

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Patogenetikai jelentőségű kópiaszám eltérések
vizsgálata veleszületett fejlődési rendellenességekben**

Nagy Orsolya



DEBRECENI EGYETEM

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2021

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Patogenetikai jelentőségű kópiaszám eltérések
vizsgálata veleszületett fejlődési rendellenességekben**

Nagy Orsolya

Témavezető: Dr. Ujfalusi Anikó



DEBRECENI EGYETEM

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2021

**PATOGENETIKAI JELENTŐSÉGŰ KÓPIASZÁM ELTÉRÉSEK VIZSGÁLATA
VELESZÜLETETT FEJLŐDÉSI RENDELLENESSÉGEKBE**

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

Írta: Nagy Orsolya, okleveles klinikai laboratóriumi kutató

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori Iskolája
(Konzervatív orvostudományok és klinikai vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Dr. Ujfalusi Anikó, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Méhes Gábor, az MTA doktora
tagok: Dr. László Zsuzsanna, PhD
Prof. Dr. Biró Sándor, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja (online formában): 2021. január 21. (csütörtök), 11:00 óra.

Az értekezés bírálói:

Dr. Török Olga, PhD
Dr. Horváth Emese, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Méhes Gábor, az MTA doktora
tagok: Dr. László Zsuzsanna, PhD
Prof. Dr. Biró Sándor, az MTA doktora
Dr. Török Olga, PhD
Dr. Horváth Emese, PhD

Az értekezés védésének időpontja (online formában): 2021. január 21. (csütörtök), 14:00 óra.

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a nagy.orsolya@med.unideb.hu e-mail címre a vitát megelőző nap (2021. január 20.) 12:00 óráig.

1. BEVEZETÉS

A kópiaszám eltérések (copy number variant, CNV) a humán genom intermedier méretű struktúrális eltérései, amelyek funkcionális következményei az általuk okozott DNS többlet vagy hiány méretétől és géntartalmától függenek. Jelentős részük benignus, az egészséges populációban is előforduló polimorfizmus. A patogén CNV-k olyan dózis-szenzitív géneket tartalmaznak, amelyek deléciója/duplikációja révén ritka veleszületett fejlődési rendellenességek alakulhatnak ki.

A veleszületett szívfejlődési rendellenességek (congenital heart disease, CHD) a leggyakoribb fejlődési anomáliák, klinikai megjelenésük alapján két csoportra oszthatók: szindrómás (egyéb fejlődési rendellenességet is mutató) vagy izolált (csak a szívet érintő). A CHD etiológiája (genetikai és környezeti hatás) az esetek mindössze 20–30%-ában ismert. A szindrómás formák azonosítása és a genetikai háttér tisztázása nélkülözhetetlen a prognózis becsléséhez és a betegek megfelelő ellátásához. A javuló diagnosztikai és sebészeti beavatkozások következtében a vitiumos betegek több mint 90%-a eléri a felnőttkort. Az ismétlődési kockázat megítéléséhez, a reprodukzív döntéshozatalhoz és a prenatalis diagnosztikához a genetikai diagnózis ismerete ma már elengedhetetlen.

Az értekezés 5.1. fejezetében a CHD-s betegcsoportban végzett citogenetikai microarray és MLPA vizsgálatok eredményeit mutatom be. Ezen módszerek alkalmazásával a CHD-k háttérében álló patogén CNV-k azonosítása, genotípus-fenotípus összefüggés leírása volt a célom. A postnatalis eseteket szindrómás és izolált csoportra osztva vizsgáltam, a prenatalis minták CHD-val diagnosztizált magzatok abortumainak kamrai szövetmintáiból származtak. Az alkalmazott módszerek hatékonyságának tesztelésével eredményes diagnosztikai kivizsgálási algoritmus kidolgozására törekedtem.

A nemi differenciálódási zavarok (differences of sex development, DSD) olyan ritka veleszületett rendellenességek, amelyek nagyon változó fenotípusbeli eltérésekkel járnak, sok esetben a klinikai diagnózis felállítása is nehézségekbe ütközik. A klinikai gyakorlatban az esetek kevesebb, mint 20%-ának van molekuláris genetikai diagnózisa, ami megnehezíti a megfelelő kezelési mód (sebészi, hormonterápia) kiválasztását és a betegség prognózisának megítélését.

Az értekezés 5.2. fejezetében egy olyan 46,XY DSD-vel diagnosztizált lány gyermek genetikai kivizsgálását mutatom be, akinél a kromoszómális nem meghatározását követően öt évre volt szükség a fenotípust magyarázó molekuláris genetikai diagnózis megszületéséhez.

Ezen eset tanulmányozása kapcsán a kisméretű, intragénikus CNV-k vizsgálatának jelentőségére hívjuk fel a figyelmet.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Kópiaszám eltérések a humán genomban és azok genetikai vizsgáló módszerei

Az intermedier méretű (50 bp – 3 Mb) CNV-k funkcionális következményei az általuk okozott DNS többlet vagy hiány méretétől és géntartalmától függenek. A humán genom kb. 12–16%-át kitevő CNV-k nagy része benignus, azaz olyan polimorfizmus, amely az egészséges populáció >1%-ában fordul elő. A patogén CNV-k olyan a fejlődéshez nélkülözhetetlen, dózis-szenzitív, filogenetikailag konzervált géneket tartalmaznak, amelyek deléciója/duplikációja ritka veleszületett rendellenességeket, autizmust, pszichiátriai kórképeket, gyakori, komplex felnőttkori betegségeket vagy szerzett tumorokat okozhat.

A szubmikroszkópos méretű (<3 Mb) CNV-k kimutatásának egyik legrégebbi módszere a *fluoreszcens in situ hibridizáció* (FISH), amely során fluoreszcens jelölésű DNS próbákat hibridizálnak interfázisú vagy metafázisú sejtek DNS-éhez a vizsgálni kívánt régió deléciójának, duplikációjának, lokalizációjának kimutatása céljából.

Az *array komparatív genomi hibridizáció* (aCGH) a teljes genom egy lépésben való vizsgálatával képes kimutatni CNV-eket. Az aCGH nagy felbontása révén kb. 15–20%-os diagnosztikai hatékonysággal rendelkezik CNV alapú betegségekből, ezért elsővonalbeli tesztként javasolt többszörös fejlődési rendellenességek, ismeretlen eredetű szomatikus és mentális retardációk, autizmus kivizsgálása esetén és azokban a prenatális esetekben is, amikor a szűrővizsgálatok során a magzat fejlődési rendellenességének gyanúja merül fel.

A *multiplex ligáció-függő próba amplifikáció* (MLPA) alkalmazásával egy gént vagy csak néhány exont érintő, ún. intragénikus CNV-k detektálhatók.

Az új generációs alapú *teljes genom szekvenálás* (WGS) a CNV-k mellett képes kiegyensúlyozott aberrációk detektálására a töréspontok szekvencia szintű megadásával és a genomi szakaszok irányultságának identifikálásával együtt. Ezáltal a WGS képes helyettesíteni valamennyi eddig alkalmazott genomi vizsgálatot.

2.2. Veleszületett szívfejlődési rendellenességek osztályozása, etiológiája és genetikája

A CHD-k a szív és a nagyerek funkcionális és strukturális defektusait foglalják magukba. A leggyakoribb születési anomáliák, az újszülöttek perinatális megbetegedésének és halálának vezető okai. Prevalenciájuk kb. 8/1000 élve született gyermek, ez a szám

azonban országonként és kontinensenként változik (2,3–9,3/1000). Az eredményes kezelési és műtéti beavatkozásoknak köszönhetően ma már a CHD-ban szenvedő betegek kb. 90%-a eléri a felnőttkort. A CHD-k osztályozásának számos formája létezik. Megkülönböztetünk egyszerű vagy komplex (több vitium együtt); cianotikus vagy acianotikus; a szív egyes részeinek érintettsége alapján jobb oldali, bal oldali, kiáramlási pályát vagy nagyereket érintő (conotruncalis), valamint oldalisági hibaként (heterotaxia) megjelenő CHD-t. A vitiumok előfordulhatnak szindrómás (egyéb szervrendszer fejlődési rendellenességét is mutató) vagy csak a szívet érintő, izolált formában. Az összes CHD 25–40%-a szindrómás, míg 60–75%-a izolált formában fordul elő.

A CHD-k etiológiája heterogén és még ma is csak részben ismert. Epidemiológiai tanulmányok adatai alapján kb. 75%-ban multifaktoriális eredetűek, azaz környezeti ágensek és sok minor gén együttes hatásának következményeként jönnek létre. Teratogén ágensek kb. 5%-ban, míg genetikai eltérések kb. 20%-ban felelősek kialakulásukért.

A CHD-kat okozó patogenetikai eltérések méretük alapján lehetnek kromoszómális aneuploidiák (trisómia, monoszómia), szubmikroszkópos CNV-k (mikrodeleció, mikroduplicáció) és egy vagy néhány nukleotidot érintő génmutációk. Ezek az eltérések szindrómás (kb. 20%) vagy izolált CHD-t (kb. 80%) egyaránt okozhatnak.

A CHD-k elsőként felfedezett genetikai okai a kromoszómák számbeli aberrációi (trisómia/monoszómia) voltak, amelyek a CHD-s esetek 9–18%-ában mutathatók ki. A teljes kromoszómákat érintő eltérések nagy géntartalmuk miatt szinte kizárólag súlyos, több szervet érintő tünetegyüttest, szindrómás CHD-t okoznak. Szubmikroszkópos CNV-k az izolált CHD-k esetén 3–10%-ban, míg az extrakardiális tüneteket is mutató szindrómás formákban 3–25%-ban mutathatók ki. A legismertebb génmutáció okozta szindrómás CHD-k az alábbiak: Alagille (*JAG1*, *NOTCH1*), Holt–Oram (*TBX5*) és Noonan (*PTPN11*, *SOS1*). Az izolált CHD-k háttérben álló mutációk olyan géneket érintenek, amelyek fehérje termékei funkciójuk szerint három fő csoportba sorolhatók: transzkripciós faktorok, szignáltranszdukcióban résztvevő fehérjék és strukturális fehérjék. A normál szívfejlődésért felelős génexpressziót szabályozó legismertebb transzkripciós faktorok: a *GATA*, a Homeobox és a T-box faktorok. Elsősorban funkcióvesztő mutációk jellemzőek a Notch, a WNT/BMP, a NODAL és a RAS/MAPK szignáltranszdukciós útvonalak érintettsége esetén. A sarcomer és az extracelluláris mátrix felépítésében résztvevő fehérjék génjeinek mutációi (pl. *MYH6*, *MYH7*, *MYH11*, *ACTC1*, *ELN*) nemcsak cardiomyopathiákat, hanem CHD-kat is eredményezhetnek. A felsorolt géncsoportokon kívül epigenetikai tényezők (DNS- és hisztonmetiláció, -acetiláció, miRNS) is módosíthatják a kardiogenezisben szerepet játszó fehérjék expresszióját.

2.3. Nemi differenciálódási zavarok osztályozása, etiológiája és genetikája

A nemi differenciálódás a 6. gesztációs héten indul és pubertáskorban nemi éréssel, valamint a reprodukzív működés kialakulásával fejeződik be. Az embrió nemi kromoszóma összetétele (XY vagy XX) határozza meg a bipotenciális gonád testis vagy ovárium irányú differenciálódását, a kialakult gonád által termelt nemi hormonok pedig a belső és külső nemi szervek fejlődését.

A nemi differenciálódás komplex folyamat, a normál irányú fejlődéshez számos gén megfelelő időben és helyen történő koordinált expressziója szükséges. A férfi irányú differenciálódás elindításához Y kromoszóma szükséges, azon belül is a rövid karon (Yp11.2) elhelyezkedő szex-determináló gén (*SRY*). Ennek hiányában (XX kariotípus) női irányú differenciálódás indul el. Az *SRY* gén egyik legfontosabb feladata a *SOX9* gén expressziójának elindítása, amely a here Sertoli-sejtjeinek fejlődéséért és rajtuk keresztül az anti-Müllerian hormon (AMH) termeléséért felelős. Ennek hatására a Müller-cső visszafejlődik és a Wolff-csőből elindul a belső és külső férfi nemi szervek kialakulása. Ezt a folyamatot támogatják a here Leydig-sejtjei által termelt androgének is. A here fejlődésében számos egyéb génnek is fontos szerepe van (pl. *GATA4*, *NR5A1*, *SOX3*, *SOX8*, *SOX10*, *WT1*), amelyek mutációi a here fejlődési zavarát és társuló veleszületett eltéréseket okozhatnak. Az ovárium irányú differenciálódásért felelős gének (pl. *DAX1*, *FOXL2*, *RSPO1*, *WNT4*) a folliculusok megfelelő differenciálódása mellett gátolják a férfi irányú *SOX9*-es útvonal kifejeződését is.

A DSD a kromoszómális, gonadális vagy a fenotípusos nem veleszületett eltéréseit jelenti. Klinikailag nagyon heterogén betegcsoport, incidenciája a fenotípus súlyosságának megfelelően változik. A klinikai kép spektruma a legenyhébb hypospadiasistól (1:250 fiúgyermek), a bizonytalan külső nemi szerveken át (1:4500) a teljes nemváltásig terjed (1:20 000). A tünetek leggyakrabban már újszülöttkorban láthatók, ritkán a nemi érés időszakában, pubertáskorban jelennek meg. A 2006-ban megjelent új nomenklatúra és osztályozás alapja a nemi kromoszóma összetétel, amely alapján a DSD-k három csoportja különíthető el: (i) a nemi kromoszómák eltérései által okozott DSD-k: 45,X; 47,XXY; 45,X/46,XY; 46,XX/46,XY; (ii) 46,XY DSD és (iii) 46,XX DSD. A DSD kialakulásáért genetikai tényezők, környezeti káros hatások, hormonális eltérések és epigenetikai változások egyaránt felelősek. A genetikai eltérések közül a nemi kromoszómák számbeli és szerkezeti eltéréseit ismerték fel legkorábban, amelyek méretüknél fogva a DSD-n kívül egyéb tüneteket is mutató szindrómás formát eredményeznek (pl. Turner, Klinefelter).

A nemi differenciálódást koordináló génekben leginkább funkcióvesztéssel járó kisméretű deléciók, inszerciók, missense, nonsense és splicing mutációk kerültek azonosításra. A genetikai heterogenitás mellett nehezítette az esetek felderítését a mutációk okozta fenotípus nagyfokú változatossága, a változó expresszivitás és csökkent penetrancia. A CNV-k DSD-ben betöltött patogenetikai szerepéről – a szekvenciaszintű mutációkhoz képest – viszonylag kevés információval rendelkezünk. A kódoló szakaszokat érintő nagy méretű CNV-k az ismert DSD gének közül leggyakrabban az *NR5A1*, az *NROB1* és a *DMRT1* géneket érintik.

Az általunk vizsgált DSD-vel diagnosztizált lány gyermek esetében a nemi differenciálódási zavarokért felelős gének közül az *NR5A1* gént érintő patogén CNV kerül bemutatásra.

Az *NR5A1* (*SF-1*) gén által kódolt fehérje egy magreceptor, amely a bipotenciális gonádban termelődve a férfi irányú differenciálódást segíti elő az *SRY* és *SOX9* gének expressziójának fokozása révén, a kialakult herében pedig stimulálja a Sertoli-sejtek AMH termelését és a Leydig-sejtek tesztoszteron szintézisét. A DSD-ben szerepet játszó gének közül az *NR5A1* gén heterozigóta mutációi a leggyakoribbak, 46,XY DSD esetén kb. 10–20%-ban fordulnak elő. A mutáció okozta haploinsufficiencia autoszómális domináns öröklődésű, leginkább 46,XY DSD-t eredményez, de leírták 46,XX DSD-ben is. A mutációk okozta klinikai kép nagyon heterogén, a hypospadiasistól a bizonytalan külső nemi szerveken át a teljes nemváltásig terjed.

2.4. A genetikai háttér tisztázásának klinikai jelentősége CHD-ban és DSD-ben

Az általunk vizsgált két betegcsoport közös vonása, a nagyfokú genetikai és klinikai heterogenitás, valamint az etiológiai háttér korlátozott ismerete. Ismereteink rohamos bővülése ellenére nagyon alacsony (20–30%) a genetikai diagnózissal rendelkező betegek aránya.

A CHD-s betegek megfelelő klinikai ellátásához ezért egyre inkább szükséges a genetikai kivizsgálás, amely eredményének birtokában az alábbi kérdésekre keresünk választ: (i) mi a CHD ismétlődési kockázata, (ii) hordozzák-e a genetikai eltérést egyenesági rokonok, (iii) vannak-e (addig fel nem ismert) extrakardiális tünetek, (iv) társuló tünetként előfordul-e az idegrendszer fejlődési zavara, (v) milyen az adott CHD prognózisa, milyenek lesznek a beteg életkilátásai.

A DSD gyakran társul bizonytalan külső nemi szervekkel, felnőttkorban infertilitással, nemi identitászavarral, késői következményként a gonádok malignus átalakulásával. A pontos diagnózis megadásához, a betegek megfelelő nemi fejlődésének kialakításához, a korrekciós műtétek megtervezéséhez, illetve a prognózis megítéléséhez elengedhetetlen a genetikai háttér ismerete.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Tudományos munkám során patogenetikai szereppel bíró CNV-k kimutatását tűztem ki célul olyan fejlődési rendellenességekben, amelyek genetikai háttere még napjainkban is nagymértékben tisztázatlan. Az eredmények birtokában genotípus-fenotípus összefüggések meghatározásával arra kerestem választ, hogy a kimutatott CNV milyen módon járul hozzá a betegség kialakulásához, milyen összefüggést mutat a klinikai képpel.

- 1.) Céлом volt szindrómás CHD-val diagnosztizált betegek esetében patogén szubmikroszkópos CNV-k azonosítása aCGH és MLPA módszer alkalmazásával. Eredményeim alapján célul tűztem ki olyan kivizsgálási algoritmus kialakítását, amelynek segítségével nagy diagnosztikai hatékonysággal igazolhatók patogenetikai jelentőségű CNV-k ezen betegek genetikai kivizsgálása során, figyelembe véve a hazai lehetőségeket.
- 2.) Vizsgálataim során célul tűztem ki extrakardiális tüneteket nem mutató, izolált CHD-val diagnosztizált betegek CNV irányú genetikai vizsgálatát.
- 3.) Munkám során céлом volt prenatalisan diagnosztizált, izolált és komplex CHD-t mutató abortumok kamrai szövetmintáiból patogén CNV-k azonosítása.
- 4.) DSD-ben a kisméretű, egy vagy néhány exont érintő CNV-k nagyon ritkán vizsgált mutációtípusok. Egy 46,XY DSD-vel diagnosztizált lány gyermek esetében célul tűztem ki a kórkép kialakításáért felelős genetikai eltérés azonosítását a nemi differenciálódásban szerepet játszó gének intragénikus kópiaszám eltéréseinek vizsgálata révén.

4. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Betegek

4.1.1. CHD-val diagnosztizált betegcsoportok

4.1.1.1. Szindrómás CHD-val diagnosztizált betegek

A szindrómás CHD-ban szenvedő betegek (n=33) vizsgálati mintái a Debreceni Egyetem, Klinikai Központ, Gyermekgyógyászati Klinika, a Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Genetikai Intézet és a zalaegerszegi Zala Megyei Szent Rafael Kórház Klinikai Genetika szakrendeléséről érkeztek. A betegek fenotípusra vonatkozó adatait az őket gondozó klinikai genetikus szakorvosok bocsátották rendelkezésünkre. A betegek életkora 2–18 év között volt, a nemek eloszlása: fiú:lány 16:17.

4.1.1.2. Izolált CHD-val diagnosztizált betegek

Az izolált CHD-s esetek (n=16) a Debreceni Egyetem, Klinikai Központ, Gyermekgyógyászati Klinika Kardiológia szakrendelésének beteganyagából és a Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Genetikai Intézetből származtak. A betegek életkora 10 hónap és 46 év között volt, a nemek aránya: fiú:lány 9:7.

4.1.1.3. Abortumokból származó minták

A Semmelweis Egyetem I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján képző eljárásokkal (ultrahang, echocardiographia) CHD-val diagnosztizált magzatok esetében mesterséges terhességmegszakításra került sor. Az abortumok patológiai vizsgálata minden esetben igazolta a CHD-t. Az abortumok átlagos gesztációs kora 20,85 (19–23) hét volt. A genetikai vizsgálatok az abortumok kamrai szövetmintáiból (n=18) történtek.

4.1.1.4. A vizsgálatok menete

A genetikai tesztek sorrendjét a betegek részletes klinikai kivizsgálása során leírt fenotípusos jegyek és a CHD jellege határozta meg. A szindrómás csoport betegeinél a rutin diagnosztikai kivizsgálás hagyományos G-sávós citogenetikai analízissel kezdődött a nagy méretű kromoszómaeltérések kimutatása/kizárása céljából. Ennek negativitása vagy a talált eltérés pontosításának szükségessége esetén, valamint azokban az esetekben, amikor a tünetek alapján egy konkrét mikrodélációs vagy mikroduplicációs szindróma gyanúja merült fel,

általam végzett célzott FISH vagy MLPA vizsgálatokra került sor. Amennyiben ezek a tesztek is negatív eredménnyel zárultak, aCGH vizsgálatot végeztünk. Az izoláltnak tekintett CHD-s csoport esetén, extrakardiális tünetek hiányában célzott MLPA vizsgálatokra került sor.

4.1.2. DSD tüneteit mutató beteg

Az általunk vizsgált lány gyermek megszületését követően fizikális vizsgálattal női külső nemi szerveket és clitoris hypertrophiát (Prader I.) mutatott. Kilenc hónapos korában észlelték kétoldali lágyéksérvét, amelyet az ultrahangvizsgálat gonádként azonosított. Laparoszkopos vizsgálattal kevert belső nemi szerveket, kis uterust, bal oldalon tuba uterinát, jobb oldalon mellékherének tűnő képletet írtak le. A gonádokat a hasüregbe helyezték, a belőlük vett biopsziás minta szövettani vizsgálata heréket igazolt spermatogóniumok nélkül, kevés Leydig-sejttel. A veleszületett kariotípus meghatározás *SRY*-pozitív 46,XY kariotípust igazolt. A komplett androgén inszenzitivitási szindróma diagnózisa kizárásra került, mivel a beteg laboratóriumi vizsgálata során alacsony tesztoszteron értéket ($<0,15$ nmol/L) mértek. Kizárásra került a mellékvesekéreg elégtelenség is, mivel a kortizol és adrenocorticotropin értékek a normál tartományba estek. A szülők lányként nevelték gyermeküket. A gyermek 5 és fél éves korában az endokrinológus által indikált MRI- és hasi ultrahangvizsgálat során uterus nem volt azonosítható és egyéb Müller-cső eredetű belső női nemi szerv sem. Az ebben az időben végzett AMH meghatározás értéke (87,3 pmol/L) a női referencia tartomány fölé (2–32 pmol/L), a férfi referencia tartomány alá (400–1300 pmol/L) esett. Ez alapján 46,XY DSD parciális gonad dysgenesissel (GD) diagnózis született, amit alátámasztott a gonádok korábbi szövettani képe is. Ebben az életkorban laparoszκόpia során eltávolították a dysgenetikus gonádokat, hogy megelőzzék azok malignus átalakulását. Az urethro-cysto-vaginoscopia során uterus nélküli, vakon végződő vaginát írtak le. Az eltávolított gonádokból újabb szövettani vizsgálat történt. A jobb oldali gonádban here, mellékhere, ductus deferens és tuba átmetszetre emlékeztető terület volt látható. A bal oldali gonádban here és mellékhere részleteket írtak le. A seminiferosus tubulusok mindkét gonádban csak Sertoli-sejteket tartalmaztak spermatogóniumok nélkül.

4.2. Módszerek

4.2.1. Citogenetikai vizsgálat

A veleszületett kariotípus meghatározása Na-heparinnal antikoagulált perifériás vérből történt. A phytohemagglutininnal stimulált vizsgálati minták 72 órán át történő tenyésztését, a kromoszómapreparálást és a Giemsa festéssel (Merck, Darmstadt, Germany) történő sávozást

standard protokoll alkalmazásával végezték. Betegenként 15 metafázisú sejtet analizáltak LUCIA kariotipizáló szoftver (LUCIA Cytogenetics, Czech Republic) segítségével. A kariotípus leírása az aktuális nemzetközi nomenklatúrának (ISCN) megfelelően történt.

4.2.2. Fluoreszcens *in situ* hibridizáció

A FISH vizsgálatokhoz a kromoszómapreparálás során nyert sejtszuspenziót használtuk. A CHD-ban szenvedő betegek mintáin az alábbi FISH próbák kerültek alkalmazásra: DiGeorge/VCFS TUPLE1, Subtelomer (4p/4q, 6p/6q), Cri-du-chat és SOTOS (Cytocell, Rainbow Scientific Inc., Windsor, CT), 24X-Cyte (MetaSystems, Altlussheim, Germany). A DSD-s beteg esetében az *SRY* génre és az X kromoszóma centromerikus régiójára specifikus próbát (Cytocell, Rainbow Scientific Inc., Windsor, CT) használtuk. Minden esetben a gyártó által megadott protokollnak megfelelően történt a vizsgálat kivitelezése. A szignálmintázatok értékelését Zeiss Axioplan 2 fluoreszcens mikroszkóppal (Carl Zeiss, Jena, Germany) és ISIS szoftver (MetaSystems, Altlussheim, Germany) használatával végeztük.

4.2.3. DNS izolálás

A DNS alapú genetikai vizsgálatok kivitelezéséhez a betegek K₃-EDTA-val (etiléndiamin-tetraecetsav) vagy Na-citráttal alvadásgátolt perifériás vérmintáiból és az abortumok kamrai szövetmintáiból a genomiális DNS izolálás QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) alkalmazásával történt, a gyártó ajánlásainak megfelelően.

4.2.4. Multiplex ligáció-függő próba amplifikáció

Szívfejlődési rendellenességek MLPA vizsgálatokor két kitet alkalmaztunk. A SALSA MLPA P250-B2 DiGeorge kit 48 régióra specifikus próbát tartalmaz: 29 próba a 22q11.2-es kromoszómarégióhoz bekötődve alkalmas a DiGeorge szindróma (DGS) és ugyanezen régió mikroduplikációjának következtében kialakuló Cat eye szindróma különböző töréspontú variánsainak azonosítására; 19 próba fedi le a DGS II. lókuszt (10p14) és a DGS-hez hasonló fenotípussal járó mikrodeléciós régiókat (4q35, 8p23, 9q34.3, 17p13.3, 22q13). A SALSA MLPA P311-B1 CHD kit olyan gének kópiaszám eltéréseit vizsgálja, amelyek mutációi CHD kialakulásához vezethetnek: *GATA4* (8p23), *TBX5* (12q24), *NKX2.5* (5q35), *BMP4* (14q22), *CRELD1* (3p25) és a 22q11.2 régió.

A DSD-vel diagnosztizált beteg esetén a SALSA MLPA P185-C2 Intersex próbamixet alkalmaztuk, amely az alábbi génekre specifikus próbákat tartalmazza: *NR0B1/DAX1*, *CXorf21*, *SOX9*, *SRY*, *ZFY*, *WNT4*, *NR5A1* (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands).

Vizsgálataink során a PCR termékek szeparálása ABI-3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA) készüléken történt, a relatív kópiaszámok meghatározása pedig Coffalyser szoftver (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) segítségével. Mintán belüli és minták közötti normalizációt követően a vizsgált régiók kópiaszámát a kapott hányadosok alapján az alábbiak szerint határoztuk meg: 0,65 és 1,30 közötti érték normál kópiaszámnak felelt meg, 0,65 alatti deléció, 1,30 feletti pedig duplikációt jelölt.

4.2.5. Teljes genom array komparatív genomi hibridizáció

Az aCGH vizsgálatokat CytoScan 750K Array (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) alkalmazásával végeztük. Ez a típusú citogenetikai microarray 750 436 oligonukleotid próbát tartalmaz (550 000 egyedi, nem polimorf CNV próba és 200 436 SNP próba). A citogenetikai microarray által lefedett géneken belül (ISCA, OMIM, RefSeq, X kromoszómán lévő és tumorgének) az átlagos felbontóképesség 1737 bp, a teljes, intra- és intergénikus átlagos felbontóképesség 4125 bp. A módszer kivitelezése, az egyes reakciók paramétereinek beállítása és alkalmazása a gyártó által megadott protokoll alapján történt.

A kapott eredmények analíziséhez a Chromosome Analysis Suite (ChAS) v2.0 szoftvert használtuk, az adatokat a GRCh37 (hg19) humán referencia genomhoz hasonlítottuk. Első lépésként ellenőriztük a minták minőségét jellemző paramétereket ($MAPD \leq 0,25$; $SNPQC \geq 15$; $Waviness-SD \leq 0,12$). Az elemzéskor valós deléciónak azokat a CNV-eket tekintettük, amelyek legalább 10, duplikációnak pedig, amelyek legalább 20 egymás után elhelyezkedő próbát tartalmaztak. A CNV-k osztályozása (patogén, valószínűleg patogén, ismeretlen klinikai jelentőségű, valószínűleg benignus, benignus) a 2011-ben leírt ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) irányelvei szerint történt az alábbi adatbázisok alkalmazásával: DGV, UCSC Genome Browser, DECIPHER, ISCA, OMIM, PubMed. A CNV-k mellett a ≥ 10 Mb méretű heterozigótaság-vesztést tartalmazó kromoszómális régiókban vizsgáltuk a genomikus imprinting mintázat változásának lehetséges hatását.

4.2.6. Teljes exom szekvenálás

A DSD-vel diagnosztizált beteg genomi DNS mintájának teljes exom szekvenálása Hongkongban, a Beijing Genomics Institute-ban történt Complete Genomics platform alkalmazásával. Az adatok értékelésére a budapesti Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi

Medicina Intézet, Klinikai Genetika és Endokrinológiai Laboratóriumában került sor a DSD-t okozó gének (*LIMI, CBX, SOX9, DHH, WT-1, SRY, AR, NR5A1, CYP17, HSD17B3, DMRT1, DAX, AMH, WNT4, RSPO1, CTNNB1, MAP3K1, NR0B1, AMHR2, LHCGR, FGF9*) célzott mutáció analízisével (Genome Analysis Toolkit, GATK szoftver).

4.2.7. Az *NR5A1* génben detektált CNV megerősítése QMPSF módszerrel

Az *NR5A1* gén 5-ös és 6-os exonjának MLPA módszerrel kimutatott delécióját, egy kvantitatív, multiplex PCR technika, QMPSF (Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments) segítségével validáltuk. A vizsgálathoz az *NR5A1* génre és 2 kontroll génre (*HSD17B3, USH2A*) tervezett primereket (0,2 µmol/L), és egy univerzális 5' fluoreszcens festékkel jelölt primert (6FAM-M13: 6FAM-5'-TGTAACGACGGCCAGT-3', 0,8 µmol/L) és MyTaq HS Mixet (Bioline, London, UK) használtunk korábban közölt protokoll alapján. A különböző hosszúságú fragmentek ABI-310 (Applied Biosystems, Foster City, CA) szekvenáló készüléken kerültek elválasztásra. A CNV meghatározásához első lépésként a vizsgált exonok fluoreszcencia intenzitását a kontroll gének amplifikált exonjainak fluoreszcencia intenzitásához viszonyítottuk (mintán belüli normalizáció), majd minták közötti normalizációt végeztünk, párhuzamosan futtatott egészséges kontroll minták ugyanezen exonjainak fluoreszcencia intenzitását figyelembe véve.

5. EREDMÉNYEK

5.1. CHD-val diagnosztizált betegcsoportok

5.1.1. Szindrómás CHD-val diagnosztizált betegek

A CHD mellett szomatikus és/vagy mentális retardációt, dysmorfiás tüneteket is mutató betegek (n=33) esetében különböző súlyosságú szívfejlődési rendellenességek fordultak elő önállóan vagy egymással kombinálódva: ASD és/vagy VSD (n=12), TOF (n=8), FoA (n=3), PDA (n=1), PS (n=1), UH (n=1), totalis situs inversus (n=1), egyéb komplex vitium (n=6).

Valamennyi szindrómás vitiummal diagnosztizált betegnél történt valamilyen genetikai vizsgálat. A rutin diagnosztikai kivizsgálás részeként 32 betegnél végeztek hagyományos kromoszóma analízist, amely során 30/33 esetben (94%) normál kariotípus igazolódott. Két beteg mintájában számbeli és szerkezeti kromoszómaaberrációkat mutattak ki (1. és 2. eset). DGS-specifikus FISH analízisre 10/33 esetben került sor, egyik mintában sem igazolódott a 22q11.2 régió deléciója. Citogenetikai microarray vizsgálatot 25/33 beteg mintáján végeztünk,

amelyek közül 21 esetben nem volt kimutatható patogenetikai jelentőségű CNV. Négy beteg (1-4. eset) mintájában kódoló OMIM géneket tartalmazó patogén CNV-t azonosítottunk, ami 16%-os (4/25) detekciós rátát jelent. Nyolc (8/33) beteg mintáján kizárólag MLPA vizsgálatot végeztünk, közülük három esetben (5-7. eset) patogén CNV-t mutattunk ki.

5.1.1.1. Az 1. eset klinikai jellemzői és genetikai eredményei

Anamnesztikus adatok alapján a prenatalisan végzett ultrahangvizsgálat nem igazolt morfológiai eltérést a magzatban, az anyai vérből történt, magzati kromoszóma rendellenességeket vizsgáló genetikai teszt (NIPT) eredménye is negatív lett. Szülést követően az újszülöttnél ASD és PDA igazolódott. Két hetes korában látta klinikai genetikus, aki többszörös fejlődési rendellenességet írt le: alacsonyan ülő fülek, hypertelorismus, hypotonia, kis száj, laryngealis hypoplasia, microcephalia, retrognathia, syndactylia II-III, spasztikus végtagok. A gyermek jellegzetes, macskanyávogásra emlékeztető sírési hangja miatt Cri-du-chat szindróma gyanúja merült fel, amelyet az 5-ös kromoszóma rövid karjának deléciója okoz. Hagyományos kromoszóma analízissel kóros kariotípus igazolódott, 5-ös eredetű gyűrűkromoszómával és egy kis számfeletti marker kromoszómával (sSMC): 47,XY,r(5),+sSMC. Az 5-ös kromoszóma szerkezeti eltérésének pontosítása céljából a Cri-du-chat régióra specifikus FISH vizsgálatra került sor, amivel az 5p15.2 régió deléciója igazolódott az 5q35-ös régió (SOTOS) megtartottsága mellett. Az sSMC kromoszómális eredetének azonosítása multicolor FISH módszerrel történt. Ennek eredménye alapján az sSMC 15-ös eredetűnek bizonyult. Ezt követően aCGH módszerrel azt vizsgáltuk, hogy milyen méretű és géntartalmú az 5-ös kromoszómát érintő CNV, amely gyűrűkromoszóma kialakulásához vezetett. Ezen kívül arra kerestünk választ, hogy az sSMC a 15-ös kromoszóma mely régióit tartalmazza parciális triszómia formájában. A vizsgálat eredménye az 5-ös rövid kar 34,58 Mb méretű, 65 OMIM gént tartalmazó terminális delécióját (5p15.33p13.2x1) igazolta. A 15-ös kromoszóma esetében CNV nem volt azonosítható, ami arra utalt, hogy az sSMC kizárólag nem kódoló, 15-ös eredetű heterokromatikus régiókból épül fel.

5.1.1.2. A 2. eset klinikai jellemzői és genetikai eredményei

A beteg születésekor ismerték fel Fallot-tetralógiáját és szoliter veséjét, amelyhez a későbbiekben extrakardiális tünetként hypothyreosis és szomatikus retardáció társult.

A rutin diagnosztikai kivizsgálás részeként végzett G-sávós kariotipizálással a 6-os kromoszóma hosszú karján interstitialis deléciót mutattak ki 6q23 és 6q25 feltételezett töréspontokkal. A töréspontok és a hiányzó kromoszómaszakasz méretének pontos meghatározása, valamint az elveszett géntartalom megadása céljából került sor az aCGH vizsgálatra. Ennek során egy 18,753 kb méretű, 6q21q23 töréspontú és 49 OMIM gént tartalmazó deléciót azonosítottunk, amely CHD-ra hajlamosító géneket (*GJA1*, *HDAC2*, *MARCKS*) is tartalmazott.

5.1.1.3. A 3. eset klinikai jellemzői és genetikai eredményei

A lány gyermek ASD-vel és situs inversus totalisszal született. Klinikai genetikai vizsgálatok a vitium mellett az alábbi fejlődési rendellenességeket mutatta: arcdysmorphia, brachydactylia, keskeny mellkas, macrocephalia, rövid és széles nyak, syndactylia III-IV, szomatikus retardáció. Az első genetikai tesztként végzett citogenetikai vizsgálattal normál női kariotípust mutattak ki. Mivel a tünetek alapján ismert mikrodeléciós/mikroduplicációs szindróma nem merült fel, következő lépésként aCGH vizsgálatot végeztünk. Ennek során a 4-es és a 6-os kromoszómákat érintő CNV-k igazolódtak, a 4q34.3q35.2 régió 12,15 Mb méretű deléciójával és a 6q25.1q27 régió 16,95 Mb méretű duplikációjával. Az együtt előforduló deléció és duplikáció kiegyensúlyozatlan formájú transzlokációra utalt. A citogenetikai microarray technikával kimutatott CNV-k 4q és 6q subtelomer specifikus FISH vizsgálattal megerősítésre kerültek. Ezen kromoszómaszakaszon belül a CHD kialakításáért felelős OMIM gének (pl. *PDLIM3*, *SLC25A4*, *SORBS2*) találhatóak. Az aCGH-val kapott eredményeket követően a beteg kariogramjainak újraértékelése, és a kariotípus revideálása történt. A kiegyensúlyozatlan transzlokáció következtében létrejött derivált 4-es kromoszóma felismerését nehezítette, hogy a transzlokációban hasonló sávmintázatú részek cseréltek helyet. A transzlokáció familiáris eredetének tisztázására elvégezték a szülők citogenetikai vizsgálatát, amely során kiderült, hogy az édesanya kiegyensúlyozott formában hordozza a betegnél kimutatott transzlokációt. Ennek ismeretében a beteg végleges kariotípusa az alábbi lett: 46,XX,der(4)t(4;6)(q34.3;q25.1)mat. arr[hg19]4q34.3q35.2(178,807,365-190,957,460)x1, 6q25.1q27(150,485,038-167,439,226)x3. Genetikai tanácsadás keretében az édesanyát felvilágosították a kiegyensúlyozatlan transzlokáció magas ismétlődési kockázatáról és prenatális citogenetikai vizsgálat lehetőségéről a jövőbeni terhességekben.

5.1.1.4. A 4. eset klinikai jellemzői és genetikai eredményei

A fiúgyermek CoA-val született, klinikai genetikai vizsgálata során plagiocephaliát, lapos occiputot, arcdysmorphiás jegyeket (epicanthus, felfelé ívelő szemrés, hosszú philtrum, mély/besüppedt orrgyök, mélyen ülő fülek, retrognathia) és hypospadiasist írtak le. A veleszületett kariotípus meghatározás normál férfi kariotípust igazolt. Az arcdysmorphia miatt célzott DiGeorge FISH vizsgálat történt, aminek eredménye negatív lett. A gyermek 4,5 éves korában került sor az aCGH vizsgálatra, amellyel a 8-as kromoszóma rövid karján, a 8p23.1-es régióban 3,842 kb méretű duplikáció igazolódott, amely MLPA módszerrel megerősítésre került. A duplikálódott régió 17 OMIM gént, köztük a CHD kialakításáért felelős géneket (kiemelt) (*CLDN23*, *MFHAS1*, *ER11*, *PPP1R3B*, *TNKS*, *MIR124-1*, *MSRA*, *PRSS55*, *RP1L1*, *SOX7*, *PINX1*, *MTMR9*, *SLC35G5*, *FAM167A*, *BLK*, ***GATA4***, *NEIL2*) tartalmazott.

5.1.1.5. Az 5. eset klinikai jellemzői és genetikai eredményei

A 22 hónapos korában vizsgált gyermek a 4. beteg lánytestvére. A 32. terhességi hétre született 1900 g súllyal és FoA-val. A CHD-n kívül az alábbi fejlődési rendellenességeket mutatta: elődomborodó homlok, hypotonia, epicanthus, széles orrgyök és a motoros fejlődés késése.

Mivel testvérénél korábban igazolódott a 8p23.1-es régió duplikációja, ezért nála célzott MLPA vizsgálat történt a régiót érintő CNV kimutatására. Ennek során a 8p23.1-es régióba lokalizálódó három gén (***GATA4***, *MSRA*, *PPP1R3B*) többletét mutattuk ki, ami alátámasztotta korábbi feltételezésünket, az eltérés familiáris eredetét.

5.1.1.6. A 6. eset klinikai jellemzői és genetikai eredményei

A Fallot-tetralógiával diagnosztizált betegnél elsőként DiGeorge MLPA vizsgálatot végeztünk, ami a 22q11.21-es kromoszómarégió delécióját mutatta ki. A deléció 14 gént érintett (*CLTCL1*, *HIRA*, *CDC45*, *CLDN5*, *GP1BB*, *TBX1*, *TXNRD2*, *DGCR8*, *ZNF74*, *KLHL22*, *MED15*, *SNAP29*, *LZTRI*) és DiGeorge szindrómában a leggyakrabban deletálódott régiónak felelt meg, ami az LCR22-A és LCR22-D (low copy repeat 22-A és -D) töréspontokkal jellemezhető. Az eredmény egyértelműen alátámasztotta a szindróma diagnózisát. Szülői minták vizsgálatára nem került sor, mert azok nem voltak elérhetők.

5.1.1.7. A 7. eset klinikai jellemzői és genetikai eredményei

A 6 hónapos kislány Fallot-tetralógiával született, amelyhez hypoplasiás thymus társult. A citogenetikai vizsgálat eredménye normál női kariotípust mutatott. A jellemző tünettársulás

miatt második genetikai vizsgálatként MLPA vizsgálatot végeztünk. Ennek eredménye a 22q11.21-es régióban az LCR22-A és LCR22-D töréspontok közé eső 14 gén delécióját igazolta, a 6. esethez hasonlóan. A szülői minták MLPA módszerrel történt vizsgálata igazolta az eltérés *de novo* eredetét.

5.1.2. *Diagnosztikai algoritmus szindrómás CHD esetén*

Vizsgálati eredményeink alapján kidolgoztunk egy kivizsgálási algoritmust szindrómás CHD-ban szenvedő betegek CNV eredetű patogenetikai hátterének tisztázására. A diagnosztikai útvonal kiindulási és egyben legfontosabb eleme a klinikai genetikus által végzett részletes fenotipizálás, amely alapvetően meghatározza a vizsgálatok sorrendjét. Amennyiben a tünetek számbeli vagy szerkezeti kromoszómaaberrációra utalnak, a rendelkezésünkre álló módszer függvényében hagyományos kromoszóma analízist vagy citogenetikai microarray vizsgálatot végzünk. A leggyakoribb, CHD-val asszociált mikrodeléciók (pl. DiGeorge és Williams) szindrómák vagy egyéb, ritkábban előforduló ismert mikrodeléciók vagy mikroduplicációk szindróma gyanúja esetén FISH vagy MLPA vizsgálatot végzünk. Ismeretlen genetikai hátterű szindróma gyanúja esetén citogenetikai microarray az elsőként választandó módszer. Ha a citogenetikai analízis, a célzott FISH és az MLPA vizsgálatok negatív eredménnyel zárulnak, aCGH módszer alkalmazása javasolt a patogén CNV-k igazolására vagy kizárására.

5.1.3. *Izolált CHD-val diagnosztizált betegek*

A kardiológusok által izolált CHD-val gondozott 16 betegnél az alábbi súlyos, komplex szívfejlődési rendellenességek fordultak elő: TOF (n=12), AVSD (n=1), UH (n=1), HLH (n=1), AVSD + TGA (n=1).

Mivel ezekben az esetekben társuló extrakardiális tünetek nem szerepeltek a betegek anamnesztikus adatai között, ezért CHD-ra specifikus MLPA módszert alkalmaztunk az ismert CHD gének kópiaszám eltéréseinek kimutatására. A vizsgálatok során patogenetikai jelentőségű CNV nem igazolódott ebben a betegcsoportban.

5.1.4. *Abortumokból származó minták*

Terhességi ultrahangszűrések során a magzatokban a CHD különböző megjelenésű és súlyosságú formáit mutatták ki, amelyeket a terhességmegszakítást követő foetopathológiai vizsgálatok megerősítettek és pontosítottak. Az általunk vizsgált 18 esetből egyszerű VSD-t két

esetben azonosítottak. A VSD egyéb vitiummal való társulását 13/18 esetben mutatták ki. Két magzatban TOF, egy magzatban pedig egykamrás szív került leírásra.

Mindkét típusú MLPA kittel megvizsgáltuk az abortumok szívének kamraszövetéből izolált genomi DNS mintákat. Az analizált 18 eset közül 17-ben nem mutattunk ki patogén CNV-t. Egy mintában (12. eset) a 14q22.2-es kromoszómarégióba lokalizálódó *BMP4* génre tervezett próbákkal az exon 1, intron 1, exon 3 és 4 duplikációja igazolódott. A DNS minták korlátozott mennyisége és minősége nem tette lehetővé további aCGH vizsgálatok végzését.

5.2. DSD tüneteit mutató beteg

Az általunk vizsgált lány gyermek megszületését követően clitoris hypertrophia miatt kromoszómális nem meghatározása történt, ami *SRY*-pozitív 46,XY kariotípust igazolt. A DSD háttérében álló genetikai eltérés azonosítása céljából a rutin diagnosztikai kivizsgálás részeként WES történt, a DSD-vel összefüggésbe hozható gének célzott analízisével. Ennek eredménye negatív lett. Ezt követően aCGH vizsgálatot végeztünk, amely során patogenetikai jelentőségű CNV nem igazolódott. Pontmutációk és szubmikroszkópos méretű CNV-k kizárása után olyan intragénikus CNV-t feltételeztünk, amely a gonadális dysgenesis kialakításáért felelős géneket érintheti. Ennek igazolására MLPA vizsgálatot végeztünk ismert, nemi differenciálódást meghatározó gének (*NR0B1/DAX1*, *SOX9*, *SRY*, *WNT4*, *NR5A1*) intragénikus kópiaszám változásának detektálása céljából. Ezzel a módszerrel az *NR5A1* gén 5-ös és 6-os exonjának heterozigóta delécióját mutattuk ki, a többi exon érintettsége nélkül. A két exont érintő deléciót QMPSF módszerrel megerősítettük. A kisméretű, intragénikus deléció a korábbi aCGH vizsgálattal azért nem volt kimutatható, mert az *NR5A1* gén ezen exonjai nincsenek lefedve CNV próbákkal az alkalmazott citogenetikai microarray platformban. A deléciótól proximálisan és disztálisan elhelyezkedő legközelebbi CNV próbák a 4-es és 6-os intronban találhatóak, ezek normál kópiaszámot mutattak. A szülők MLPA vizsgálatakor az *NR5A1* génben nem igazolódott CNV, ami megerősítette a kislánynál kimutatott eltérés *de novo* eredetét. Az *NR5A1* gén parciális deléciójának igazolásával 46,XY DSD részleges GD-vel diagnózis került leírásra.

6. MEGBESZÉLÉS

6.1. CHD-val diagnosztizált betegcsoportok, genotípus-fenotípus összefüggések

6.1.1. Szindrómás CHD-val diagnosztizált betegek

Harminchárom szindrómás CHD-val diagnosztizált beteg közül hét esetben sikerült patogén CNV-t azonosítani, ami 21%-os detekciós arányt jelent. Ez a diagnosztikai hatékonyság megfelel a szakirodalomban közölt adatoknak. Klinikai és tudományos célú tanulmányok eredményei alapján a CHD-s esetek 3–25%-ában mutathatók ki patogenetikai szereppel bíró CNV-k.

Array CGH módszerrel az általunk igazolt patogén CNV-k mérete 3,8 és 34,58 Mb között változott. Jól ismert tény, hogy a veleszületett betegségek kialakításáért felelős CNV-k méretüket, ezáltal géntartalmukat tekintve nagyon heterogének, az általuk okozott klinikai kép ebből adódóan nagyon változó. A veleszületett szívhibák háttérében igazolt CNV-k esetén tovább nehezíti a genotípus-fenotípus összefüggés megadását a CHD fenotípus inkomplett penetranciája.

Az első szindrómás betegnél az aCGH tisztázta és pontosította a diagnosztikai kivizsgálás során végzett citogenetika, FISH és multicolor FISH vizsgálatok eredményeit. Az 5-ös kromoszóma rövid karján igazolt 34,58 Mb méretű terminális deléció megerősítette a Cri-du-chat szindróma (MIM # 123450) diagnózisát, amely a gyakoribb mikrodeléciós szindrómák közé tartozik, 1:20 000 – 1:50 000 incidenciával. A betegnél kimutatott deléciós 5-ös kromoszóma gyűrű formában történő előfordulása igen ritka, eddig mindössze néhány esetet írtak le ebben a szindrómában. A szindróma az esetek 85%-ában *de novo* eredetű, az 5-ös rövid kart érintő deléciók mérete 560 kb és 40 Mb között változik. A betegek heterogén fenotípusát egyértelműen magyarázza a deléciók méretében mutatkozó különbözőség. Egy, a genotípus-fenotípus korrelációt vizsgáló összefoglaló tanulmány szerint a legjellemzőbb tünetek az alábbi kromoszómaregiók elvesztéséhez köthetők: macskanyávogásra emlékeztető sírasi hang 5p15.31, beszédkésés 5p15.32–15.33, arcdysmorphia 5p15.2–15.31. A mentális retardáció annál súlyosabb, minél proximálisabb régiók (5p14.1–14.2) érintettek a delécióban. Az általunk vizsgált betegnél az azonosított deléció töréspontja alapján súlyos mentális retardáció várható későbbi életkorban. A szindrómában érintettek 15–20%-ának van szívfejlődési rendellenessége, amelyek közül leggyakoribb a betegnél is kimutatott PDA és ASD. A vitiumok kialakításáért felelős gént vagy géneket még nem sikerült azonosítani. A citogenetikai microarray analízis nem igazolta a DNS kópiaszámának duplikációját a 15-ös kromoszómán,

amiből arra a következtetésre jutottunk, hogy a teljes sSMC nem kódoló heterokromatinból épül fel, ezáltal nem befolyásolja a klinikai képet.

A 2. esetben a citogenetikai analízissel feltételezett 6q deléció pontosítása és a töréspontok meghatározása céljából végeztünk citogenetikai microarray vizsgálatot. Ennek során a 6-os kromoszóma hosszú karján interstitialis deléció igazolódott a 6q21 és 6q23.2 töréspontok között. A kimutatott 18,753 kb méretű deléció 49 OMIM gént tartalmaz. Ez a CNV tartalmazza a ritka „6q21–q22 deléciós szindróma”-ként ismert kórkép kialakulásáért felelős kromoszómarégiót, mely igen változatos veleszületett fejlődési rendellenességekkel, arc dysmóriával, szomatikus és mentális retardációval jár. A 6-os kromoszóma hosszú karját érintő deléciók a jellemző töréspontok alapján 3 csoportba sorolhatók: „A” vagy proximális (6q11–q16); „B” vagy középső (6q15–q25); „C” vagy terminális (6q25–qter). Az általunk azonosított CNV a „B” deléciós csoportba tartozik. Az interstitialis 6q deléciós esetek genotípus-fenotípus összefüggéseit elemző irodalmi adatok szerint a CHD-val diagnosztizált esetekben egy 113–114,5 kb-os méretű közös deléciós szegmens mutatható ki, amely a kardiális morfogenezisben kritikus szereppel bíró géneket (*GJAI*, *HDAC2*, *MARCKS*) tartalmazza. A betegnél igazolt deléció is magába foglalja ezeket a géneket és magyarázza a beteg kardiális fenotípusát.

A 3. esetben aCGH vizsgálattal sikerült igazolni a betegség háttérben álló parciális 4q34.3q35 monoszómiát és 6q25.1q27 parciális triszómiát, amelyek kiegyensúlyozatlan transzlokáció következtében jöttek létre. A 4-es kromoszóma hosszú karjának terminális deléciója egy ritka aberráció, az esetek kb. 10–20%-ában szülői kiegyensúlyozott transzlokáció kiegyensúlyozatlan formában való örökítésének eredménye és együtt jár a transzlokációban részt vevő partnerkromoszóma parciális duplikációjával. Az általunk vizsgált beteg klinikai tünetei nagymértékben átfednek a terminális 4q deléciós esetek fenotípusos jegyeivel: mentális retardáció, fejlődésbeli elmaradás, CHD, szájpadhasadék, craniofacialis dysmorphia és vázrendszeri eltérések. A 4q terminális részén belül két, CHD-val szoros összefüggést mutató kromoszómarégió is leírásra került. A 4q32.2–q34.3-ban a *TLL1*, *HPGD* és *HAND2* gének deléciója tehető felelőssé a CHD létrejöttéért. A kiegyensúlyozatlan transzlokáció hordozás következtében a beteg fenotípusának kialakításához hozzájárul a terminális 6q duplikáció (6q25–q27) is, amelynek következményei nagyon heterogének. A CHD jelölt gének ebben a régióban a *DLL1*, *QKI*, *RPS6KA2*. A kiegyensúlyozott transzlokáció hordozás miatt a szülőket genetikai tanácsadás keretében tájékoztatták a magas ismétlődési kockázatról és a prénatalis genetikai diagnosztika lehetőségéről egy következő terhességben.

Két, familiáris etiológiájú beteg (4. és 5. eset) mintájában a 8p23.1-es kromoszómarégió duplikációját mutattuk ki. A 8p23.1 duplikációs szindróma ultra ritkának számít, becsült prevalenciája 1:58 000. Huszonnégy, molekulárisan is karakterizált esetet írtak le eddig, amelyek nagy része sporadikus. A 8p23.1 duplikációs szindrómás betegek fenotípusa igen heterogén, leggyakoribb tünetek a CHD, fejlődésbeli elmaradás, tanulási nehézségek (>90%), viselkedészavarok és enyhe dysmorphia. A CHD különböző súlyosságú formái az esetek 25%-ában fordulnak elő. A 8p23.1 kromoszómarégióban számos gént (n=27) és mikroRNS-t (n=5) azonosítottak, melyek közül a *GATA4*, *TNKS1*, *SOX7* és *XKR6* dózis-szenzitív gének, fokozott expressziójuk felelős a szindróma tüneteinek kialakulásáért. A *GATA4* és *SOX7* gének együttes hatására alakul ki CHD, a *TNKS* a viselkedési zavarokért, a *SOX7* a fejlődésbeli elmaradásért tehető felelőssé. A betegnél azonosított 3842 bp méretű duplikáció teljes mértékben lefedi a szindrómáért felelős kritikus régiót, ennek megfelelően a beteg fenotípusa is átfed az irodalomban leírt tünetekkel: aszimmetrikus arc és koponya, epicanthus, benyomott orrgyök, hosszú philtrum, retrognathia, alacsonyan ülő fülek.

Az ötödik beteg az előző lánytestvére, aki a pozitív familiáris anamnézis, a congenitalis vitium és enyhe dysmorphia miatt 22 hónapos korában került klinikai genetikushoz. Célzott MLPA vizsgálattal a 8p23.1-es régióban lévő gének (*GATA4*, *MSRA*, *PPP1R3B*) duplikációját mutattuk ki, amelyek a 8p23.1 kritikus régiójának telomerikus, középső és centromerikus részébe lokalizálódnak. Ebből arra következtettünk, hogy a duplikálódott régió mérete azonos a testvérénél azonosítottal. A kislánynál jelentkező enyhébb CHD (FoA) és fenotípusbeli eltérések lehetséges magyarázata a CNV szindrómákra jellemző csökkent penetrancia és változó expresszivitás lehet.

A 6. és 7. esetben célzott MLPA vizsgálattal igazoltuk a DiGeorge szindróma (MIM # 188400) diagnózisát, 14 egymás melletti gén folytonos deléciójának kimutatásával. Mindkét betegnél Fallot-tetralógiát diagnosztizáltak születéskor, amely a leggyakoribb vitium ebben a szindrómában. Mivel azonban az immundeficiencia (a betegség egyik legjellemzőbb tünete) hiányzott a 6. betegnél, 16 éves koráig izolált CHD-val tartották nyilván. A 7. betegnél a thymus hypoplasia és TOF alapján már 1 hónapos korban felmerült a DGS diagnózisa. A 22q11.2 lókuszt deléciója által okozott DGS a legrégebben ismert és leggyakoribb mikrodéléció szindróma, prevalenciája 1:3000 – 6000. A kórkép főbb tünetei: CHD, thymus hypoplasia, fejlődésbeli elmaradás, tanulási nehézségek, beszédkéés, hypoparathyreosis okozta hypocalcaemia, arcdysmorphia, szájpadhasadék és a szájpad funkciózavara, a vese és a szem fejlődési rendellenességei, felnőttkorban pszichiátriai betegségek. A 22q11.2-es kromoszómarégióban több alacsony kópiaszámú ismétlődő szekvencia (LCR) található,

amelyek NAHR-ra hajlamosítva eredményezik a régióban előforduló gyakori szubmikroszkópos delécióit és duplikációt. A DGS-re jellemző klinikai kép nagyon heterogén, a CHD-kat változó expresszivitás és csökkent penetrancia jellemzi. A csökkent expresszivitás, a CHD szindrómák jellegzetes tüneteinek hiányát eredményezheti, ami megnehezítheti a szindrómás formák felismerését, ezért az izoláltak tűnő esetekben klinikailag nagyon hasznos lehet a CNV-ket kimutató aCGH vagy MLPA alkalmazása.

6.1.2. *Izolált CHD-val diagnosztizált betegek*

Az izolált CHD-val diagnosztizált csoportban főleg komplex szívfejlődési rendellenességet mutató betegek voltak: TOF (n=12), UH (n=1), HLH (n=1), AVSD (n=1), AVSD + TGA (n=1). Az ő esetükben célzott MLPA vizsgálatokat végeztünk az ismert, szívfejlődési rendellenességet okozó gének (*GATA4*, *TBX5*, *NKX2.5*, *BMP4*, *CRELD1*) és kromoszómarégiók (4q35, 8p23, 9q34.3, 10p14, 17p13.3, 22q11.2, 22q13) kópiaszám eltéréseinek kimutatására. Az általunk alkalmazott MLPA kitekkel nem igazolódott patogén deléció vagy duplikáció egyik beteg mintájában sem. A kapott eredmény lehetséges magyarázata a vizsgált esetek alacsony száma és/vagy az analízis célzott jellege lehetett. Eredményeinkkel azonos vagy alacsony detektálási hatékonyságot közöltek több olyan tanulmányban, amelyben célzott CHD-specifikus MLPA alkalmazására került sor.

6.1.3. *Abortumokból származó minták*

A prenatalisan felismert vitiumok háttérében 18–22%-ban mutatható ki kromoszómális aneuploidia és DiGeorge szindróma, a magzatok jelentős hányadában egyéb genetikai eltérések (CNV, pontmutációk) feltételezhetők. Az ismert, CHD-val társuló mikrodeléciós/mikroduplikációs szindrómák szűrésére CHD-specifikus MLPA alkalmazható, az aCGH módszer azonban nemcsak ezek, hanem egyéb, ritka CNV-k felismerését is lehetővé teszi. Ezért a citogenetikai microarray ma már elsővonalbeli genetikai tesztként javasolt eljárás magzati rendellenességek esetén. Vizsgálataink során különböző súlyosságú és komplexitású vitiummal diagnosztizált magzatok (n=18) mintáin MLPA módszerrel a DGS- (22q11.2) és más CHD-specifikus kromoszómarégiókban (4q35, 8p23, 9q34.3, 10p14, 17p13.3, 22q13) nem azonosítottunk delécióit vagy duplikációt. A CHD-kban patogén szereppel bíró gének (*GATA4*, *TBX5*, *NKX2.5*, *BMP4*, *CRELD1*) CNV szűrése során egy mintában (12. eset) a 14q22.2-es kromoszómarégióba lokalizálódó *BMP4* gén duplikációját mutattuk ki. Ennél a magzathoz VSD és CoA volt látható ultrahangvizsgálattal. Állatmodellekben igazolták, hogy a BMP4 fehérje fontos szerepet játszik a kardiogenezisben, a szeptumok és az ingerületvezetés kialakításában.

A gén funkcióvesztő mutációja súlyos veleszületett szívhibákat eredményez. A gén duplikációjának szívfejlődésre gyakorolt funkcionális következményeiről nincsenek irodalmi adatok.

Eredményeink alapján a citogenetikai microarray módszer hatékony eljárásnak bizonyult patogenetikai jelentőségű CNV-k kimutatására szindrómás CHD-ban. A kórállapot háttérben álló mutációk azonosításával genetikai diagnózis állítható fel, ami lehetővé teszi pontos genotípus-fenotípus összefüggés megadását, elősegíti a betegek prognosztikai besorolását, az érintettek korai, személyre szabott megelőző és terápiás ellátását. A genetikai eltérések ismerete segítséget nyújt a klinikai genetikusnak a társuló tünetek korai felismerésében, az ismétlődési kockázat becslésében, az elsőfokú rokonok szűrésében. Amikor az érintett egyén eléri a felnőttkort, a genetikai diagnózis birtokában lehetővé válik prenatális genetikai diagnosztika is.

6.2. DSD tüneteit mutató beteg

Az általunk vizsgált beteg női külső nemi szervekkel, clitoromegaliával és enyhe dysmorfhiás jegyekkel született. A kromoszóma analízis *SRY*-pozitív 46,XY kariotípust igazolt. A későbbiekben végzett képalkotó vizsgálatok hiányzó uterus, vakon végződő vaginát és kétoldali inguinalis sérvet mutattak ki. Ez utóbbiak szövettani vizsgálata dysgenetikus gonádokat írt le, testis, epididymis, tuba uterina és ductus deferens részletekkel. A DSD gének mutáció analízise és a teljes genomot vizsgáló aCGH módszer eredménye negatív lett. A DSD kialakításában szerepet játszó gének (*DAX1/NR0B1*, *CXorf21*, *SOX9*, *SRY*, *ZFY*, *WNT4*, *NR5A1*) kópiaszám változásának vizsgálatára MLPA módszert alkalmaztunk. Ennek során az *NR5A1* gén 5-ös és 6-os exonjának heterozigóta delécióját azonosítottuk, melyet QMPSF technika segítségével megerősítettünk. Az általunk kimutatott CNV új mutáció, DSD-vel diagnosztizált beteg esetében ilyen genetikai eltérést még nem írtak le.

Az *NR5A1* fehérje egy magreceptor szupercsalád tagja. A ligandkötő doménjének felépítésében a gén 4-es exonjának egy része, az 5-ös, 6-os és 7-es exon vesz részt. Az általunk vizsgált esetben az *NR5A1* gén 5-ös és 6-os exonjának deléciója egy out-of-frame mutáció, amely stop kodont eredményez közvetlenül a 4-es exon kódoló szekvenciája után. Ennek következményeként vagy funkcióképtelen, trunkált *NR5A1* fehérje szintetizálódik erről az allélról vagy a nonszensz-mediálta mRNS lebomlás miatt egyáltalán nem képződik fehérje. A másik allél mutációja kizárható, mivel az exom szekvenálás során ebben a génben nem

igazolódott szekvenciabeli eltérés. Ezek alapján az *NR5A1* gén parciális deléciója okozta haploinsufficiencia tehető felelőssé a beteg nemi differenciálódási zavaráért.

A 46,XY DSD komplett vagy parciális GD-vel járó formáiban a testis differenciálódási zavara vagy az androgén hatás elmaradása miatti maszkulinizációs/virilizációs zavar figyelhető meg. A 46,XY DSD háttérében álló gének közül az egyik legtöbbet vizsgált az *NR5A1*. Az általa kódolt NR5A1 fehérje egy transzkripció faktor, a férfi irányú nemi differenciálódásban kulcsfontosságú szerepet játszó gének (pl. *SRY*, *SOX9*) expressziójának szabályozásában vesz részt a WT1 fehérjével együtt. A bipotenciális gonádból kialakult herékben fokozza a Sertoli-sejtek AMH termelését, ami a Müller-cső visszafejlődéséhez vezet. A here Leydig-sejtjeiben a tesztoszteronszintézisért felelős enzimek expressziójának fokozása révén a Wolff-cső differenciálódását, a belső és külső férfi nemi szervek kialakulását segíti elő.

Humán vizsgálatok eredményei alapján az *NR5A1* gén funkcióvesztéssel járó mutációi nagyfokú fenotípusbeli variabilitással járnak: férfi infertilitás, hypospadiasis, rejtettheréjűség, bilaterális anorchia, primer ovárium elégtelenség (46,XX kariotípusú nőknél), GD és ritkán mellékvesekéreg elégtelenség. Napjainkig az *NR5A1* génben kb. 40 heterozigóta mutációt azonosítottak 46,XY DSD-vel diagnosztizált betegekben, ezek nagy része egy vagy néhány nukleotidot érintő pontmutáció volt. A kisskálájú génmutációkkal szemben nagyon kevés irodalmi adat áll rendelkezésre a 46,XY DSD-vel összefüggésbe hozható gének, illetve ezen géneket tartalmazó lókuszok kópiaszám eltéréseiről. *NR5A1* gént érintő CNV-t csak néhány esetben írtak le, ezek mind méretük, mind fenotípusbeli következményeik tekintetében nagyon heterogének voltak.

Összefoglalva, vizsgálataink során egy új, az *NR5A1* génben két exont érintő deléciót azonosítottunk egy 46,XY parciális GD-vel diagnosztizált lány gyermek esetén, amely egy eddig még nem leírt genetikai eltérés 46,XY DSD-ben. Eredményeink újabb bizonyítékot szolgáltatottak az intragénikus CNV-k patogenetikai szerepéről a DSD-k kialakulásában és hangsúlyozták azok kimutatásának klinikai jelentőségét. Ezeknek a mutációtípusoknak a vizsgálata ma még nem része a DSD-s betegek rutin diagnosztikai kivizsgálásának, eredményeink alapján azonban egyértelműen javasolt a tisztázatlan genetikai háttérű esetek felderítésében. Az MLPA módszer alkalmasnak bizonyult a DSD-vel összefüggésbe hozható gének exonális kópiaszám eltéréseinek szűrésére, alkalmazása javíthatja a kórkép nagyon alacsony diagnosztikai hatékonyságát.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Tudományos munkám során aCGH és MLPA módszerek alkalmazásával vizsgáltuk patogén CNV-k előfordulását CHD-ban és egy DSD-vel diagnosztizált beteg esetében.

Az első tanulmányban a CHD-s betegpopulációt három alcsoportra osztva vizsgáltuk.

A szindrómás CHD-val diagnosztizált betegcsoportban (n=33) 21%-os (7/33) diagnosztikai hatékonysággal azonosítottunk patogén CNV-t, ami megfelel az irodalomban közölt adatoknak. A genotípus-fenotípus összefüggés vizsgálatakor valamennyi pozitív esetben igazolható volt a CNV patogenetikai szerepe. Három betegnél ismert mikrodeléciós szindróma (2 DiGeorge, 1 Cri-du-chat), egy testvérpárnál ultra ritka familiáris 8p23.1 duplikációs szindróma, egy betegnél nagyon ritka 6q21–q22 deléciós szindróma, egy beteg esetében pedig egy eddig még nem leírt kiegyensúlyozatlan transzlokáció került kimutatásra. Eredményeink alapján kialakítottunk egy kivizsgálási algoritmust a CNV-k hatékony kimutatására szindrómás CHD-k esetén.

Az izolált CHD-s csoportban (n=16) a betegek súlyos, komplex CHD-val rendelkeztek extrakardiális tünetek nélkül. CHD-specifikus MLPA vizsgálatokkal nem igazolódott etiológiai szereppel bíró patogén CNV. Ennek egyik lehetséges magyarázata az alacsony mintaszám, a másik pedig a vizsgálat célzott jellege.

A CHD-val diagnosztizált abortumok kamrai szövetmintáiból (n=18) MLPA módszerrel egy esetben mutattunk ki CNV-t, amely a 14q22.2-es kromoszómaregióba lokalizálódó *BMP4* gén duplikációját jelentette. A kardiogenezisben szerepet játszó gén kópiaszám növekedésének patogenetikai jelentősége nem bizonyított.

A második tanulmányban egy tisztázatlan etiológiájú DSD-vel diagnosztizált beteg genetikai kivizsgálását végeztük el. Az *SRY*-pozitív, 46,XY kariotípusú, lányként nevelt gyermeknél női külső genitalia, hiányzó uterus és GD került leírásra. A DSD-specifikus génekben új generációs szekvenálással mutáció nem volt kimutatható, teljes genom citogenetikai microarray vizsgálattal patogén CNV nem igazolódott. DSD-specifikus MLPA módszer alkalmazásával egy eddig még nem leírt mutációt, az *NR5A1* gén 5-ös és 6-os exonjának heterozigóta delécióját azonosítottuk, amely a dózis-szenzitív *NR5A1* gén haploinsufficienciáját eredményezve vezet DSD-hez. A mutáció megerősítette a 46,XY parciális GD diagnózisát. Eredményeink megerősítették az intragénikus CNV-k patogenetikai szerepét a DSD-k kialakulásában és hangsúlyozták azok kimutatásának klinikai jelentőségét. Az MLPA módszer alkalmasnak bizonyult a DSD-vel összefüggésbe hozható gének exonális

kópiaszám eltéréseinek szűrésére, alkalmazása javíthatja a kórkép nagyon alacsony diagnosztikai hatékonyságát.

8. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSAI

- 1.) Elsőként végeztünk Magyarországon olyan tanulmányt, amelyben patogén CNV-k előfordulását vizsgáltuk CHD-ban aCGH és MLPA módszerek alkalmazásával. Vizsgálataink során 21%-os diagnosztikai hatékonysággal azonosítottunk patogén CNV-eket a CHD szindrómás formáinak háttérében. A leggyakoribb DiGeorge szindróma mellett olyan ritka (prevalencia <1:2000) vagy ultra ritka (prevalencia <1:50 000) CNV okozta szindrómák genetikai diagnózisát állítottuk fel, mint a Cri-du-chat, 6q21–q22 deléció vagy 8p23.1 duplikációs szindróma. Egy esetben egy eddig még nem leírt, familiáris eredetű kiegyensúlyozatlan transzlokációt azonosítottunk. Mivel valamennyi mikrodeléció/mikroduplikációs szindróma autoszóm domináns módon öröklődik, amennyiben az érintettek elérik a felnőttkort, a genetikai diagnózis birtokában lehetőség nyílik prenatális genetikai vizsgálatra a betegség ismétlődésének megelőzése céljából.
- 2.) Megállapítottuk, hogy az általunk alkalmazott aCGH és MLPA technikák hatékony diagnosztikai eljárások a szindrómás CHD-k háttérében álló CNV-k azonosításában. Eredményeink alapján egy olyan, a CNV-k kimutatására alkalmas diagnosztikai algoritmust dolgoztunk ki, mellyel a genetikai tesztek eredményesen és költségkímélően alkalmazhatóak.
- 3.) Az izolált CHD-s esetek és a prenatálisan CHD-val diagnosztizált magzati minták esetében kapott eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a célzott MLPA vizsgálatok nem elegendőek patogén CNV-k azonosítására. A teljes genomra kiterjedő CNV szűrés citogenetikai microarray módszerrel nagyobb hatékonysággal azonosíthat patogenetikai jelentőségű CNV-eket.
- 4.) Egy tisztázatlan genetikai háttérű DSD-vel diagnosztizált betegben új, eddig nem közölt mutációt azonosítottunk az *NR5A1* génben MLPA módszerrel. A gén 5-ös és 6-os exonját érintő heterozigóta deléció a DSD-t okozó mutációk egy nagyon ritka típusa. Eredményeink alapján felhívtuk a figyelmet a DSD kialakításában szerepet játszó gének intragénikus parciális kópiaszám eltéréseinek vizsgálatára. Hangsúlyoztuk az MLPA módszer alkalmazásának jelentőségét ezen CNV-k azonosításában, amely révén jelentős mértékben javítható a DSD-k nagyon alacsony diagnosztikai hatékonysága.

9. 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/240/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Nagy Orsolya
Neptun kód: BVGBTN
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10057382

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Nagy, O.**, Szakszon, K., Biró, B. O., Mogyorósy, G., Nagy, D., Nagy, B., Balogh, I., Ujfalusi, A.:
Copy number variants detection by microarray and multiplex ligation-dependent probe amplification in congenital heart diseases.
J. Biotechnol. 299, 86-95, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.04.025>
IF: 3.503
2. **Nagy, O.**, Kárteszi, J., Hartwig, M., Bertalan, R., Jávorszky, E., Erhardt, É., Patócs, A., Tornóczy, T., Balogh, I., Ujfalusi, A.: The importance of the multiplex ligation-dependent probe amplification in the identification of a novel two-exon deletion of the NR5A1 gene in a patient with 46,XY differences of sex development.
Mol. Biol. Rep. 46 (5), 5595-5601, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-019-04980-8>
IF: 1.402





További közlemények

3. Ujfalusi, A., **Nagy, O.**, Bessenyei, B., Lente, G., Kántor, I., Borbély, Á. J., Szakszon, K.: 22q13 microduplication syndrome in siblings with mild clinical phenotype: broadening the clinical and behavioral spectrum.
Mol Syndromol. 11 (3), 146-152, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1159/000507103>
IF: 1.198 (2019)
4. **Nagy, O.**, Baráth, S., Ujfalusi, A.: The role of microRNAs in congenital heart disease.
EJIFCC. 30 (2), 165-178, 2019.
5. Tóth, N. K., Székely, E. G., Czuriga-Kovács, K. R., Sarkady, F., **Nagy, O.**, Láncki, L., Berényi, E., Fekete, K., Fekete, I., Csiba, L., Bagoly, Z.: Elevated factor VIII and von Willebrand factor levels predict unfavorable outcome in stroke patients treated with intravenous thrombolysis.
Front. Neurol. 8, 1-10, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2017.00721>
IF: 2.635

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,738

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
4,905**

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, 2020.08.19.



10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik segítséget nyújtottak a PhD dolgozatom elkészítése során.

Elsősorban szeretném hálásan megköszönni témavezetőmnek, **Dr. Ujfalusi Anikó** adjunktusnak az elmúlt évek során végzett önzetlen és áldozatos munkáját, kitartó türelmét, aki sokoldalú, iránymutató tanácsokkal látott el mind elméleti, mind gyakorlati kérdésekben. Ötleteivel és kritikáival jelentősen hozzájárult a PhD értekezés alapjául szolgáló publikációk, illetve az értekezésem elkészítéséhez. Köszönöm a segítségét a **Citogenetikai Részleg asszisztenseinek** a citogenetikai vizsgálatok kivitelezésében.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Balogh István** egyetemi docensnek, a Klinikai Genetikai Tanszék vezetőjének, aki biztosította számomra a kutatómunkámhoz és a dolgozatom elkészítéséhez szükséges szakmai feltételeket. Köszönöm továbbá a **Klinikai Genetikai Tanszék valamennyi dolgozójának**.

Hálás köszönettel tartozom **Dr. Kappelmayer János** Professzor úrnak, a Laboratóriumi Medicina Intézet igazgatójának, aki az elmúlt években figyelemmel kísérte és folyamatosan támogatta tudományos munkámat, biztosította az azokhoz szükséges feltételeket. Köszönöm neki, hogy ebben az Intézetben végezhettem a PhD munkámat.

Köszönet illeti a **szerzőtársaimat** is, akik értékes munkájukkal hozzájárultak az értekezés alapjául szolgáló közlemények elkészítéséhez és elfogadásához.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Baráth Sándornak**, a Laboratóriumi Medicina Intézet adjunktusának a publikációkban és az értekezésben szereplő kiváló ábrák elkészítésében nyújtott önzetlen segítségéért.

A kutatómunka a **GINOP-2.3.2-15-2016-00039** számú, a „*Ritka betegségek pathogenezisének kutatása, új diagnosztikai és terápiás eljárásokat megalapozó fejlesztések*” című pályázat támogatásával jött létre.