

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Koczok Katalin

Súlyos monogénes betegségek prenatális és postnatális genetikai diagnosztikai kihívásai

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2019

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Súlyos monogénes betegségek prenatális és postnatális genetikai diagnosztikai kihívásai

Dr. Koczok Katalin

Témavezető:

Dr. Balogh István



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2019

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	3
2. Bevezetés.....	5
2.1 Irodalmi áttekintés	8
2.1.1 Az anyai sejt kontamináció interferáló hatása invazív módszerrel nyert prenatális minták molekuláris genetikai tesztelése során	8
2.1.2 A dystrophinopathiák molekuláris genetikai analízise, a dystrophin fehérje	10
2.1.3 A Smith-Lemli-Opitz szindróma	13
3. Célkitűzések	18
4. Anyagok és módszerek.....	19
4.1 Az anyai sejt kontamináció interferáló hatása invazív módszerrel nyert prenatális minták molekuláris genetikai tesztelése során.....	19
4.1.1 MCC szimuláció	19
4.1.2 A Sanger DNS szekvenálás anyai sejt kontaminációval szembeni szenzitivitásának meghatározása.....	19
4.1.3 Az MLPA módszer anyai sejt kontaminációval szembeni szenzitivitásának meghatározása.....	20
4.1.4 Az új generációs DNS szekvenálási módszer (piroszekvenálás) anyai sejt kontaminációval szembeni szenzitivitásának meghatározása.....	21
4.2 Új misszensz mutáció a <i>DMD</i> génben.....	21
4.2.1 Esetbemutatás, klinikai jellemzők.....	21
4.2.2 DNS izolálás	22
4.2.3 A <i>DMD</i> gén deléción/duplikáció analízise	22
4.2.4 A <i>DMD</i> gén 4. exonjának Sanger DNS szekvenálása	22
4.2.5 A <i>DMD</i> gén teljes kódoló régiójának szekvenálása.....	23
4.2.6 Az izom szövettani vizsgálata, a dystrophin fehérje immunhisztokémiai analízise	23
4.2.7 <i>In silico</i> analízisek.....	23
4.3 Magyarországi Smith-Lemli-Opitz szindrómás betegek mutációs spektruma.....	24
4.3.1 Betegek	24
4.3.2 Módszerek.....	30
4.4 Szekvencia variánsok leírása (nómenklátúra)	32
4.5 Szekvencia variánsok terminológiája	32
4.6 Szekvencia variánsok klasszifikációja.....	33
5. Eredmények.....	34
5.1 Az anyai sejt kontamináció interferáló hatása invazív módszerrel nyert prenatális minták molekuláris genetikai tesztelése során.....	34
5.1.1 A Sanger DNS szekvenálás anyai sejt kontaminációval szembeni szenzitivitása ...	34
5.1.2 Az MLPA módszer anyai sejt kontaminációval szembeni szenzitivitása.....	36

5.1.3 Új generációs DNS szekvenálási módszer (piroszekvenálás) anyai sejt kontaminációval szembeni szenzitivitása	39
5.2 Új misszensz mutáció a <i>DMD</i> génben.....	41
5.2.1 A szérum kreatin kináz időbeli változása	41
5.2.2 A <i>DMD</i> gén molekuláris genetikai analízise	42
5.2.3 Az izom szövettani és immunohisztokémiai vizsgálata.....	44
5.2.4 Az Asn76Ile mutáció hatásának <i>in silico</i> analízise.....	46
5.3 Magyarországi Smith-Lemli-Opitz szindrómás betegek mutációs spektruma.....	49
5.3.1 Szérum koleszterin és 7-DHC meghatározás.....	49
5.3.2 A <i>DHCR7</i> gén molekuláris genetikai analízise.....	49
6. Megbeszélés	54
6.1 Az anyai sejt kontamináció interferáló hatása invazív módszerrel nyert prenatális minták molekuláris genetikai tesztelése során.....	54
6.2 Új misszensz mutáció a <i>DMD</i> génben.....	60
6.3 Magyarországi Smith-Lemli-Opitz szindrómás betegek mutációs spektruma.....	64
7. Összegzés	72
8. Summary	73
9. Az értekezés új megállapításai	74
10. Irodalomjegyzék.....	76
11. Publikációs lista.....	90
12. Tárgyszavak/keywords.....	93
13. Köszönetnyilvánítás	94
14. Függelék.....	95

1. Rövidítések jegyzéke

ABD	actin binding domain, aktinkötő domén
ABS	actin binding site, aktinkötő hely
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics, Amerikai Orvosi Genetikai és Genomikai Társaság
AF	amniotic fluid, magzatvíz
ARPKD	autosomal recessive polycystic kidney disease, autoszomális recesszív polycisztás vesebetegség
BMD	Becker muscular dystrophy, Becker-izomdystrophia
CF	cystic fibrosis, cystás fibrosis
CH	calponin homology, calponin homológia
CK	creatine kinase, kreatin kináz
CVS	chorionic villus sampling, chorionboholy biopszia
dbSNP	Single Nucleotide Polymorphism Database (adatbázis)
7-DHC	7-dehydrocholesterol, 7-dehidrokoleszterin
8-DHC	8-dehydrocholesterol, 8-dehidrokoleszterin
DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase, 7-dehidrokoleszterin reduktáz
DMD	Duchenne muscular dystrophy, Duchenne-izomdystrophia
DQ	dosage quotient, dózis kvóciens
EBP	kolesztenol delta-izomeráz
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid, etilén-diamin-tetraecetsav
ExAC	Exome Aggregation Consortium (adatbázis)
HGVS	Human Genome Variation Society
LOD	limit of detection, detektálási határérték

LOVD	Leiden Open Variation Database (adatbázis)
MAF	minor allele frequency, minor allél frekvencia
MCC	maternal cell contamination, anyai sejt kontamináció
MFS	Marfan syndrome, Marfan szindróma
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification, multiplex ligáció-függő próba amplifikáció
mRNS	messenger ("hírvivő") RNS
NA	nem alkalmazható
N-ABD	N-terminal actin binding domain, N-terminális aktinkötő domén
NGS	nextgeneration sequencing, új generációs szekvenálás
NMD	nonsense-mediated mRNA decay, nonszensz mutáció mediálta mRNS lebomlás
RFLP	restriction fragment length polymorphism, restrikciós fragmenthossz polimorfizmus analízis
SHH	sonic hedgehog (fehérje)
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant (predikciós szoftver)
SLO	Smith-Lemli-Opitz
SLOS	Smith-Lemli-Opitz syndrome/szindróma
SSD	sterol sensing domain, szterol érzékelő domén
TM	transmembrane, transzmembrán
UTR	untranslated region, nem transzlálódó régió
XLOS	X-linked Opitz G/BBB syndrome, X-hez kötött Opitz G/BBB szindróma

2. Bevezetés

A molekuláris genetikai diagnosztika más laboratóriumi vizsgálatokhoz hasonlóan preanalitikai, analitikai és posztanalitikai fázisra különíthető el.

A preanalitikai fázisban (a minta analízisét megelőző időintervallum) fordul elő a hibák többsége [1, 2, 3], a molekuláris diagnosztikában mintegy 60%-a [4], melyekért gyakran az alábbiak felelősek: a minta nem megfelelő azonosítása, esetlegesen nem megfelelő antikoaguláns. A hibák 32% illetve 8%-a az analitikai és a posztanalitikai fázisban fordul elő [4], mely utóbbi szakasznak igen fontos része az eredmények interpretációja a vizsgálatot kérő klinikai orvos felé.

Az értekezésben ezen három fázis néhány speciális kihívást jelentő aspektusát mutatom be. Súlyos monogénes betegségek esetén a genetikai diagnosztika fontos szerepet játszik a diagnózis felállításában, genotípus-fenotípus összefüggések révén a prognózis becslésében, a reprodukzív döntéshozatalban és megteremti a prenatális diagnosztika lehetőségét is.

A prenatális molekuláris genetikai diagnosztika egy igen speciális preanalitikai befolyásoló tényezője az anyai sejtek bekerülése a magzati mintába invazív mintavétel során, mely leggyakrabban chorionboholy biopsziát vagy magzatvízvételt jelent. Irodalmi adatok alapján a magzati mintát kontamináló anyai DNS interferáló hatása az alkalmazott diagnosztikai módszer analitikai szenzitivitásától függ a laboratóriumi tesztelés analitikai fázisában [5, 6, 7]. A posztanalitikai fázisban az eredmények interpretációja a preanalitikai (anyai sejt kontamináció mértéke) és analitikai (diagnosztikai módszerek analitikai érzékenysége) faktorok figyelembevételével kell, hogy történjen.

Az első tanulmány (Az anyai sejt kontamináció interferáló hatása invazív módszerrel nyert prenatális minták molekuláris genetikai tesztelése során) során a magzati mintákban előforduló anyai DNS kontamináció különböző molekuláris genetikai tesztekre, mint Sanger

DNS szekvenálás, multiplex ligáció-függő próba amplifikáció (MLPA) és piroszekvenálás, gyakorolt interferáló hatását vizsgáltuk.

Az alkalmazott módszer analitikai specificitására, azaz az MLPA-val detektált egy exont érintő deléciók másik módszerrel való megerősítésének jelentőségére hívja fel a figyelmet **második tanulmányunk** (*Új misszensz mutáció a DMD génben*). Előbbi mellett, az interpretációs kihívást jelentő új misszensz mutáció patogenitása megítélésének nehézségeit mutatjuk be egy igen nagy méretű fehérje, a dystrophin esetén, melyet különböző *in silico* módszerek és, minden rendelkezésre álló információt figyelembe véve, variáns klasszifikációs algoritmus [8] alkalmazásával kíséreltünk meg. Az eset komplexitását mutatja az izom szövettani vizsgálat és dystrophin immunhisztokémiai analízis elvégzésének szükségessége is.

A **harmadik tanulmányban** (*Magyarországi Smith-Lemli-Opitz szindrómás betegek mutációs spektruma*) 2008-2012 között diagnosztizált magyar Smith-Lemli-Opitz (SLO) szindrómás betegek mutációs spektrumát írjuk le és hasonlítjuk össze az irodalomban közölt mutációtípus megoszlással, a mutációk génen belüli elhelyezkedésével és más európai országokban leírt SLO szindrómát okozó *DHCR7* génmutációkkal. A molekuláris genetikai adatok mellett tanulmányunkban összefoglaltuk a betegek biokémiai és klinikai fenotípusos jellemzőit is. Munkánk során egy új misszensz mutációt is detektáltunk, a patogenitás eldöntéséhez és a variáns kategorizálásához *in silico* módszereket, illetve variáns klasszifikációs algoritmust [8] alkalmaztunk. Fehérvérsejtekből izolált *DHCR7* messenger RNS (mRNS) szekvenálás nonszensz mutáció mediálta mRNS lebomlást (NMD) igazolt a c.452G>A (p.Trp151*) korai stop kodon beépülését okozó mutáció esetén. Ezen SLO szindrómát okozó mutáció esetén az NMD leírt jelenség [9], azonban kimutatása korábban bőr fibroblasztokból izolált mRNS vizsgálatával történt. Ezen eredményünk igazolja, hogy a perifériás vérmintából izolált *DHCR7* mRNS analitikai szempontból szintén megfelelő, kevésbé invazív beavatkozással nyerhető mintatípus.

A **második** és **harmadik tanulmány** részét képezte a genotípus és a fenotípus (immunhisztokémiai, biokémiai és klinikai) leírása és elemzése is, mely szintén jól példázza a posztanalitikai fázis részét képező interpretációs folyamat egy másik fontos elemét, nevezetesen annak a kérdésnek az eldöntését, hogy az új genetikai eltérés oki kapcsolatban lehet-e a megfigyelt fenotípussal. A variánsok kategorizálásának (a patogenitás eldöntésének) fontos elemét képezi továbbá a detektált genetikai eltérések betegség/génspecifikus adatbázisokban való fellelhetőségének keresése. További értékes adatokat szolgáltatva a **második** és **harmadik tanulmányban** kimutatott, irodalomból már ismert és új mutációk feltöltésre kerültek a Leiden Open Variation Adatbázisokba (<https://databases.lovd.nl/shared/genes/DHCR7>, <https://databases.lovd.nl/shared/genes/DMD>).

2.1 Irodalmi áttekintés

2.1.1 Az anyai sejt kontamináció interferáló hatása invazív módszerrel nyert prenatális minták molekuláris genetikai tesztelése során

Napjainkban prenatális molekuláris genetikai diagnosztika számos súlyos mendeli betegség esetén elérhető. Habár az anyai vérben található szabad magzati DNS vizsgálata bizonyos esetekben non-invazív módszerrel lehetségessé vált [10], máig a legtöbb genetikai laboratóriumban az invazív módszerrel nyert magzati minták genetikai vizsgálata adja az elvégzett prenatális tesztek zömét. Az invazív mintavétel azonban a főtális minta anyai sejtekkel való kontaminációjának (maternal cell contamination, MCC) veszélyét rejt magában. A leggyakoribb, chorionboholy-mintavétellel (chorionic villus sampling, CVS) vagy amniocentézissel nyert mintatípusok (amniotic fluid, AF, magzatvíz) esetén az anyai sejt kontamináció minden esetben preanalitikai rizikófaktornak tekintendő [11].

A chorionbiopsziás minták deciduával (méhnyálkahártya) szennyeződhetnek, melynek mértéke függ az operátor tapasztalatától, a terhességi kortól, a chorionbolyhok preparálási módjától, a minta minőségétől és mennyiségétől egyaránt [12].

Az amnionfolyadék genetikai analízisét anyai hemopoietikus sejtek jelenléte nehezítheti [13]. A magzatvíz minták tenyésztési körülményei az amniocyták növekedésének kedveznek, az anyai perifériás vérsejtek előregednek illetve elpusztulnak, emiatt a tenyésztett AF minták anyai DNS kontamináció veszélye kisebb [14].

Ezzel ellentétben a CVS minták tenyésztése növeli az MCC kockázatát, mely nagymértékben csökkenthető a bolyhok megfelelő előkészítésével (a decidua a chorionbolyhokról történő eltávolításával a tenyésztés elindítása előtt) [15].

A prenatális molekuláris diagnosztika több szempontból is kihívás elé állítja a laboratóriumot: gyakorlatilag pótolhatatlan, gyakran kis mennyiségű vagy szuboptimális mintákkal, és igen rövid leletátfordulási idővel szükséges dolgozni, míg az eredmények

interpretációja sokszor nem egyszerű [11]. Anyai sejt kontamináció jelenlétében a PCR-alapú módszerek DNS szennyezéssel szembeni nagy érzékenysége miatt a magzat genotípusát esetlegesen rosszul határozhatjuk meg. Az irányelv szerint [16] minden prenatális molekuláris genetikai teszt esetén javasolt ugyanazon magzati mintából MCC analízist végezni, a vizsgálandó betegségtől és az öröklődés módjától függetlenül. Anyai és magzati polimorf, rövid ismétlődő DNS szekvenciák (short tandem repeat loci) összehasonlításával a magzati mintában az MCC mértéke (százalékos aránya) meghatározható, ezen vizsgálathoz számos kereskedelmi forgalomban kapható esszé áll rendelkezésre. Az MCC kimutatására alkalmazott tesztek detektálási szenzitivitását a laboratóriumnak előzetesen meg kell határozni, az érzékenység minimálisan 5% kell, hogy legyen [16].

Az eredmények megfelelő interpretációjához a rutinszerűen alkalmazott molekuláris diagnosztikai tesztek MCC-vel szembeni szenzitivitását is javasolt meghatározni keverékes vizsgálatokkal [12, 16]. A magzati eredmények értelmezését befolyásoló, vagyis szignifikáns MCC nagymértékben függ az alkalmazott diagnosztikai tesztől és az eredmények értékelhetőségét az MCC jelenléte nem feltétlenül teszi lehetetlenné [12, 17].

Chamberlain és mtsai, a PCR módszer klinikai felhasználását bemutató egyik legelső publikációjukban [5], a dystrophin gén delécióinak kimutatására használt multiplex PCR MCC-vel szembeni szenzitivitását vizsgálva azt találták, hogy 3-5%-os MCC 25-ös ciklusszám mellett még tolerálható (a deléciót nem „fedi” el). Lamb és mtsai [7] eredményei alapján 135K oligonukleotid-alapú microarray eredményeit csak magasabb koncentrációjú MCC (>20%) zavarja, a szignifikancia szint függ a kópiaszám variáció típusától (deléció vagy duplikáció) és méretétől is. Hessner és munkacsoportja [6] kimutatta, hogy az apai vércsoportantigéneket kódoló allélok detektálása, melynek immuncytopenia által veszélyeztetett magzatok esetén van jelentősége, 94-99,8%-os anyai kontamináció mellett is lehetséges volt allél-specifikus PCR-rel. Ez arra is példa, hogy a szignifikáns anyai kontamináció szintje nem csak az alkalmazott

módszertől, hanem a teszt céljától is függ, vagyis az apai allél még kimutatható volt alléltól függően 0,2-6%-os koncentrációban.

Annak tükrében, hogy a különböző magzati mintákban az MCC előfordulási gyakorisága akár a 7,1%-ot is elérheti [7], fontos a molekuláris diagnosztikai módszerek anyai DNS kontaminációra való érzékenységének ismerete.

2.1.2 A dystrophinopathiák molekuláris genetikai analízise, a dystrophin fehérje

A dystrophinopathiák a leggyakoribb neuromusculáris betegségek. Az X-kromoszómához kötött recesszív öröklődést mutató, progresszív izomvesztéssel járó allélikus betegségek a Duchenne- (Duchenne muscular dystrophy, DMD, MIM 310200) és Becker-izomdystrophiák (Becker muscular dystrophy, BMD, MIM 300376) hátterében a dystrophin fehérjét kódoló *DMD* génben (MIM 300377, Xp21.2-p21.1) kialakuló mutációk állnak [18, 19]. A DMD a klinikailag súlyosabb forma, hátterében álló mutációk általában a dystrophin fehérje teljes hiányához vezetnek vagy a fehérje funkcionálisan kritikus doménjét érintik [20-22]. A fenotípusos megjelenésében enyhébb BMD-re nagyfokú variabilitás jellemző a klinikai tünetek súlyosságát, megjelenésének idejét illetően, továbbá a progresszió tekintetében. Kialakulását abnormális, de funkcióját részben megtartott dystrophin fehérje jelenléte okozza [23, 24].

A dystrophin egy sarcolemmával (izomrostot körülvevő sejthártya) asszociált fehérje, mely a sejtmembránba integrált és citoplazmatikus proteinekkel (sarcoglycánok, dystroglycánok, syntrophinek és dystrobrevinek) való interakciója révén (ún. dystrophin-glikoprotein komplex, DGC) kapcsolatot létesít az extracelluláris mátrix bazális laminája és a citoskeletális aktin között. A DGC fő funkciója a sarcolemma stabilizálása és az izomrostok védelme hosszú távon az izomkontrakció-indukálta károsodással és nekrozissal szemben. A DGC mechanikai funkcióján kívül nagy valószínűséggel szerepet játszik az izomsejt

növekedésben, a citoskeleton organizációjában, az izom homeosztázisban illetve atrophíában/hypertrophíában mint transzmembrán szignalizációs komplex [25-27].

A dystrophin fehérjének három teljes hosszúságú izoformája létezik, melyek egymástól független promóterek (agyi, Purkinje és izom promóter) szabályozása alatt állnak. Ezeken kívül legalább négy rövid dystrophin izoforma ismert, melyeket belső (intronban elhelyezkedő) promóterek irányítanak és nem rendelkeznek aktinkötő doménnal. A 14 000 bp (teljes) hosszúságú mRNS elsősorban a váz- és szívizomban expresszálódik, kisebb mennyiségben az agyban [28].

Az izom promóter szabályozása alatt álló teljes hosszúságú dystrophin fehérje 3685 aminosavból áll, molekulatömege 427 kDa [18]. A fehérje négy strukturális doménba szerveződik: 1) N-terminális aktinkötő domén (N-ABD vagy ABD1); 2) középső pálca (central rod) domén (egy második aktinkötő domént is tartalmaz, ABD2), mely a molekula mintegy 76%-át teszi ki, 24 spektrin-szerű ismétlődő szekvenciát és négy kapocsrégiót (hinge) tartalmaz; 3) cisztein-gazdag (cystein rich) domén, ami a sejtmembránban elhelyezkedő beta-dystroglycánhoz kötődik; és a 4) C-terminális domén, mely a dystrobrevinhez és a syntrophinokhoz kapcsolódik [29, 30].

Az emelkedett szérum kreatin kináz (CK) koncentráció és/vagy izombiopsziás lelet és/vagy klinikai tünetek megjelenése miatt felmerülő dystrophinopathia gyanúját a *DMD* gén molekuláris genetikai vizsgálata erősítheti meg. Az elsővonalbeli genetikai teszt deléciók/duplikációk kimutatására irányul, mely genetikai eltérések a *DMD/BMD* esetek körülbelül 65%–80%-áért felelősek [31, 32]. A legelterjedtebb módszer ezen nagy skálájú mutációk kimutatására a multiplex ligáció-függő próba amplifikáció [33]. Ha deléció/duplikáció nem mutatható ki, második vonalbeli tesztként a *DMD* gén szekvenálása ajánlható fel [34]. Kis skálájú (egy vagy néhány nukleotidot érintő) mutációk mintegy 20-35%-ban mutathatóak ki *DMD/BMD* háttérben, többségük nonszensz pontmutáció, kereteltolódást

okozó kis deléció/inzerció vagy mRNS érést (splicingot) érintő mutáció [28]. Komplex genomiális átrendeződések és mély introni mutációk mintegy 2%-ban fordulnak elő, kimutatásuk RNS-alapú módszerekkel eredményes lehet [34]. Az MLPA analitikai szenzitivitása 71,3%, míg a teljes molekuláris analízisé (MLPA és DNS szekvenálás együttesen) 97,3% [22].

A *DMD* a legnagyobb humán gén, 2,5 millió bp-ból áll, a teljes humán genom 0,1%-át és az X kromoszóma 1,5%-át teszi ki. A gén 99%-át intronok teszik ki, 79 konstitutív exonból áll [28]. A gén nagy mutációs rátájáért feltehetően az igen nagy méretű intronok felelősek [35]. Az esetek 1/3-ában a betegség kialakulásának hátterében *de novo* mutáció áll [36]. Fontos azonban szem előtt tartani, hogy a látszólagos sporadikus DMD esetek egy jelentős részében (átlagosan, vagyis az összes mutáció típusra vonatkoztatva ez 19%-ra tehető) az édesanya esetében csírasejtes mozaicizmusról van szó [22, 37], melyet az ismétlődési kockázat megállapításánál figyelembe kell venni [38].

A dystrophin fehérje aktin kötésért és az extracelluláris mátrixszal való összeköttetésért felelős strukturális elemei jól karakterizáltak. A kristályszerkezet alapján két dystrophin fehérjemolekula N-ABD doménjei egymással antiparallel dimert képeznek [39]. Az N-ABD főként helikális szerkezetű és két calponin homológ (CH) szubdoménnel rendelkezik. A CH1 és CH2 szubdoméneket helikális összekötő (linker) régió kapcsolja össze (I hélix). A CH2 szubdomén fő (A, C, E és G) és rövid (B, D és F) hélixekkel rendelkezik. A CH1 szubdomén a CH2-höz hasonló konformációjú, de a rövid B és D hélixeket hurok (loop) régiók helyettesítik. Az N-ABD doménben három aktinkötő hely (actin binding site, ABS) található. Az ABS1 (K18-A27) az A hélixben (CH1 szubdomén), míg az ABS2 (N88-L116) főként a CH1 szubdomén F és G hélixében helyezkedik el. Az ABS3 kötőhely (L131-S147) a CH2 szubdomén A hélixében található.

A DMD/BMD betegek igen kis százalékában a betegség hátterében misszensz mutáció áll, azonban ezen mutációk közel fele az N-ABD-t érinti (Leiden Open Variation Database, Leiden Muscular Dystrophy pages, www.dmd.nl).

2.1.3 A Smith-Lemli-Opitz szindróma

A Smith-Lemli-Opitz szindróma (SLO szindróma, MIM 270400) a koleszterinszintézis elsőként felfedezett és leggyakoribb súlyos veleszületett zavara, melyet a 7-dehidrokoleszterin reduktáz (DHCR7) enzim deficienciája okoz [40-43]. A koleszterin bioszintézise acetátból két fő szakaszra, a preszkvalén és a posztszkvalén koleszterin szintézisre tagolódik. A preszkvalén szakasz a szterol és izoprenoid szintézishez járul hozzá, végterméke a lanoszterin (az első szterol a koleszterin bioszintézise során), mely a posztszkvalén szakaszban két szintetikus útvonalon alakulhat koleszterinné számos enzim közreműködésével. A két útvonal az alifás oldalláncban lévő C24-C25 kettős kötés redukciójának (24-dehidrokoleszterin reduktáz katalizálja) az időpontjában különbözik. A Kandutsch-Russel útvonal során a redukció az első, a Bloch útvonal esetén pedig az utolsó enzimatis lépésben történik. Emberben a legtöbb szövetben a Kandutsch-Russel útvonal az elsődleges [44], melyben az utolsó lépésben a DHCR7 enzim a 7-dehidrokoleszterint (7-DHC) koleszterinné redukálja. Az agyban, a herékben és ez emlő exokrin mirigyeiben a koleszterin mellett jelentős mennyiségű desmoszterin lehet, mely utóbbi a DHCR7 enzim hatására 7-dehidrodesmoszterinből keletkezik a Bloch útvonal utolsó előtti lépésében [43, 45-47].

A humán DHCR7 az endoplazmatikus retikulumba lokalizálódó NADPH-függő membránprotein, aminosavösszetétel alapján becsült molekulatömege 54,5 kDa. A protein transzmembrán topológiáját kísérletesen nem határozták meg, több modell létezik, melyek elsődlegesen a transzmembrán domének számában térnek el [48-51]. Két szterol reduktáz motívummal rendelkezik, a szterol reduktáz 1 motívumot a 213-228., míg szterol reduktáz 2

motívumot a 439-462. aminosavak alkotják. Emellett rendelkezik egy szterol reduktáz signature motívummal is (394-405 aminosavak). A potenciális szterol érzékelő domént (sterol sensing domain, SSD) a 181-362. aminosavak képezik. Ezen protein motívumok/domének enzimatisz szerepe nem ismert [52].

SLO szindrómában a DHCR7 enzim csökkent működése következtében a koleszterin és dezmoszterin szintézis csökkent, míg a 7-DHC és izomere, a 8-dehidrokoleszterin (8-DHC) koncentrációja emelkedett a vérben és a szövetekben egyaránt [41, 53-55]. A 8-DHC nagy valószínűséggel 7-DHC-ből keletkezik az EBP (koleszterol delta-izomeráz, MIM 300205) enzim közreműködésével [54, 56].

Az SLO szindróma klinikai diagnózi a szérum/szövetek emelkedett 7-DHC koncentrációjának kimutatása alapján erősíthető meg, az emelkedett 7-DHC a betegség nagymértékben specifikus biokémiai markere. Egyes pszichiátriai gyógyszerek szedése (pl. aripiprazol, trazodon, haloperidol) [57-59], fokozott koleszterin szintézissel járó patológiás állapotok (pl. familiáris hypercholesterinaemia - abszolút 7-DHC emelkedés jellemzi, a 7-DHC/koleszterin arány normál marad) és a cerebrotendinosus xantomatosis (7-DHC emelkedés mellett egyéb szterol prekursorok és a cholestanol szintje is emelkedik) is a vér 7-DHC koncentrációjának emelkedéséhez vezethetnek [60]. Enyhe/nem egyértelmű 7-DHC szint emelkedés esetén (bőr) fibroblastok vagy lymphoblastok lipid-deficiens médiumban való tenyésztése segíthet a differenciáldiagnosztikában (ilyen körülmények között fokozott a *de novo* koleszterinszintézis és a kontrollhoz hasonlítva a 7-DHC szintje markánsan megnő az SLO szindrómában szenvedő beteg esetén) [43]. A szérum koleszterin koncentrációja normál is lehet, így ez a paraméter kizárásra nem alkalmazható [43].

A szindróma elsőként 1964-ben került leírásra három hasonló fenotípust (jellegzetes arckarakter, mentális retardáció, microcephalia, súlyos táplálási nehezítettség, megkésett fejlődés és hypospadiasis) mutató férfibeteg észlelése során [61].

A koleszterin szintézis zavaraival ellentétben általában a veleszületett anyagcserebetegségekre nem jellemző fejlődési rendellenességek jelenléte. Azonban a koleszterin vér-agy gáton és placentán keresztüli transzportja és ezáltal az anyai metabolizmus kompenzáló hatása csak korlátozottan lehetséges. A magzati fejlődés endogén koleszterin szintézistől való függése a magyarázata az egyéb metabolikus betegségek többségére nem jellemző embrionális fejlődési zavarnak [43].

A leggyakrabban előforduló általános klinikai tünetek a növekedési elmaradás, megkésett fejlődés, mentális retardáció és a viselkedészavar (autisztikus vonások, hiperaktivitás, önbántalmazó magatartás stb.). Több szervrendszert érintő veleszületett fejlődési rendellenességek jelenléte szintén gyakori és jellegzetes arckarakter (kicsi orr, előrenéző orrnyílások, ptosis, micrognathia) figyelhető meg [60, 62, 63]. A 2. és 3. lábujj syndactyliája a betegek több, mint 95%-ában jelen van. A fenotípusos spektrum rendkívül széles, az igen enyhe mentális retardációval és viselkedészavarral társuló minor fizikális eltérésektől a prenatális/perinatális halálozáshoz vezető súlyos esetekig terjed [60, 64].

A koleszterinnek számos biológiailag fontos funkciója van. Az emlős sejtek membránjának esszenciális lipid alkotóeleme, a myelin fő összetevője, a szteroid hormonok, neuroszteroidok, oxiszteroidok és epesavak prekursora, szerepe van továbbá az embrió fejlődésében és a morfogenezisben is a Sonic hedgehog proteinnel (SHH) való interakciója révén [49, 52, 65]. Az SHH a központi idegrendszer, az arc és a végtagok embrionális fejlődésében játszik szerepet [62].

A koleszterin az ún. lipid tutajok (lipid rafts) fontos strukturális komponense, a szterol összetétel megváltozása befolyásolja a sejtmembrán fizikokémiai és funkcionális tulajdonságait. A 7-DHC helyettesítő szerepe számos metabolikus útvonalon egyelőre még nem teljes mértékben definiált [64].

A rendkívül színes tünetegyütteshez nagy valószínűséggel a koleszterin deficiencia mellett az emelkedett 7-/8-DHC koncentráció illetve a felszaporodott metabolitok származékai mind hozzájárulnak [43, 62]. A 7-DHC nagymértékben oxidálabilis, a lipidperoxidáció során számos oxiszterol keletkezik belőle *in vitro* és *in vivo* [66, 67], melyek biológiailag aktívak és nagy valószínűséggel befolyásolják az agy fejlődését [68].

Az SLO szindróma monogén betegség, öröklődésmenete autoszomális recesszív, a Humán Gén Mutációs Adatbázis alapján 217 mutációt írtak le eddig a kóroki *DHCR7* génben (11q13.4, MIM 602858) (Professional Human Gene Mutation Database, <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/start.php>, 2018.2 release). A *DHCR7* mutációk kimutatásának nem kizárólag az erős klinikai gyanú mellett nem egyértelműen/minimálisan emelkedett vagy normál szérumban 7-DHC koncentrációk esetén van megerősítő diagnosztikai szerepe [64]. A molekuláris genetikai diagnosztika segítségével a családra jellemző mutációk kimutathatóak, mely a későbbiekben lehetőséget biztosít prenatális diagnosztikára, az egyeneságú leszármazottak célzott hordozóság tesztelésére, genetikai tanácsadásra és rizikóbecslésre.

A humán *DHCR7* gén cDNS-ét 1998-ban Moebius és mtsai klónozták először [69], majd három egymástól független kutatócsoport igazolta *DHCR7* mutációk jelenlétét az SLO szindróma hátterében [48, 70, 71]. A *DHCR7* gén mutációi csak az SLO szindrómával hozhatók összefüggésbe.

A humán *DHCR7* gén 14 100 bázispárból (bp) áll és 9 exonból épül fel [48]. A *DHCR7* mRNS 2786 bp-ból áll és 1425 bp hosszúságú nyitott leolvasási kerettel rendelkezik, melyet a 3-9. exonok kódolnak. A 194 bp-nyi 5' nem transzlálódó régiót (untranslated region, UTR) az 1., 2. és részben a 3. exon, a start kodont a 3. exon, a fehérje karboxi-terminális részét és a 961 bp-nyi 3' UTR régiót a 9. exon kódolja [52]. A *DHCR7* egy ubiquiter fehérje, de a *DHCR7* mRNS legnagyobb mennyiségben a mellékvesékben, a májban, a herékben és az agyban mutatható ki [69].

Az SLO szindróma viszonylag gyakori a kaukázusi populációban, a betegség incidenciája 1:10 000-1:70 000 az észak- és közép-európai származásúakban [43]. Az igen magas hordozó gyakoriságot (1-2%) [64, 72, 73] részben a heterozigóták szelekciós előnyével magyarázzák. A bőrben lévő 7-DHC-ből D3 provitamin képződik UV sugárzás hatására, egy elmélet szerint az Észak-Európában gyakori D-vitamin hiány ellen védhetett a *DHCR7* mutációk hordozása [60], illetve egy másik elmélet alapján a heterozigóták sejtmembránjában minimálisan emelkedett 7-DHC koncentráció bizonyos vírusfertőzések ellen nyújthatott védelmet [43]. A *DHCR7* génmutációk jellegzetes földrajzi megoszlására Európában feltehetően az alapító hatás, a genetikai sodródás és visszatérő mutációk együttes jelenléte ad magyarázatot [74].

3. Célkitűzések

1) Célul tűztük ki három molekuláris genetikai diagnosztikai módszer anyai DNS kontaminációra való szenzitivitásának meghatározását:

i) Sanger DNS szekvenálás [75], mely a kis skálájú genetikai eltérések kimutatásának arany standardja és a prenatális molekuláris genetikai diagnosztikában az egyik leggyakrabban használt módszer,

ii) multiplex ligáció-függő próba amplifikáció [76], mely exon-/génszintű deléciók/duplikációk kimutatására alkalmas molekuláris genetikai teszt,

iii) a piroszekvenálás [77], egy új generációs szekvenálási módszer (nextgeneration sequencing, NGS), mivel a molekuláris diagnosztikában a Sanger DNS szekvenálás visszaszorulóban van, az NGS pedig egyre nagyobb teret nyer.

Emellett az irodalomban fellelhető, ezen módszerek analitikai szenzitivitására vonatkozó adatokat áttekintettük és elemeztük a prenatális molekuláris genetikai diagnosztika és az anyai DNS kontamináció összefüggésében.

2) Molekuláris diagnosztikai tevékenységünk kapcsán a *DMD* génben egy új misszensz mutációt detektáltunk. A mutáció patogenitásának megítélését a klinikai kép, az izom szövettani vizsgálata, a dystrophin immunhisztokémiai analízise és a fehérje szerkezetének *in silico* analízise alapján kíséreltük meg.

3) Tizenhárom (12 nem rokon) magyarországi SLO szindrómás beteg molekuláris genetikai vizsgálata alapján a magyar betegpopuláció mutációs spektrumának meghatározását, klinikai és biokémiai (koleszterin, 7-DHC) fenotípusos jellemzőinek összefoglalását, egy új misszensz mutáció patogenitásának megvizsgálását és a mutáció detektálási szenzitivitás meghatározását tűztük ki célul.

4. Anyagok és módszerek

4.1 Az anyai sejt kontamináció interferáló hatása invazív módszerrel nyert prenatális minták molekuláris genetikai tesztelése során

4.1.1 MCC szimuláció

A tanulmány során elvégzett kísérletekben genomiális DNS keverékeket alkalmaztunk. Vad típusú DNS minta ('magzati') heterozigóta DNS mintával ('anyai') történő kontaminációjával 1%, 5%, 10%, 20%, 30% és 40%-os anyai sejt kontaminációt szimuláltunk, mely sorrendben 0,5%, 2,5%, 5%, 10%, 15% és 20% mutáns allél aránynak felelt meg.

A perifériás vér leukocytaiból a genomiális DNS izolálása QIAamp DNA Blood Mini Kit-tel (Qiagen, Hilden, Németország) történt. A DNS koncentrációt a NanoDrop 2000 spektrofotométeren (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) határoztuk meg a gyártó utasításai szerint.

4.1.2 A Sanger DNS szekvenálás anyai sejt kontaminációval szembeni szenzitivitásának meghatározása

Hat kis skálájú mutáció, 1) 5 egy nukleotidot érintő báziscsere és 2) egy 3-bp-t érintő deléció tesztelését végeztük el.

1) A vad típusú DNS mintát ('magzati') öt különböző *PKHD1* gén (fibrocystin/polyductin, 6p12.3-p12.2, MIM 606702) pontmutációra heterozigóta DNS mintával ('anyai') kontamináltuk: NM_138694.3: c.8870T>C, c.3407A>G, c.7916C>A, c.6992T>A és c.107C>T. A *PKHD1* génben előforduló mutációk autoszomális recesszív polycystás vesebetegséghez vezetnek (ARPKD, MIM 263200).

2) A vad típusú DNS mintát ('magzati') a *CFTR* gén (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, 7q31.2, MIM 602421) 3 bp-t érintő deléciójára heterozigóta DNS mintával ('anyai') kontamináltuk: NM_000492.3: c.1521_1523delCTT, a mutáció neve

hagyományos nómenklatúra szerint F508del. A *CFTR* gén mutációi az autoszomális recesszív öröklődésű cystás fibrosis (CF, MIM 219700) kialakulásához vezetnek.

Az amplikon szekvenálást a BigDyeTerminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-tel (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) végeztük a gyártó utasításai szerint. A kapilláris gélelektroforézist az ABI PRISM 310 Genetikai Analizátoron, míg az adatok analízisét Sequencing Analysis Software-rel végeztük (Applied Biosystems).

4.1.3 Az MLPA módszer anyai sejt kontaminációval szembeni szenzitivitásának meghatározása

Az MLPA módszer szenzitivitását 1) egy multiexon-deléció és 2) egy multiexon-duplikáció esetén vizsgáltuk meg. Minden MLPA kísérletet a gyártó utasításai szerint végeztünk. Az adatok analízisét blokk normalizációval végeztük. Röviden, mintán belüli és minták közötti normalizáció után határoztuk meg a dózis kvócienseket nemben illesztett kontrollok alkalmazásával Microsoft Excel segítségével.

1) Vad típusú női DNS mintát ('magzati') kevertünk a *MID1* gén (midline 1, Xp22.2, MIM 300552) 1-3. exonjainak deléciójára (NG_008197.1(NM_000381.3):c.(?-365)_(864 + 1_865-1)del) heterozigóta női DNS mintával ('anyai'). A *MID1* génben előforduló mutációk X-hez kötött Opitz G/BBB szindróma (XLOS, MIM 300000) kialakulásához vezetnek. Az MLPA analízist a SALSA MLPA P233-B2 MID1 próbamix (MRC-Holland, Amsterdam, Hollandia) alkalmazásával végeztük. Az X-hez kötött öröklődésment miatt a próba felismerési/komplementer szekvenciájának deléciója az amplifikáció teljes elmaradásához vezet férfiakban, míg a heterozigóta formában előforduló deléció a dózis kvóciens ~35-50%-os csökkenéséhez vezet.

2) Vad típusú DNS mintát ('magzati') kevertünk a *PKHD1* gén 33-35. exonjainak duplikációjára (NG_008753.1(NM_138694.3):c. (5236 + 1_5237-1)_(5751 + 1_5752-1)dup)

heterozigóta ('anyai') DNS mintával. Az MLPA analízist a SALSA MLPA P341-B2/P342-B2 PKHD1 próbamix (MRC-Holland) alkalmazásával végeztük. Heterozigóta duplikáció esetén a dózis kvóciens tipikusan az 1,30-1,65 tartományba esik.

4.1.4 Az új generációs DNS szekvenálási módszer (piroszekvenálás) anyai sejt kontaminációval szembeni szenzitivitásának meghatározása

Vad típusú DNS mintát ('magzati') kevertünk az *FBN1* gén (fibrillin 1, 15q21.1, MIM 134797) egy nukleotidot érintő báziscseréjére (NM_000138.4: c.4727T>C) heterozigóta ('anyai') DNS mintával. Az *FBN1* gén mutációi Marfan szindrómához (MFS, MIM 154700) vezetnek, mely autoszomális domináns öröklődést mutat. A bidirekcionális piroszekvenálás GS Junior rendszeren történt és az adatok analízisét a GS Amplicon Variant Analyzer Software-rel (Roche 454 Life Sciences, Branford, Connecticut, Amerikai Egyesült Államok) végeztük. A DNS mixeket duplikátumban vizsgáltuk.

4.2 Új misszensz mutáció a *DMD* génben

4.2.1 Esetbemutató, klinikai jellemzők

A 6 hónapos fiúcssecsemő neurológiai kivizsgálása enyhe, generalizált izomgyengeség, hypotonia és megkésett motoros fejlődés miatt kezdődött. A perinatális anamnézis eseménytelen volt, mentális fejlődése rendben zajlott, érzészavara nem volt. Szenzomotoros tréning ellenére a tünetekben javulás nem következett be, ezért neuromusculáris betegség gyanúja merült fel. Az electromyographia myopathiás jeleket mutatott. Az 1 éves korban elvégzett laboratóriumi vizsgálat során mért emelkedett kreatin kináz érték (1497 U/L, referencia tartomány: 24–195 U/L) miatt dystrophinopathia gyanúja merült fel és 14 hónapos korban *DMD* gén analízis elvégzésére került sor. A családban DMD/BMD nem fordult elő. 25 hónapos korban a fizikális vizsgálat fekvésből való nehezített felülést, scapula alátát, a felső

végtagokon és a mellkason csökkent izomtömeget és enyhe vádli hypertrophiát írt le. Ezt követően a quadriceps izomból biopszia elvégzésére került sor.

4.2.2 DNS izolálás

A perifériás vér leukocytaiból a genomiális DNS izolálása a **4.1.1** pontban leírtak szerint történt.

4.2.3 A *DMD* gén deléció/duplikáció analízise

Deléciók/duplikációk vizsgálata a *DMD* génben MLPA módszerrel történt a SALSA MLPA P034-B2 *DMD* és P035-B1 *DMD* próbamixekkel (MRC-Holland). Az adatok analízisét a gyártó utasításai szerint végeztük. A dózis kvóciens kalkulálása röviden: beteg és kontroll minták mintán belüli normalizációja (referencia próbák alkalmazásával) után a betegmintában kalkulált relatív csúcsmagasságot hasonlítottuk a nemben illesztett kontrollokban kalkulált relatív csúcsmagasságok átlagához minden próba esetén Microsoft Excel segítségével. Férfiakban a próba komplementer szekvenciájának deléciója a próba amplifikáció elmaradásához (a fragment analízis során hiányzó csúcs a várt mérettartományban) vezet.

4.2.4 A *DMD* gén 4. exonjának Sanger DNS szekvenálása

A *DMD* gén 4. exonjának és a határoló introni szakaszoknak irodalmi primerekkel [78] történő PCR-rel történő amplifikációja után bidirekcionális Sanger DNS szekvenálást végeztünk a **4.1.2** pontban leírtak szerint.

4.2.5 A DMD gén teljes kódoló régiójának szekvenálása

A DMD gén szekvenálása bidirekcionális piroszekvenálással GS Junior rendszeren (Roche 454 Life Sciences) történt a DMD MASTR esszével (Multiplicom, Niel, Belgium). Az adatok analízisét a GS Amplicon Variant Analyzer Software-rel (Roche 454 Life Sciences) végeztük.

4.2.6 Az izom szövettani vizsgálata, a dystrophin fehérje immunhisztokémiai analízise

Harántcsíkolt izom szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatát fagyasztott izombiopsziás mintából készült, 7 mikrométer vastagságú, keresztmetszeti síkú metszeteken végeztük el standard protokoll szerint [79]. Sarcolemmális és sarcolemma-asszociált proteinek immunhisztokémiai vizsgálata az alábbiak szerint történt: a dystrophin fehérje 1-es, 2-es és 3-as epitópja ellen irányuló antitestekkel, melyek sorrendben a centrális/központi, C-terminális és N-terminális régióknak felelnek meg (Novocastra, Newcastle, UK, forgalmazó Biomarker, Gödöllő, Hungary; a primer antitestek hígítása 1:20 volt minden esetben); illetve sarcoglycan α , β , γ és δ (Novocastra, primer antitest-hígítások sorrendben: 1:50, 1:100, 1:100 és 1:50); merosin (Novocastra, 1:100) és spectrin (Novocastra, 1:100) fehérjék elleni antitestekkel. A primer antitestek tárgylemezen történő inkubálását 1 órán át szobahőmérsékleten végeztük. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során a detektálás a MACH 4 Universal HRP-Polymer Detection System (Biocare Medical, Pacheco, California, Amerikai Egyesült Államok) kittel a gyártó utasításai szerint történt. *(Dr. Hortobágyi Tibor, Patológiai Intézet, Neuropathológiai Nem Önálló Tanszék, Debreceni Egyetem).*

4.2.7 In silico analízisek

Vizsgálatainkhoz a dystrophin (PDB ID: 1DXX) [39], utrofin (PDB ID: 1QAG) [80], α -aktinin 3 (PDB ID: 1WKU) [81] és fimbrin (PDB ID: 1AOA) [82] proteinek ABD doménjének Protein Data Bank adatbázisban elérhető kristályszerkezetét használtuk, a fehérjékre vonatkozó további

információkat (pl. szekvencia) az UniProt adatbázisból töltöttük le: dystrophin (UniProt ID: P11532), utrofin (UniProt ID: P46939), α -aktinin 3 (UniProt ID: Q08043) és fimbrin (UniProt ID: P13797). A szerkezeti ábrák a PyMOL Molecular Graphics System (Version 1.3 Schrödinger, LLC) program segítségével készültek. A szerkezet-alapú szekvencia-illesztést a SALIGN web-szerverrel végeztük [83]. A másodlagos szerkezetre vonatkozó predikciók a JPred4 szerver [84] alkalmazásával készültek. A FoldX algoritmussal [85] és a SDM web-szerverrel [86] kalkuláltuk a pontmutációk hatására a protein stabilitásában bekövetkezett változásokat ($\Delta\Delta G$, kcal/mol), a dystrophin fehérje N-ABD kristályszerkezetének felhasználásával. Az aggregációs hajlamra vonatkozó dinamikus predikciót az N-ABD domén A láncának szerkezete alapján az Aggrescan3D szerver használatával végeztük [87] (Dr. Mótyán János András, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debreceni Egyetem).

4.3 Magyarországi Smith-Lemli-Opitz szindrómás betegek mutációs spektruma

4.3.1 Betegek

2008-2012 között összesen 13 (12 nem rokon) egyén SLO szindróma irányú molekuláris genetikai és biokémiai diagnosztikáját végeztük el. A vizsgált betegek az ország különböző régióiból (Nyugat-Dunántúl, Dél-Dunántúl, Közép-Magyarország, Észak-Alföld, Észak-Magyarország) érkeztek.

Az SLO szindróma klinikai gyanúját elsővonalbeli tesztként a szérumban 7-DHC koncentrációjának meghatározásával erősítettük meg. Minden esetben a *DHCR7* gén molekuláris genetikai vizsgálatát is elvégeztük. A kezelőorvosok által rendelkezésünkre bocsátott klinikai jellemzőket az alábbiakban részletezzük. A súlyossági pontérték kiszámítását klinikai genetikus szakorvos végezte a Bialer és munkatársai által kifejlesztett [88], majd Kelley és Hennekam által módosított pontozó rendszer szerint [60].

4.3.1.1 Klinikai jellemzők

1. Beteg

A leánygyermek a 37. terhességi héten született császármetszéssel édesanyja első, praeeclampsziával és diabetésszel komplikált terhességéből, születési súlya 2510 g volt. A születéskor megfigyelhető klinikai jellemzők a következőek voltak: generalizált, enyhe oedema, generalizált izomhypotonia, microcephalia, microphthalmia, rövid szemrések, bal oldali cataracta, mélyen ülő fülek, hypoplasiás nyelv, gingiva hypertrophia, jobb oldalon teljes, bal oldalon részleges coanalis atresia, micrognathia, minden végtagon postaxiális polydactylia, négyujj-redő, aszimmetrikus labia majora, hiányzó labia minora, imperforált anus és sacralis sinus pilonidalis. A beteg az első életnapon légzési elégtelenség miatt elhalálozott. Az édesanyjának ezt követően két terhessége végződött spontán vetéléssel a 7. és 14. terhességi héten.

2. Beteg

A fiúgyermek többszörös fejlődési rendellenességgel a 39. terhességi hétre született egyszerű fartartás miatt császármetszéssel édesanyja 5. terhességéből. Az édesanyjának ezen gyermek születését megelőzően három spontán vetélése volt, majd egy egészséges leánygyermeknek adott életet. Perinatális asphyxia miatt születés után újraélesztésre volt szükség. A fejkörfogat 32,5 cm, a születési hossz 46 cm, a születési súly 2810 g volt. Születéskor generalizált izomhypotonia és bizonytalan jellegű külső nemi szervek (micropenis, hasadt scrotum, perineoscrotális hypospadias, bilaterális cryptorchismus) voltak megfigyelhetőek. Citogenetikai vizsgálat 46,XY kariotípust állapított meg. Craniofaciális eltérésként microcephalia, kisméretű orr széles, lapos orrnyereggel, előrenéző orrnyílások, micrognathia, magasan ívelt szájpad lágyszájpad hasadékkal és széles alveoláris szegélyek voltak megfigyelhetőek. Vázrendszeri eltérések mindkét kézen és a jobb lában postaxiális polydactylia

és bilaterális, részleges 2–3. lábujjakat érintő syndactylia (bőrt érintő) és négyujj-redő voltak jelen. Egyéb eltérések bilaterális cataracta, corpus pineale cysta, oldalkamra tágulat és pylorus stenosis.

3. Beteg

A 2. Beteg fiútestvére, édesanyja 6. terhességéből született egyszerű fartartás miatt császármetszéssel a 37. terhességi héten. A fejkörfogat 33,5 cm, a születési hossz 46 cm, a születési súly 2700 g volt. A klinikai jellemzők a következők voltak: micrognathia, magasan ívelt szájpad lágyszájpad hasadékkal, kisméretű orr széles, lapos ornyereggel, előrenéző orrnyílások, bizonytalan jellegű külső nemi szervek (clitoris-hypertrophia vagy micropenis, perineoscrotális hypospadias és bilaterális cryptorchismus), postaxiális polydactylia a jobb kézen, a bal kéz 5. ujjának clinodactyliája, bilaterális, részleges 2–3. lábujjakat érintő syndactylia (bőrt érintő); majdnem teljes a 4–5. bal lábujjakat érintő syndactylia, négyujj-redő, vesicoureterális reflux és következményes pyelectasia; izomhypotonia és adrenalis hyperplasia.

4. Beteg

Ez a leánygyermek császármetszéssel született édesanyjának első terhességéből a 35. terhességi héten. A fejkörfogat 31 cm, a születési hossz 36 cm, a születési súly 2000 g volt. Többszörös fejlődési rendellenességek jelenléte volt megfigyelhető: craniofaciális eltérések (micrognathia, lágyszájpad hasadék, szájpadhoz tapadt nyelv), postaxiális polydactylia, részleges 2–3. és teljes 5–6. lábujj syndactylia, vertebrális deformáció, atrioventriculáris szeptumdefektus, nyitott ductus arteriosus, tricuspidális billentyű-elégtelenség és a bal vese agenéziája. A beteg keringési elégtelenség következtében 12 napos életkorban exitált, az újraélesztés sikertelen volt. Postmortem vizsgálat tüdő alobulációt és hypoplasiát, hepatomegaliát, uterus bicornist és pneumoniát igazolt.

5. Beteg

A 38. terhességi héten született, 3090 g születési súlyú leánygyermeknél minor rendellenességek voltak megfigyelhetők: bilaterális részleges 2–3. lábujj syndactylia, clinodactylia, a jobb kézen négyujj-redő, microcephalia, magasan ívelt szájpád, uvula bifida, hosszú philtrum, széles, lapos orrnyereg és enyhe hypertelorismus.

6. Beteg

Ez a leánygyermek a 38. terhességi héten született. A fejkörfogat 32 cm, a születési hossz 52 cm, a születési súly 2840 g volt. Klinikailag mélyen ülő fülek, kemény szájpád hasadék, postaxiális polydactylia a jobb kézen, bilaterális 2–3. lábujj syndactylia, dongaláb a bal oldalon, 11 borda a bal oldalon, jobb kamra hypertrophia, tricuspidális billentyűelégtelenség, gastroesophageális reflux, táplálási nehezítettség, dystopiás vese és agyi atrophia. A gyermek 1,5 éves korában valószínűleg anesztetikumra adott adverz reakció miatt halálozott el.

7. Beteg

A fiúgyermek édesanyja első terhességéből született császármetszéssel a 39. héten meconiummal festenyzett magzatvíz miatt. A klinikai tünetek a következők voltak: microcephalia, szájpádhasadék, retrognathia, mélyen ülő fülek, postaxiális polydactylia, négyujj-redő, részleges 2–3. lábujj syndactylia, micropenis, hypospadias, a corpus callosum részleges dysgenezise, atrioventriculáris szeptumdefektus és táplálási nehezítettség.

8. Beteg

Ez a fiúgyermek édesanyja első, nem komplikált terhességéből született a 42. terhességi héten. Születési súlya 3160 g volt. A fenotípusos jellemzők a következők voltak: micrognathia, epicanthus, rövid szemrések, hypertelorismus, magasan ívelt száypad, gingiva hypertrophia, kétoldali négyujj-redő, 2–3. lábujj syndactylia, távol ülő mellbimbók, hasadt scrotum, micropenis, laza ízületek és bőr. Szomatomentális fejlődése lassú volt, 8 hónapos korában szepszis talaján kifejlődött többszervi elégtelenségben elhalálozott.

9. Beteg

A lánygyermek a 38. terhességi héten született, születési súlya 2710 g volt. Megfigyelhető rendellenességek a következők voltak: izomhypotonia, micrognathia, epicanthus, széles orrgyök, előrenéző orrnyílások, részleges 2–3. lábujj syndactylia, négyujj-redő, bifid uvula, táplálási nehezítettség és megnagyobbodott oldalkamrák.

10. Beteg

Ez a fiúgyermek a 36. terhességi héten született császármetszéssel praeeclampsia miatt. Intrauterin retardáció miatt amniocentézis történt, mely 46,XY kariotípust igazolt. A következő eltérések voltak megfigyelhetőek: bizonytalan jellegű külső nemi szervek, hypospadias, hypertelorismus, mélyen ülő fülek, magasan ívelt száypad, jobb oldali postaxiális polydactylia, 2–3. lábujj syndactylia, nyitott ductus arteriosus, enyhén megnagyobbodott jobb oldalkamra és súlyos Hirschsprung betegség.

11. Beteg

A lánygyermek a 38. terhességi héten született, születését megelőzően édesanyjának 3 spontán vetélése volt és született egy egészséges fiúgyermek. Születési súlya 2350 g volt. A következő

klinikai tünetek voltak megfigyelhetők: postaxiális polydactylia minden végtagon, bal kézen négyujj-redő, hypertoniás végtagok, rövid felkar és comb, kétoldali részleges 2–3. lábujj syndactylia, magasan ívelt szájpad, rövid nyak, távol ülő mellbimbók, bizonytalan jellegű külső nemi szervek (kariotípus: 46,XY), pylorus stenosis, biliáris cirrhosis és atrioventriculáris szeptumdefektus. Táplálási nehezítettségén a pylorotomia nem javított, így parenterális táplálásra szorult. 3 hónapos korában számos infekció után halálozott el.

12. Beteg

A fiúgyermek a 35. terhességi hétre született diabetes mellitusszal és hypertensióval komplikált terhességből praeclampsia miatt császármetszéssel. Születési súlya 1725 g volt. A következő fenotípusos eltérések voltak megfigyelhetők: inguinális sérv a bal oldalon, kétoldali részleges 2–3. lábujj syndactylia, hypospadias, hasadt scrotum és pitvari szeptumdefektus.

13. Beteg

A legenyhébb fenotípust mutató, jelenleg 25 éves nőbeteg. Klinikai jellemzők: postaxiális polydactylia, 2–3. lábujj syndactylia, pitvari szeptumdefektus, mentális retardáció, scoliosis, strabismus és nagyothallás. Idősebb lánytestvére a 38. terhességi hétre született akut asphyxiás állapotban, születési súlya 2500 g volt. Sikeresen újraélesztették. Minor anomáliák (nincs klinikai adat, édesanya elmondása alapján újszülöttként éppen úgy nézett ki, mint fiatalabb lánytestvére) és veleszületett szívfejlődési rendellenesség miatt Turner-szindróma gyanúja merült fel, de citogenetikai vizsgálat normál női kariotípust igazolt. Súlyos kardiovaszkuláris rendellenességek voltak megfigyelhetők: atrioventriculáris szeptumdefektus, nyitott ductus arteriosus, részleges tüdővéna transzpozíció, hiányzó tüdőlobuláció és epehólyag agenesia. Súlyos kardiális dekompenzáció miatt a fejlődésben elmaradt és 1 hónapos korában elhalálozott (SLO szindróma irányú kivizsgálás nem történt).

4.3.2 Módszerek

4.3.2.1 Biokémiai diagnosztikai módszerek

Szérum mintákból a 7-DHC szint meghatározását a Honda és mtsai által leírt UV spektrofotometriás módszerrel végeztük [89], a totál koleszterin koncentrációt enzimatikus kolorimetriás módszerrel határoztuk meg.

4.3.2.2 A *DHCR7* gén kódoló régiójának molekuláris genetikai analízise

A perifériás vér leukocytaiból történő genomiális DNS izolálás a **4.1.1 pontban leírtak szerint** történt. A *DHCR7* gén molekuláris genetikai analízise során a kódoló 3–9. exonokat és az exon-intron határokat amplifikáltuk. A korábban Fitzky és mtsai által leírt [48] intronokban lokalizálódó primereket alkalmaztuk, a 7. exon (e7F: 5'-GCT GGG CTC TCG CTA AGT AA-3', e7R: 5'-GCA GTA GAT TAA GGT CAT GGG AAT-3') és 9a exon reverz primer kivételével (e9aR: 5'-ATG TAG AAG TAG GGC AGC AGG TGG C-3'). A Sanger DNS szekvenálást a **4.1.2 pontban leírtak szerint** végeztük. Az elektroferogramok manuális értékelésénél használt referencia szekvencia: *DHCR7* gén (NG_012655.2). A betegek DNS mintáiban detektált mutációk *transz* elhelyezkedését a szülői minták célzott analízisével minden esetben igazolni tudtuk. A 11. Beteg esetén csak a szülői minták álltak rendelkezésünkre.

4.3.2.3 A DHCR7 gén nem-kódoló exonjainak és szabályozó szekvenciáinak analízise

A feltételezett promóter régiót [52] és a 3' UTR egy részét is (a stop kodontól 462 nukleotidot 3' irányban, mely tartalmazza az egyik poliadenilációs helyet [69]) a következő primerek alkalmazásával analizáltuk: PM1F (5'-CCT GAC ACC CATGTG TTT ACC-3'), PM1R (5'-CCG GAC TCG AGA TTG ACG-3'), PM2F (5'-AGC TGG GAT CCC GAA GAA G-3'), PM2R (5'-CAC GCC GCC TAC CCT CTA-3'), PM3-e1F (5'-GCA ATC GCTGAC ATC ATC C-3'), PM3-e1R (5'-CCT GTG AGT GGG CACCTG-3'), e2F (5'-GAG CTT CTG CCC TCT CCT G-3'), e2R (5'-TCA ACG CTG TGA AGC CAT AG-3'), 3UTR1F (5'-CTA CATGGC CAT CCT GCT G-3'), 3UTR1R (5'-CCC CAG GGA CACTGA TTA GA-3'), 3UTR2F (5'-GTT CCT TGC TTT TGC CTTCA-3') és 3UTR2R (5'-GGA GGG GGA TCT AGA GCT GA-3'). A Sanger DNS szekvenálást a **4.1.2** pontban leírtak szerint végeztük.

4.3.2.4 A DHCR7 mRNS szekvenálása

EDTA-val (etilén-diamin-tetraecetsav) antikoagulált perifériás vérből végeztünk totál RNS izolálást Trizol reagenssel (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok). A reverz transzkripciót a High Capacity cDNA Kit-tel (Applied Biosystems) végeztük. A DHCR7 cDNS-t 4 átfedő fragmentben amplifikáltuk *Pfu* DNS polimeráz enzimmel (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok) a következő primerek alkalmazásával: DHCR7mR1F (5'-TGA CAG AACCGC ATC TCA A-3'), DHCR7mR1R (5'-CTC CTA CGT AGCCGG GTA GA-3'), DHCR7mR2F (5'-TAC CTT GTG GGT CACCTT CC-3'), DHCR7mR2R (5'-ATT GGT CAC ATG GCT GTGG-3'), DHCR7mR3F (5'-GAT CGG GAA GTG GTT TGA CT-3'), DHCR7mR3R (5'-GCC ACC CGG AAG ATG TAG TA-3'), DHCR7mR4F (5'-GAC TGT GTC TGG CTG CCT TA-3') és DHCR7mR4R (5'-AGG ATG GCC ATG TAG ATG ATG-3'). A Sanger DNS szekvenálást a **4.1.2** pontban leírtak szerint végeztük.

4.3.2.5 Az új misszensz mutáció patogenitásának megítélésére használt módszerek

Az általunk detektált, korábban nem leírt c.374A>G (p.Tyr125Cys) misszensz mutáció funkcionális hatásának megítélésére a Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) predikciós szoftvert használtuk [90, 91]. A DHCR7 ortológok többszörös szekvencia-illesztését ClustalW bioinformatikai analízissel végeztük [92]. Annak kizárására, hogy nem egy gyakori magyar populációban előforduló polimorfizmusról (benignus variánsról) van szó 50 egészséges egyén DNS mintáját analizáltuk a c.374A>G variáns jelenlétére PCR-RFLP (restrikciós fragmenthossz polimorfizmus) módszerrel, *Sna*BI restrikciós enzim alkalmazásával. A *DHCR7* gén 5. exonjának amplifikációja egy 250 bp-os PCR terméket eredményez. Homozigóta normál (vad típusú) minták emésztése *Sna*BI restrikciós enzimmal (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, Amerikai Egyesült Államok) egy 121 és egy 129bp-os restrikciós fragmentet eredményez, míg az *Sna*BI enzim hasítási helye elvész a c.374A>G variáns jelenléte esetén.

4.4 Szekvencia variánsok leírása (nómenklatúra)

A szekvencia variánsok nómenklatúrája a Human Genome Variation Society (HGVS) (weboldal: <http://varnomen.hgvs.org/>) ajánlásainak megfelelő. CF esetén a mutációk hagyományos elnevezését is feltüntettük [8, 93].

4.5 Szekvencia variánsok terminológiája

Az új variáns klasszifikáció [8] a "mutáció" illetve "polimorfizmus" kifejezések használata helyett a detektált genetikai eltérések "variáns" megnevezését javasolja a következő jelzőkkel kiegészítve: (i) patogén, (ii) valószínűleg patogén, (iii) bizonytalan jelentőségű, (iv) valószínűleg benignus vagy (v) benignus.

Ennek ellenére a mutáció/mutation megnevezést az irodalomban/diagnosztikai gyakorlatban is még mindig igen elterjedt volta miatt a dolgozatban is használtuk a <1% minor allél frekvenciával előforduló, potenciálisan a betegséggel összefüggésbe hozható vagy korábban leírt patogén variánsok megnevezésére.

4.6 Szekvencia variánsok klasszifikációja

A korábban nem leírt szekvencia variánsok besorolására az Amerikai Orvosi Genetikai és Genomikai Társaság (American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)) klasszifikációs rendszerét alkalmaztuk [8], mely két kritérium-szettet alkalmaz a patogén vagy valószínűleg patogén illetve a benignus vagy valószínűleg benignus variánsok klasszifikációjára. A patogenitást alátámasztó kritériumok/bizonyítékok nagyon erős (very strong (PVS1)), erős (strong (PS1–4)), közepes (moderate (PM1–6)) vagy "támogató" (supporting (PP1–5)) erősségűek lehetnek. A variáns benignus voltát alátámasztó kritériumok/bizonyítékok önmagukban bizonyító erejűek (stand-alone (BA1)), erősek (strong (BS1–4)) vagy "támogató" (supporting (BP1–6)) erősségűek lehetnek. Az egyes kategóriákon belüli számozások célja kizárólag a visszavezethetőség, hogy mely kritériumok alapján történt az adott variáns besorolása, nem a bizonyíték erősségi szintjét jelöli. A rendelkezésre álló bizonyítékok kombinációja alapján történik a variáns klasszifikációja az öt kategória egyikébe. Amennyiben egy adott variáns sem a patogén, sem a benignus kritérium-szett kritériumait nem teljesíti, vagy a rendelkezésre álló bizonyítékok ellentmondóak, a bizonytalan jelentőségű variáns besorolás a javasolt. A klasszifikációs kritériumrendszer használatát nagyban megkönnyíti az interneten elérhető és a felhasználó által megadott bizonyítékok alapján a variáns besorolást automatikusan elvégző program [94].

5. Eredmények

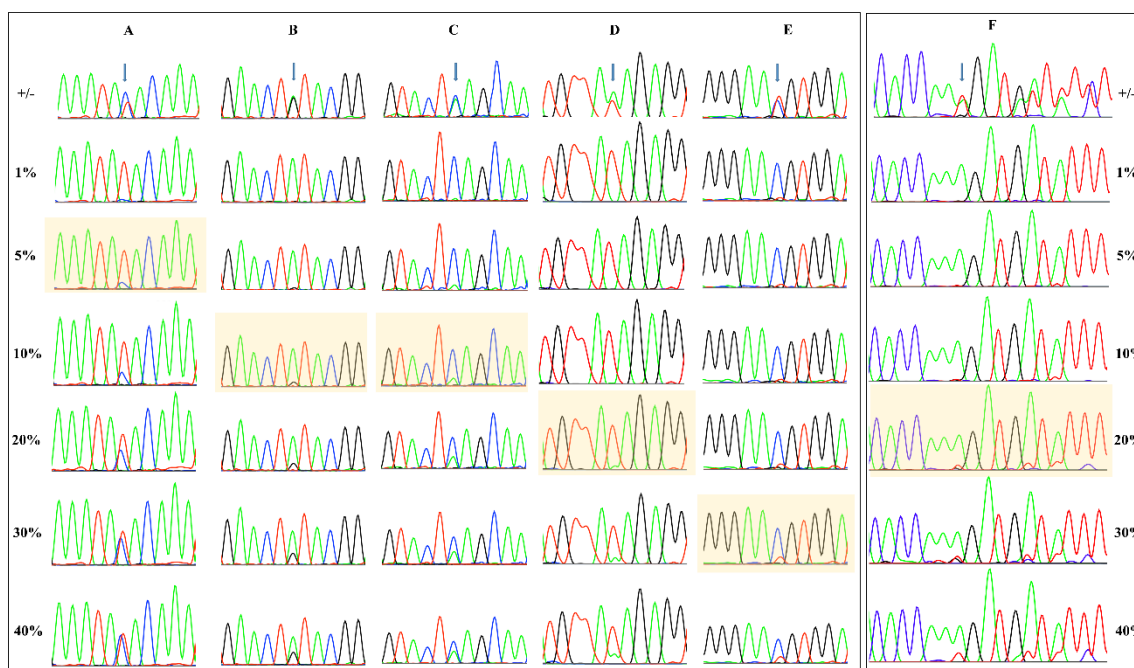
5.1 Az anyai sejt kontamináció interferáló hatása invazív módszerrel nyert prenatális minták molekuláris genetikai tesztelése során

5.1.1 A Sanger DNS szekvenálás anyai sejt kontaminációval szembeni szenzitivitása

Hat kis skálájú mutáció esetén végeztük el a keverékes kísérleteket a Sanger DNS szekvenálás szenzitivitásának meghatározására.

Vad típusú DNS minta ('magzati') és különböző pontmutációkra heterozigóta DNS minta ('anyai') keverékes vizsgálatával az alábbi mutáns allélra vonatkozó detektálási határértékeket (limit of detection, LOD) kaptuk: 1) NM_138694.3:c.8870T>C, 2.5% mutáns allél (5% MCC, **1A. ábra**); 2) és 3) NM_138694.3:c.3407A>G és c.7916C>A, 5% mutáns allél (10% MCC, **1B.,C. ábra**); 4) NM_138694.3:c.6992T>A 10% mutáns allél (20% MCC, **1D. ábra**); (5) NM_138694.3:c.107C>T, 15% mutáns allél (30% MCC, **1E. ábra**).

Vad típusú DNS minta ('magzati') és egy 3 bp-os delécióra (NM_000492.3:c.1521_1523delCTT) heterozigóta DNS minta ('anyai') keverékes vizsgálata során 10% mutáns allél bizonyult a detektálás alsó határának (20% MCC, **1F. ábra**).



1. ábra A Sanger DNS szekvenálás anyai DNS kontaminációval szembeni szenzitivitása. Vad típusú DNS mintát ('magzati') 6 kis skálájú mutációra heterozigóta DNS mintával kevertünk ('anyai'): **A)** NM_138694.3:c.8870T>C; **B)** NM_138694.3:c.3407A>G; **C)** NM_138694.3:c.7916C>A; **D)** NM_138694.3:c.6992T>A; **E)** NM_138694.3:c.107C>T; **F)** NM_000492.3:c.1521_1523delCTT). +/-, heterozigóta 'anyai' DNS minta; 1-40%, a szimulált MCC mértéke. A mutáns allél detektálási határát narancssárga téglalap jelöli minden keveréses vizsgálatnál.

A detektálási határérték megállapítását minden esetben az alapvonal „zajosságától” függően határoztuk meg és kizárólag az egyértelműen elkülöníthető (jelnek tekinthető) csúcsokat vettük figyelembe.

5.1.2 Az MLPA módszer anyai sejt kontaminációval szembeni szenzitivitása

A keverékes vizsgálatot két nagy skálájú mutációtípus 1) egy multiexon-deléció és 2) egy multiexon-duplikáció esetén végeztük el.

1) Az első esetben vad típusú női DNS mintát ('magzati') a *MID1* gén 1-3. exonjainak deléciójára heterozigóta női DNS mintával kevertünk ('anyai'). A kontamináló DNS mintában a heterozigóta deléciónak megfelelő 0,51-0,65 tartományba eső dózis kvócienseket kalkuláltunk a deletált régióra specifikus próbák esetén. 30%-os szimulált MCC-ig a 'magzati' genotípus változatlan maradt, a deletált régióknak megfelelő próbák dózis kvóciensei a normál tartományban maradtak. 40%-os anyai sejt kontamináció hatására, mely 20% mutáns allél arálynak felel meg, a próbák relatív csúcsmagasság értéke a 0,70-0,89 tartományba esett, mely már diagnosztikai bizonytalanságot eredményezhet a gyakorlatban (**1. táblázat**).

Más megközelítésből elemezve az eredményeket, ha a vad típusú mintában a deletált régióknak megfelelő próbák dózis kvócienseinek átlagát tekintettük 100%-nak, a kevert DNS mintákban a próbák átlagos relatív csúcsmagasság csökkenése 0%, 1,96%, 3,92%, 9,8%, 15,68% és 21,56% volt sorrendben az 1%, 5%, 10%, 20%, 30% és 40%-os szimulált MCC esetén (**1. táblázat**).

1. táblázat Az anyai sejt kontamináció interferáló hatása - MLPA módszer, deléció analízis

DNS minta típusa ^a	Átlag ^b (tartomány) ^c	Átlagos DQ ^d csökkenés	Magzati genotípus ^e
vad típus	1,02 (0,97-1,12)	NA	NA
1% MCC	1,02 (0,89-1,10)	0%	vad típus
5% MCC	1,00 (0,85-1,10)	1,96%	vad típus
10% MCC	0,98 (0,88-1,09)	3,92%	vad típus
20% MCC	0,92 (0,85-0,98)	9,80%	vad típus
30% MCC	0,86 (0,81-0,91)	15,68%	vad típus
40% MCC	0,80 (0,70-0,89)	21,56%	nem egyértelmű
heterozigóta deléció	0,57 (0,51-0,65)	44,11%	NA

MCC, anyai sejt kontamináció (maternal cell contamination); DQ, dózis kvóciens (dosage quotient); NA, nem alkalmazható.

^aMCC szimuláció: vad típusú női DNS mintát ('magzati') a *MID1* gén 1-3. exonjainak deléciójára heterozigóta női DNS mintával ('anyai') kevertünk. ^bA deléciós szakaszra specifikus próbák (n=8) átlagos DQ és ^cDQ tartomány értékei. ^dÁtlagos DQ csökkenés a vad típusú minta átlagos DQ-hez képest (utóbbit 100%-nak tekintettük). ^eA magzat teoretikus genotípusa.

2) A második esetben vad típusú DNS mintát ('magzati') a *PKHD1* gén 33-35. exonjainak duplikációjára heterozigóta DNS mintával kevertünk ('anyai'). A kontamináló DNS mintában a heterozigóta duplikációnak megfelelő 1,39-1,46 tartományba eső dózis kvóciensek adódtak a duplikált régióknak megfelelő próbák esetén. A vizsgálat az mutatta, hogy még 40%-os szimulált MCC sem változtatta meg a teoretikus magzati genotípust, a duplikált régióra specifikus próbák dózis kvóciensei a normál tartományban maradtak (**2. táblázat**).

Az előbbieken leírt másik elemzést alkalmazva, ha a vad típusú mintában a duplikált régióknak megfelelő próbák dózis kvócienseinek átlagát tekintettük 100%-nak, a kevert DNS mintákban a próbák átlagos relatív csúcsmagasság növekedése 2,02%, 3,03%, 8,08%, 12,12% és 13,13% volt sorrendben az 5%, 10%, 20%, 30% és 40%-os szimulált MCC esetén (**2. táblázat**, 1% MCC nem eredményezett átlagos relatív csúcsmagasság növekedést).

2. táblázat Az anyai sejt kontamináció interferáló hatása - MLPA módszer, duplikáció analízis

DNS minta típusa ^a	Átlag ^b (tartomány) ^c	Átlagos DQ ^d növekedés	Magzati genotípus ^e
vad típus	0,99 (0,96-1,02)	NA	NA
1% MCC	0,98 (0,96-1,02)	-	vad típus
5% MCC	1,01 (0,98-1,04)	2,02%	vad típus
10% MCC	1,02 (0,99-1,06)	3,03%	vad típus
20% MCC	1,07 (1,03-1,10)	8,08%	vad típus
30% MCC	1,11 (1,08-1,15)	12,12%	vad típus
40% MCC	1,12 (1,09-1,15)	13,13%	vad típus
heterozigóta duplikáció	1,42 (1,39-1,46)	43,43%	NA

MCC, anyai sejt kontamináció (maternal cell contamination); DQ, dózis kvóciens (dosage quotient); NA, nem alkalmazható.

^aMCC szimuláció: vad típusú DNS mintát ('magzati') a *PKHD1* gén 33-35. exonjainak duplikációjára heterozigóta DNS mintával ('anyai') kevertünk. ^bA duplikációs szakaszra specifikus próbák (n=4) átlagos DQ és ^cDQ tartomány értékei. ^dÁtlagos DQ növekedés a vad típusú minta átlagos DQ-hez képest (utóbbit 100%-nak tekintettük). ^eA magzat teoretikus genotípusa.

Az **1. és 2. táblázatokban** kizárólag a deletált és a duplikált régióknak megfelelő próbák relatív csúcsmagasság értékeit tüntettük fel.

5.1.3 Új generációs DNS szekvenálási módszer (piroszekvenálás) anyai sejt

kontaminációval szembeni szenzitivitása

A vizsgálat során vad típusú DNS mintát ('magzati') egy, az *FBN1* génben előforduló pontmutációra (NM_000138.4: c.4727T>C) heterozigóta DNS mintával kevertünk ('anyai').

Piroszekvenálással nagy lefedettségénél (szekvenálási mélység) 0,5% mutáns allél kimutatható volt. A 2,5%, 5%, 10%, 15% és 20% mutáns allél frakciók kvantifikálása megfelelőnek bizonyult (átlag lefedettség 752x, minimum-maximum lefedettség: 437-1165x), a kalkulált és a detektált allél arányok különbsége elfogadhatóan kicsi volt, a legkisebb eltérés, 0,23% a 2,5% mutáns allél frakció, míg a legnagyobb eltérés, 1,92% a 20% mutáns allél frakció esetén adódott (a számítást a bidirekcionális és duplikátumban végzett szekvenálások átlagos detektált mutáns allél aránya alapján végeztük). Az eredményeket a **3. táblázatban** foglaltuk össze.

3. táblázat Az anyai sejt kontamináció interferáló hatása - piroszekvenálás

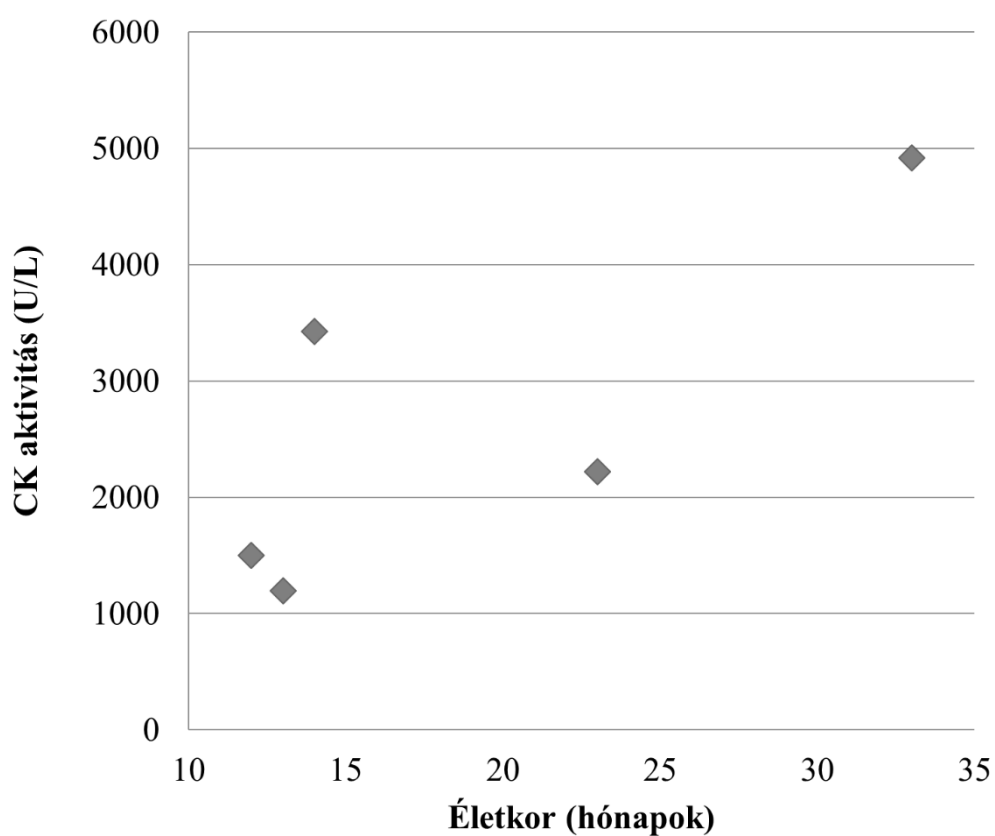
Szimulált MCC ^a %	Kalkulált mutáns allél %	Detektált mutáns allél ^b %	Lefedettség ^c
1	0,5	0,14	802
1	0,5	0,37	545
5	2,5	2,90	1165
5	2,5	2,56	772
10	5	4,23	974
10	5	4,57	459
20	10	8,42	1065
20	10	9,56	530
30	15	17,66	645
30	15	14,50	1029
40	20	16,86	437
40	20	19,30	448

^aVad típusú DNS mintát ('magzati') egy, az *FBN1* génben előforduló pontmutációra heterozigóta DNS mintával kevertünk ('anyai'). ^bA detektált mutáns allél százalékos aránya a bidirekcionális szekvenálás adatainak átlaga. ^cA lefedettség a bidirekcionális szekvenálási lefedettségek összege. A mintákat duplikátumban vizsgáltuk.

5.2 Új misszensz mutáció a *DMD* génben

5.2.1 A szérumban kreatin kináz időbeli változása

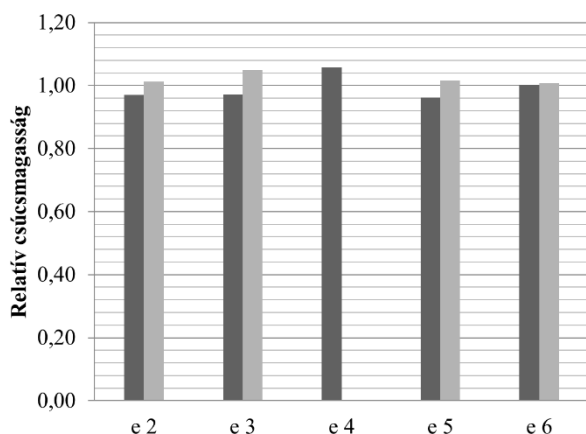
A **2. ábrán** a szérumban kreatin kináz (CK) koncentráció időbeli változását mutatjuk be a követési periódus alatt.



2. ábra A szérumban CK aktivitás emelkedő tendenciát mutatott (1497-4915 U/L) a követési periódus alatt (12-33 hónap). Referencia tartomány: 24–195 U/L.

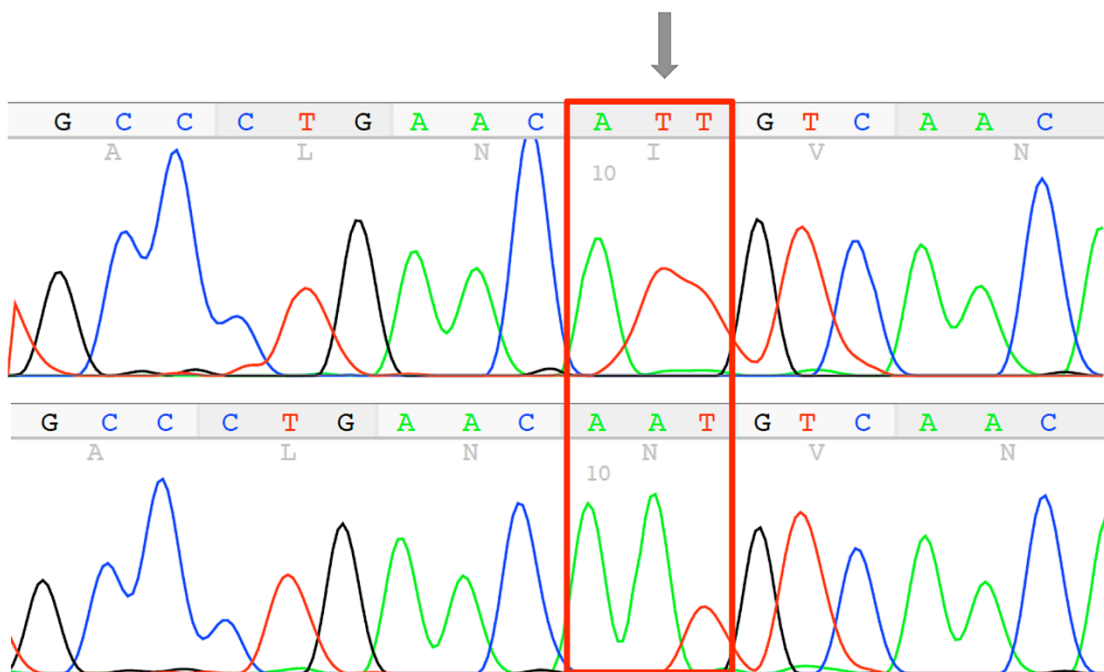
5.2.2 A *DMD* gén molekuláris genetikai analízise

Az MLPA módszerrel történt deléció/duplikáció analízis a *DMD* gén 4. exonjának delécióját mutatta (**3. ábra**).



3. ábra A *DMD* gén MLPA analízise. A 4. és a két szomszédos exonra specifikus próbák relatív csúcsmagasság értékei vannak feltüntetve. A 4. exon esetén a beteg DNS mintájában nem detektáltunk próba amplifikációt (világos szürke). Sötét szürke, normál kontroll (férfi) DNS minta.

A 4. exon PCR-rel történő amplifikációja azonban sikeres volt, így ez a vizsgálat a deléciót nem erősítette meg. A 4. exon Sanger DNS szekvenálása egy új pontmutációt igazolt (c.227A>T, p.Asn76Ile; LOVD adatbázis: <https://databases.lovd.nl/shared/variants/0000171133>), mely a 76. aminosavpozícióban aszparagin-izoleucin cserét eredményez. A mutáció *de novo*-nak bizonyult, az édesanya DNS mintájában nem volt kimutatható (**4. ábra**).



4. ábra A *DMD* gén Sanger DNS szekvenálása új misszensz mutációt igazolt a 4. exonban (nyíl, LRG_199t1:c.227A>T, LRG_199p1:p.Asn76Ile) a beteg DNS mintájában hemizigóta formában (felső panel). *De novo* eredetűnek bizonyult, az édesanya DNS mintájában nem volt kimutatható (alsó panel).

A *DMD* génben egyéb, esetlegesen patogén mutáció jelenlétének kizásására a teljes kódoló régió szekvenálását elvégeztük. Az izom promóter, az exonok és az exon-intron határtól ± 5 nukleotidnyi szakaszok analízise három hemizigóta variánst igazolt. Az eddig nem leírt misszensz mutáción (c.227A>T) kívül, melyet előzőleg Sanger DNS szekvenálással is kimutattunk, két további variánst detektáltunk (mindkettő szerepel a Single Nucleotide Polymorphism Adatbázisban (dbSNP) >5%-os minor allél frekvenciával (minor allele frequency, MAF), **4. táblázat**)

4. táblázat A DMD génben piro szekvenálással detektált variánsok

Lokalizáció	Genotípus (hemizigóta) ^a	Fehérjeshintű hatás ^b	dbSNP ID ^c	MAF ^d
exon 4	c.227A>T	p.Asn76Ile	-	-
exon 37	c.5234G>A	p.Arg1745His	rs1801187	0,47
exon 59	c.8810A>G	p.Gln2937Arg	rs1800280	0,12

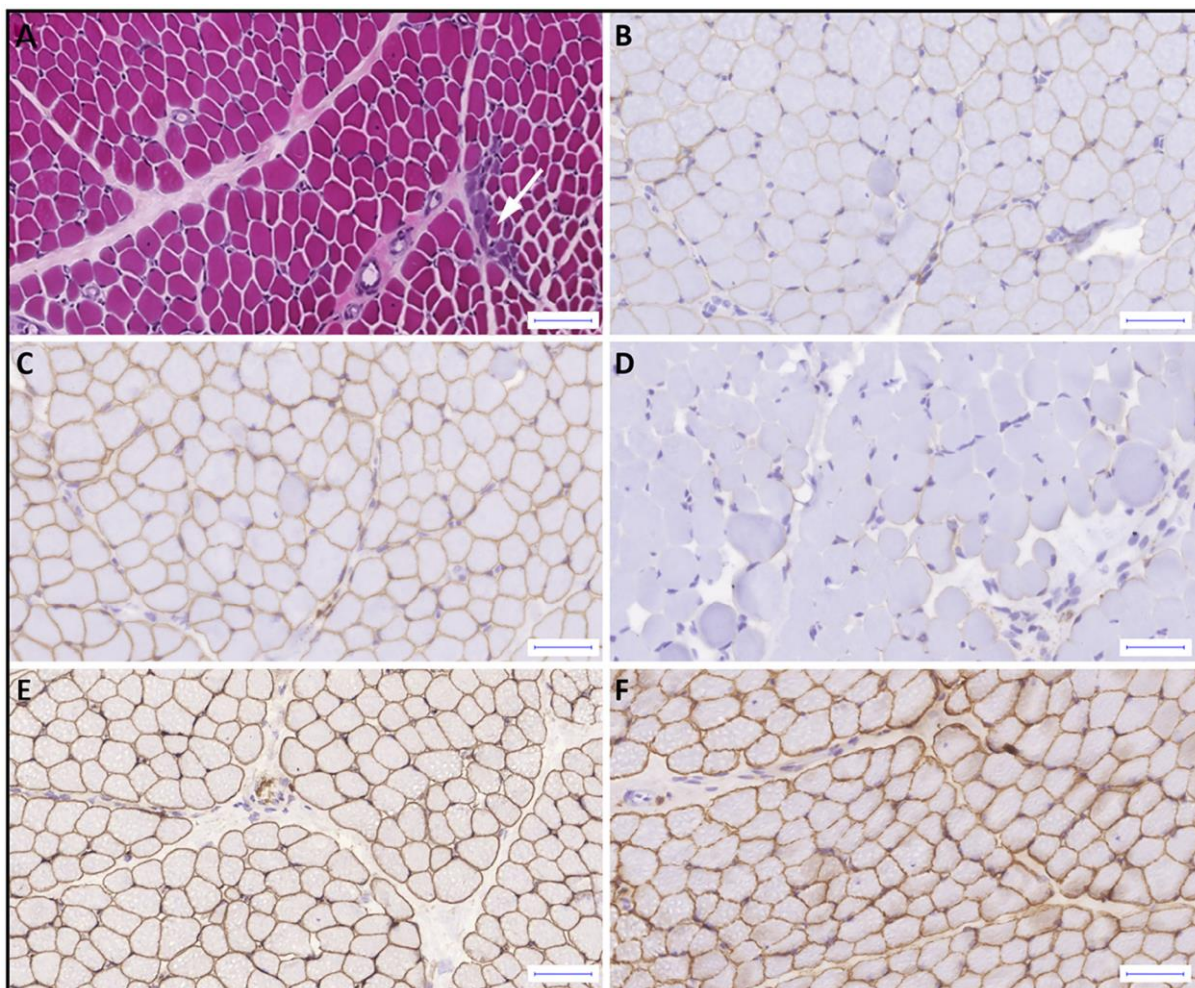
Referencia szekvenciák: ^aLRG_199t1 és ^bLRG_199p1.

^cdbSNP ID, Single Nucleotide Polymorphism database azonosító szám; ^dMAF, minor allél frekvencia, 1000 Genom Projekt.

5.2.3 Az izom szövettani és immunohisztokémiai vizsgálata

Az izom szövettani vizsgálata enyhe dystrophiás vonásokat mutatott: mérsékelten fokozott rostkaliber ingadozás, elvértve néhány hyperkontrahált rost, helyenként enyhe fokú maginternalizáció, kis csoportokban basophil regeneratív rostok (5A. ábra).

A dystrophin immunhisztokémiai vizsgálata: 1) az 1-es antitesttel a sarcolemma változó intenzitású jelölődést mutatott, szegmentálisan minimális vagy hiányzó immunoreaktivitással; 2) a 2-es antitesttel intenzív, lineáris sarcolemmális expresszió volt megfigyelhető (normál jelölődés); 3) a 3-as antitesttel a rostok döntő többsége negatív volt, a rostok kevesebb mint 5%-ában teljes vagy szegmentális sarcolemmális expresszió volt kimutatható (5B., C. és D. ábra). A spectrin immunhisztokémiai vizsgálata normál, lineáris sarcolemmális expressziót mutatott (5E. ábra). Az α , β , γ és δ sarcoglycánok lineáris sarcolemmális expressziót mutattak közepes vagy erős intenzitással, néhány rostban szegmentális expresszió csökkenés volt látható. A merosin expresszió szabályos, erős sarcolemmális mintázatot adott (5F. ábra). Minden immunhisztokémiai reakciót megfelelő negatív és pozitív kontroll minták mellett értékeltünk. A dystrophin immunhisztokémiai vizsgálatát az eredmények megerősítése érdekében megismételtük (Dr. Hortobágyi Tibor, Patológiai Intézet, Neuropathológiai Nem Önálló Tanszék, Debreceni Egyetem).



5. ábra Izombiopszia analízis. **A)** Mérsékelt rostkaliber ingadozás, enyhe fokú maginternalizáció, néhány nekrotikus és bazofil regeneratív rost (fehér nyíl) látható. **B)** Az 1-es antitesttel (dystrophin központi régió) a sarcolemma szegmentálisan csökkent vagy hiányzó immunoreaktivitást mutat. **C)** A 2-es antitesttel (dystrophin C-terminális régió) normál lineáris sarcolemmális expresszió. **D)** A 3-as antitesttel (dystrophin N-terminális régió) a rostok többsége negatív, elvétve néhány rostban szegmentális jelölődés. **E)** A spectrin normál, lineáris sarcolemmális expressziót mutat. **F)** A merosin szabályos, erős sarcolemmális mintázatot ad.

5.2.4 Az Asn76Ile mutáció hatásának *in silico* analízise

5.2.4.1 A humán dystrophin 76. pozíciójában elhelyezkedő aszparagin reziduum (Asn76)

jellemzése

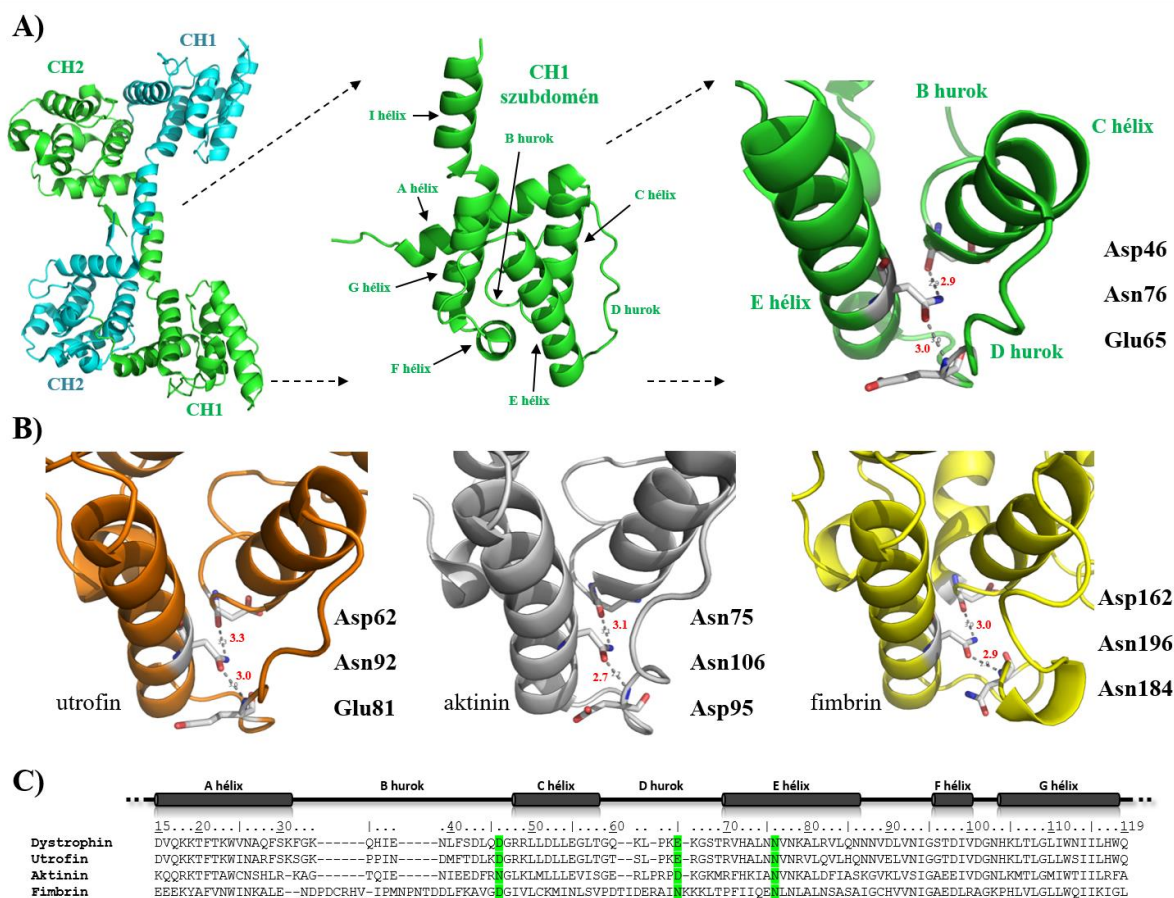
Az Asn76 reziduum domén stabilizációban betöltött szerepének megítélése céljából a humán dystrophin N-ABD szerkezetét analizáltuk. A kristályszerkezet alapján az Asn76 reziduum az N-ABD CH1 szubdoménjának E hélixében helyezkedik el (**6A. ábra**). Irodalmi adatok szerint az Asn76 reziduum nem része az aktinkötő helyek egyikének sem és közvetlenül nem vesz részt az aktin kötésben [39]. Az Asn76 oldallánca nem a CH1 szubdomén felszínén, hanem sokkal inkább a C és E hélixek és a D hurok között „rejtve” helyezkedik el. Az Asn76 oldalláncát alkotó atomok hidrogénkötésnyi távolságra vannak az Asp46 és Glu65 reziduumok fő láncát alkotó atomoktól az N-ADB kristályszerkezete alapján (Asn76.ND2-Asp46.O és Asn76.OD1-Glu65.N). Ezek a hidrogénkötések feltehetően stabilizálják a CH1 szubdomént, kölcsönhatást teremtve az E hélix (Asn76), a B hurok (a C hélix N-terminális vége mellett) (Asp46) és a D hurok között (Glu65) (**6A. ábra**).

5.2.4.2 CH1 szubdoménnel rendelkező fehérjék szerkezet-alapú szekvencia-illesztése

A humán dystrophin, utrofin, α -aktinin 3 és fimbrin fehérjék N-ABD doménjeinek szerkezeti összehasonlítása (**6B. ábra**) és szekvencia-illesztése is az Asn reziduum nagyfokú konzerváltságát mutatta (dystrophin számozás szerint a 76. pozícióban) (**6C. ábra**), mely megfelel korábbi analízisek során tapasztaltak [39, 95, 96].

Az Asn76 reziduummal interakcióban lévő Asp46 és Glu65 reziduumok konzerváltságát szintén megvizsgáltuk. Az Asp reziduum (Asp46 dystrophin számozás szerint) nem mutatott teljes mértékű konzerváltságot a vizsgált humán proteinek CH1 szubdoménjei között (**6C. ábra**), míg az α -aktinin 1 és 4 izoformái esetén Asp reziduum, a 2 és 3 izoformák esetén Asn található ebben a pozícióban (nincs ábrázolva). A humán dystrophin Glu65

reziduumhoz hasonlóan, az Asp46 esetében is hasonló oldalláncok konzerváltsága jellemző ebben a pozícióban (Asn vagy Asp) (6C. ábra).



6. ábra A humán dystrophin, utrofin, α -aktinin 3 és fimbrin fehérjék szerkezete és szekvenciája.

A) A humán dystrophin N-ABD ábrázolása szalagmodellel. Bal oldali panel: az N-terminális ABD-k antiparalell dimert formálnak. Középső panel: a CH1 szubdomén szerkezete hélix és hurok számozással. Jobb panel: a CH1 szubdomén Asn76, Glu65 és Asp46 reziduumok ábrázolása pálcikamodellel, a kölcsönható atomok közötti távolságok (Å) feltüntetésével. **B)** A humán utrofin, α -aktinin 3 és fimbrin fehérjék konzervált Asn reziduumainak interakciói. A humán dystrophin C hélixének, D hurkának és E hélixének megfelelő régiókat mutatjuk. A kölcsönható reziduumokat pálcika ábrázolással mutatjuk, a reziduumok nevét és az atomok közötti távolságot (Å) is feltüntettük. **C)** Az aktinkötő domének szerkezet-alapú szekvencia-illesztése. A humán dystrophin aminosav szekvencia számozása és másodlagos szerkezetének

szerveződése az illesztett szekvenciák fölött található. A hélixeket és hurkok elnevezését feltüntettük, az Asp46, Glu65 és Asn76 reziduumokat (dystrophin számozás szerint) zöld színnel emeltük ki.

5.2.4.3 Az Asn76Ile mutáció feltehetően nagymértékben destabilizáló hatású

Az Asn76Ile mutációnak a másodlagos szerkezetre gyakorolt hatását a mutáns N-ABD szekvenciája alapján jósoltuk. A predikció alapján az aminosavcsere nem változtatja meg sem az N-ABD domén, sem pedig az E hélix másodlagos szerkezetét.

A mutáns humán dystrophin protein szerkezete (a FoldX algoritmussal végzett számítás alapján) úgy változik meg, hogy az Asn76-nak a szomszédos Asp46 és Glu65 reziduumokkal kialakított konzervált hidrogénkötései felbomlanak a poláros aszparagin hidrofób izoleucinra cserélődése miatt. A mutáció feltehetően nagymértékben destabilizáló ($\Delta\Delta G > 3$ kcal/mol) és következményes fehérje diszfunkciót okoz.

Az p.Asn76Ile mutáció a dystrophin fehérje aggregációs hajlamára/szolubilitására gyakorolt hatását szintén megvizsgáltuk. Analízisünk alapján mind a vad típusú Asn76, mind a mutáns Ile76 reziduumok „rejtve” maradnak a C és E hélixek között, így a CH1 szubdomén aggregációra hajlamos régióinak nem képezik részét (Dr. Mótyán János András, *Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debreceni Egyetem*).

5.3 Magyarországi Smith-Lemli-Opitz szindrómás betegek mutációs spektruma

5.3.1 Szérum koleszterin és 7-DHC meghatározás

Minden beteg esetén extrém mértékben emelkedett szérum 7-DHC koncentrációt mértünk 87-302 mg/L tartományban, mely 580-2013-szorosa a referencia értéknek ($<0,15$ mg/L). A szérum koleszterin koncentráció 8/13 beteg esetén alacsony volt a korspecifikus referencia tartományhoz viszonyítva. A 7-DHC/koleszterin arány minden esetben kóros volt (nem tüntettük fel). A 7-DHC és koleszterin értékek minden esetben a kezelést (koleszterin szupplementáció) megelőzően kerültek meghatározásra.

5.3.2 A *DHCR7* gén molekuláris genetikai analízise

5.3.2.1 *DHCR7* génmutáció típusok a magyar SLO szindrómás betegpopulációban

12/13 beteg esetén mindkét kóroki mutációt azonosítottuk, 1 esetben egy mutációt detektáltunk heterozigóta formában. A betegek genotípusát, a fehérjeszintű hatást, a súlyossági pontértéket, a szérum 7-DHC és koleszterin meghatározások eredményeit az **5. táblázatban** részletezzük.

12 nem rokon egyénben, 23 identifikált allél alapján: 56,5% (13/23) misszensz mutáció, 26,1% (6/23) nonszensz mutáció és 17,4% (4/23) splicingot érintő mutáció. 11 nem rokon betegben detektáltuk mindkét mutációt és egy beteg kivételével, aki homozigóta genotípusú volt a c.964–1G>C null allélra (9,1%, 1/11) minden esetben összetett heterozigótaság igazolódott: 63,6%-ban (7/11) null allél (nonszensz vagy splicing mutáció)/misszensz mutáció, 27,3%-ban (3/11) két különböző misszensz mutáció volt kimutatható.

5. táblázat Magyarországi SLO szindrómás betegek mutációs spektruma, szérumban 7-DHC és koleszterin értékei

Betegek	Genotípus ^a	Fehérjeszintű következmény ^b	Súlyossági fok ^c	7-DHC ^d (mg/L)	Koleszterin ^e (mmol/L)
1	c. [964-1G>C];[964-1G>C]	p.[Gly322Lysfs*136];[Gly322Lysfs*136]	55-S	109	0,31
2	c. [964-1G>C];[1190C>T]	p.[Gly322Lysfs*136];[Ser397Leu]	50-T	302	1,4
3	c. [964-1G>C];[1190C>T]	p.[Gly322Lysfs*136];[Ser397Leu]	40-T	253	1,08
4	c. [964-1G>C];[1190C>T]	p.[Gly322Lysfs*136];[Ser397Leu]	55-S	174	0,58
5	c. [452G>A];[740C>T]	p.[Trp151*];[Ala247Val]	10-E	130	3,47
6	c. [976G>T];[374A>G]	p.[Val326Leu];[Tyr125Cys]	40-T	205	2,1
7	c. [730G>A];[976G>T]	p.[Gly244Arg];[Val326Leu]	40-T	155	0,72
8	c. [326T>C];[452G>A]	p.[Leu109Pro];[Trp151*]	30-T	126	0,77
9	c. [1295A>G];[1328G>A]	p.[Tyr432Cys];[Arg443His]	15-E	217	2,0
10	c. [452G>A];[976G>T]	p.[Trp151*];[Val326Leu]	20-T	156	1,57
11	c. [725G>A];[452G>A]	p.[Arg242His];[Trp151*]	55-S	215	0,8
12	c. [452G>A];[1295A>G]	p.[Trp151*];[Tyr432Cys]	20-T	274	1,47
13	c. [452G>A];[?]	p.[Trp151*];[?]	15-E	87	2,44

Referencia szekvencia *DHCR7* gén (NCBI): ^aNM_001360.2 (kódoló DNS szekvencia),

^aNG_012655.2 (genomi), ^bNP_001351.2 (fehérje szekvencia).

^cE = enyhe; T = típusos/klasszikus; S = súlyos.

Korspecifikus referencia tartományok: ^d7-DHC <0,15 mg/L; ^ekoleszterin 0-1 év: >1,3 mmol/L

(1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 Betegek), koleszterin >1 év: 2,8-5,2 mmol/L (5, 13 Betegek).

5.3.2.2 Magyar DHCR7 génmutációs spektrum

A magyar SLO szindrómás betegekben detektált genetikai eltéréseket összehasonlítottuk egyéb európai országok mutációs spektrumával (**6. táblázat**). A pánetnikus, de Nagy-Britanniában legelterjedtebb, leggyakoribb SLO szindrómát okozó mutáció a c.964-1G>C gyakori Spanyolországban, Olaszországban, Németországban és Ausztriában [97, 98], de ritka Lengyelországban, Csehországban, Szlovákiában és Dél-Olaszországban [97, 99, 100] a második leggyakoribb mutációnak adódott az általunk vizsgált betegpopulációban (4 allél). A p.Trp151* volt a leggyakoribb a (6 allél) magyar SLO szindrómás betegekben. A p.Trp151* szintén gyakori Lengyelországban, Németországban és Ausztriában, Csehországban, Szlovákiában, de nagyon ritka Nagy-Britanniában, Spanyolországban és Olaszországban. A másik tipikusan kelet-európai mutáció, a p.Val326Leu allél [97], az előbbi mutációhoz nagyon hasonló földrajzi megoszlást mutat, a magyar betegpopulációban is a 3. leggyakoribb előfordulású (3 allél). A p.Ser397Leu és p.Tyr432Cys mutációkat összesen 2-2 allélon detektáltuk, további 8,3-8,3%-ban. További, korábban leírt SLO szindrómát okozó mutációk [101] 1-1 allélon fordultak elő: p.Ala247Val, p.Gly244Arg, p.Leu109Pro, p.Arg443His és p.Arg242His (**5. táblázat**).

6. táblázat A leggyakoribb SLO szindrómát okozó *DHCR7* génmutációk prevalenciája (%)

Európában

Ország (allélok száma)	Nagy- Britannia (44)	Lengyel- ország (30)	Németország, Ausztria (44)	Olasz- ország (20)	Spanyol- ország (40)	Csehország, Szlovákia (20)	Magyarország (24)
p.Trp151*	2,3	33,3	18,2	<5,0	<5,0	50,0	25,0
p.Val326Leu	2,3	23,3	18,2	0	0	25,0	12,5
p.Arg352Trp	0	13,3	6,8	<5,0	<5,0	0	0
p.Leu157Pro	0	6,7	2,3	0	0	5,0	0
c.964–1G>C	34,0	3,3	20,5	20,0	30,0	5,0	16,7
p.Arg446Gln	0	3,3	0	0	7,5	5,0	0
p.Arg404Cys	9,1	0	0	<5,0	0	0	0
p.Thr93Met	6,8	0	0	45,0	23,0	0	0
p.Gly410Ser	2,3	0	2,3	0	7,5	10,0	0
p.Phe302Leu	2,3	0	0	0	10,0	0	0
p.Ser397Leu	0	0	0	0	0	0	8,3
p.Tyr432Cys	0	0	0	0	0	0	8,3
Összesen	59,1	83,3	68,3			100,0	70,8
Referencia ¹	a	a	a	b	b	c	jelen tanulmány

¹a = [97]; b = [98]; c = [99]. Kövérített betűkkel a magyar betegpopulációban ≥ 2 allélon detektált mutációkat jelöltük.

5.3.2.3 Új misszensz mutáció kimutatása a *DHCR7* génben

A már ismert SLO szindrómát okozó nonszensz, misszensz és splicing mutációkon kívül egy új misszensz mutációt c.374A>G (p.Tyr125Cys) is detektáltunk. A mutáció patogenitását az alábbiak támasztják alá: 1) az érintett aminosavreziduum filogenetikailag konzervált emberben, kutya, zebadánióban, egérben és rhesusmajomban (7. ábra), 2) a Grantham mátrix pontszám 194 és 3) a SIFT predikciós szoftver szerint ebben a pozícióban a tirozin-cisztein aminosavcsere nem tolerálható. Fentiekén túl a c.374A>G volt az egyetlen potenciálisan patogén variáns *transz* pozícióban egy másik ismert SLO szindrómát okozó mutációval (c.976G>T (p.Val326Leu)) az érintett egyénben. A legközelebbi aminosavpozíciók, ahol SLO szindrómát okozó mutációt leírtak a 119. (p.His119Leu [71]) és a 138. (p.Gly138Val, [102]) (7.

ábra). A c.374A>G 50 egészséges egyén DNS mintájában (100 allél) PCR-RFLP módszerrel nem volt kimutatható.

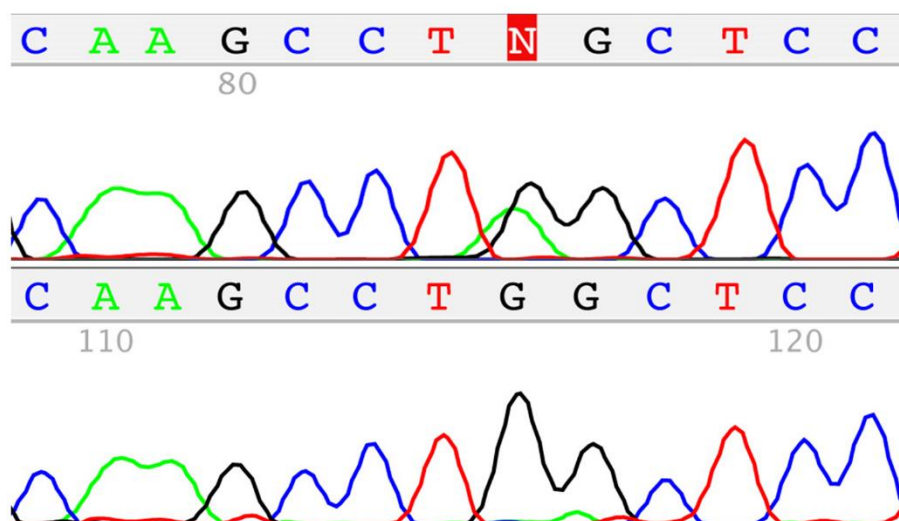
gi 12652617 gb AAH00054.1	CHKFLPGYVGGIQEGAVTPAGVVNKYQING	147
gi 384945612 gb AFI36411.1	CHKFLPGYVGGIQEGAVTPAGVVNKYQING	147
gi 73983551 ref XP_540796.2	CHKFLPGYVGGVQEGAVTPAGIVNKYEING	147
gi 71059883 emb CAJ18485.1	CHRFLPGYVGGVQEGAITPAGVVNKYEVNG	143
gi 41152207 ref NP_958487.1	LHKILPGYVGGVQDGARTPAGLINKYEVNG	150
	*:*****:*:* ** *:*****:*	

7. ábra DHCR7 ortológok aminosavszekvencia illesztése. AAH00054.1: ember, AFI36411.1: rhesusmajom, XP_540796.2: kutya, CAJ18485.1: egér, NP_958487.1: zebradánió. Az érintett tirozin reziduumot aláhúzással jelöltük. A 2 legközelebb eső ismert SLO szindrómát okozó misszensz mutációt kövérített betűk jelzik (H119, G138).

5.3.2.4 A DHCR7 gén többszintű molekuláris genetikai analízise

A 13. Beteg esetén a standard molekuláris genetikai analízissel (kódoló exonok és exon-intron határok szekvenálása) egy korábban leírt, SLO szindrómát okozó mutációt tudtunk azonosítani heterozigóta formában (c.452G>A (p.Trp151*)). Második szintű analízisként a nem kódoló (1-2.) exonok, a feltételezett promóter régió és a 3' UTR régió vizsgálata (a stop kodontól 462 nukleotid 3' irányban, mely tartalmazza az egyik poliadenilációs helyet is) történt. Ez a vizsgálat újabb potenciálisan patogén eltérést nem igazolt.

A következő lépésben DHCR7 mRNS szekvenálást végeztünk. Ez utóbbi vizsgálat nonszensz mutáció mediálta mRNS lebomlást igazolt a c.452G>A mutáció esetén, a mutáns allél fehérvérsejtekből származó mRNS-ben nem volt kimutatható (**8. ábra**). Ezen SLO szindrómát okozó mutáció esetén ez ismert jelenség [9]. Egyéb patogén eltérést az mRNS szekvenálás sem igazolt.



8. ábra *DHCR7* cDNS analízis. A c.452G>A (p.Trp151*) mutáció nem volt detektálható a fehérvérsejtekből származó mRNS-ben, mely nonszensz mutáció mediálta mRNS lebomlásra utal. *Felső panel:* genomiális DNS, *alsó panel:* cDNS.

6. Megbeszélés

6.1 Az anyai sejt kontamináció interferáló hatása invazív módszerrel nyert prenatális minták molekuláris genetikai tesztelése során

Ebben a tanulmányban 3 molekuláris genetikai módszer, a Sanger DNS szekvenálás, az MLPA és a piroszekvenálás anyai DNS kontaminációval szembeni érzékenységét határoztuk meg. A molekuláris prenatális diagnosztikában előforduló leggyakoribb szituációt modellezve, súlyos monogén betegség öröklődése, ismert, a családra jellemző mutációkkal, mely esetekben az édesanya autoszomális recesszív vagy X-kromoszómához kötött recesszív betegség hordozója; minden esetben a kontamináló DNS minta ('anyai') különböző mutációkra heterozigóta genotípusú volt.

A Sanger DNS szekvenálás anyai DNS kontaminációra való szenzitivitásának vizsgálata során a keveréses kísérletek, melyeket hat (5 pontmutáció és egy 3 bp-t érintő kis

deléció) kis skálájú mutáció esetén végeztünk el, különböző detektálási határértékeket (2,5-15% mutáns allél, mely 5-30% szimulált MCC-nek felel meg) mutattak. Eredményeink alapján ≥ 5 -30% MCC értékek esetén a magzati genotípus bizonytalanná válhat, és diagnosztikai bizonytalansághoz vagy akár fals magzati genotípus megállapításához vezethet a gyakorlatban.

Az általunk megállapított detektálási határértékek összhangban vannak az irodalomban közölt, a Sanger DNS szekvenálás analitikai szenzitivitását, mozaikosság detektálására való alkalmasságát vizsgáló tanulmányok eredményeivel szolid tumorok és nem tumoros betegségek vonatkozásában [103-106]. Ezekben a tanulmányokban tesztelt mutációk többségénél az LOD 15-20% mutáns allélnak adódott, a Sanger DNS szekvenálás inszenzitív voltát igazolva kismértékű mozaikosság kimutatására [103, 104, 106]. Tumoros sejtvonalakat alkalmazó keverékes vizsgálatok alapján a Sanger DNS szekvenálás képes 2-10% mutáns allél frakció kimutatására is, azonban ebben a tartományban gyenge a reprodukálhatóság, gyakori a téves vagy bizonytalan genotipizálás, míg a genotípusok meghatározása 20-30%-os mutáns allél frakciók esetén az esetek döntő többségében megfelelő [105]. Habár a Sanger DNS szekvenálás nem kvantitatív módszer, ismert, hogy az elektroferogramon megjelenő csúcs magassága a szóban forgó nukleinsav bázis mintában előforduló relatív koncentrációjával arányos (az általunk elvégzett keverékes vizsgálatok is demonstrálják ezt, **1. ábra**). Mindazonáltal, a Sanger DNS szekvenálás egy analóg módszer, mely egy átlagos jelet generál a mintában jelen lévő mutáns és vad típusú DNS molekulákról és az eredmények gyakran variábilisak, különösen, ha az allélfrekvencia alacsony [104, 107]. A Sanger DNS szekvenálás limitációi a spektrum mindkét végén ismertek, a nagyobb arányú mozaikosságot (30-35%) gyakran „túlbecsüli”, csírasejtes variánsnak tűnhet [103]. A magzati mintában jelen lévő anyai DNS mennyiségétől függően a kvantifikációs képesség hiánya, a variábilis szenzitivitás és a gyenge reprodukálhatóság alacsony allélfrakciók esetén a Sanger DNS szekvenálással nyert prenatális eredmények interpretációját megnehezítheti.

Kissé kiszélesítve tanulmányunk tárgykörét, ha a magzat apai mutáció hordozó autoszomális domináns betegség esetén, a kontamináló anyai minta homozigóta normál lesz. Ebben az esetben, a Sanger DNS szekvenálás szenzitivitását figyelembe véve, a szignifikáns (vagyis magzati eredményt befolyásoló) MCC szint valószínűleg sokkal magasabb lesz, mivel az apai mutáció 2,5-15%-os allélfrakcióig feltehetően kimutatható marad a magzati mintában. Az anya apai mutációra nézve negatív státusza autoszomális recesszív öröklődésmenet esetén szintén befolyásolhatja az apai mutáció kimutathatóságát az allélfrakciók eltolása miatt a főtális mintában.

Összefoglalva, habár az általunk elvégzett vizsgálatok és az irodalomban elérhető adatok a Sanger DNS szekvenálás alacsony analitikai szenzitivitását mutatják a legtöbb tesztelt mutáció esetén, fontos hangsúlyozni, hogy a szignifikáns anyai DNS kontamináció mértéke igen sok tényezőtől függhet: a már említett mutáció típusán túl, a szekvencia környezettől, az alapvonal variabilitásától, az öröklődés módjától és a DNS minta minőségétől egyaránt, nem is beszélve az esetleges PCR torzítás előfordulásáról (amikor valamilyen oknál fogva az egyik allél preferáltan amplifikálódik), ezért minden eset egyedi és rendkívül fontos a prenatális minták bidirekcionális DNS szekvenálása is.

Az MLPA módszer anyai DNS kontaminációra való szenzitivitását vizsgáló első kísérletben vad típusú női DNS mintát a *MID1* gén 1-3. exonjainak deléciójára heterozigóta női DNS mintával kevertünk. 30%-os szimulált MCC koncentrációig (15% mutáns allél) a teoretikus magzati genotípus változatlan maradt. 40% MCC (20% mutáns allél) mellett a deléciós szakaszra specifikus próbák esetén a dózis kvóciensek 30%-os maximális csökkenését detektáltuk, mely már diagnosztikai bizonytalansághoz vezethet (heterozigóta deléció esetén a relatív csúcsmagasság tipikusan 35-50%-os csökkenése várható). Egy másik megközelítést alkalmazva az anyai DNS kontamináció MLPA módszerre való hatásának megítélésére, a vad típusú mintában a deletált régióra specifikus próbák dózis kvócienseinek átlagát 100%-nak

tekintettük. A növekvő mértékben kontaminált DNS mintákban a releváns próbák átlagos relatív csúcsmagasságának fokozatos csökkenése volt kimutatható (**1. táblázat**).

A második esetben vad típusú DNS mintát a *PKHD1* gén 33-35. exonjainak duplikációjára heterozigóta DNS mintával kevertünk. Az eredmények alapján 40%-os szimulált MCC (20% mutáns allél) sem változtatta meg a teoretikus magzati genotípust, a duplikált régióra specifikus próbák relatív csúcsmagasság értékei a normál tartományban maradtak (**2. táblázat**). Az eredmények analízisére az előbbieken leírt másik módszert alkalmazva, ha a vad típusú mintában a duplikált régióra specifikus próbák dózis kvócienseinek átlagát tekintettük 100%-nak, a kevert DNS mintákban a megfelelő próbák átlagos relatív csúcsmagasság értékeinek fokozatos növekedése volt megfigyelhető (**2. táblázat**). Az MLPA egy szemikvantitatív technika és az előbbieken leírt kalkuláció a rutindiagnosztikai gyakorlatban nem használatos, azonban lehetségessé teszi az allélfrakciók durva becslését.

Összefoglalva, az anyai DNS kontamináció MLPA módszerrel nyert eredményekre gyakorolt hatását: 1) több exont érintő deléciók esetén $\geq 40\%$ MCC vezethet magzati genotipizálási hibához (a detektálási határ 20% mutáns allél volt); 2) a több exont érintő duplikáció vizsgálata során a legmagasabb tesztelt (40%) MCC sem befolyásolta a genotípust, ezen típusú mutáció esetén az LOD feltehetően $>20\%$ mutáns allél. Van Veghel-Plandsoen és mtsai vizsgálták az MLPA alacsony szintű mozaicizmus kimutatására való képességét egy több exont érintő duplikáció és egy teljes gén deléció esetén, melyek megközelítőleg (sorrendben) 20% illetve 15% mutáns allél jelenléte esetén voltak kimutathatóak [108]. A mi eredményeinkhez hasonlóan, az MLPA módszer kevésbé bizonyult érzékenynek duplikációk kimutatására a deléciókkal összehasonlítva. Habár ezen adatok az MLPA módszer inszenzitivitását mutatják anyai DNS kontaminációval szemben, a pontos magzati genotipizáláshoz elengedhetetlen a párhuzamosan elvégzett MCC szint meghatározás és az anyai genotípus figyelembevétele, amennyiben anyai DNS kontamináció jelen van (például, ha

a klinikai kérdés az, hogy a magzat hordozza-e az apai mutációt és az anya genótipusa homozigóta normál erre a kópiaszám variációra, CNV). A CNV mérete és a próbák denzitása is feltehetően befolyásolja a detektálás szenzitivitását, illetve az egy exont érintő mozaikos deléciók/duplikációk megítélése nehezebb, mert az amplifikált próbák szignálintenzitása függ a DNS minőségétől is [108, 109].

Irodalmi adatok szerint >20% MCC szint ritkán, a magzati minták 0,3-1,3%-ában detektálható [7], mely alapján az esetek döntő többségében a CVS és AF mintákban az anyai DNS kontamináció szintje a Sanger DNS szekvenálás és MLPA módszerek (leggyakrabban detektált) szenzitivitási szintje alatt van. Azt is meg kell említeni, hogy az MCC detektálási esszék ajánlott szenzitivitása 5% [16], mely 3-8-szor magasabb, mint a Sanger DNS szekvenálás és MLPA módszerek esetén szignifikánsnak számító anyai DNS kontamináció mértéke.

A harmadik keverékes vizsgálatsorozat során a piroszekvenálás anyai DNS kontaminációval szembeni érzékenységét vizsgáltuk. A prenatális molekuláris genetikai tesztek elvégzésének két fő indikációs területe lehet. Súlyos, monogénes betegség öröklődik a családban és a családra jellemző mutációk ismertek, ebben az esetben a vizsgálatok ezen genetikai eltérések kimutatására irányulnak. A másik lehetőség, hogy a magzati ultrahang vizsgálat genetikai betegség gyanúját veti fel és a genetikai tesztek ennek megerősítésére irányulnak [110]. Ez utóbbi esetben az új generációs DNS szekvenálási módszerek nagy áteresztőképessége, gyorsasága és relatíve alacsonyabb költsége a Sanger szekvenálással összehasonlítva nagy előnyt jelenthet genetikai heterogenitást mutató kórképek genetikai diagnosztikája esetén.

A piroszekvenálás egy kvantitatív módszer, az egyedi DNS molekulák szekvenálása lehetővé teszi az allél arányok pontos meghatározását [111]. Vizsgálatunk alapján piroszekvenálással 0,5% mutáns allél detektálása is lehetséges volt nagy lefedettségénél,

azonban ezt az igen alacsony allél frakciót a módszer alámérte. A 2,5-20%-os allél frakció tartományban a mutáns frakció pirosekvenálással történő kvantifikálása pontos volt (a pontosságot az invazív prenatális molekuláris diagnosztika elvárásaihoz mérten értjük), ezért, amennyiben ugyanazon magzati mintán elvégezzük az MCC analízist és az anyai genotípus ismert, az eredmények interpretációja lehetséges lehet 1-40%-os anyai DNS kontamináció mellett is.

A pirosekvenálás szenzitivitását korábban *KRAS* génmutációk kimutatására kifejlesztett esszék esetén több munkacsoport is vizsgálta és körülbelül 5%-ban határozta meg [105, 106, 112]. Rohlin és mtsai szerint a pirosekvenálás ennél is magasabb analitikai szenzitivitású, 1% mutáns allél is kimutatható igen magas lefedettségénél (648-8313x) [104]. Jamuar és munkacsoportja egy másik típusú új generációs szekvenálási technika mozaikos formában előforduló mutációk kimutatása során mutatott szenzitivitását vizsgálta és azt találták, hogy ≥ 200 -szoros átlagos szekvenálási lefedettségénél 5% mutáns allél kimutatható [103]. A klinikai gyakorlatban alkalmazott új generációs szekvenálási módszerek alkalmazása esetén ennél sokkal alacsonyabb az átlagos lefedettség (40-80x) [103], mely nagy valószínűséggel lényegesen alacsonyabb érzékenységet eredményez.

Az új generációs szekvenálási technikák kvantitatív módszerek, a mintában lévő mutáns és vad allélok pontos arányának meghatározására képesek, a kvantifikáció pontossága elsősorban a szekvenált molekulák számától, vagyis a szekvenálás mélységétől (lefedettség) függ [107]. Ezért, bár ezek a módszerek nagy lefedettség esetén igen szenzitívek az anyai DNS kontamináció jelenlétére, párhuzamosan meghatározott MCC szint és ismert anyai genotípus mellett az allél arányok pontos meghatározása lehetővé teheti az eredmények megfelelő interpretációját anyai DNS kontamináció jelenléte esetén is.

Összefoglalva, a magzati mintákban esetlegesen jelen lévő anyai DNS miatt az eredmények körültekintő interpretációja kritikus a prenatális molekuláris genetikai

diagnosztikában. Fontos hangsúlyozni az ugyanazon magzati mintából a diagnosztikai teszttel párhuzamosan elvégzett MCC analízis szerepét. Jelen tudásunk alapján anyai DNS kontamináció jelenléte a magzati mintában nem feltétlenül teszi értékelhetetlenné az eredményeket, helyes prenatális molekuláris genetikai diagnózis és leletkiadás az esetek döntő többségében lehetséges és az ismételt, invazív és kockázatot jelentő mintavétel elkerülhető.

6.2 Új misszensz mutáció a *DMD* génben

A tizennégy hónapos fiúgyermek esetén jelentősen emelkedett CK érték, enyhe izomhypotonia és a motoros fejlődés elmaradása alapján BMD/DMD gyanúja merült fel. A többszintű molekuláris genetikai kivizsgálást a *DMD* gén MLPA analízisével kezdtük, mely a 4. exon delécióját mutatta. Az MLPA-val igazolt egy exont érintő deléciók más módszerrel történő megerősítése szükséges, mivel egy "látszólagos" deléció hátterében a próbák hibridizációját vagy ligációját gátló, a hibridizációs régióban lévő pontmutáció állhat [113]. A 4. exon sikeres PCR amplifikációja az előzetes MLPA eredmény fals pozitivitását igazolta, majd ezt követően Sanger DNS szekvenálással a 227. nukleotid helyet érintő A-T transzverziót detektáltunk az 5' MLPA próba ligációs helyének megfelelően. A pontmutáció nagy valószínűséggel a ligáció és/vagy hibridizáció és ezáltal a próbaamplifikáció elmaradásához vezetett. A *DMD* gén teljes kódoló régiójának szekvenálása nem igazolt egyéb potenciálisan patogén genetikai eltérést a korábban Sanger DNS szekvenálással detektált, nem leírt c.227A>T pontmutáción kívül. A c.227A>T variánst a legújabb variáns klasszifikáció [8] alapján valószínűleg patogénként kategorizáltuk a következők alapján: i) 'erős' (strong) bizonyíték, hogy a detektált variáns *de novo*, az édesanya DNS mintájában a mutáció nem volt kimutatható és a családi anamnézis negatív BMD/DMD-re nézve; ii) közepes erejű evidencia, hogy a genetikai eltérés nem szerepel az 1000 Genom Projekt és az ExAC (Exome Aggregation Consortium) adatbázisokban, iii) támogató bizonyíték, hogy az érintett aminosavreziduum fajok közötti evolúciós

konzerváltságot mutat, továbbá strukturálisan hasonló, aktinkötő doménnel rendelkező humán proteinekkel való összehasonlítása (szekvenciális és strukturális) is az Asn76 konzerváltságát mutatta; iv) a beteg fenotípusa specifikus BMD/DMD-re (a jelentősen emelkedett CK koncentráció és a klinikai kép alapján).

A detektált új misszensz mutáció patogenitásának további (indirekt) alátámasztására és differenciáldiagnosztikai szempontok (BMD vagy DMD?) miatt izombiopszia elvégzésére is sor került. Az izom szövettani vizsgálata (hematoxin-eozin festés) enyhefokú myopathiás jellegű elváltozásokat mutatott regeneratív aktivitással. A dystrophin fehérje expressziós mintázata patológiás volt. Az 1-es antitesttel (a fehérje központi részét ismeri fel) változó intenzitású, szegmentálisan minimális, illetve hiányzó sarcolemmális immunoreaktivitás volt detektálható, a 3-as antitesttel (a fehérje N-terminális részét ismeri fel) a rostok kevesebb mint 5%-ában szegmentális, a többiben teljesen hiányzó festődés volt megfigyelhető. A dystrophin fehérje expressziós mintázatának megváltozása megfelelhet a genetikai analízis során detektált, N-ABD-t érintő misszensz mutáció következményének és Becker-féle izomdystrophiára utal. Ez az eset rávilágít az igen nagy méretű fehérjék, mint a dystrophin, vizsgálata esetében, a több funkcionálisan fontos szerepet betöltő domén elleni antitesttel történő vizsgálat jelentőségére, a fals negatív vagy fals pozitív esetek elkerülése miatt.

Misszensz mutációk ritkán állnak DMD/BMD háttérben, azonban ezek egy jelentős része (~50%) az N-ABD-t érinti [www.dmd.nl]. A humán dystrophin fehérje tanulmányozásának gátat szab a teljes hosszúságú fehérje expressziójának és tisztításának nehézsége, a tanulmányok többnyire csak az N-ABD-t vizsgálják [114]. Jelenleg az N-ABD, a C-terminális régió WW domén fragmensének illetve a rod-domén első N-terminális ismétlődő szakaszának (spectrin repeat) kristályszerkezete ismert (PDB adatbázis: 2018. 08. 18.).

In silico módszerek alkalmazásával a detektált pontmutáció dystrophin fehérje szerkezetére és stabilitására kifejtett hatását mi is az N-ABD szintjén vizsgáltuk, az N-ABD

szekvenciájának és kristályszerkezetének ismeretében. Az p.Asn76Ile mutáció feltételezett hatását összehasonlítottuk a korábban tanulmányozott, az X-kromoszómához kötött dilatatív cardiomyopathiával (XLDCM) és DMD-vel asszociált p.Lys18Asn és p.Leu54Arg mutációk következményével [96, 114]. Néhány CH1 szubdoménnel rendelkező humán fehérje szerkezeti összehasonlítása (**6B. ábra**) és az aminosavszekvencia illesztése (**6C. ábra**) a 76. pozícióban lévő Asn reziduum (dystrophin számozás szerint) konzerváltságát mutatta. Hasonlóan a korábban vizsgált Lys18 és vele interakcióban lévő Asn39 and Phe41 reziduumok nagymértékű konzerváltságához [114], az általunk elvégzett analízis is az Asn76 és a kölcsönható Asp46 és Glu65 reziduumok evolúciós konzerváltságát mutatta, mely ezen kötéseknek a domén stabilizálásban betöltött szerepét sejteti.

Az Asn76Ile aminosavcsere az E hélix másodlagos szerkezetére nincs hatással, hasonlóan (saját analízisünk alapján) a p.Lys18Asn és p.Leu54Arg mutánsok másodlagos szerkezete is megegyezik a vad típusú N-ABD szerkezetével. Ez jó egyezést mutat a cirkuláris dikroizmus spektroszkópiás mérésekkel, melyek alapján a p.Lys18Asn mutáció nem változtatja meg az N-ABD globális másodlagos szerkezetét [114]. Molekuladinamikai szimulációk a p.Leu54Arg és p.Lys18Asn mutánsok esetén az I hélix (linker régió) helicitásának nagymértékű csökkenését (p.Lys18Asn) vagy elvesztését (p.Leu54Arg) mutatták, mely ezen mutációk jelenléte esetén lokális konformációváltozások és távolabbi szerkezetre gyakorolt hatásokra utal [96]. A linker régió helicitásának csökkenése és a molekula dinamikájának megváltozása befolyásolhatja az aktin kötés hatékonyságát [96]. Egyszerű, csupán a másodlagos szerkezet predikcióján alapuló módszerek alkalmazásával nem lehet kellő biztonsággal megjósolni a p.Asn76Ile esetében a mutációtól távoli szerkezeti hatásokat. Bár különböző kísérletes technikákkal vagy molekuladinamikai számításokkal a pontmutációk hatására bekövetkező szerkezeti hatások felderíthetőek, azonban ezek túlhaladnak jelen tanulmány keretein.

A protein stabilitásra vonatkozó predikciós vizsgálat (az SDM server segítségével) a p.Asn76Ile mutáció nagymértékű destabilizáló hatását mutatta, hasonlóan a CH1 szubdomén hidrofób központi részét érintő p.Leu54Arg mutációhoz ($\Delta\Delta G > 5$ kcal/mol), mely jó egyezést mutat ezen utóbbi genetikai eltérés korábban kimutatott hatásával [115]. Mivel a p.Asn76Ile mutáció analízisünk alapján az N-ABD másodlagos szerkezetét nem befolyásolja, nagy valószínűséggel lokális konformációváltozáshoz vezet a CH1 szubdoménen belüli stabilizáló interakciók megzavarása révén. A mutáció valószínűleg a B hurok flexibilitását (az E hélix és a B hurok közötti Asn76-Asp46 hidrogénkötés elvesztése miatt) és a D hurok reziduumainak térbeli elhelyezkedését (az E hélix és a D hurok közötti Asn76-Glu65 hidrogénkötés elvesztése miatt) változtatja meg. Feltehetően a C hélix konformációját is befolyásolja a p.Asn76Ile mutáció, mivel az E és C hélixek között nincs direkt hidrogénkötés, csak a C hélix N-terminális vége mellett elhelyezkedő Asp46 lép interakcióba az Asn76 reziduummal. A CH1 szubdomén A hélixében elhelyezkedő Lys18 reziduum is stabilizálja a szomszédos B hurok egy kanyarulatának konformációját és mutációja (p.Lys18Asn) feltehetően a B hurok megnövekedett flexibilitásához vezet, az A hélix (Lys18) és a B hurok (Asn39 and Phe41) reziduumai közti kölcsönhatások megzavarása révén [114].

Sem a vad típusú, sem a p.Asn76Ile mutáns N-ABD esetén nem fokozott a CH1 szubdomén aggregációs hajlama.

Összefoglalva, a p.Asn76Ile mutáció az *in silico* analízisek alapján a másodlagos szerkezetet nem befolyásolja, hanem feltehetően a CH1 szubdoménen belüli stabilizáló interakciók megzavarása révén, nagymértékben destabilizáló hatású. Irodalmi adatok szerint a monogénes betegséget okozó misszensz mutációk patogenitásának hátterében mintegy 80%-ban a fehérjét destabilizáló hatás áll [116], mely végső soron a megfelelő végleges konformációt felvevő, ezáltal funkcionális protein populáció arányát csökkenti [114]. Továbbá, a nem

megfelelően feltekeredett protein, *in vivo* a proteázok hatásának is fokozottabban ki van téve [117].

A fenotípus súlyosságának megítélése két szempontból nehéz ebben az esetben. Először is, a detektált, valószínűleg patogén genetikai eltérés egy új misszensz mutáció. Hatását *in silico* módszerekkel próbáltuk prediktálni, melyek a mutáció patogenitását támogatják, azonban a fenotípus súlyosságát nem tudják megítélni. Másodszor, a beteg igen fiatal kora miatt (6 év) a klinikai tünetek a DMD/BMD differenciáldiagnosztikájában nem segítenek. A dystrophin immunhisztokémiai vizsgálata alapján úgy gondoljuk, hogy a p.Asn76Ile mutáció nagy valószínűséggel BMD-t okoz, de a fenotípus felülvizsgálata időről-időre szükséges a prognózis pontosabb előrejelzése miatt. A szérum CK aktivitás az utánkövetéses periódus alatt (12-33 hónap) emelkedő tendenciát mutatott (1497-4915 U/L), mely feltehetően a legmagasabb (peak) érték eléréséig tart, majd a betegség progressziójával várhatóan csökkenő tendenciát kezd mutatni [118]. A mért CK aktivitás BMD-ben megfigyelt értékekkel jó egyezést mutat (36 BMD-ban szenvedő beteg vizsgálata alapján (átlagéletkor 27 év (6-55 év), 101-12090 U/L, átlag 2366 U/L, 3/36 betegben mértek normál CK értéket, akik ≥ 45 évesek voltak és súlyos fenotípust mutattak; [119])). A BMD súlyossága a CK aktivitással inverz korrelációt mutat [119], a CK csökkenésének üteme a szérumban a betegség progresszióját jelző prognosztikai marker [118]. Mivel a mutáció eredete alapján *de novo*, az ismétlődési kockázat a korábban említett csírasejtes mozaicizmus BMD/DMD-ben való nem elhanyagolható gyakorisága miatt kb. 2% [38]. Molekuláris genetikai analitikai szempontból eredményeink az MLPA módszerrel kimutatott egy exont érintő deléciók más módszerrel történő megerősítő vizsgálatának fontosságára hívják fel a figyelmet.

6.3 Magyarországi Smith-Lemli-Opitz szindrómás betegek mutációs spektruma

A koleszterin bioszintézis veleszületett zavarainak közös vonása a koleszterin deficiencia, feltehetően a különböző szterol prekursorok felszaporodása vezet az egyes

szindrómákban megfigyelhető eltérő tünetegyüttesekhez [43]. Az SLO szindróma klinikai gyanúja esetén az elsővonalbeli laboratóriumi teszt a szérum/plazma 7-DHC koncentrációjának meghatározása. A 7-DHC koncentráció ritkán csak minimális emelkedést mutat [120, 121], azonban az esetek többségében minimum 50-szerese a kontroll értéknek [43]. Ezen laboratóriumi teszt egyben el is különíti az SLO-t az igen ritka, de fenotípusos spektrumban átfedést mutató ‘SLO-szerű’ szindrómáktól, a lathosterolosistól és a desmosterolosistól [64]. A plazma koleszterin koncentrációja a betegek mintegy 10%-ában normál lehet, ezért szűrőtesztként nem alkalmazható [43, 60]. Ennek részben az az oka, hogy a koleszterin koncentráció meghatározása során a dehidrokoleszterinek is reakcióba lépnek a koleszterin mellett (a 7-/8-DHC a szterolok >50%-át is kiteheti!) [60].

Az általunk vizsgált betegcsoportban minden esetben extrém mértékben emelkedett szérum 7-DHC koncentrációt mértünk. A szérum koleszterin koncentráció a betegek közel 2/3-ában csökkent volt a korspecifikus referencia tartománnyal összehasonlítva. Az SLO szindrómában prognosztikai markernek tekinthető [53, 122] 7-DHC/koleszterin arány minden esetben kóros volt.

A *DHCR7* gén molekuláris genetikai analízise során 11 nem rokon beteg esetén mindkét mutáció jelenlétét sikerült igazolnunk, 1 esetben 1 mutációt detektáltunk heterozigóta formában (23/24 allél, 95,8%). Ez jó egyezést mutat az irodalmi adatok alapján 95-96%-os mutáció detektálási rátával a *DHCR7* gén kódoló régiójának és az exon-intron határok szekvenálása esetén [101, 122], mely alapján nagy deléciók és egyéb típusú SLO szindrómát okozó mutációk előfordulása feltehetően ritka.

Kiterjesztett analízis ellenére (nem kódoló exonok, feltételezett promóter régió, 3' UTR régió vizsgálata) a 13. Beteg esetén egy mutációt detektáltunk heterozigóta formában (c.452G>A, p.Trp151*). Fehérvérsejtekből izolált *DHCR7* mRNS szekvenálás NMD-t igazolt a c.452G>A mutáció esetén. Ezen SLO szindrómát okozó mutáció esetén az NMD leírt jelenség

[9], kimutatása korábban bőr fibroblasztokból izolált mRNA vizsgálatával történt. Mivel eredményeink a perifériás vér fehérvérsejtjeiből izolált mRNA szekvenálásával ugyanazt az eredményt mutatták, feltehetően ez a mintatípus is alkalmas *DHCR7* mRNA vizsgálatok elvégzésére, melynek szükségessége esetén a bőrbíopszia így elkerülhető lehet. Az NMD korai stop kodont tartalmazó (potenciálisan káros hatású) fehérjék szintetizálása ellen védő celluláris mechanizmus [123]. Egyéb patogén eltérést az mRNA szekvenálás sem igazolt. Egy aberráns splicing-ot és (esetlegesen teljes mértékű) következményes NMD-t okozó (így nem detektálható) második mutáció előfordulását az enyhe fenotípus miatt nem tartjuk valószínűnek (hiszen a detektált másik allél egy null allél). Kereteltolódást nem okozó, exon skipping-et eredményező mutáció az mRNA vizsgálata során nem volt detektálható. A 2. mutáció feltehetően nem vizsgált mély introni vagy szabályozó szekvenciát érinthet és nagy valószínűséggel az mRNA stabilitását vagy mennyiségét befolyásolja. Egy másik, szövet-specifikus promóter létezése a koleszterin szintézis szempontjából kritikusabb szövetekben sem kizárható. Az irodalom több egyetlen igazolt *DHCR7* mutációval jellemezhető SLO szindrómás esetről számol [48, 100, 102, 124, 125]. Az általunk vizsgált 13. Beteg esetén az SLO szindróma diagnózisa a klinikai tünetek és az emelkedett szérum 7-DHC koncentráció alapján egyértelműen felállítható volt (diagnosztikai algoritmus [64]).

Az eset további érdekessége, hogy a 13. Beteg újszülöttkorában elhalálozott lánytestvére (az ő esetében az SLO szindróma diagnózisa nem került megállapításra, biokémiai és genetikai tesztek elvégzésére nem került sor), aki többszörös, SLO szindrómában is megfigyelhető fejlődési rendellenességekkel született, a klinikai spektrum éppen ellentétes végén helyezkedne el, mint a jelenleg is élő (25 éves) és igen enyhe fenotípust mutató testvére. Számos SLO szindrómás beteg genotípus-fenotípus elemzése alapján ugyanazon *DHCR7* genotípusú betegek jelentősen eltérő súlyossági pontértékekkel és plazma 7-DHC koncentrációval rendelkezhetnek [101], mely, habár az SLO szindróma monogénes betegség, egyéb genetikai,

epigenetikai és/vagy környezeti tényezők moduláló hatását valószínűsíti [60, 126-128]. Az SLO szindrómás testvérpárok többségénél a fenotípus hasonló [126, 129], mely igaz a mi betegpopulációnkban igazoltan SLO szindrómás testvérpár esetében is (2. és 3. Beteg), azonban, egyes esetekben, jelentős intrafamiliaris variabilitást figyeltek meg [62]. Természetesen nem kizárható, hogy a 13. Beteg testvére más betegségben szenvedett, érdekes azonban az édesanya anekdotikus beszámolója a két újszülött nagyon hasonló arckarakteréről.

A mutációk kb. fele-fele arányban az 5-7. exonokban és a 8. intron-9.exonban helyezkedtek el, mely jó egyezést mutat a korábban leírt megoszlással, miszerint a genetikai eltérések mintegy fele a 9. exonban fordul elő [122]. A mutációk mintegy fele (56,5%) misszensz mutáció volt, mely kevesebb az irodalomban (40-154 mutáció alapján) leggyakrabban közölt aránynál (~90%, [52, 101, 122]. Az aminosavcserével járó mutációk mintegy kétharmada (69%) a feltételezett transzmembrán (TM) doménekben ([48] membrán topológia alapján) helyezkedett el (p.Leu109Pro, p.Arg242His, p.Gly244Arg, p.Ala247Val, p.Val326Leu és p.Tyr432Cys) korábbi irodalmi adatoknak megfelelően [122]. Ezen belül is a TM mutációk kétharmada (p.Arg242His, p.Gly244Arg, p.Ala247Val, p.Val326Leu) a feltételezett szterol érzékelő doménben [52] található. A TM doménokat érintő misszensz mutációk feltehetően a protein stabilitását befolyásolják [122], mely egy eltérés esetén kísérletes körülmények között igazolódott is [48]. A nem TM doménban elhelyezkedő misszensz mutációk közül, a 2 allélon detektált p.Ser397Leu a nagymértékben konzervált, feltételezett szterol reduktáz „signature” motívumot (394-405. aminosavak, 4. citoplazmatikus hurok, [52]), míg a p.Arg443His a 2-es szterol reduktáz motívumot (C-terminus) érinti és ez utóbbi nagy valószínűséggel a protein stabilitását csökkenti [52, 124]. A misszensz mutációk mellett 26,1% nonszensz és 17,4% splicingot érintő mutációt detektáltunk, melyek null allélt eredményeznek [52, 122].

A genotípusok megoszlása az irodalomban leírthoz hasonlóan adódott [101, 130]. Egy beteg kivételével (9,1%) minden esetben összetett heterozigótaság igazolódott: 63,6%-ban null allél/misszensz mutáció, 27,3%-ban két különböző misszensz mutáció volt kimutatható.

A *DHCR7* gén mutációi érdekes földrajzi megoszlást mutatnak, mely allélikus heterogenitás más monogénis betegségek esetén is ismert [131, 132]. A null allélt eredményező p.Trp151* nonszensz mutáció volt a leggyakoribb a magyar SLO szindrómás betegekben. A p.Trp151*mutáció feltehetően Dél-Lengyelországban keletkezett és kelet-nyugati gradienst mutat Észak-Európában [97].

A 8. intronban a splice akceptor helyet érintő, null allélt eredményező c.964–1G>C mutáció a második leggyakoribbnak adódott az általunk vizsgált betegpopulációban. A c.964–1G>C a leggyakoribb SLO szindrómát okozó, Észak-Európában nyugat-keleti gradienst mutató mutáció feltehetően brit eredetű [97]. Erre a mutációra homozigóta állapot igen súlyos fenotípust eredményez [70, 71, 122, 124, 130]. A c.964–1G>C mutációra homozigóta genotípusú 1. Beteg az első életnapon elhalálozott, majd az édesanya 2. és 3. terhessége spontán vetéléssel végződött a 7. és 14. terhességi héten (a 3. magzat genotípusa került meghatározásra, ahol szintén c.964–1G>C homozigótaság igazolódott). Az SLO szindrómával érintett családokban a magzati halálozás és a spontán vetélések incidenciája mintegy 2-szerese az átlag populációénak [133]. Az általunk vizsgált családok negyedében fordult elő többszörös spontán vetélés.

A null mutációk (c.964–1G>C és p.Trp151*) gyakorisága ellenére igen kevés a 0/0 genotípusú eset, mely indirekt bizonyíték a nagymértékű pre- és perinatális halálozásra nézve (utóbbi esetek jó része diagnosztizálatlan maradhat) [134]. A korábban feltételezett 80%-os prenatális mortalitási rátát [135, 136] egy 2017-es, több, mint 260 000 egyénben *DHCR7* mutáció hordozósági gyakoriságot vizsgáló retrospektív tanulmány, a hordozósági gyakoriság

alapján becsült és korábban publikált születési incidencia adatok alapján 42-88%-os tartományba helyezte a prenatális halálozás mértékét SLO szindrómában [73].

A másik tipikusan kelet-európai mutáció, a p.Val326Leu [97], mely a harmadik leggyakoribbnak bizonyult a magyar betegekben, a p.Trp151* és c.964-1G>C mutációkkal együtt az SLO szindrómát okozó eltérések 54%-áért felelős Magyarországon. Haplotípus analízis alapján feltehetően mindhárom alapító mutáció [97]. A magyar populációban $\leq 8,3\%$ -ban elforduló mutációk egyéb országokban is a ritka allélok közé számítanak [97, 99]. Az allélikus heterogenitás miatt ugyanazon génpanel esetén a detektálási ráta szignifikánsan különböző lehet a vizsgált populációtól függően.

A magyar adatokkal kiegészített, irodalomban közölt mutációs spektrum adatok alapján a ritka és unikális *DHCR7* mutációk aránya viszonylag nagy [101].

Jelen tanulmányunkban a már ismert SLO szindrómát okozó nonszensz, misszensz és splicing mutációkon kívül egy új misszensz mutációt c.374A>G (p.Tyr125Cys) is detektáltunk. Egy misszensz mutáció patogenitását, fehérje működésre kifejtett hatását az érintett aminosav evolúciós konzerváltsága, az aminosavcsere fizikokémiai következményei és az érintett aminosav fehérjén belüli elhelyezkedése, szerepe határozza meg.

Predikációs szoftverek - jelen esetben mi a SIFT predikációs szoftvert használtuk, mely homológ fehérje szekvenciák analízisét végzi el - segítségével a misszensz mutációk fehérjére gyakorolt hatása (patogén vagy benignus volta) jósolható, azonban ezek pontossága kb. 65-80%-ra tehető [137], és eltérő predikációs hatékonyságúak lehetnek géntől függően [8]. Az ezen szoftverek által használt algoritmusok gyakran ugyanazon információkat használják (evolúciós konzerváltság és/vagy protein szerkezet/funkció). A SIFT szoftver szerint Tyr125Cys csere ártalmas a fehérje funkciójára nézve, a *DHCR7* ortológok szekvencia-illesztése az érintett aminosav reziduum nagyfokú konzerváltságát mutatta, a Grantham mátrix alapján kalkulált pontszám 194, vagyis a két aminosav fizikokémiai tulajdonságaiban jelentősen különbözik. A

legújabb variáns klasszifikáció ajánlás [8] szerint az *in silico* adatok csak egy tényezőt, támogató ('supporting') evidenciát képezhetnek a patogenitás megítélésében és amennyiben nem egybehangzóak, abban az esetben nem javasolt az eredményt a klasszifikációnál figyelembe venni.

A folyamatosan bővülő ún. populációs adatbázisok a detektált variáns gyakoriságának megítélésében nyújtanak segítséget. Az általunk detektált c.374A>G 50 egészséges egyén DNS mintájában (100 allél) nem volt kimutatható (feltehetően nem egy gyakori magyar polimorfizmusról/benignus variánsról van szó), emellett sem az ExAC, sem az 1000 Genom Projekt adatbázisban nem szerepel. Ez közepes szintű evidenciának számít. A *transz* helyzet megállapítása autoszomális recesszív öröklődésmenet esetén (vagyis, ha az új variáns *transz* helyzetben van egy ismert patogen variánssal) szintén közepes erősségű bizonyíték a patogenitás mellett. Ha az adott betegség hátterében gyakoriak a misszensz mutációk, akkor ez egy új misszensz mutáció patogenitását illetően támogató bizonyíték. A beteg fenotípusa is további patogenitást támogató erejű lehet, amennyiben i) a teszt klinikai szenzitivitása magas, ii) a beteg klinikai tünetei alapján egy adott betegség fennállása valószínű, iii) ha a génben nem túl gyakori a benignus variáció populációs adatbázisok alapján és iv) a családfa alapján a betegséggel egybehangzó az öröklődésmenet.

A fentieket figyelembe véve a 2015-ös variáns klasszifikáció alapján c.374A>G (p.Tyr125Cys) a valószínűleg patogen ('likely pathogenic') kategóriába sorolható [8, 94].

Az SLO szindrómával érintett családokban a 2008-2018 közötti időszakban 10 esetben végeztünk prenatális vizsgálatot chorionboholy biopsziás vagy magzatvíz mintából, mely 2 esetben a magzat érintettségét igazolta (homozigótaság vagy összetett heterozigótaság), 1 esetben hordozói státusz igazolódott (2018. júniusi CVS minta) és 7 egészséges gyermek (4 esetben heterozigóta hordozó, 3 esetben normál genotípus) született.

Az értekezésben bemutatott tanulmányok jól mutatják a molekuláris genetikai diagnosztika és a tudomány szoros összefonódását és elválaszthatatlanságát, a klinikus és egyéb diagnosztikus tevékenységet végző kollégákkal való szoros együttműködés és konzultáció fontosságát és a körültekintő és a tesztelési folyamat minden elemét figyelembe vevő interpretációs tevékenység szükségességét.

7. Összegzés

A bemutatott tanulmányokban súlyos monogénis betegségek prenatális és postnatális molekuláris genetikai diagnosztikájának néhány speciális kihívást jelentő aspektusát vizsgáltuk.

Az első vizsgálat sorozatban három molekuláris genetikai teszt anyai sejt kontaminációra való érzékenységeinek meghatározását végeztük el. A Sanger DNS szekvenálás esetén a szignifikáns anyai sejt kontamináció szint 5-30%-nak adódott. Az MLPA teszt esetén $\geq 40\%$ anyai DNS kontamináció interferált a 'magzati' genotipizálással. A piroszekvenálás igen érzékenynek bizonyult, 1% anyai sejt kontamináció kimutatása is lehetséges volt.

A második tanulmányban egy 14 hónapos fiúgyermek Duchenne/Becker-izomdystrophia irányú többszintű genetikai kivizsgálását végeztük el. Az elsővonalbeli tesztként elvégzett MLPA teszt a 4. exon delécióját mutatta, melyet más módszerrel megerősíteni nem tudtunk. A *DMD* gén teljes kódoló régiójának szekvenálása egy új pontmutáció (c.227A>T, p.Asn76Ile) jelenlétét igazolta, mely a dystrophin fehérje N-terminális aktinkötő doménját érinti. *In silico* analízisek alapján a mutáció feltehetően destabilizálja az N-terminális aktinkötő domént. A dystrophin fehérje immunhisztokémiai vizsgálata BMD-t valószínűsített.

A harmadik tanulmányunkban 13 magyar SLO szindrómás beteg molekuláris genetikai adatait, biokémiai és klinikai jellemzőit foglaltuk össze. Minden esetben jelentősen emelkedett szérum 7-DHC koncentrációt mértünk. A mutáció detektálási ráta 95,8% volt. Magyarországon három allél (p.Trp151*, c.964–1G>C és p.Val326Leu) felelős a betegséget okozó genetikai eltérések 54%-áért. Egy esetben null mutációra homozigóta genotípus, míg a további esetekben összetett heterozigótaság igazolódott. Egy új misszensz mutációt is detektáltunk (c.374A>G, p.Tyr125Cys), melyet valószínűleg patogénként kategorizáltunk.

8. Summary

In our work we studied some of the special and challenging aspects of prenatal and postnatal molecular genetic diagnostics of severe monogenic disorders.

In our first study we investigated the sensitivity of three molecular genetic methods to MCC. Sensitivity of Sanger DNA sequencing proved to be variable, significant MCC was in the range of 5-30% depending on the type of mutation. In the case of MLPA method only high level ($\geq 40\%$) MCC interfered with 'fetal' genotyping. Pyrosequencing was shown to be very sensitive to MCC detecting as low as 1%.

In the second study we performed a tiered molecular genetic analysis of *DMD* gene in the case of a 14-month-old male patient. The initial screen for deletions/duplications with MLPA method showed deletion of exon 4, which could not be confirmed by another method. A novel point mutation (c.227A>T, p.Asn76Ile) affecting the N-ABD of dystrophin protein was detected by Sanger DNA sequencing. No other potentially pathogenic mutation was detected by sequencing the whole coding region of *DMD* gene. Based on *in silico* analyses the detected missense mutation was predicted to be highly destabilizing on the N-ABD. According to dystrophin immunohistochemistry results the detected genetic alteration most likely leads to BMD.

In our third study we summarized molecular genetic, biochemical and clinical data of 13 Hungarian Smith-Lemli-Opitz syndrome patients. 7-DHC concentration was extremely elevated in the patients' sera. The mutation detection rate was 95.8%, in one case we detected only one mutation in heterozygous form in spite of tiered molecular genetic analysis. In Hungarian SLOS patients three alleles (p.Trp151*, c.964-1G>C and p.Val326Leu) accounted for 54% of mutations. One patient was homozygous for a null mutation, while all other patients were compound heterozygotes. One novel missense mutation, c.374A>G (p.Tyr125Cys) was also identified, which was classified as likely pathogenic.

9. Az értekezés új megállapításai

1) Keveréses vizsgálatokkal különböző mértékű (1, 5, 10, 20, 30 és 40%) szimulált anyai DNS kontamináció esetén komprehenzív módon meghatároztuk 3 molekuláris genetikai diagnosztikai módszer esetén a szignifikáns (magzati genotipizálást befolyásoló) anyai sejt kontamináció mértékét és a detektálási határértékeket. A Sanger DNS szekvenálás szenzitivitása variábilis volt, mutációtól függően a szignifikáns anyai sejt kontamináció szint 5-30%-nak adódott. Az MLPA teszt esetén nagy mértékű anyai DNS kontamináció ($\geq 40\%$) esetén jelentkezett interferencia. A piroszekvenálás igen érzékeny módszer, 1% anyai sejt kontamináció kimutatása is lehetséges volt. Eredményeinket összehasonlítottuk az irodalomban fellelhető, ezen módszerek analitikai szenzitivitására vonatkozó adatokkal és ezeket a prenatális molekuláris genetikai diagnosztika, illetve az anyai DNS kontamináció összefüggésében elemeztük.

2) A misszensz mutációk előfordulása dystrophinopathiák háttérében igen ritka és érdekes módon ezen típusú mutációk mintegy fele a dystrophin fehérje N-terminális aktinkötő doménját érinti. A *DMD* génben egy új, szintén az N-terminális aktinkötő domént érintő és a dystrophin fehérje immunhisztokémiai vizsgálata alapján nagy valószínűséggel Becker-izomdystrophiához vezető misszensz mutációt (c.227A>T, p.Asn76Ile, LOVD adatbázis: <https://databases.lovd.nl/shared/variants/0000171133>) detektáltunk, mely *in silico* analízisek alapján feltehetően nagymértékben destabilizáló hatású.

3) Munkánk során összefoglaltuk a magyarországi Smith-Lemli-Opitz szindrómás betegek mutációs spektrumát, továbbá klinikai és biokémiai fenotípusos jellemzőit, mellyel kiegészítettük az eddigi irodalomban fellelhető európai mutációs és fenotípusra vonatkozó adatokat. A detektált mutációkat/genotípusokat génspecifikus adatbázisba is feltöltöttük (<https://databases.lovd.nl/shared/genes/DHCR7>). Egy új, valószínűleg patogén, SLO

szindrómát okozó misszensz mutációt is detektáltunk (c.374A>G (p.Tyr125Cys). Magyarországon 3 allél (p.Trp151*, c.964–1G>C és p.Val326Leu) felelős a betegséget okozó genetikai eltérések mintegy feléért. Eredményeink alapján *DHCR7* mRNS analízis a perifériás vér leukocytaiból is elvégezhető.

10. Irodalomjegyzék

1. Bonini, P., et al., *Errors in laboratory medicine*. Clin Chem, 2002. **48**(5): p. 691-8.
2. Carraro, P. and M. Plebani, *Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later*. Clin Chem, 2007. **53**(7): p. 1338-42.
3. Plebani, M., *Errors in laboratory medicine and patient safety: the road ahead*. Clin Chem Lab Med, 2007. **45**(6): p. 700-7.
4. Hofgartner, W.T. and J.F. Tait, *Frequency of problems during clinical molecular-genetic testing*. Am J Clin Pathol, 1999. **112**(1): p. 14-21.
5. Chamberlain, J.S., et al., *Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(23): p. 11141-56.
6. Hessner, M.J., et al., *The sensitivity of allele-specific polymerase chain reaction can obviate concern of maternal contamination when fetal samples are genotyped for immune cytopenic disorders*. Am J Obstet Gynecol, 1997. **176**(2): p. 327-33.
7. Lamb, A.N., et al., *Defining the impact of maternal cell contamination on the interpretation of prenatal microarray analysis*. Genet Med, 2012. **14**(11): p. 914-21.
8. 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**(5): p. 405-24.
9. Correa-Cerro, L.S., et al., *DHCR7 nonsense mutations and characterisation of mRNA nonsense mediated decay in Smith-Lemli-Opitz syndrome*. J Med Genet, 2005. **42**(4): p. 350-7.
10. Allyse, M., et al., *Non-invasive prenatal testing: a review of international implementation and challenges*. Int J Womens Health, 2015. **7**: p. 113-26.

11. Schrijver, I., S.C. Cherny, and J.L. Zehnder, *Testing for maternal cell contamination in prenatal samples: a comprehensive survey of current diagnostic practices in 35 molecular diagnostic laboratories*. J Mol Diagn, 2007. **9**(3): p. 394-400.
12. Clinical Molecular Genetics Society. CMGS. *Practice guidelines for the Testing for Maternal Cell Contamination (MCC) in Prenatal Samples for Molecular Studies*. 2008 Available from. http://www.acgs.uk.com/media/774784/mcc_08.pdf
13. Nuss, S., D. Brebaum, and C. Grond-Ginsbach, *Maternal cell contamination in amniotic fluid samples as a consequence of the sampling technique*. Hum Genet, 1994. **93**(2): p. 121-4.
14. Winsor, E.J., et al., *Maternal cell contamination in uncultured amniotic fluid*. Prenat Diagn, 1996. **16**(1): p. 49-54.
15. Saura, R., et al., *Early amniocentesis versus chorionic villus sampling for fetal karyotyping*. Lancet, 1994. **344**(8925): p. 825-6.
16. Nagan, N., et al., *Laboratory guidelines for detection, interpretation, and reporting of maternal cell contamination in prenatal analyses a report of the association for molecular pathology*. J Mol Diagn, 2011. **13**(1): p. 7-11.
17. American College of Medical Genetics. ACMG. *Standards and Guidelines for Clinical Genetic Laboratories*. 2008. Available from: www.acmg.net/Pages/ACMG_Activities/stds-2002/g.htm.
18. Hoffman, E.P., R.H. Brown, Jr., and L.M. Kunkel, *Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus*. Cell, 1987. **51**(6): p. 919-28.
19. Davies, K.E., et al., *Mild and severe muscular dystrophy associated with deletions in Xp21 of the human X chromosome*. J Med Genet, 1988. **25**(1): p. 9-13.

20. Hoffman, E.P., et al., *Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy*. N Engl J Med, 1988. **318**(21): p. 1363-8.
21. Monaco, A.P., et al., *An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus*. Genomics, 1988. **2**(1): p. 90-5.
22. Grimm, T., et al., *Risk assessment and genetic counseling in families with Duchenne muscular dystrophy*. Acta Myol, 2012. **31**(3): p. 179-83.
23. Beggs, A.H., et al., *Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies*. Am J Hum Genet, 1991. **49**(1): p. 54-67.
24. Ferlini, A., M. Neri, and F. Gualandi, *The medical genetics of dystrophinopathies: molecular genetic diagnosis and its impact on clinical practice*. Neuromuscul Disord, 2013. **23**(1): p. 4-14.
25. Rando, T.A., *The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies*. Muscle Nerve, 2001. **24**(12): p. 1575-94.
26. Batchelor, C.L. and S.J. Winder, *Sparks, signals and shock absorbers: how dystrophin loss causes muscular dystrophy*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(4): p. 198-205.
27. Glass, D.J., *A signaling role for dystrophin: inhibiting skeletal muscle atrophy pathways*. Cancer Cell, 2005. **8**(5): p. 351-2.
28. Muntoni, F., S. Torelli, and A. Ferlini, *Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes*. Lancet Neurol, 2003. **2**(12): p. 731-40.
29. Blake, D.J., et al., *Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle*. Physiol Rev, 2002. **82**(2): p. 291-329.

30. Ervasti, J.M., *Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(2): p. 108-17.
31. Yan, J., et al., *Three-tiered noninvasive diagnosis in 96% of patients with Duchenne muscular dystrophy (DMD)*. Hum Mutat, 2004. **23**(2): p. 203-4.
32. White, S.J., et al., *Duplications in the DMD gene*. Hum Mutat, 2006. **27**(9): p. 938-45.
33. Lalic, T., et al., *Deletion and duplication screening in the DMD gene using MLPA*. Eur J Hum Genet, 2005. **13**(11): p. 1231-4.
34. Abbs, S., et al., *Best practice guidelines on molecular diagnostics in Duchenne/Becker muscular dystrophies*. Neuromuscul Disord, 2010. **20**(6): p. 422-7.
35. Nobile, C., et al., *Genomic organization of the human dystrophin gene across the major deletion hot spot and the 3' region*. Genomics, 1995. **28**(1): p. 97-100.
36. Haldane, J.B., *The rate of spontaneous mutation of a human gene*. 1935. J Genet, 2004. **83**(3): p. 235-44.
37. Bakker, E., et al., *Germline mosaicism and Duchenne muscular dystrophy mutations*. Nature, 1987. **329**(6139): p. 554-6.
38. Helderma-van den Enden, A.T., et al., *Recurrence risk due to germ line mosaicism: Duchenne and Becker muscular dystrophy*. Clin Genet, 2009. **75**(5): p. 465-72.
39. Norwood, F.L., et al., *The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy*. Structure, 2000. **8**(5): p. 481-91.
40. Irons, M., et al., *Defective cholesterol biosynthesis in Smith-Lemli-Opitz syndrome*. Lancet, 1993. **341**(8857): p. 1414.
41. Tint, G.S., et al., *Defective cholesterol biosynthesis associated with the Smith-Lemli-Opitz syndrome*. N Engl J Med, 1994. **330**(2): p. 107-13.

42. Waterham, H.R., *Defects of cholesterol biosynthesis*. FEBS Lett, 2006. **580**(23): p. 5442-9.
43. Porter, F.D. and G.E. Herman, *Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis*. J Lipid Res, 2011. **52**(1): p. 6-34.
44. Kandutsch, A.A. and A.E. Russell, *Preputial gland tumor sterols. 3. A metabolic pathway from lanosterol to cholesterol*. J Biol Chem, 1960. **235**: p. 2256-61.
45. Clark, R.M., et al., *Desmosterol in human milk*. Lipids, 1983. **18**(3): p. 264-6.
46. Bourre, J.M., et al., *Alterations of cholesterol synthesis precursors (7-dehydrocholesterol, 7-dehydrodesmosterol, desmosterol) in dysmyelinating neurological mutant mouse (quaking, shiverer and trembler) in the PNS and the CNS*. Biochim Biophys Acta, 1989. **1004**(3): p. 387-90.
47. Lin, D.S., et al., *Unique lipids of primate spermatozoa: desmosterol and docosahexaenoic acid*. J Lipid Res, 1993. **34**(3): p. 491-9.
48. Fitzky, B.U., et al., *Mutations in the Delta7-sterol reductase gene in patients with the Smith-Lemli-Opitz syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 8181-6.
49. Waterham, H.R. and R.J. Wanders, *Biochemical and genetic aspects of 7-dehydrocholesterol reductase and Smith-Lemli-Opitz syndrome*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1529**(1-3): p. 340-56.
50. Holmer, L., A. Pezhman, and H.J. Worman, *The human lamin B receptor/sterol reductase multigene family*. Genomics, 1998. **54**(3): p. 469-76.
51. Jang, J.C., et al., *A critical role of sterols in embryonic patterning and meristem programming revealed by the fackel mutants of Arabidopsis thaliana*. Genes Dev, 2000. **14**(12): p. 1485-97.
52. Correa-Cerro, L.S. and F.D. Porter, *3beta-hydroxysterol Delta7-reductase and the Smith-Lemli-Opitz syndrome*. Mol Genet Metab, 2005. **84**(2): p. 112-26.

53. Tint, G.S., et al., *Correlation of severity and outcome with plasma sterol levels in variants of the Smith-Lemli-Opitz syndrome*. J Pediatr, 1995. **127**(1): p. 82-7.
54. Batta, A.K., et al., *Identification of 8-dehydrocholesterol (cholesta-5,8-dien-3 beta-ol) in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome*. J Lipid Res, 1995. **36**(4): p. 705-13.
55. Yu, H. and S.B. Patel, *Recent insights into the Smith-Lemli-Opitz syndrome*. Clin Genet, 2005. **68**(5): p. 383-91.
56. Paik, Y.K., et al., *Microsomal enzymes of cholesterol biosynthesis from lanosterol. Solubilization and purification of steroid 8-isomerase*. J Biol Chem, 1986. **261**(14): p. 6470-7.
57. Korade, Z., et al., *Vulnerability of DHCR7(+/-) mutation carriers to aripiprazole and trazodone exposure*. J Lipid Res, 2017. **58**(11): p. 2139-2146.
58. Korade, Z., et al., *The Effect of Small Molecules on Sterol Homeostasis: Measuring 7-Dehydrocholesterol in Dhcr7-Deficient Neuro2a Cells and Human Fibroblasts*. J Med Chem, 2016. **59**(3): p. 1102-15.
59. Korade, Z., et al., *Effect of psychotropic drug treatment on sterol metabolism*. Schizophr Res, 2017. **187**: p. 74-81.
60. Kelley, R.I. and R.C. Hennekam, *The Smith-Lemli-Opitz syndrome*. J Med Genet, 2000. **37**(5): p. 321-35.
61. Smith, D.W., L. Lemli, and J.M. Opitz, *A Newly Recognized Syndrome of Multiple Congenital Anomalies*. J Pediatr, 1964. **64**: p. 210-7.
62. Nowaczyk, M.J. and M.B. Irons, *Smith-Lemli-Opitz syndrome: phenotype, natural history, and epidemiology*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2012. **160C**(4): p. 250-62.
63. Koczok, K., et al., *[Inborn error of cholesterol biosynthesis: Smith-Lemli-Opitz syndrome]*. Orv Hetil, 2015. **156**(42): p. 1695-702.

64. Porter, F.D., *Smith-Lemli-Opitz syndrome: pathogenesis, diagnosis and management*. Eur J Hum Genet, 2008. **16**(5): p. 535-41.
65. Kelley, R.L., et al., *Holoprosencephaly in RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome: does abnormal cholesterol metabolism affect the function of Sonic Hedgehog?* Am J Med Genet, 1996. **66**(4): p. 478-84.
66. Xu, L., Z. Korade, and N.A. Porter, *Oxysterols from free radical chain oxidation of 7-dehydrocholesterol: product and mechanistic studies*. J Am Chem Soc, 2010. **132**(7): p. 2222-32.
67. Xu, L., et al., *Novel oxysterols observed in tissues and fluids of AY9944-treated rats: a model for Smith-Lemli-Opitz syndrome*. J Lipid Res, 2011. **52**(10): p. 1810-20.
68. Korade, Z., et al., *Biological activities of 7-dehydrocholesterol-derived oxysterols: implications for Smith-Lemli-Opitz syndrome*. J Lipid Res, 2010. **51**(11): p. 3259-69.
69. Moebius, F.F., et al., *Molecular cloning and expression of the human delta7-sterol reductase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(4): p. 1899-902.
70. Wassif, C.A., et al., *Mutations in the human sterol delta7-reductase gene at 11q12-13 cause Smith-Lemli-Opitz syndrome*. Am J Hum Genet, 1998. **63**(1): p. 55-62.
71. Waterham, H.R., et al., *Smith-Lemli-Opitz syndrome is caused by mutations in the 7-dehydrocholesterol reductase gene*. Am J Hum Genet, 1998. **63**(2): p. 329-38.
72. Cross, J.L., et al., *Determination of the allelic frequency in Smith-Lemli-Opitz syndrome by analysis of massively parallel sequencing data sets*. Clin Genet, 2015. **87**(6): p. 570-5.
73. Lazarin, G.A., et al., *Smith-Lemli-Opitz syndrome carrier frequency and estimates of in utero mortality rates*. Prenat Diagn, 2017. **37**(4): p. 350-355.
74. Witsch-Baumgartner, M., et al., *Age and origin of major Smith-Lemli-Opitz syndrome (SLOS) mutations in European populations*. J Med Genet, 2008. **45**(4): p. 200-9.

75. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
76. Stuppia, L., et al., *Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(3): p. 3245-76.
77. Ronaghi, M., *Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing*. Genome Res, 2001. **11**(1): p. 3-11.
78. Chamberlain JS, G.R., Ranier JE, Caskey CT, *Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy*. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. G.D. Innis MA, Sninsky JJ, White TJ 1990, San Diego (USA): Academic Press.
79. Sewry CA, Goebel HH, *General pathology of muscle disease*. In: Muscle disease: pathology and genetics, ed. Goebel HH, Sewry CA, Weller RO, 2nd ed. Chichester, UK: Wiley-Blackwell; 2013. p. 19–38.
80. Keep, N.H., et al., *Crystal structure of the actin-binding region of utrophin reveals a head-to-tail dimer*. Structure, 1999. **7**(12): p. 1539-46.
81. Franzot, G., et al., *The crystal structure of the actin binding domain from alpha-actinin in its closed conformation: structural insight into phospholipid regulation of alpha-actinin*. J Mol Biol, 2005. **348**(1): p. 151-65.
82. Goldsmith, S.C., et al., *The structure of an actin-crosslinking domain from human fimbrin*. Nat Struct Biol, 1997. **4**(9): p. 708-12.
83. Braberg, H., et al., *SALIGN: a web server for alignment of multiple protein sequences and structures*. Bioinformatics, 2012. **28**(15): p. 2072-3.
84. Drozdetskiy, A., et al., *JPred4: a protein secondary structure prediction server*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(W1): p. W389-94.

85. Schymkowitz, J., et al., *The FoldX web server: an online force field*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(Web Server issue): p. W382-8.
86. Worth, C.L., R. Preissner, and T.L. Blundell, *SDM--a server for predicting effects of mutations on protein stability and malfunction*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Web Server issue): p. W215-22.
87. Zambrano, R., et al., *AGGRESCAN3D (A3D): server for prediction of aggregation properties of protein structures*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(W1): p. W306-13.
88. Bialer, M.G., et al., *Female external genitalia and mullerian duct derivatives in a 46,XY infant with the smith-lemli-Opitz syndrome*. Am J Med Genet, 1987. **28**(3): p. 723-31.
89. Honda, A., et al., *Screening for abnormal cholesterol biosynthesis in the Smith-Lemli-Opitz syndrome: rapid determination of plasma 7-dehydrocholesterol by ultraviolet spectrometry*. Am J Med Genet, 1997. **68**(3): p. 288-93.
90. Ng, P.C. and S. Henikoff, *Predicting deleterious amino acid substitutions*. Genome Res, 2001. **11**(5): p. 863-74.
91. Ng, P.C. and S. Henikoff, *Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function*. Genome Res, 2002. **12**(3): p. 436-46.
92. Larkin, M.A., et al., *Clustal W and Clustal X version 2.0*. Bioinformatics, 2007. **23**(21): p. 2947-8.
93. Berwouts, S., et al., *Mutation nomenclature in practice: findings and recommendations from the cystic fibrosis external quality assessment scheme*. Hum Mutat, 2011. **32**(11): p. 1197-203.
94. Kleinberger, J., et al., *An openly available online tool for implementing the ACMG/AMP standards and guidelines for the interpretation of sequence variants*. Genet Med, 2016. **18**(11): p. 1165.

95. Banuelos, S., M. Saraste, and K. Djinojic Carugo, *Structural comparisons of calponin homology domains: implications for actin binding*. Structure, 1998. **6**(11): p. 1419-31.
96. Chakravarty, D., S. Chakraborti, and P. Chakrabarti, *Flexibility in the N-terminal actin-binding domain: clues from in silico mutations and molecular dynamics*. Proteins, 2015. **83**(4): p. 696-710.
97. Witsch-Baumgartner, M., et al., *Frequency gradients of DHCR7 mutations in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome in Europe: evidence for different origins of common mutations*. Eur J Hum Genet, 2001. **9**(1): p. 45-50.
98. Witsch-Baumgartner, M., et al., *Identification of 14 novel mutations in DHCR7 causing the Smith-Lemli-Opitz syndrome and delineation of the DHCR7 mutational spectra in Spain and Italy*. Hum Mutat, 2005. **25**(4): p. 412.
99. Kozak, L., et al., *Smith-Lemli-Opitz syndrome: molecular-genetic analysis of ten families*. J Inherit Metab Dis, 2000. **23**(4): p. 409-12.
100. De Brasi, D., et al., *Smith-Lemli-Opitz syndrome: evidence of T93M as a common mutation of delta7-sterol reductase in Italy and report of three novel mutations*. Eur J Hum Genet, 1999. **7**(8): p. 937-40.
101. Waterham, H.R. and R.C. Hennekam, *Mutational spectrum of Smith-Lemli-Opitz syndrome*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2012. **160C**(4): p. 263-84.
102. Wayne, J.S., et al., *Smith-Lemli-Opitz syndrome: carrier frequency and spectrum of DHCR7 mutations in Canada*. J Med Genet, 2002. **39**(6): p. E31.
103. Jamuar, S.S., et al., *Somatic mutations in cerebral cortical malformations*. N Engl J Med, 2014. **371**(8): p. 733-43.
104. Rohlin, A., et al., *Parallel sequencing used in detection of mosaic mutations: comparison with four diagnostic DNA screening techniques*. Hum Mutat, 2009. **30**(6): p. 1012-20.

105. Ogino, S., et al., *Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing*. J Mol Diagn, 2005. **7**(3): p. 413-21.
106. Tsiatis, A.C., et al., *Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications*. J Mol Diagn, 2010. **12**(4): p. 425-32.
107. Diehl, F. and L.A. Diaz, Jr., *Digital quantification of mutant DNA in cancer patients*. Curr Opin Oncol, 2007. **19**(1): p. 36-42.
108. van Veghel-Plandsoen, M.M., et al., *Multiplex ligation-dependent probe amplification is not suitable for detection of low-grade mosaicism*. Eur J Hum Genet, 2011. **19**(9): p. 1009-12.
109. Nellist, M., et al., *Large deletion at the TSC1 locus in a family with tuberous sclerosis complex*. Genet Test, 2005. **9**(3): p. 226-30.
110. Lench, N., et al., *The clinical implementation of non-invasive prenatal diagnosis for single-gene disorders: challenges and progress made*. Prenat Diagn, 2013. **33**(6): p. 555-62.
111. Fakhrai-Rad, H., N. Pourmand, and M. Ronaghi, *Pyrosequencing: an accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms*. Hum Mutat, 2002. **19**(5): p. 479-85.
112. Dufort, S., M.J. Richard, and F. de Fraipont, *Pyrosequencing method to detect KRAS mutation in formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissues*. Anal Biochem, 2009. **391**(2): p. 166-8.
113. Janssen, B., et al., *MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls*. Neurogenetics, 2005. **6**(1): p. 29-35.

114. Singh, S.M., et al., *Missense mutation Lys18Asn in dystrophin that triggers X-linked dilated cardiomyopathy decreases protein stability, increases protein unfolding, and perturbs protein structure, but does not affect protein function*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e110439.
115. Singh, S.M., et al., *Missense mutations in dystrophin that trigger muscular dystrophy decrease protein stability and lead to cross-beta aggregates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(34): p. 15069-74.
116. Yue, P., Z. Li, and J. Moulton, *Loss of protein structure stability as a major causative factor in monogenic disease*. J Mol Biol, 2005. **353**(2): p. 459-73.
117. Glickman, M.H. and A. Ciechanover, *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction*. Physiol Rev, 2002. **82**(2): p. 373-428.
118. Zatz, M., et al., *Serum creatine-kinase (CK) and pyruvate-kinase (PK) activities in Duchenne (DMD) as compared with Becker (BMD) muscular dystrophy*. J Neurol Sci, 1991. **102**(2): p. 190-6.
119. Aston, J.P., et al., *Plasma pyruvate kinase and creatine kinase activity in Becker muscular dystrophy*. J Neurol Sci, 1984. **65**(3): p. 307-14.
120. Langius, F.A., et al., *Identification of three patients with a very mild form of Smith-Lemli-Opitz syndrome*. Am J Med Genet A, 2003. **122A**(1): p. 24-9.
121. Haas, D., et al., *Smith-Lemli-Opitz syndrome with a classical phenotype, oesophageal achalasia and borderline plasma sterol concentrations*. J Inher Metab Dis, 2005. **28**(6): p. 1191-6.
122. Witsch-Baumgartner, M., et al., *Mutational spectrum in the Delta7-sterol reductase gene and genotype-phenotype correlation in 84 patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome*. Am J Hum Genet, 2000. **66**(2): p. 402-12.

123. Cartegni, L., S.L. Chew, and A.R. Krainer, *Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(4): p. 285-98.
124. Goldenberg, A., et al., *[Clinical characteristics and diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome and tentative phenotype-genotype correlation: report of 45 cases]*. Arch Pediatr, 2003. **10**(1): p. 4-10.
125. Yu, H., et al., *Spectrum of Delta(7)-dehydrocholesterol reductase mutations in patients with the Smith-Lemli-Opitz (RSH) syndrome*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(9): p. 1385-91.
126. Ciara, E., et al., *DHCR7 mutations and genotype-phenotype correlation in 37 Polish patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome*. Clin Genet, 2004. **66**(6): p. 517-24.
127. Anstey, A.V., et al., *Photosensitive Smith-Lemli-Opitz syndrome is not caused by a single gene mutation: analysis of the gene encoding 7-dehydrocholesterol reductase in five U.K. families*. Br J Dermatol, 2005. **153**(4): p. 774-9.
128. DeBarber, A.E., et al., *Smith-Lemli-Opitz syndrome*. Expert Rev Mol Med, 2011. **13**: p. e24.
129. Cunniff, C., et al., *Clinical and biochemical spectrum of patients with RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome and abnormal cholesterol metabolism*. Am J Med Genet, 1997. **68**(3): p. 263-9.
130. Nowaczyk, M.J., et al., *Smith-Lemli-Opitz (RHS) syndrome: holoprosencephaly and homozygous IVS8-1G-->C genotype*. Am J Med Genet, 2001. **103**(1): p. 75-80.
131. 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**(3): p. 259-68.
132. Ivady, G., et al., *Distribution of CFTR mutations in Eastern Hungarians: relevance to genetic testing and to the introduction of newborn screening for cystic fibrosis*. J Cyst Fibros, 2011. **10**(3): p. 217-20.

133. Jira, P.E., et al., *Smith-Lemli-Opitz syndrome and the DHCR7 gene*. Ann Hum Genet, 2003. **67**(Pt 3): p. 269-80.
134. Nowaczyk, M.J. and J.S. Wayne, *The Smith-Lemli-Opitz syndrome: a novel metabolic way of understanding developmental biology, embryogenesis, and dysmorphology*. Clin Genet, 2001. **59**(6): p. 375-86.
135. Kelley, R.I. and G.E. Herman, *Inborn errors of sterol biosynthesis*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2001. **2**: p. 299-341.
136. Opitz, J.M., et al., *Cholesterol and development: the RSH ("Smith-Lemli-Opitz") syndrome and related conditions*. Pediatr Pathol Mol Med, 2002. **21**(2): p. 153-81.
137. Thusberg, J., A. Olatubosun, and M. Vihinen, *Performance of mutation pathogenicity prediction methods on missense variants*. Hum Mutat, 2011. **32**(4): p. 358-68.

11. Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/11/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Koczok Katalin
Neptun kód: GKQM6L
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10037481

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Koczok, K.**, Merő, G., P. Szabó, G., Madar, L., Gombos, É., Ajzner, É., Mótyán, J. A., Hortobágyi, T., Balogh, I.: A novel point mutation affecting Asn76 of dystrophin protein leads to dystrophinopathy.
Neuromusc. Disord. 28 (2), 129-136, 2018.
IF: 2.487 (2017)
2. **Koczok, K.**, Gombos, É., Madar, L., Török, O., Balogh, I.: Interfering effect of maternal cell contamination on invasive prenatal molecular genetic testing.
Prenat. Diagn. 38 (9), 713-719, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/pd.5319>
IF: 2.779 (2017)
3. Balogh, I., **Koczok, K.**, P. Szabó, G., Török, O., Hadzsiev, K., Csábi, G., Balogh, L., Dzsudzsák, E., Ajzner, É., Szabó, L., Csákváry, V., Oláh, A.: Mutational spectrum of Smith-Lemli-Opitz syndrome patients in Hungary.
Mol Syndromol. 3 (5), 215-222, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000343923>





További közlemények

4. **Koczok, K.**, Gurumurthy, C. B., Balogh, I., Korade, Z., Mirnics, K.: Subcellular localization of sterol biosynthesis enzymes.
J. Mol. Histol. 50 (1), 63-73, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10735-018-9807-y>
IF: 2.412 (2017)
5. 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: 3.73 (2017)
6. Korade, Z., Genaro-Mattos, T. C., Tallman, K. A., Liu, W., Garbett, K. A., **Koczok, K.**, Balogh, I., Mirnics, K., Porter, N. A.: Vulnerability of DHCR7+/- mutation carriers to aripiprazole and trazodone exposure.
J. Lipid Res. 58 (11), 2139-2146, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2017.12.003>
IF: 4.505
7. Korade, Z., Kim, H. Y. H., Tallman, K. A., Liu, W., **Koczok, K.**, Balogh, I., Xu, L., Mirnics, K., Porter, N. A.: The Effect of Small Molecules on Sterol Homeostasis: Measuring 7-Dehydrocholesterol in Dhcr7-Deficient Neuro2a Cells and Human Fibroblasts.
J. Med. Chem. 59 (3), 1102-1115, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01696>
IF: 6.259
8. **Koczok, K.**, Oláh, A., Szabó, G., Oláh, É., Török, O., Balogh, I.: A koleszterin-bioszintézis veleszületett zavara: a Smith-Lemli-Opitz-szindróma.
Orv. hetil. 156 (42), 1695-1702, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2015.30256>
IF: 0.291
9. Oláh, A., **Koczok, K.**, Szabó, G., Varga, J., Balogh, I., Harangi, J.: A veleszületett koleszterinhiány jellemző biomarkerei Smith-Lemli-Opitz-szindrómás betegekben és hordozókban.
Metabolizmus. 13 (3), 196-201, 2015.
10. 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





11. Bubán, T., **Koczok, K.**, Földesi, R., Szabó, G., Sümegi, A., Tanyi, M., Szerafin, L., Udvardy, M., Kappelmayer, J., Antal-Szalmás, P.: Detection of internal tandem duplications in the FLT3 gene by different electrophoretic methods.
Clin. Chem. Lab. Med. 50 (2), 301-310, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2011.762>
IF: 2.15
12. Szodoray, P., **Koczok, K.**, Szántó, A., Horváth, I. F., Nakken, B., Molnár, I., Zeher, M.: Autoantibodies to novel membrane and cytosolic antigens of the lachrymal gland in primary Sjögren's syndrome.
Clin. Rheumatol. 27 (2), 195-199, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10067-007-0678-y>
IF: 1.559

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 26,914

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
5,266**

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

Debrecen, 2019.01.17.



12. Tárgyszavak/keywords

anyai sejt kontamináció, Sanger DNS szekvenálás, MLPA, új generációs DNS szekvenálás, piroszekvenálás, Duchenne/Becker-izomdystrophia, dystrophin, dystrophinopathia, koleszterin, 7-DHC, DHCR7, mutációs spektrum, SLO szindróma

maternal cell contamination, Sanger DNA sequencing, MLPA, next generation sequencing, pyrosequencing, Duchenne/Becker muscular dystrophy, dystrophin, dystrophinopathy, cholesterol, 7-DHC, DHCR7, mutational spectrum, SLOS

13. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönettel tartozom Témavezetőmnek, Dr. Balogh Istvánnak, aki megszerettette velem a genetikát. Szemléletmódja és lelkesedése nagy hatással volt rám. Témavezetőként és később Tanszékvezetőként egy igen szigorú, de következetes, önálló munkára nevelő, kiteljesedésre teret biztosító, vitára mindig nyitott és minden helyzetben emberséges és emberi munkatársat ismertem meg benne a hol nehéz és rögzös, hol pedig sikeres szakmai úton.

Köszönet illeti a Molekuláris Genetikai Részlegen dolgozó orvosdiagnosztikai analitikus és klinikai kutató kollégáimat és egyben szerzőtársaimat, Dzsudzsák Erikát, Kálmáncheyné Gombos Évát és Madar Lászlót, akiktől rengeteget tanultam és tanulok mind a mai napig.

Köszönöm minden közvetlen munkatársamnak, hogy a mindennapi diagnosztikai munkám és kutatási tevékenységem kapcsán egy „népes”, vidám és nagyszerű laboratóriumi genetikai csapatnak lehetek a tagja.

Köszönöm klinikus kollégámnak és szerzőtársamnak, dr. Török Olga Tanárnőnek, hogy megosztotta velem tudását és tapasztalatait a magzati mintavétel és a genetikai tanácsadás terén.

Köszönöm szerzőtársaimnak, hogy értékes munkájukkal hozzájárultak az értekezés alapjául szolgáló közlemények teljességéhez és sokrétűségéhez.

Köszönöm dr. Kappelmayer János Professzor Úrnak, a Laboratóriumi Medicina Intézet Igazgatójának, egykori kedvenc oktatómnak, hogy az általa vezetett intézetben, kihívásokkal teli, inspiráló és támogató környezetben fejlődhetek, dolgozhatok.

Köszönöm férjemnek, gyermekeimnek, szüleimnek, nagyszüleimnek és barátaimnak, hogy mindig mutatják a helyes utat, általuk lehetek az, aki vagyok.

A kutatómunka a Gazdaságfejlesztési és Innovációs Operatív Program (GINOP-2.3.2-15-2016-00039) támogatásával jött létre.

14. Függelék

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