Akadémiai doktori értekezés tézisei

HEMATOLÓGIAI ÉS IMMUNOLÓGIAI BETEGSÉGEK ÖRÖKLETES TÉNYEZŐINEK VIZSGÁLATA

dr. Tordai Attila

Budapest, 2005.

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés és célkitűzések 2
II. Vizsgált populációk, alkalmazott módszerek 3
II.1. Populációk 3
II. 2. Módszerek 3
III. Eredmények és következtetések 4
III.1. Monogénes hematológiai/immunológiai kórképek 4
III.2. Genetikai kockázati tényezők populációs vizsgálatai 7
IV. A dolgozat alapjául szolgáló saját közlemények (említésük sorrendjében) 9
V. Köszönetnyilvánítás 10
VI. Rövidítések jegyzéke 10

I. Bevezetés és célkitűzések

Más szakterületekhez hasonlóan a hematológia és immunológia területein is folyamatosan emelkedik azon kórképek száma, amelyek esetében bizonyítottá és ismertté válik a pontos genetikai háttér. Ezeknél a betegségcsoportoknál számos esetben derül fény monogénes genetikai mechanizmusra. Ezek az általában viszonylag kis számú beteget érintő kórképek hatékonyan tanulmányozhatók genetikai laboratóriumi eszközökkel. Egy másik fontos terület a genetikai kockázati tényezők vizsgálata, amely általában jelentősebb számú beteget érintő kórképeknél merül fel, ugyanakkor a genetikai kockázati tényezők szerepe a betegségek kialakulásában kevésbé egyértelmű. A jelen dolgozatban bemutatott, mintegy 10 évet felölelő időszak során az általam vezetett kutatócsoport alapfeladata a klinikai orientáltságú genetikai kutatómunka eszközeinek meghonosítása, az újabb kísérleti módszerek, eljárások folyamatos átvétele, és a kiértékeléshez, összehasonlításhoz elengedhetetlen feltételek (számítógépes programok, statisztikai módszerek) megteremtése volt. A kialakított és folyamatosan fejlesztett infrastruktúra segítségével a monogénes betegségek, illetve populációgenetikai kutatások területén a következő célkitűzéseink voltak: (i) Közvetett és közvetlen vizsgálatokra alkalmas molekuláris genetikai módszerek beállítása és születés előtti, illetve hordozó-diagnosztika végzése A és B típusú örökletes hemophiliában (HA és HB). (ii) Olyan lehetséges mechanizmusok tanulmányozása, amelyek a VIII. véralvadási faktor gén egyes betegségokozó ritka szerkezeti változatai keletkezéséhez vezethetnek. (iii) Kóroki mutációk felderítése örökletes angioneurotikus oedemában (HANO) és fiatalkori hemokromatózisban (JH). (iv) A mutáció-keresési munkában résztvevő csoportok nemzetközi együttműködését elősegítő internetes adatbázis kifejlesztése, valamennyi közölt C1 inhibitor génmutáció összegyűjtése. (v) A hazai populációgenetikai mérésekhez szükséges populációs minták összegyűjtése, és klinikai szempontból fontos örökletes kockázati tényezők előfordulási gyakoriságának megállapítása a hazai átlagpopulációban. (vi) A valós idejű PCR technikával végzett genotipizálás körülményeinek szisztematikus elemzése.

II. Vizsgált populációk, alkalmazott módszerek

II.1. Populációk

Az A, illetve B típusú hemophiliában szenvedő betegek anyagait az Országos Hemophilia Központból és az országban működő Hemophilia Gondozóktól kaptuk, ahol megtörtént a betegek és családtagjaik részletes fenotípusos kivizsgálása és a családfa-adatok felvétele. A prenatális vizsgálatokhoz szükséges chorion boholy minták (CVS) vételét és citogenetikai vizsgálatát az OGYK Szülészeti Osztályán végezték. Az örökletes angioedemában szenvedő betegek és családtagjaik részletes kivizsgálása és gondozása országos ellátási területtel a SE Kútvölgyi Klinikai Tömb Allergológiai Ambulanciáján történt. A fiatalkori hemokromatózisban szenvedő beteg és családtagjai kivizsgálását a Fővárosi Szent János Kórház III. Belgyógyászati Osztályán végezték. A populációgenetikai vizsgálatokhoz használt első csoport (277 személy) egymással rokoni kapcsolatban nem álló, egészséges intézeti dolgozókból, csontvelődonorokból és apasági vizsgálatok résztvevőiből, a második, nagyobb létszámú (közel 1000 személy) reprezentatív csoportunk pedig egészséges véradókból állt. A mintagyűjtést az OVSZ Budai illetve Szegedi Területi Állomásai végezték. A myelodysplasiában (MDS) szenvedő betegcsoport összegyűjtését és klinikai vizsgálatait a SE III. Belklinikán végezték.

II. 2. Módszerek

A DNS-izolálást elsősorban frissen vett, illetve fagyasztott állapotban tárolt, EDTA-val alvadásgátolt vérmintákból végeztük kisózásos módszerrel, majd gyári reagensekkel. A prenatális vizsgálatokat CVS mintákból izolált DNS felhasználásával végeztük. A projektek többségében a DNS-analízis kiindulópontja a polimeráz láncreakció (PCR) útján végzett amplifikáció, amelyet standard módon az adott szekvenciára specifikus, szintetikus oligonukleotid primerek, Taq polimeráz, dNTP, megfelelő puffer és genomiális DNS-templát jelenlétében végeztük. A PCR termék analízise horizontális gélelektroforézissel, etidium bromidos festéssel és UV-megvilágítással történt. Mutációk és/vagy polimorfizmusok kimutatása céljából az elektroforézist megelőzően több esetben restrikciós endonukleázokkal emésztettük a PCR terméket (PCR-RFLP). A mutáció-kimutatás újabb módszereként valós idejű PCR és olvadáspont-elemzéssel megvalósuló genotipizálást használtunk. A közvetett marker-vizsgálathoz mikroszatellita-elemzéseket használtunk, először radioaktív primer-jelöléssel és akrilamid gélelektroforézissel, később fluoreszcens primer-jelöléssel és kapilláris elektroforézissel. A nagyméretű génszerkezeti változások kimutatására a klasszikus radioaktív jelölésű Southern blot technikát, illetve a speciális körülmények között végzett hosszú-PCR technikát alkalmaztuk. Mutáció-keresés vagy megerősítés céljából közvetlen szekvencia analízist, a Sanger-féle didezoxi láncterminációs technikát alkalmaztuk, kezdetben radioaktív didezoxi nukleotid-jelöléssel és különleges akrilamid elektroforézissel, majd fluoreszcens didezoxi nukleotid-jelöléssel és kapilláris elektroforézissel. A statisztikai módszerek közül a mutációk/variánsok előfordulási gyakoriságainak összehasonlításához allél-frekvencia (a mutációt tartalmazó kromoszómák aránya az összes vizsgált

kromoszómához képest) értékeket és 95%-os megbízhatósági tartományt (95% CI) számítottunk. Az értékeket a khi-négyzet próbával vagy Fischer-féle exact teszttel hasonlítottuk össze. A folyamatos változók értékeit átlag ± SD-ként tüntettük fel, összehasonlításukat pedig kétmintás t-próbával végeztük.

III. Eredmények és következtetések

III.1. Monogénes hematológiai/immunológiai kórképek

Az A típusú, örökletes hemophilia (HA) a VIII. véralvadási faktor deficienciája következtében kialakuló, nemhez kötött, recesszív öröklésmenetű, mintegy 1:10.000 fiúgyermeket érintő kórkép, amelyre ismétlődő, ízületi, bőr alatti, izmokon belüli, illetve belső szerveket érintő vérzések jellemzők. A molekuláris szintű hordozó-, és prenatális diagnosztikai feladatok elvégzésére komplex genetikai vizsgálati algoritmust dolgoztunk ki közvetlen mutáció-kimutatás és közvetett marker-vizsgálatok alkalmazásával. A protokoll szerint súlyos (1% alatti VIII. alvadási faktor szint) HA-betegeknél elsőként Southern blotting, hosszú PCR és egyszerű PCR módszerekkel elvégezzük a VIII. faktor gén (*FVIII*) 22. és 1. intronjait érintő inverziók kimutatását. A negatívnak talált súlyos HA-családoknál és valamennyi középsúlyos, illetve enyhe HA-családnál közvetett marker-vizsgálatokat alkalmazunk a genetikai eltérés öröklésmenetének megállapítására. Elsőként két intragenikus marker informativitását teszteljük PCR-RFLP, illetve fluoreszcens PCR és kapilláris elektroforézis technikával, és csak szükség esetén alkalmazzuk a harmadik, extragenikus markert (**1. cikk**). A dolgozat beadásának időpontjáig országos programunk keretében 158 családot vizsgáltunk, 95 esetben végeztünk hordozó-vizsgálatot, ebből 31 esetben állapítottunk meg hordozó, és 64 esetben nem hordozó státuszt. 16 fiú magzat esetében igényeltek prenatális vizsgálatot, ebből 10 eset zárult egészséges, 6 pedig beteg eredménnyel. Diagnosztikai algoritmusunk az esetek 95%-ában biztosított informatív markert. 138, súlyos, HA-ban szenvedő családnál vizsgáltuk két gyakori mutáció, a 22., illetve 1. intron inverzió előfordulását. 75 esetben mutattuk ki a 22. intron inverzióját, amelyből négy atípusos mintázatú, a 22. intront érintő nagyméretű szerkezeti variánst találtunk. A fennmaradó 63 család közül pedig egy esetben észleltünk pozitivitást az 1. intron inverzióra. A négy atípusos család részletesebb jellemzése során két esetben derült fény nagyméretű delécióra, két esetben pedig egy új keletkezési mechanizmust, a 22. intron homológ régió duplikációját feltételeztük. Megfigyeléseink alátámasztják azt az elméletet, hogy a *FVIII* gén 22. intron szerkezete elősegíti nagyméretű deléciók és duplikációk kialakulását (**2. cikk**).

A HA-hoz klinikai szempontból sok hasonlóságot mutató, a IX. véralvadási faktor deficienciájával járó B típusú hemophiliában (HB) szenvedő családok közül a dolgozat készítésének időpontjáig 26 család anyagát kaptuk meg. A program első szakaszában négy, PCR-RFLP technikával vizsgálható, közvetett markert alkalmazó módszer-együttest állítottunk be a IX. faktor gént (*FIX*) érintő mutációk öröklésmenetének követésére, amellyel 10 családot vizsgáltunk, és nyolc esetben találtunk informatív

markert, két esetben azonban egyik marker sem volt informatív (**1. cikk**). A *FIX* gén kisebb mérete miatt az elmúlt két évben lehetőségünk volt áttérni a közvetlen mutáció-elemzésre a teljes génszekvencia meghatározásával. A dolgozat készítésének időpontjáig 21, nem rokoni kapcsolatban álló HB-család esetében 19 betegségokozó mutációt mutattunk ki, amely mutációk közül egy még nem közölt. A közvetlen mutáció-elemzés révén lehetőség van a genetikai rendellenesség gyors, célzott és definitív kimutatására még olyan esetekben is, ha a családtagok nem elérhetők.

A hemophilia-projektekben sikeresen beállított módszerek lehetővé tették, hogy Magyarországon elsőként megkezdjük az örökletes angioneurotikus oedemában (HANO) szenvedő betegek molekuláris vizsgálatait. A komplement rendszer egyik fontos gátló fehérjéje, a C1 észteráz inhibitor (C1-INH) deficienciája miatt kialakuló, autoszomális domináns öröklésmenetű, mintegy 1:50.000 gyakoriságú kórképre rohamokban jelentkező, bőr, illetve nyálkahártya alatti, légúti valamint gastrointestinális oedema jellemző. A komplement rendszer laboratóriumi vizsgálatával elkülöníthető az I. típusú (csökkent C1-INH fehérje szint), illetve a II. típusú (normális vagy emelkedett fehérje szint, kóros fehérje funkció) rendellenesség. Az összes HANO-beteg mintegy 85%-át kitevő, jóval gyakoribb I. típusú HANO (HANO-I) esetében a hét, aminosavat kódoló és egy nem kódoló exonból álló *C1-INH* gén bármely régióját érintheti a mutáció, sőt 10%-s gyakorisággal nagyméretű szerkezeti eltérések is előfordulhatnak. A II. típusú HANO (HANO-II) esetében viszont a DNS-eltérés a reaktív centrum régióját kódoló rövid szakaszt érinti. A fentieknek megfelelően az általunk kidolgozott DNS-vizsgálati algoritmus szerint HANO-I esetében elsőként Southern blotting elemzést végzünk a *C1-INH* gén 1 kb-nál nagyobb méretű szerkezeti eltérései kimutatására. A negatív esetekben elvégezzük a teljes kódoló régió és az mRNS-hasítási (splicing) helyek közvetlen szekvencia analízisét. A HANO-II esetekben viszont közvetlenül a reaktív centrumot kódoló 8. exon szekvencia analízisét végezzük. Diagnosztikai algoritmusunkat 26 HANO által érintett család (23 HANO-I, és 3 HANO-II család, összesen 64 beteg) esetében alkalmaztuk. A 23 HANO-I család közül négy esetben mutattunk ki nagyméretű delétiót. Utóbbiakból egy családnál mintegy 9 kb méretű, a másik háromnál pedig 2-4 kb méretű delétiókat észleltünk. A három kisebb kiterjedésű eltérés esetében valós idejű PCR-rel és relatív mennyiségi elemzéssel bizonyítottuk a 4. exon érintettségét. A fennmaradó 19 HANO-I családnál 16, egy bázist vagy néhány bázisos DNS-szakaszokat érintő kóroki mutációt azonosítottunk a *C1-INH* gén szekvenciájában. A 16 kóroki mutáció közül 13 még korábban nem ismert eltérés volt, a következő mechanizmus szerinti megoszlásban: 2 non-sense (stop-kodont eredményező bázis-csere); 4 kisméretű deléció/duplikáció; 4 mis-sense (aminosavcserét eredményező bázis-csere); és 3 mRNS-hasítási (splice) variáns. Az említett négy mechanizmus közül a non-sense mutációk és a delétiók esetében egyértelműen valószínűsíthető a fehérjelánc jelentős megrövidülése. Az általunk felfedezett mis-sense mutációk kóroki szerepének bizonyítása során családon belüli betegség-szegregációt észleltünk, azaz csak az érintett családtagoknál volt kimutatható a mutáció. Szintén megállapítottuk, hogy konzervált

aminosavat érintő, töltésváltozással is járó cserék következtek be. A további bizonyítás érdekében, az esetleges polimorfizmus-jelleg kizárására a három újonnan felfedezett mis-sense mutáció szempontjából vizsgáltunk egy 50 egészséges személyből álló kontroll csoportot és mindhárom esetben negatív eredményt kaptunk. A három új mRNS-hasítási variáns közül két bázis-csere a leginkább konzervált, exon-határral szomszédos bázist érinti, míg a harmadik egybázisos inszerció (beékelődés) eltolja a konszenzus hasítási donor szekvenciát. A pozitív családon belüli szegregáció mellett az mRNS-hasítási mutációk hatását egy számítógépes program segítségével is vizsgáltuk, és eredményeink valószínűsítették a hasítási variáció létezését. Mind az újonnan felfedezett mis-sense mutációk, mind az mRNS-hasítási variánsok esetében elvégeztük a teljes kódoló régió szekvencia-elemzését, és további szekvencia eltérést nem találtunk. Összefoglalva, az általunk beállított molekuláris genetikai módszerekkel hazánkban elsőként végeztük el sikeresen a kóroki mutációk azonosítását egy jelentős számú HANO-betegcsoportnál. A nagy számú új mutáció felfedezése alátámasztja a *C1-INH* gén fokozott genetikai instabilitását, elősegítheti a hazai és nemzetközi további molekuláris diagnosztikai tevékenységet, és szerkezet-funkció kutatásokat (**3. cikk**).

A HANO szakterületén folyó európai együttműködés keretében létrehoztuk a *C1-INH* gén internetes lokusz-specifikus mutációs adatbázisát, amely a dolgozat írásakor 148 különböző *C1-INH* génmutációt tartalmazott. A rendszer bárki számára hozzáférhető részében többféle szempont szerint kereshetők, csoportosíthatók, illetve letölthetők a mutációk és egyéb információk, valamint a teljes *C1-INH* gén kódoló régióit, a mutációk elhelyezkedését és alapvető adatait tartalmazó térkép is rendelkezésre áll. Az adatbázis korlátozott hozzáférhetőségű részében a regisztrált felhasználóknak lehetőségük van új mutációk rögzítésére, a már létező rekordok adatainak módosítására, illetve megjegyzések fűzésére mások által rögzített mutációkhoz. A rendszer a változásokról értesítést küld elektronikus levél formájában. A dinamikus és interaktív rendszer segítséget adhat új mutációk lokalizációjában, esetleges kóroki szerepük meghatározásában, és megkönnyítheti a közös adatfeldolgozást, illetve nemzetközi populációs tanulmányok végzését (**4. cikk**).

Az utóbbi néhány évben valósult meg a fiatalkori vasfelhalmozódással járó, recesszív öröklésmenetű betegség (juvenilis hemokromatózis, JH) hátterében álló két gén, a *hepcidin* és a *hemojuvelin* felfedezése. Az igen ritka, ugyanakkor a klasszikus hemokromatózisnál súlyosabb, a második évtized közepe táján jelentkező, gyorsan progrediáló kórkép esetében a leggyakrabban a szív-érintettség dominál. Az általunk vizsgált fiatal férfi beteg is gyorsan súlyosbodó, majd a későbbiekben halálos kimenetelű szív-panaszok miatt fordult orvoshoz. A vasfelhalmozódás egyértelmű diagnózisát a szívizom szövettani vizsgálatával állapították meg, de más szervek (máj, hasnyálmirigy, endokrin szervek, bőr) érintettsége is egyértelmű volt. A molekuláris szintű diagnózis felállítása és esetleges családvizsgálat érdekében közvetlen szekvencia-elemzéssel végeztünk mutáció-kimutatást a kórkép hátterében álló, nemrégiben felfedezett két gén bázissorrendjének vizsgálatával. A *hepcidin* gén szekvenciájában nem találtunk eltérést, ezzel szemben a *hemojuvelin* gént magában

foglaló DNS-szakaszon egy korábban még nem ismert, csonkolt fehérje keletkezését eredményező mutációt (G66X) fedeztünk fel a betegnél homozigóta, míg két tünetmentes testvérénél és anyjánál heterozigóta formában. Az újonnan leírt mutáció az addig ismert legközelebbi a gén 5' végéhez, és felfedezése kizárja azt a korábbi elképzelést, hogy a gén 2-5. exonjait tartalmazó alternatív, kisebb méretű mRNS változatok funkcionális fehérjét kódolhatnak (**5. cikk**).

III.2. Genetikai kockázati tényezők populációs vizsgálatai

Az 1. típusú (klasszikus) örökletes hemokromatózis több szervet érintő, progresszív, általában a negyedik-ötödik évtizedben jelentkező, monogénes, recesszív öröklésmenetű vasfelhalmozódással járó betegség. Régóta keresett génjét (*HFE*) 1996-ban sikerült felfedezni, és ezt követően vált ismertté a gén kóroki pontmutációjának (C282Y) szokatlan, a kaukázusi populációra jellemző elterjedtsége. Ennek alapján sokan a betegség korábban ismertnél jóval nagyobb gyakoriságát valószínűsítették. Ebben az összefüggésben fontos volt a *HFE* gén C282Y pontmutáció regionális gyakorisági adatainak megismerése. Újszerű PCR-RFLP módszert is alkalmazva, egy jelentős számú egészséges hazai populáció körében mértük a *HFE* C282Y és H63D pontmutációinak előfordulási gyakoriságát. Adataink az európai átlagot meghaladó elterjedtségre utaltak, ami meglepő volt, tekintve a C282Y mutáció kelta eredetét. Eredményeink ugyanakkor jelezték, hogy Magyarországon is fontos szerepe lehet a *HFE* gén mutációinak a klasszikus vasfelhalmozódás kialakulásában, és a kóros fenotípus esetében jelentős diagnosztikai szerepe lehet a DNS-vizsgálatnak (**6. cikk**). A kontroll-adatok bővítésével párhuzamosan a vasfelhalmozódással rendelkező betegeknél megkezdtük a molekuláris diagnosztikai vizsgálatokat, amely munka pillanatfelvételét a **7. cikk** tartalmazza. A jelen dolgozat készítésekor végzett összesítés szerint 464 betegnél végeztünk diagnosztikai célú molekuláris vizsgálatot a *HFE* gén C282Y és H63D pontmutációinak kimutatására, és 28 C282Y homozigótát, illetve 21 C282Y/H63D kettős heterozigótát azonosítottunk. A mutáció-pozitív betegek egy alcsoportjánál volt lehetőségünk a klinikai paraméterek elemzésére, amely az irodalmi adatokhoz hasonló eredményeket mutatott.

A hemokromatózis populációs aspektusait tovább vizsgáltuk egy jelentős esetszámú, véradóknál végzett genetikai szűrővizsgálat keretében. Alapkérdésünk az volt, hogy kimutatható-e gyakorisági különbség a *HFE*-mutációkat illetően a különböző számú véradáson részt vett egészséges véradók alcsoportjai között, másként fogalmazva: jelenthet-e védelmet a *HFE*-mutáció(k) jelenléte az ismételt véradások során felmerülő vasveszteséggel szemben. A munka másik célkitűzése egy jelentős számú, egészséges magyar referencia-populáció mintáinak összegyűjtése volt, amely kontrollként szolgálhat különböző genetikai variánsok gyakorisági mérései során. A budapesti és szegedi régióból származó, közel ezer, különböző számú véradáson részt vett véradónál végzett mutáció-elemzés eredményeinek összesítése után nem találtunk jelentős különbséget az első, illetve sokszoros véradók között a *HFE* gén C282Y mutáció előfordulási gyakoriságát illetően, ami arra utalt, hogy ez a genetikai kockázati

tényező nem játszik jelentős szerepet a sokszoros véradókat veszélyeztető esetleges vashiány elleni védelemben. Az eredeti hipotézisünket alátámasztani látszó adatokat mindössze a nők alcsoportjában mértünk, amennyiben a többszörös véradó nők között tapasztalt HFE C282Y gyakoriság több mint kétszerese volt az első véradó nők csoportjában észlelt gyakoriságnak, a különbség azonban nem volt szignifikáns mértékű (**8. cikk**). A szűrővizsgálat keretében összegyűjtött, egészséges véradóktól származó DNS-mintákat a későbbiekben hazai együttműködés keretében több tanulmányhoz használtuk referencia-csoportként.

A vérképző őssejtek egyik klonális, rosszindulatú elváltozása a myelodysplasiás szindróma (MDS), amely kórképben az ineffektív vörösvérsejt-képzés és a gyakori transzfúziós kezelések miatt jelentős vasterhelés éri a szervezetet. Ezért egy klasszikus asszociációs vizsgálat keretében MDS-ben szenvedő betegek körében vizsgáltuk a vasfelhalmozódásra hajlamosító *HFE*-mutációk előfordulási gyakoriságát. Az 50 betegből álló csoportban a *HFE* gén C282Y és/vagy H63D mutációinak összesített gyakorisága szignifikáns mértékben magasabb volt, mint az egészséges kontroll, véradókból álló csoportban. Az eredmény arra utal, hogy a *HFE* gén C282Y és H63D mutációi feltehetően akár heterozigóta formában is hozzájárulhatnak az MDS kialakulásához vagy progressziójához. A *HFE*-mutációk szempontjából pozitív, illetve negatív beteg-alcsoportok kezelés előtti vasparamétereinek (szérum vas és transzferrin szaturáció) összehasonlításakor a mutáció pozitív csoportban magasabb értékeket mértünk, de valószínűleg a kis esetszám miatt a különbség nem volt szignifikáns mértékű (**9. cikk**).

Közvetlen népegészségügyi jelentőségű és nagy visszhangot kiváltó volt az a felfedezés, hogy a mélyvénás trombózis kockázatát jelentős mértékben növelő genetikai eltérés, az V. alvadási faktor Leiden mutáció (*FV* Leiden) heterozigóta formájának előfordulási gyakorisága mintegy 10%-os egyes kaukázusi csoportokban. Tekintve, hogy Magyarországon is gyakori a mélyvénás trombózis, fontos kérdés volt a releváns magyarországi adatok megismerése. Ebben az összefüggésben elsőként határoztuk meg az *FV* Leiden magyarországi gyakoriságát (mintegy 10%-os heterozigóta-gyakoriság), amely az általunk vizsgált első csoportban a magasabb tartományba helyezte hazánkat. A későbbiekben általunk a véradó kontroll csoportban megismételt genotipizálás, valamint több magyar régióban mért eredmények összesítése alapján a valódi hazai allél-frekvencia 4,1%-ra tehető. Ezek alapján indokolttá vált a *FV* Leiden-kimutatás rutinszerű végzése érintetteknél és vérrokonaiknál, és az eredmény közvetlen hatással van a betegek ellátására és a megelőzésre (**10. cikk**).

A mutáció-kimutatás néhány éve hozzáférhető, alternatív módszere, a LightCycler elnevezésű, valós idejű PCR-készülékkel végzett genotípus-meghatározás beállítása során részletes vizsgálatokat végeztünk a legkedvezőbb amplifikációs primer-arányok megismerése céljából. A korszerű eljárás lényege, hogy jelöletlen amplifikációs primerekkel végzett PCR-reakciót követően fluoreszcens festékekkel jelölt oligonukleotidokkal (szonda) végzünk hibridizációt és olvadáspont elemzést. A genetikai variáns jelenlétében, illetve hiányában eltérő hőmérsékleten történik meg a jelölt

oligonukleotidok leválása, és ennek alapján különböztethető meg a háromféle lehetséges genotípus. Több genetikai variáns vizsgálata során kimutattuk, hogy 1:6,7 arányban alkalmazott amplifikációs primerek esetén a szignál-intenzitás átlagosan 11,2-szeres emelkedése érhető el. Az aszimmetrikus PCR-reakcióban mindig annak a primernek kell a mennyiségét növelni, amely az alkalmazott hibridizációs oligonukleotidokkal komplementer DNS-szál szintézisét teszi lehetővé. Hipotézisünk bizonyítására az *FV* Leiden kimutatási rendszerben az eredetivel egyező szakaszt, de az ellentétes szálon felismerő hibridizációs oligonukleotidokat is készíttettünk, és ebben az esetben pontosan fordított arányú aszimmetria mellett kaptunk az eredeti aszimmetrikus rendszerhez hasonlítható eredményeket. A valós idejű PCR-rel és hibridizációval megvalósuló genotipizálási rendszerben tehát kimutattuk, hogy a megfelelő irányban eltolt arányú amplifikációs primerek alkalmazása jelentősen növeli a hatékonyságot, és ez bizonyos esetekben fontos körülmény lehet a saját tervezésű reagensek optimális alkalmazási körülményeinek beállítása során (**11. cikk**).

Összefoglalásként elmondható, hogy az értekezésben bemutatott projektek révén az eltelt 10 évben egy új szakterület, a klinikai molekuláris genetika két fontos területén sikerült megvalósítani az alapvető laboratóriumi, statisztikai, számítógépes és logisztikai módszerek beállítását és számos jelentős módszertani fejlesztést. A betegségokozó mutációk azonosítása iránti igény a jövőben bizonyosan fokozódik mind a tárgyalt, mind új kórképek esetében, így valószínűsíthető, hogy a bemutatott munkák következtetései és tapasztalatai a tárgyalt kórképek mellett újabb konkrét betegségek vizsgálatánál is hasznosulni fognak. A monogénes betegségek elemzésével párhuzamosan sikerült megteremteni a populációgenetikai vizsgálatok és adatelemzés módszertani alapjait. Jelentős eredmény a néhány fontos genetikai eltérésre vonatkozó első regionális adatszolgáltatás, amely nemzetközi illetve hazai referenciaként használható. A populációs adatok és a kialakított módszerek jó kiindulási pontként szolgálhatnak további, a jelenlegi időszakban igen népszerű asszociációs vizsgálatokhoz.

IV. A dolgozat alapjául szolgáló saját közlemények (említésük sorrendjében)

1. Klein, I., Andrikovics, H., Bors, A., Nemes, L., **Tordai, A.,** Váradi A. 2001. A haemophilia A and B molecular genetic diagnostic program in Hungary: a highly informative, cost-effective strategy. *Haemophilia* **7:**306-312. (IF : **0,756)**
2. Andrikovics, H., Klein, I., Bors, A., Nemes, L., Váradi A., **Tordai, A.** 2003. Analysis of large structural changes of the factor VIII gene in severe hemophilia A. *Haematologica* **88:**778-84. (IF : **3,453)**
3. Kalmár L., Bors, A., Farkas, H., Vas, S., Fandl, B., Varga, L., Füst, G., **Tordai, A**. 2003. Mutation screening of the C1 inhibitor gene among Hungarian patients with hereditary angioedema. *Human Mutation* **22:**498. (IF : **6,328)**
4. Kalmár L., Hegedűs, T. Farkas, H., Nagy, M., **Tordai, A**. 2005. Creation of a novel interactive, locus-specific mutation database of the C1 inhibitor gene. *Human Mutation* **25:**1-5. (IF: **6,328**)
5. Jánosi A, Andrikovics H, Vas K, Bors A, Hubay M, Sápi Z, **Tordai A.** 2005. Homozygosity for a novel nonsense mutation (G66X) of the HJV gene causes severe juvenile hemochromatosis with fatal cardiomyopathy. *Blood* **105:**432. (IF: **10,120**)
6. **Tordai, A.,** Klein I., Andrikovics H., Kalmár L., Sarkadi, B., Rajczy, K., Pénzes, M., Váradi A. 1998. High frequency of the haemochromatosis C282Y point mutation can argue against its Celtic origin. *J. Med. Genet.* **35:**878-879. (IF : **2,682)**

7. Andrikovics, H., Klein, I., Kalmár, L., Bors, A., Jermendy, Gy., Petri, I., Kalász, L., Váradi, A., és **Tordai, A.** 1999. Új, molekuláris genetikai módszer az öröklődő hemokromatózis differenciáldiagnosztikájában. *Orvosi Hetilap* **140(45):**2517-2522.

8. Andrikovics, H., Kalmár, L., Bors, A., Fandl, B., Petri, I., Kalász, L., **Tordai, A.** 2001. Genotype screening for hereditary hemochromatosis among voluntary blood donors in Hungary. *Blood Cells Mol. Dis.* **27:**334-341. (IF : **1,703)**

9. Várkonyi, J., Tarkovács, G., Karádi, I., Andrikovics, H., Varga, F., Varga, F., Demeter, J., **Tordai, A**. 2003. High incidence of hemochromatosis gene mutations in the myelodysplastic syndrome: The Budapest study on 50 patients. *Acta Hematol.* **109:**64-7. (IF : **1,874)**

10. Tordai, A., Klein I., Rajczy, K., Pénzes, M., Sarkadi, B., Váradi, A. 1997. Prevalence of factor V Leiden (Arg506Gln) in Hungary. *Br. J. Hematol.* **99:**466-467. (IF : **3,370)**

11. Szilvási A, Andrikovics H, Kalmár L, Bors A, **Tordai A.** Asymmetric PCR increases efficiency of melting peak analysis on the LightCycler. *Clin. Biochemistry közlés alatt.* (IF : **1,825)**

V. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönetet mondok közvetlen munkatársaimnak, *dr. Andrikovics Hajnalkának*, *Kalmár Lajosnak*, *Bors Andrásnak*, *Szilvási Anikónak*, *Horváth Csongorné Magdinak*, *Pfundt Antalné Júliának*, *Bakonyi Ildikónak* és *Szaver Gabriellának*, akik egy stabil csapatot alkotva az eltelt évtizedben igazi, - és nemcsak - munka-társaim voltak. Az ő közreműködésük nélkül a dolgozatban bemutatott eredmények nem születhettek volna meg. Köszönöm mentoromnak, *dr. Sarkadi Balázsnak* a folyamatos támogatást és bátorítást, az ötleteket, az önállóságra való biztatást, és a különböző jellegű konkrét segítséget, amit a laboratórium elindításakor mint közvetlen főnököm, majd később mint kutatási vezető számomra és a laboratórium számára nyújtott. Köszönöm korábbi tanítóimnak, *Prof. Machovich Raymundnak*, *Prof. Gárdos Györgynek* és *Prof. Erwin Gelfandnak*, hogy a megfelelő időben, a megfelelő irányban és a megfelelő mértékben igazították pályám koordinátáin, és emellett mindenben segítették kutatói tevékenységemet. Köszönöm az Intézet jelenlegi és korábbi főigazgatóinak *dr. Vályi-Nagy Istvánnak* és *Prof. Petrányi Győzőnek* hogy biztosították munkámhoz a támogató körülményeket. Megköszönöm *dr. Váradi András* és *dr. Klein Izabel* segítségét a DNS-munka kezdeti elsajátításában és a kezdetek óta is megőrzött intenzív és kellemes együttműködés fenntartásáért. Köszönettel tartozom kiváló klinikus partnereinknek, *dr. Nemes Lászlónak*, *dr. Farkas Henriettnek*, *dr. Várkonyi Juditnak*, *dr. Jánosi Andrásnak*, és *dr. Hajdú Krisztinának*, akik nélkülözhetetlen segítséget adtak és adnak a betegek felkutatásában, kivizsgálásában, valamint a minták és adatok összegyűjtésében. Köszönöm valamennyi intézeti és intézeten kívüli társszerzőmnek a tudományos együttműködést. E helyen is köszönetet mondok az Alapítvány a Magyar Felsőoktatásért és Kutatásért által adományozott Magyary Zoltán posztdoktori ösztöndíjért és az MTA által biztosított Bolyai János kutatási ösztöndíjért. Végül köszönetet mondok családomnak, *feleségemnek, Ágotának*, és *édesanyámnak, anyukának*, hogy mindvégig lankadatlanul biztosították a sziklaszilárd, harmonikus és megértő családi hátteret.

VI. Rövidítések jegyzéke

CI: megbízhatósági (konfidencia) tartomány
CVS: chorion boholy minta
DE: Debreceni Egyetem
DNS: dezoxiribonukleinsav
EDTA: etilén diamin tetraecetsav
FV Leiden: V. alvadási faktor Leiden mutációja
HA: A típusú haemophilia
HANO: örökletes angioneurotikus oedema
HB: B típusú haemophilia
HFE: a felnőttkori (klasszikus) hemokromatózis génje
JH: fiatalkori hemokromatózis
kb: kilobázis
MTA: Magyar Tudományos Akadémia
OGYK: Országos Gyógyintézeti Központ
OVSZ: Országos Vérellátó Szolgálat
PCR: polimeráz láncreakció
RFLP: restrikciós fragment hosszúság polimorfizmus
SD: standard deviáció
SE: Semmelweis Egyetem