biol, 1991. **290**: p. 63-71; discussion -4.
105. Lucotte, G., et al., *Complete map of cystic fibrosis mutation DF508 frequencies in Western Europe and correlation between mutation frequencies and incidence of disease*. Hum Biol, 1995. **67**: p. 797-803.
106. Estivill, X., et al., *Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium*. Hum Mutat, 1997. **10**: p. 135-54.

107. Faa, V., et al., *A new insertion/deletion of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene accounts for 3.4% of cystic fibrosis mutations in Sardinia: implications for population screening*. J Mol Diagn, 2006. **8**: p. 499-503.
108. Ferec, C., et al., *Gross genomic rearrangements involving deletions in the CFTR gene: characterization of six new events from a large cohort of hitherto unidentified cystic fibrosis chromosomes and meta-analysis of the underlying mechanisms*. Eur J Hum Genet, 2006. **14**: p. 567-76.
109. Girardet, A., et al., *The improvement of the best practice guidelines for preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis: toward an international consensus*. Eur J Hum Genet, 2016. **24**: p. 469-78.
110. Ioannou, L., et al., *Population-based carrier screening for cystic fibrosis: a systematic review of 23 years of research*. Genet Med, 2014. **16**: p. 207-16.
111. Xu, P., et al., *[Application of droplet digital PCR for non-invasive prenatal diagnosis of single gene disease in two families]*. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2018. **35**: p. 224-7.
112. Gruber, A., et al., *Non-invasive prenatal diagnosis of paternally inherited disorders from maternal plasma: detection of NF1 and CFTR mutations using droplet digital PCR*. Clin Chem Lab Med, 2018. **56**: p. 728-38.
113. Bergougnoux, A., et al., *Current and future molecular approaches in the diagnosis of cystic fibrosis*. Expert Rev Respir Med, 2018.
114. Bergougnoux, A., et al., *Multicenter validation study for the certification of a CFTR gene scanning method using next generation sequencing technology*. Clin Chem Lab Med, 2018.
115. Gilles, A., et al., *Accuracy and quality assessment of 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing*. BMC Genomics, 2011. **12**: p. 245.
116. Shao, W., et al., *Analysis of 454 sequencing error rate, error sources, and artifact recombination for detection of Low-frequency drug resistance mutations in HIV-1 DNA*. Retrovirology, 2013. **10**: p. 18.



**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 tudományos ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2018.05.07.



9. TÁRGYSZAVAK

Cisztás fibrózis

Mutációspektrum

Mutációsűrés

Magyarország

Molekuláris diagnosztika

Új generációs szekvenálás

Piroszekvenálás

Homopolimer

c.2052_2053insA

Újszülöttkori szűrés

10. KEYWORDS

Cystic fibrosis

Mutational spectrum

Mutation screening

Hungary

Molecular diagnostics

New Generation Sequencing

Pyrosequencing

Homopolymer

c.2052_2053insA

Newborn screening

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

E sorokban szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik segítségemre voltak az egyetemi doktori értekezést megalapozó kísérletek elvégzésében, a közlemények megírásában és szakmai és baráti tanácsaikra mindig számíhattam.

Elsőként Prof. Dr. Kappelmayer Jánosnak, a Laboratóriumi Medicina Intézet vezetőjének és Dr. Balogh István témavezetőmnek amiért lehetővé tették, hogy munkámat az intézet Molekuláris Genetika részlegén folytathassam, valamint annak során nyújtott hasznos ötleteikért, segítségükért és tanácsaikért.

Hálás vagyok a velem együtt dolgozó kollégáknak, Madar Lászlónak, Dzsudzsák Erikának, Kálmáncheyné Gombos Évának, Ujfaludiné Tóth Izabellának, Győri Klaudiának, Nagyné Koroknai Ágnesnek, Gajdáné Szabó Máriának, Dr. Csoma Eszternek, Dr. Koczok Katalinnak, Dr. Vida Andrásnak, Dr. Baráth Sándornak, Dr. Mezei Zoltánnak és Dr. Orosz Orsolyának, akik hasznos tanácsokkal ellátva rengeteg segítséget nyújtottak a kísérletek elvégzésében és a publikációk megszületésében.

Köszönöm az LMI minden munkatársának a támogatást.

Végül, de nem utolsósorban hálával tartozom családomnak, akikre bármikor számíthatok, minden jó és rossz pillanatban mellettem állnak.

12. TÁMOGATÁS

A kutatómunka az alábbi támogatások segítségével jött létre:

- Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (K109076),
- Gazdaságfejlesztési és Innovációs Operatív Program (GINOP-2.3.2-15-2016-00039),
- Társadalmi Megújulás Operatív Program (TAMOP 4.2.1./B-091/1/KONV-2010-0007),
- Új Nemzeti Kiválóság Program (UNKP-16-3 IV/4).



13. FÜGGELÉK

Az értekezés alapjául szolgáló három eredeti közlemény.