

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

A WISKOTT-ALDRICH SZINDRÓMA MOLEKULÁRIS PATOLÓGIÁJA

Dr. Gulácsy Vera

Témavezető: Lajszné Dr. Tóth Beáta



DEBRECENI EGYETEM
PETRÁNYI GYULA KLINIKAI IMMUNOLÓGIAI ÉS ALLERGOLOGIAI DOKTORI
ISKOLA

Debrecen, 2014

A WISKOTT-ALDRICH SZINDRÓMA MOLEKULÁRIS PATOLÓGIÁJA

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

Írta: **Dr. Gulácsy Vera**, általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai doktori
iskolája keretében

Témavezető: Lajszné Dr. Tóth Beáta, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Zeher Margit, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Nagy Kálmán, PhD
Dr. Szegedi István, PhD

A doktori szigorlat helye és időpontja:

DE ÁOK Belgyógyászati Intézet „C” épület tárgyalója
2014. szeptember 02., 12.00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Garami Miklós, PhD
Dr. Lányi Árpád, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Zeher Margit, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Nagy Kálmán, PhD
Dr. Garami Miklós, PhD
Dr. Lányi Árpád, PhD
Dr. Szegedi István, PhD

Az értekezés védésének helye és időpontja:

DE ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2014. szeptember 02., 14.00 óra.

BEVEZETÉS

A Wiskott–Aldrich-szindróma (WAS) X-kromoszómához kötött, recesszíven öröklődő, ritka, primer immunhiányos betegség, amelyet mikrothrombocytopenia, visszatérő fertőzésekhez vezető kombinált immundefektus és ekcéma jellemez. A betegség gyakorisága 1 millió élve születésre 1–10 közé tehető.

A WAS legjellemzőbb tünete a **thrombocytopeniás vérzékenység** – amelyet a thrombocytopenia mellett a vérlemezkék funkciózavara okoz –, a bakteriális kórokozókkal szembeni fokozott érzékenységből eredő **ismétlődő fertőzések** és az **ekcéma**. A tünetek az esetek többségében az első életév során jelentkeznek. Típusos esetben már újszülött korban pontszerű bevérzések jelennek meg az érintett fiúgyermekek bőrén, amelyeket véres hasmenés, visszatérő orrvérzés követ, a későbbiekben légúti bakteriális fertőzések alakulnak ki, végül általában az ekcéma jelentkezik utoljára. Későbbi manifesztációk között szerepelnek az autoimmun betegségek és a malignus lymphoreticularis tumorok. A WAS három variánsa, enyhébb formája: az X-kromoszómához kötött thrombocytopenia (XLT), az intermittáló thrombocytopenia és az X-kromoszómához kötött súlyos neutropenia (XLN). XLT esetében csupán mikrothrombocytopenia észlelhető, az ekcéma és a fertőzésekre való fokozott hajlam kevésbé jellemző. Az intermittáló thrombocytopenia a WAS legkevésbé súlyos fenotípusos formája, jellemzője a thrombocytaszám fluktuációja a normális és a kórosan alacsony tartomány között, a csökkent thrombocyta-térfogat, valamint a vérzéses és egyéb tünetek hiánya. XLN esetén visszatérő, bakteriális infekciók, súlyos, veleszületett neutropenia és monocytopenia hívja fel a figyelmet a genetikai betegségre.

A betegségért felelős génszakaszt 1994-ben írták le az X kromoszóma rövid karján. A gén 12 exonból áll és egy 502 aminosav hosszúságú fehérjét, a Wiskott-Aldrich szindróma proteint (WASP) kódolja. A WASP-ről igazolták, hogy csak a haematopoietikus sejtek és osteoclastok expresszálják, funkciója az aktin polimerizációjától kezdve a jelátviteli folyamatokon keresztül az immunsejtek működésének irányításáig rendkívül szerteágazó. A WAS betegek jelenlegi egyetlen, végleges gyógyulást biztosító kezelése a HLA-identikus, allogén őssejt transzplantáció. A napjainkban is zajló kutatások alapján alternatív kezelésként a jövőben a génterápia is ígéretesnek tűnik olyan betegek számára, akik nem rendelkeznek megfelelő őssejt donorral.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Magyarországi Wiskott-Aldrich szindrómás betegek diagnosztizálása immunológiai, hematológiai és génvizsgálatok alapján. Genotípusos és fenotípus jellegzetességek elemzése génszekvencia variánsok és klinikai fenotípus jelek közötti összefüggések tanulmányozása.
2. Családvizsgálatok során potenciális hordozók felkutatása és diagnosztizálása. Prenatalis genetikai vizsgálat WAS hordozó nőkben a 10-12. terhességi héten korionboholy mintákból izolált DNS szekvencia analízissel.
3. Közép- és kelet-európai országokból, Oroszországból, Törökországból és Azerbajdzsánból származó WAS betegek mutációinak vizsgálata, a térségre jellemző mutációs spektrum felmérése és összehasonlítása az irodalmi adatokkal.
4. WAS deléciós mutációk molekuláris genetikai elemzése saját eredmények és irodalmi adatok alapján.

BETEGEK ÉS RUTIN LABORATÓRIUMI, HEMATOLÓGIAI, IMMUNOLÓGIAI MÓDSZEREK

A vizsgálatokat minden esetben megelőzte a vizsgálandó személyek vagy törvényes képviselőjük tájékoztatása és a beleegyező nyilatkozat aláírása a Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum Etikai Bizottsága által meghatározott követelményeknek megfelelően. A genetikai és klinikai kutatáshoz engedélyt adtak a vizsgált országok illetékes hatóságai.

Vizsgált betegek és hordozók

Tizenegy közép-kelet-európai országból, Oroszországból, Törökországból és Azerbajdzsánból származó, 100 egymással nem rokon családból, összesen 177 WAS mutációt hordozó személy (114 hemizigóta fiú és 63 hordozó nő) került be a vizsgálatunkba. A WAS diagnózisát a típusos klinikai tünetek, mint a mikrothrombocytopenia, ekcéma és visszatérő fertőzések megléte, valamint a laboratóriumi eredmények alapján állítottuk fel. A WAS génen

végzett genetikai vizsgálattal támasztottuk alá a diagnózist. Harmincöt fiú és 38 nő genetikai vizsgálatát az Infektológiai és Gyermekimmunológiai Tanszék molekuláris genetikai laboratóriumában végeztük el, míg a többi beteg genetikai vizsgálata külföldi laboratóriumokban történt. Prenatalis diagnosztikai vizsgálatot öt magyar és egy orosz beteg hozzátartozóinál végeztünk. Ezekben az esetekben a genetikai vizsgálatot a terhesség 12. hetében, amniocentesis során nyert korionboholy sejtekből izolált DNS mintán végeztük el.

DNS amplifikáció és szekvenálás

DNS izolálás

Genomiális DNS-t (gDNS) izoláltunk alvadásgátolt perifériás vérből a Gen ELUTE Blood Genomic DNA mini kit (Sigma-Aldrich Ltd., Germany) használatával standard módszer szerint.

Amplifikációs polimeráz láncreakció

A WAS gén mind a 12 exonját polimeráz láncreakcióval (PCR) felszoroztuk specifikus intronikus oligonukleotid primer párok használatával.

Agaróz gélelektroforézis

A PCR eredményességét és a felszaporított DNS fragmentumok méretét agaróz-gélelektroforézissel ellenőriztük az EasyLadder I (100 bp-2000 bp) segítségével (Bioline, London, UK), 2%-os agarózgélt alkalmazva.

Szekvenálási PCR és célzott génszekvenálás

A PCR terméket tisztítottuk, majd a szekvenálási PCR során egyszálú DNS szakaszokat sokszoroztunk fel. A szekvenáláshoz ABI 3130 DNA automata szekvenálót (Applied Biosystems) használtunk.

A szekvenálás során kapott elektroferogrammok értékeléséhez a GenBank adatbázisát használtuk (WAS gDNS referenciaszáma: Ensembl - NG_007877.1 cDNS referenciaszáma: Ensembl - ENST00000376701) (www.ensembl.org). A nukleotid sorrend számozásakor a cDNS iniciációs kódjának (ATG) az adeninje felelt meg az első pozíciónak. A mutációk nomenklaturájakor a den Dunnen and Antonarakis (2003) ajánlásait követtük (den Dunnen és Antonarakis, 2003). A WAS gén mutációit az ESID által létrehozott Human Gene Mutation Database-ben (HGMD) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>) szereplő mutációkkal vetettük össze.

Áramlási citometriás mérések

A vizsgálathoz EDTA-val alvadásgátolt vért használtunk. Intracellulárisan jelenlévő WAS protein jelöléséhez anti-human-WASP nyúl monoklonális antitestet (Abcam, Cambridge, MA) és Alexa Fluor 488 (Cell Signaling, Eugene, OR, USA) másodlagos antitestet alkalmaztunk, IgG2a isotípus kontroll (Sigma-Aldrich) mellett.

Western blot

Heparinnal alvadásgátolt vérmintából izolált mononukleáris sejtekből (PBMC) totál proteint izoláltunk. Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) a fehérjéket méret szerint elválasztottuk, majd polivinildifluorid (PVDF) membránra (Millipore Corp, Billerica, MA) blottoltuk. A WAS protein kimutatásához indirekt jelölést használtunk. Az elsődleges antitesttel, anti-humán-WASP nyúl monoklonális antitesttel (Abcam, Cambridge, MA) inkubáltuk a membránt, majd a másodlagos antitesttel, a torna peroxidáz konjugált kecske anti-nyúl IgG-vel (Sigma-Aldrich) jelöltük. Detektáláshoz kemilumineszcenciás (Thermo Science, Rockford, IL) módszert alkalmaztunk aktin kontroll mellett.

T sejt proliferációs vizsgálat

A vizsgálat során az ismert protoll mellett az alábbi módosítások történtek. T sejteket anti-CD3-mal fedett, 96 lyukú tálcára vittük fel humán interleukin-2 (IL-2) hozzáadásával vagy anélkül. A sejteket 48 órán keresztül stimuláltuk, majd 24 órán keresztül ³H-thymidine-ből (Perkin Elmer, Jügesheim, Németország) 1 uCi (0.037 MBq) mennyiségek kerültek hozzáadásra. A vizsgálat Prof. Dr. Klein laboratóriumában, kollaborációs vizsgálat keretében történt.

Podoszóma festés

CD14⁺ sejteket jelöltünk anti-CD14 mágneses gyöngyökkel (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Németország) és ezeket a sejteket AutoMACS készülékkel izoláltuk (Miltenyi Biotech). Podosoma vizsgálatot a korábban leírtaknak megfelelően végeztük Prof. Dr. Klein laboratóriumában, kollaborációs vizsgálat keretében.

Molekuláris analízis

A betegektől származó CD3⁺ lymphocytaikat WASP-pozitív illetve WASP-negatív frakciókra választottuk szét. Mindkét frakcióból kivontuk a genomikus DNS-t, amelyet a teljes WAS gén felamplifikálása követett PCR-ral. A DNS szekvenciát ABI Prism 3130 DNA

automata szekvenáló és 3.4 verziójú DNA Sequencing Analysis software (Applied Biosystems) valamint 3.4.1 verziójú Sequencer (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) segítségével határoztuk meg.

A WASP-pozitív frakcióból származó CD3-CD56+ NK sejtek és a B sejtek (CD3-CD56-CD19+CD20+) amplifikációját a fentieknek megfelelően végeztük el. A terméket gélen elválasztottuk és a PCR-Script cloning vectorral (Stratagene, Amsterdam, Hollandia) klónoztuk. A klónok szekvenálását M13 univerzális primerekkel végeztük. A fenti genetikai vizsgálatok Prof. Dr. Klein laboratóriumában kollaborációval történtek.

EREDMÉNYEK

Magyarországi WAS betegek

A vizsgálatunk célja elsősorban a magyarországi WAS családok felkutatása és diagnosztizálása volt. 2004 óta összesen 9 családot sikerült azonosítanunk, 9 beteg fiúval és 18 hordozó nővel. A genetikai vizsgálat révén a családtervezést is elősegítettük ezekben a családokban, több prenatalis vizsgálat elvégzésével.

A magyar WAS betegek fenotípusos jellemzői

Thrombocytopenia

Mind a kilenc magyar beteg első prezentációs tünete a különböző súlyosságú thrombocytopenia volt. Az eltérés véres hasmenés és apró bőrvérzések klinikai tüneteivel manifestálódott a betegekben. Az összes beteg esetében a vérlemezkeszám csökkenését már röviddel a születést követően felfedezték, kivéve két beteget. A betegek átlagban legalacsonyabb thrombocyta száma 20 G/L (Normál tartomány: 150-400 G/L) körüli illetve az alatti volt. A thrombocyták átlagos térfogata a 7 fl-t (Normál tartomány: 7.2-11.1 fl) nem érte el illetve csak kevéssel haladta meg. Thrombocyta transzfúziót minden beteg kapott. A kilenc beteg közül egy kisfiú esetében a thrombocytopenia volt a WAS egyedüli manifestációja.

Infekciók

Különböző súlyosságú fertőzések, kettő beteg kivételével, az összes fiút érintették, a legsúlyosabb esetben pneumonia és Salmonella sepsis formájában. BCG oltást követő, lokális gennyes folyamat 2 beteg esetében alakult ki. A betegek jellemző fertőzései a légutakat

érintették, pneumonia több betegben diagnosztizálásra került. Fatális infekció egy betegben következett be, kettő kisleány az összejt transzplantációt követő súlyos fertőzések kapcsán exitált.

Ekcéma

Ekcéma egy kivétellel minden magyar kisleánál kialakult, a bőrtünetek többnyire már az első életévben leírásra kerültek. Az ekcémás bőrtünetek az alkalmazott hagyományos kezelésekre nem jól reagáltak.

Autoimmunitás/malignitás

Autoimmun valamint tumoros szövődmények a megfigyelési időszakban a kilencből mindösszesen egy betegben manifesztálódtak. Ugyanebben a betegben a rendszeres csontvelő vizsgálat során, a génterápiát követő 7. évben, myelodysplasia jelei mutatkoztak.

WAS score

A klinikai tünetek megléte alapján felállított WAS score rendszerbe minden beteg beilleszthető, egy XLT beteg és nyolc klasszikus WAS beteg volt a csoportban.

Laboratóriumi jellemzők

A laboratóriumi eltérések közül jelentős lymphopeniát egyik vizsgált betegben sem észleltünk. A szérum immunglobulin izotípusok (IgG, IgA, IgM, IgE) általában a korspecifikus normál tartományban voltak mérhetőek, egy-egy betegben a WAS-ra jellemző IgA, IgE emelkedés, 3 betegben IgM csökkenés volt megfigyelhető. Tartós IVIG kezelést indikáló hypogammaglobulinaemia egyik betegben sem alakult ki.

Terápia

A kilenc magyar beteg közül egy beteg még a kuratív kezelés előtt elhunyt, a többi nyolc beteg közül hét kisleány részesült összejtátültetésben, egy beteg pedig génterápiában. A hét transzplantált beteg közül öt beteg gyógyult, 2 beteg sajnos exitált. A génterápiában részesült beteg hét évvel a beavatkozást követően egyelőre tünetmentes.

Családi anamnézis

A családi anamnézis csupán 2 beteg esetében volt WAS-ra nézve pozitív.

Családszűrés és prenatalis vizsgálat a magyar családokban

A magyar betegek családtagjaiban végzett genetikai vizsgálat 15 nő esetében igazolt hordozói státuszt. Három családban elvégzett prenatalis genetikai vizsgálat további 3 hordozó leány magzatra derített fényt. Egy családban a kétpetéjű ikermagzatok a prenatalis vizsgálat alapján vad típusnak bizonyultak. Egy másik családban az első prenatalis analízis beteg kislányt igazolt, a második terhesség esetében más egészséges fiút jeleztünk elő.

A nyolcadik prenatalis vizsgálatot egy orosz hordozó nőben végeztük el, az eredmény egészséges fiú magzat volt.

Magyar WAS családok genetikai vizsgálata

Az első beteg genetikai vizsgálatával a WAS gén első exonján két timin deléciójával járó mutációt igazoltunk. A családvizsgálat során a gyermek édesanyja és anyai nagymamája hordozónak bizonyult. Az időközben megfogant testvérben prenatalis vizsgálatot végeztünk a terhesség 12. hetében és a korionboholyból izolált DNS minta szekvenálása során hordozó leánygyermeket azonosítottunk. A második esetben a betegséget okozó mutációt a WAS gén első exonján citozin/timin cserével járó nonszensz mutációként azonosítottuk. A gyermek édesanyja a mutációra nézve vad típusnak bizonyult. A harmadik beteg genetikai vizsgálatára viszonylag későn, négy éves kora után került sor, amely során a WAS gén kettes exonján timin/citozin cserével járó, ismert misszensz mutációt találtunk, a génhiba triptofán/arginin cserét okozott, az édesanya hordozó volt. A következő beteg genetikai vizsgálata a WAS gén kettes exonján ismert fenilalanin/szerin cserével járó misszensz mutációt igazolt. A családszűrés során számos hordozó nőt tudtunk azonosítani, valamint a későbbiekben a proband leendő testvérében prenatalis vizsgálat elvégzésére is sor került, az eredmény hordozó kislányt igazolt. Az ötödik betegünk genetikai vizsgálata a WAS gén kettes exonján ismert, hotspot mutációt (R86H) mutatott ki. A beteg családjában több hordozó nőt azonosítottunk, valamint prenatalis vizsgálatra is sor került a proband édesanyjának kétpetéjű ikerterhessége során negatív eredménnyel. A hatodik gyermek genetikai vizsgálata külföldön történt, amely a harmas exon elején található GT bázisok delécióját eredményezte. A beteg kuratív kezelés nélkül, négy éves korában súlyos infekciós szövődmény következtében hunyt el. Tanszékünkön a gyermek édesanyjánál, majd a későbbiekben prenatalis vizsgálat keretében, a születendő leány testvérében is igazoltuk a génhibát. A következő kislány genetikai vizsgálatára 2 hónapos korában került sor, amely során a WASP gén 4. exonján G/T cserével járó nonszensz mutációt igazolt, amely génhiba az irodalomban korábban még nem

került leírásra. A gyermek édesanyjában és anyai nagymamájában a mutáció nem volt kimutatható. A beteg édesanyjában a későbbiekben két alkalommal került sor prenatalis genetikai vizsgálatra, első alkalommal ugyancsak beteg kisfiú, második alkalommal viszont egészséges fiú magzat igazolódott. A klasszikus WAS-ra jellemző tünetegyüttest mutató nyolcadik betegben a genetikai vizsgálat a WAS gén 10. exonján egy citozin deléciójával járó pathogén mutációt tárt fel. A családtagok vizsgálata az édesanya hordozói státuszát igazolta, míg a gyermek leánytestvére nem örökölte a génhibát. Az utolsó beteg esetében a génhibát a WAS gén 9. intronján találtuk meg splice site defektus formájában.

A továbbiakban az eredmények közlését a nagy WAS betegcsoportban végzett genetikai vizsgálatok összefoglalásával folytatjuk.

A WAS gén mutációk típusai

A vizsgált közép-kelet-európai, orosz, török és azerbajdzsáni betegeket reprezentáló WAS beteg populációban összesen 77 különböző WAS gén mutációt azonosítottunk, ebből 22 mutációt az irodalomban eddig még nem írtak le. A kimutatott mutációk közül 34 egyszerű bázispár cserével járó mutáció (20 misszensz és 14 nonszensz mutáció), 20 kisméretű, 2 nagy deléció és 1 komplex (InDel) mutáció, 12 splice site defektus és 8 kisméretű inszerció volt.

A leggyakoribb szekvencia variánsok a kisméretű deléciók (25.9%) és misszensz (25.9%) mutációk voltak, gyakoriságban a harmadik helyen a nonszensz (18.2%) mutációk állnak, ritkábbak voltak a splice site defektus (15.6%) mutációk, inszerciók (10.4%), a nagy deléciók (2.6%) és a komplex mutáció, amely az összes mutáció 1.3%-át tette ki. Mind a 12 exonon találtunk mutációt a 9. exon kivételével, valamint a WAS gén hat intronikus szakaszán 12 különböző splice site mutáció volt kimutatható.

Az exonikus mutációk az összes génhiba 83%-ának feleltek meg. A mutációk több, mint a fele, 38 mutáció (59.4%) az első négy exonon volt megtalálható, a gén középső szakaszán (5-8 exon) a talált mutációk csupán 12.5%-a fordult elő, az utolsó 3 exonra a génhibák 26.5%-a jutott, a teljes gén deletálódásával járó nagy mutáció az össz exonikus mutációk 1.5%-t tette ki.

Az intronikus szakaszon jóval kevesebb génhibát azonosítottunk, az össz mutációk mindössze 15.6 % lokalizálódott erre a régióra. Elsősorban a 6-8. intronokon alakult ki mutáció a vizsgált betegekben, a legtöbb ilyen mutáció a WAS gén 6. intronján volt megtalálható.

Az ismert 6 mutációs hotspot mindegyike érintett volt a vizsgált betegcsoportban (Thr45Met – 2, Arg86His – 5, Arg86C – 2, Arg211X – 4, IVS6+5g>a – 4, IVS8+1g>n - 1, IVS8 + 1-6 del gtga – 3). Ezek a mutációk 17 különböző családból származó, összesen 21 (18.4%) betegben, az összes beteg közel 1/5-ében alakultak ki. Az összes hotspot mutációk 34%-a a WAS gén 2. exonon kódolt 86. számú aminosav kicserélődésével járó misszensz mutáció volt, ezzel a leggyakoribb hotspot mutációnak bizonyult.

A betegcsoportban a misszensz mutációk domináltak (42). A leggyakrabban érintett aminosavak az Arg86 és az Asp224 volt hét illetve öt esetben. A misszensz típusú mutációk többsége (16) a WAS gén első négy exonján alakult ki, csupán négy misszensz mutáció helyezkedett el a gén utolsó szakaszain, a 7., 11. és a 12. exonon. A misszensz mutációkhoz hasonlóan a deléciók aránya is magas volt a vizsgált beteg populációban. Ezek főleg kisméretű deléciók voltak, 1-22 bázispár kivágódását okozták. Kettő esetben nagy deléció került azonosításra, amely 322 nukleotid illetve a teljes WAS gén kiesésével járt. A legtöbb deléció az első 6 exont érintette, öt deléciót a 10. exonon találtunk, a 11. és 12. exonon mindössze egy-egy kis deléciót mutattunk ki. Egy betegben azonosított komplex mutáció által okozott nagy deléció a 10-11. exonokat is érintette. Nonszensz típusú mutációt 21 betegben találtunk, ez a génhiba a WAS gén 5., 9. és 12. exon kivételével a többi 9 kilenc kódoló szakaszon megtalálható volt. Splice site defektust 16, inszerciót 11 esetben azonosítottunk, amelyek elsősorban a gén középső részén alakultak ki. Splice site defektusok a hatos és nyolcas intronon jöttek létre a legnagyobb számban a vizsgált betegpopulációban. A leggyakrabban egy nukleotid inszertálódott, amely elsősorban citozin vagy timin volt.

A 22 új mutációból 8 deléció, 6 inszerció, 4 nonszensz, 2 misszensz, 1 splice site defektus és 1 komplex (InDel) típusú mutáció volt. Az új mutációk a WAS gén 9. exonján voltak kimutathatóak, többségük a 10. exont érintette (5), három-három új mutáció az 1. és 2. exonon alakult ki. A 4. és 11. exonon kettő-kettő, a 3., 5., 7., 8. exonon, a 7. intronon és a 3. intron-4. exon határon egy-egy új mutáció igazolódott.

A vizsgált betegpopulációban a kisméretű deléciós mutációk gyakoriak voltak. Korábban leírt, súlyos fenotípussal járó nagy deléciós mutációkat mindössze két beteg esetében igazoltuk. Új mutációként ugyancsak egy nagy deléciót is magában foglaló, valamint egy adenin nukleotid inszerciójával komplikálódó génhibát találtunk egy román kisfiúban, az ő kivizsgálását az alábbiakban, részletesen is ismertettük.

Új nagy deléciós WASP mutáció

A beteg genetikai vizsgálata során a WASP gén mind a 12 exonját vizsgáltuk. Az agaróz gél elektroforézis normál hosszúságú bandeket mutatott az 1-9. és 12. exonok esetében és a nukleotid szekvencia is a vad típusnak megfelelt. A 10. és 11. exont reprezentáló amplikonok nem voltak kimutathatóak gél elektroforézissel, amely eltérés nagy deléciót sejtetett az adott szakaszokon. A mutáció felderítése érdekében a 9-12 exont magába foglaló gDNS szakaszt vizsgáltuk. Normál esetben a négy exont magába foglaló szakasz 2816 bázispár hosszúságú, vizsgálataink során azonban a beteg mintájában ennél kisebb, körülbelül 1000 bázispár hosszúságú amplikont kaptunk.

A továbbiakban bidirekcionális szekvenálással határoztuk meg a nukleotidok sorrendjét. A vizsgálat során a beteg esetében a WAS gén 1595 bázispár deléciója és egy adenin inszerciója vált nyilvánvalóvá.

Az édesanya mintáján is elvégezve az amplifikációs PCR-t, majd a PCR termék agaróz gél elektroforézisét, két bandet kaptunk, amelyek a normál és a mutáns alléleknek feleltek meg. A szekvenálást követően az anya esetében heterozigóta mutációt igazoltunk a g.5247_6841 szakaszon 1595 bázispár deléciójával és egy adenin inszerciójával. Az InDel mutáció a 10-11 exont és a 10-11 intront érintette, a mutáció kereteltolódást okozott, amely eredményeként a WAS fehérje szintézise károsodott (R439fs).

A fehérje expressziót flow cytometriával végeztük intracelluláris jelölést követően a beteg, édesanyja és kontroll mintákban. Az édesanya és a kontroll mintákban megfelelő WASP expresszió kimutatható volt, míg a beteg esetében elhanyagolható mennyiségű WASP-t detektáltunk. Western blot analízis teljes hosszúságú WASP-t (66 kDa) igazolt az anya mintájában a kontrollal megegyezően. Ezzel ellentétben a beteg PBMC sejteiben ezzel a vizsgálattal WAS fehérje nem volt kimutatható.

A szomatikus reverzió ismert, de ritka jelenség WAS-ban. Betegcsoportunkban erre a ritka eseményre is találtunk példát egy ukrán testvérpár esetében.

Másodlagos mutációk és szomatikus reverzió

WAS fenotípusú ukrán testvérpár vizsgálata során a WAS gén egyes exonján új 58C>T nonszensz mutációt igazoltunk, amely génhiba a 20. glutamint kódoló triplet helyett Stop kodont eredményezett.

A betegek további kivizsgálása német kollégák bevonásával, kollaborációs munkában Hannóverben történt. A betegek rutin laboratóriumi eredményei thrombocytopeniát

(Thrombocytaszám < 50 G/L), csökkent B lymphocytaszámot, megfordult CD4/CD8 arányt mutattak. A CD3-mal végzett stimulációs vizsgálatok mindkét betegben csökkent T sejt proliferációs választ igazoltak. Az eltérés humán IL-2 hozzáadásával részlegesen helyreállítható volt. A perifériás vérből izolált CD14⁺ monocyták podoszóma vizsgálata során mindkét beteg mintáiban a podoszómák teljes hiányát figyeltük meg.

Flow cytometriával vizsgálva a betegek PBMC-t, WASP-pozitív és WASP-negatív csoportok különültek el a CD3⁺ lymphocyták és NK sejtek között. A WASP-pozitív és negatív CD3⁺ sejtek szétválasztását követően a két sejtcsoport WAS gén szekvenciájának meghatározását végeztük. A WASP-negatív sejtekben a korábban igazolt nonszensz mutáció volt megfigyelhető (58C>T). Ezzel szemben a WASP-pozitív sejtekben az egyes exon adott szakaszán, ahol a korábbi mutációt találtuk, a nukleotid szekvencia nem volt egyértelműen meghatározható. A jelenség arra utalt, hogy a WASP-pozitív lymphocyták között több eltérő másodlagos mutáció alakult ki ugyanazon a tripleten, mint ahol az első, betegséget okozó génhibát is felfedeztük.

A betegek követése során a következő 18 hónapban a WAS klinikai tüneteinek csökkenését figyelhattuk meg. Az ekcéma és a vérzékenység egyaránt javult, a thrombocytaszámuk pedig normál tartományba emelkedett. A fiatalabb testvér CD8⁺ lymphocytaszámában emelkedést észleltünk B sejt lymphopeniájuk azonban nem szűnt meg és a CD4/CD8 arány sem változott.

MEGBESZÉLÉS

Vizsgálatunk során Wiskott-Aldrich szindrómában szenvedő betegek genetikai jellegzetességet kívántuk feltárni. Az adott betegek genetikai hátterének tisztázása érdekében molekuláris genetikai vizsgálatokat alkalmaztunk és lehetőség szerint WAS fehérje expresszió vizsgálatára is sor került. Magyarországon 9 WAS családot sikerült azonosítani, 9 index pácienssel.

Magyarországi WAS betegek és hordozók

A kilenc magyar beteg klinikai fenotípusa egy esetben XLT-nek felelt meg, mivel nála csak thrombocytopenia formájában nyilvánult meg a betegség. A többi nyolc beteg a klasszikus WAS klinikai tüneteit mutatta. A legsúlyosabb formát egy beteg esetében láttunk, akiben autoimmun szövődménnyel komplikálódott az alapbetegség. Minden betegben vezető tünet volt a súlyos thrombocytopenia, amely gyakran indikált transzfúziót. A vérlemezkék

átlagos térfogata csökkent volt a legtöbb beteg esetében. Infekciók két beteg kivételével, az összes kisfiúban kialakultak és recidiváltak, különböző súlyossággal és gyakorisággal. Ekcéma a kilencből nyolc betegben jellemző tünet volt. Autoimmun illetve malignus kórkép a vizsgált időszakban csupán egy betegben alakult ki. Ennek oka az lehet, hogy a betegeink többsége az első évtizedükben jár és ezek a súlyos szövődmények általában a későbbi életévekben manifesztálódnak. Valamint a betegeink körében nagy arányban sikerrel elvégzett kuratív kezelések az autoimmun illetve tumoros rizikót jelentős mértékben csökkentik. A betegek WAS score értéke átlagosan 3-4 közötti volt. Az immunrendszer állapotáról tájékoztató laboratóriumi eredmények (lymphocyta szám, szérum immunglobulin eredmények) összességében egyik beteg esetében sem voltak teljes mértékben típusosak. Ezen megfigyelés alapján ezek a paraméterek csupán másodlagos fontosságúaknak tekinthetők a klinikai tünetek és a genetikai vizsgálat eredménye mellett. A magyar betegcsoportban hét betegben végeztek őssejttranszplantációt, két beteg a transzplantációt követő fertőzések miatt exitált. Egy beteg génterápiában részesült.

Célkitűzéseinknek megfelelően a WAS betegek genetikai vizsgálatát elvégeztük, mind a 9 magyar betegben megtaláltuk a betegséget okozó mutációt. A magyar kisfiúk közül nyolc esetben, korábban az irodalomban már leírt, ismert mutációt sikerült azonosítani a WAS génen. Hotspot mutáció egy beteg esetében került leírásra. A mutációk közül három esetben deléciót, három betegben misszensz egy betegben pedig nonszensz mutációt találtunk. Új mutációt egy betegben találtunk, amely eltérés a WAS gén 4. exonján a 397. bázis helyen található guanin helyett timint eredményezett. A mutáció a WASP aminosav sorrendjében 133. helyen található glutaminsavat kódoló triplet megváltozását okozta. Az eredeti GAG triplet a mutáció hatására TAG-ra módosult. Az új triplet STOP codonnak felelt meg és a fehérjeszintézis korai leállítását eredményezte. A mutáció a betegben klasszikus WAS fenotípus megjelenésével járt. A magyar betegek esetében a genetikai vizsgálat mellett WAS fehérje kimutatás rutinszerűen nem történt.

A potenciális hordozó nők felderítése érdekében családfát készítettünk, ahol lehetséges volt, kijelöltük a vizsgálandó nőket és felvilágosítást követően elvégeztük a genetikai vizsgálatokat. A kilenc magyar családban összesen 18 hordozó nőt sikerült azonosítanunk. A hordozói státusz tisztázásával lehetőség nyílt a pozitív eredményt mutató és még fertilis korban lévő nők esetében a prenatalis genetikai vizsgálatra. Ez a beavatkozás öt magyar és egy orosz család esetében segítette a családtervezést. Az hat családban, összesen 7 alkalommal, nyolc magzaton végeztük el a vizsgálatot, amely során négy fiú és négy leánymagzat WAS génvizsgálata történt meg.

WAS gén mutációk közép-kelet európai betegekben

A Tanszék nemzetközi szakmai kapcsolatai révén lehetőségünk nyílt a közép-kelet európai régió WAS betegeinek összegyűjtésére, genetikai adataik rendszerezésére. Azok a külföldi beteg, akik hazájukban a genetikai vizsgálat hiánya miatt nem jutottak pontos diagnózishoz, Tanszékünkön kerültek kivizsgálásra. Ily módon összesen 46 külföldi személy, 26 beteg fiú és 20 hordozó nő genetikai vizsgálatára került sor Ukrajnából (8-8), Oroszországból (8-5), Törökországból (3-2), Romániából (3-2), Azerbajdzsánból (2), Lengyelországból (1-2) és Lettországból (1-1). További hét országból pedig a már diagnosztizált betegek és hordozók adatait gyűjtöttük össze.

A talált exonikus mutációk több, mint a fele a WAS gén első 4 kódoló szakaszán volt megtalálható, hasonlóan az irodalomban korábban leírtakhoz. A hotspot mutációk a vizsgált betegpopulációban az esetek közel 20%-át tették ki, hasonlóan a korábban nagy WAS betegcsoportot feldolgozó közleményhez. A hotspot mutációk közül az Arg86His cserét okozó génhibát hordozó magyar beteg, az irodalommal ellentétben, nem az enyhe XLT fenotípust, hanem a klasszikus WAS súlyos formáját mutatta.

Az irodalmi adatokkal összhangban misszensz típusú mutáció fordult elő a legnagyobb számban a vizsgált betegek között, azonos mutációk rokoni kapcsolattól függetlenül, több betegnél is megtalálhatóak voltak. A misszensz mutációk elsősorban a WAS gén első négy exonján alakultak ki. Deléciós mutációkat is nagy számban találtunk a beteganyagban, ezek általában csak 1-1 betegben fordultak elő. A nagy deléciós mutációk ritkák voltak a mi betegeink között is, hasonlóan a korábbi közlésekhez, mindössze a betegek 2.6%-ban (3 beteg) igazoltunk ilyen génhibát. Ezek közül egy új, complex mutációt is részletesen leírtunk. Kevés inszerciót találtunk, de azok 75%-a új mutáció volt. A WAS gén 11 exonján találtunk mutációt, a 9. exon nem volt érintett a mi beteg anyagunkban. Ez az exon az irodalmi adatok alapján is csak kevés ismert mutációnak ad helyet. Az intronikus mutációk közel fele hotspot helyen következett be.

A WAS génen összességében 77 különböző típusú mutációt azonosítottunk, ezek közül 22 az irodalomban eddig nem ismert mutáció volt. Az új mutációk 36.3%-ban deléciók, 27.2%-ban inszerciók, 18.1%-ban nonszensz, 9 %-ban misszensz, 4.5-4.5%-ban splice site defektus és komplex mutációk voltak. A 22 új mutációból 18 frameshift deléció vagy inszerció, illetve nonszensz típusú mutáció, amelyek mindegyike a WAS protein szintézisének korai leállítását eredményezi, ezáltal betegséget okozó mutációként értékelendő. Ezzel a 22 új mutációval tovább gazdagítottuk a WAS gén mutációs adatbázist, amely több mint 300 ismert génhibát foglal magába.

A fentiekben részletezett WAS esetek esetek 80%-a korábban ismert mutációkon alapult. A legsúlyosabb esetek hátterében általában a kereteltolódást és fehérje hiányt okozó nonszensz és deléciós mutációk állnak. A nagy delécióval járó mutációk ritkák WAS-ban, az irodalom csak néhány esetet közöl, de a fenotípus minden esetben súlyosnak mondható, a klinikai tünetek korán és súlyos formában manifesztálódnak. A romániai kisfiú esete kapcsán, akiben új nagy inszerciós-deléciós mutációt találtunk, a WAS génen korábban leírt nagy deléciós mutációkat is feldolgoztuk.

A WAS gén nagy deléciós mutációi

WAS-ban észlelt deléciós mutációk többsége rövid, 1-12 bázispár hiányát okozó mutáció, a nagy deléciók ritkák. Ezek a genetikai hibák egy teljes exon hiányán túl 2 vagy akár több exon kivágódását is okozhatják érintve a köztes intronikus régiókat is, vagy akár a teljes WAS gén is deletálódhat a genomról. Az értekezésben áttekintést nyújtottunk a korábban leírt WAS génen bekövetkezett nagy deléciós mutációkról az irodalmi adatok alapján, kiegészítve az általunk azonosított nagy deléciós mutációval.

A romániai kisfiú esetében azonosított új InDel mutáció a WAS gén 3' végén található. A genetikai vizsgálat azt igazolta, hogy a deléciós mutáció a gén 10. exon, 5246 nukleotid pozíciójából indult és 1595 bázispár kivágódását valamint egy adenin inszercióját eredményezte. A nagy deléciós mutációk csupán egy töredékét képezik annak a több száz WAS gén mutációnak, amelyet 1994 óta az irodalomban leírtak. Az általunk közölt esettel a nagy deléciós mutációk sorát bővítettük. A kevés ismert esetszám miatt, nagy delécióra hajlamosító gén régiót nem tudunk megnevezni. Az összes nagy deléció a WASP teljes hiányával járt vagy megrövidült, funkcióképtelen fehérjét okozott. A mutációk mindegyike a klasszikus WAS súlyos fenotípusában fejeződött ki. Emiatt a nagy deléciók korai felismerése elengedhetetlen a minél korábbi kuratív kezelés- összejt transzplantáció, génterápia - megkezdéséhez.

Végül a WAS-ban ritkán bekövetkező, szomatikus reverzió alapuló, spontán állapotjavulást mutató testvérpár összegzésével zárjuk a megbeszélést.

Másodlagos WAS gén mutációk és szomatikus reverzió

Az ukrán testvérpárnál, a magyarországi genetikai vizsgálatot és a WAS diagnózisának megerősítését követően, összejttranszplantációt terveztek, azonban a megfelelő

donorok hiányában a beavatkozást nem végezték el egyik gyermek esetében sem. A betegek génterápiás programba kerültek és kivizsgálásuk tovább folytatódott. Prof. Dr. Klein laboratóriumában végzett WASP vizsgálat során, a mutáció alapján elvárt teljes WASP expresszió hiány helyett, mindkét beteg sejtjeiben mérhető fehérje expressziót találtunk. Ez az eredmény felvetette a szomatikus mozaicizmus és a spontán reverzió lehetőségét, amely jelenséget már korábban is leírták az irodalomban.

A leírt WAS esetek többségében a szomatikus mozaicizmus igazi reverziós mutációk eredménye volt, a másodlagosan kialakult mutációk által okozott funkciónyerés is ismert, de ritkább jelenségnek számít. Az ukrán testvérpár esetéből fontos tanulságokat vonhatunk le. Mindkét beteg esetében igazoltuk a szomatikus mozaicizmust, azáltal, hogy a betegek CD8+ lymphocytaiban és NK sejtjeiben WASP expressziót igazoltunk. A WASP-pozitív sejtek nagy száma mindkét betegben arra utalhat, hogy ezen sejtek proliferációs előnye igen kifejezett a WASP-negatív sejtekhez képest. A reverzió pontos mechanizmusa és az eseményt kiváltó tényező(k) meghatározása még várat magára. A testvérpár esetében környezeti faktorok szerepe is felmerül, mivel mindkét betegnél egyaránt létrejött a reverzió.

Újszülött- és csecsemőkori thrombocytopeniás vérzések, családon belül fiúgyermekek halmozott mortalitása esetén mindenképpen gondolnunk kell a WAS lehetőségére is. A WAS-ra jellemző klasszikus tüneti triászt a thrombocytopeniás vérzések, a visszatérő infekciók és az ekcéma alkotja. A diagnózisban a klinikai és a laboratóriumi leleteken kívül fontos a genetikai vizsgálat, hiszen a WAS gén mutációjának kimutatásával egyértelműen bizonyíthatjuk a WAS diagnózisát. Genetikai vizsgálattal az enyhébb fenotípusok (XLT, XLN, intermittáló thrombocytopenia) etiológiája is kétséget kizáróan tisztázható. Mivel anyai ágon öröklődő genetikai betegségről van szó, a probandus mutációanalízise után meg kell vizsgálni a még élő női rokonokat is, lehetséges hordozókat keresve. A WAS kuratív terápia nélkül halálos betegség, jelenleg pedig a csontvelő-transzplantáció az egyedüli elfogadott és hatékony oki terápiája. A beavatkozás azonban szigorú kritériumokhoz kötött, és súlyos mellékhatásokkal is járhat amellet, hogy nem mindig sikeres. Új alternatívát a génterápia jelenthet, amely szintén végleges gyógyulást hozhat a WAS-ban szenvedő betegeknek.

Kutatómunkánk során Magyarországon 9 család esetében sikerült egy-egy index beteg kapcsán a WAS gén mutációt igazolni. A családssűrűsések során összesen 18 hordozó nő került felismerésre, 5 magyar és egy orosz család esetében prenatalis vizsgálattal segítettük a családtervezést. Emellett 11 közép-kelet-európai országból, Oroszországból, Törökországból és Azerbajdzsánból származó, WAS-ban szenvedő betegek és a mutációt hordozó nők genetikai vizsgálatát végeztük el, illetve a korábban, más laboratóriumban diagnosztizált

személyek genetikai eredményeit gyűjtöttük össze. A genetikai vizsgálat során bidirekcionális DNS szekvenálással kerestük a betegséget okozó mutációt a WAS génen a betegek és a betegek családtagjainak mintáiban. A vizsgálatba 114 beteg fiú és 63 hordozó nő került bevonásra, összesen 77 különböző mutációt sikerült azonosítani, amelyből 22 génhiba új mutációnak bizonyult. A talált mutációk jellegzetességei, a mutációtípusok gyakorisága, a WAS génen való lokalizációjuk, az irodalmi adatokkal összességében összhangban voltak. Egy új komplex mutáció kapcsán a WAS gén korábban leírt nagy deléciós mutációit is áttekintettük. Egy testvérpár esete pedig a szomatikus reverzió révén a WAS spontán javulására hívta fel a figyelmünket. A tanulmány során az eddig vizsgált legnagyobb WAS-val diagnosztizált közép-kelet-európai betegcsoportot mutattuk be.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki mindenekelőtt témavezetőmnek, Lajszné Dr. Tóth Beátának és korábbi témavezetőmnek, Prof. Dr. Maródi László egyetemi tanárnak, az Infektológiai és Gyermekimmunológiai Tanszék vezetőjének, akik hozzáértő szakmai segítségükkel elméleti és gyakorlati munkámat egyaránt lelkiismeretesen irányították.

Külön megköszönöm a hannoveri Orvostudományi Egyetem Gyermekhematológiai részleg vezetőjének Prof. Dr. Christoph Klein professzor úrnak és munkatársainak az eredményes együttműködést.

Köszönettel tartozom kollégáimnak, Csorba Gabriellának, Soltész Beátának valamint az Infektológiai és Gyermekimmunológiai Tanszék minden munkatársának önzetlen segítségükért.

Külön köszönet illeti a szakmai együttműködésért a J Project valamennyi résztvevő centrumát és munkatársait.

Köszönetet mondok a betegnek és családtagjaiknak a készséges együttműködésükért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a Páromnak és családtagjaimnak az általuk tanúsított megértést és a támogatást.

Iktatószám: DEENKÉTK/374/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

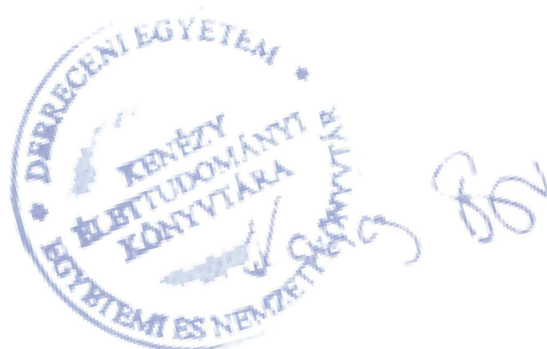
Jelölt: Gulácsy Vera

Neptun kód: NKAWMO

Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunbiológiai és Allergológiai Doktori Iskola

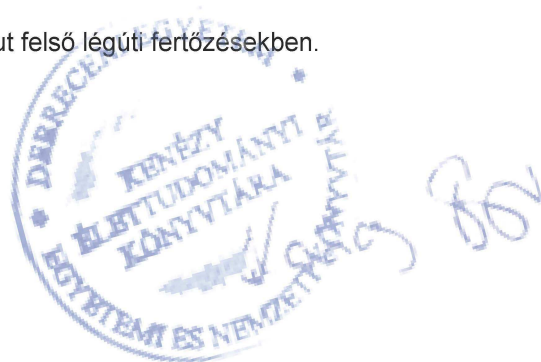
A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Gulácsy, V.**, Freiburger, T., Shcherbina, A., Pac, M., Chernyshova, L., Avcin, T., Kondratenko, I., Kostyuchenko, L., Prokofjeva, T., Pasic, S., Bernatowska, E., Kutukculer, N., Rascon, J., Iagaru, N., Mazza, C., Tóth, B., Erdős, M., van der Burg, M., Maródi, L., The J Project Study Group: Genetic characteristics of eighty-seven patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Mol. Immunol.* 48 (5), 788-792, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2010.11.013>
IF:2.897
2. Boztug, K., Germeshausen, M., Avedillo Díez, I., **Gulácsy, V.**, Diestelhorst, J., Ballmaier, M., Welte, K., Maródi, L., Chernyshova, L.I., Klein, C.: Multiple independent second-site mutations in two siblings with somatic mosaicism for Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin. Genet.* 74 (1), 68-74, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0004.2008.01019.x>
IF:3.206



További Közlemények

3. **Gulácsy V.**, Maródi L.: Szubkután immunglobulin-pótlás és -terápia.
Orv. Hetil. 152 (2), 64-67, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2011.28940>
4. Liu, L., Okada, S., Kong, X., Kreins, A.Y., Cypowyj, S., Abhyankar, A., Toubiana, J., Itan, Y., Audry, M., Nitschke, P., Masson, C., Tóth, B., Flatot, J., Migaud, M., Chrabieh, M., Kochetkov, T., Bolze, A., Borghesi, A., Toulon, A., Hiller, J., Eyerich, S., Eyerich, K., **Gulácsy V.**, Chernyshova, L., Chernyshov, V., Bondarenko, A., Cortés Grimaldo, R.M., Blancas-Galicia, L., Madrigal Beas, I.M., Roesler, J., Magdorf, K., Engelhard, D., Thumerelle, C., Burgel, P., Hoernes, M., Drexel, B., Seger, R., Kusuma, T., Jansson, A.F., Sawalle-Belohradsky, J., Belohradsky, B., Jouanguy, E., Bustamante, J., Bué, M., Karin, N., Wildbaum, G., Bodemer, C., Lortholary, O., Fischer, A., Blanche, S., Al-Muhsen, S., Reichenbach, J., Kobayashi, M., Espinosa Rosales, F., Lozano, C.T., Sebnem Kilic, S., Matias, O., Etzioni, A., Traidl-Hoffmann, C., Renner, E.D., Abel, L., Picard, C., Maródi, L., Boisson-Dupuis, S., Puel, A., Jean-Laurent, C.: Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis.
J. Exp. Med. 208 (8), 1635-1648, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20110958>
IF:13.853
5. Constantin T., Székely A., Ponyi A., **Gulácsy V.**, Ambrus C., Kádár K., Vastagh I., Dajnoki A., Tóth B., Bokrétás G., Müller V., Katona M., Medvecz M., Fiedler O., Széchei R., Varga E., Rudas G., Kertész A., Molnár S., Kárpáti S., Nagy V., Magyar P., Mohamed M., Rákóczi É., Németh K., Bereczki D., Garami M., Erdős M., Maródi L., Fekete G.: Fabry-betegség - terápiás útmutató.
Orv. Hetil. 151 (31), 1243-1251, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2010.28796>
6. **Gulácsy V.**, Maródi L.: Felső légúti fertőzések.
Gyermekeorv. Továbbk. 9 (4), 168-171, 2010.
7. **Gulácsy V.**, Maródi L.: Antibiotikum-terápia gyermekkori akut felső légúti fertőzésekben.
Gyermekeorv. Továbbk. 1 (8), 34-38, 2009.
8. **Gulácsy V.**, Maródi L.: Wiskott-Aldrich-szindróma.
Orv. Hetil. 149 (29), 1367-1371, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2008.28377>



A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 19.956

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
6.103**

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.11.25



A dolgozat alapjául szolgáló egyéb közlemény:

Gulácsy, V., Soltész, B., Petrescu, C., Bataneant, M., Gyimesi, E., Serban, M., Maródi, L., Tóth, B.: A novel large deletion and single nucleotide insertion in the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene. Eur J Haematol, 2014, Manuscript: EJM-2014-520 - (737).

Közlemény megjelenés alatt.