

DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**A 4-ES KROMOSZÓMÁN TALÁLT REKURRENS ÉS
NEM-REKURRENS KÓPIASZÁM VARIÁCIÓK
ÖSSZEHASONLÍTÁSA**

DUGA BALÁZS



TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. MELEGH BÉLA

PROGRAMVEZETŐ: PROF. DR. MELEGH BÉLA

DOKTORI ISKOLA VEZETŐJE: PROF. DR. SÜMEGI BALÁZS

PÉCS, 2015

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR, ORVOSI GENETIKAI INTÉZET

BEVEZETÉS

Genomiális betegségek

A 1990-es évek elején, mikor a Humán Genom Projekt (HGP) kezdetét vette, a kutatók még úgy vélték, hogy a humán genom szekvenciájának variánsai (single nucleotide polymorphism - SNP) állhatnak a legtöbb megbetegedés hátterében. A HGP lezárásával és a hibridizációs technikák rohamos fejlődésével egyetemben ez a nézet is változni látszott. A szekvenálási technikák fejlődésével a humán genom teljes szekvenálása már alig egy hét alatt kivitelezhető, azonban az ezekből az eredményekből nyert adatok sem adnak választ a betegségek kialakulásának nagy részére. Napjainkban a szemlélet változóban van: a genetikával foglalkozó kutatók figyelme egyre inkább a genomika irányába fókuszál.

CNV-k (Kópiaszám eltérések)

Az elmúlt évtizedben végzett genomanalízisek során számos olyan régió volt felfedezhető, melyek többszörös kópiaszámban fordulnak elő a genomban. Ezek a régiók a kilobázisos mérettől a megabázisos méretekig terjedhetnek. Ezeknek a szakaszoknak a kópiaszámában bekövetkező változásait egységesen kópiaszám variációknak (copy number variations – CNVs) nevezzük. A CNV-k nagyszámú előfordulása a genomban, a populációs genom diverzitás egy fontos mozgatórugója, azonban ezek az eltérések állhatnak sok esetben a genomiális betegségek hátterében. A CNV-k első csoportba tartoznak azok, melyek frekvenciája a populációkban meghaladja az 1%-ot. A CNV-k ezen csoportját egységesen CNP-knek vagy kópiaszám polimorfizmusoknak (copy number polymorphisms – CNPs) nevezik. A másik csoport a ritka CNV-k csoportja, ahol a CNV-k mérete több mint 100 kb, azonban előfordulásukat tekintve ritkának mondhatóak a populációban (kevesebb, mint 1%).

Ritka CNV-k

A ritka CNV-k rekurrens és nem rekurrens CNV-kre oszthatók. A rekurrens CNV-k közel azonos méretűek, és töréspontjaik is megegyeznek. Utóbbiak bizonyos LCR régiókhoz kötöttek. Ezzel ellentétben a nem rekurrens CNV-k töréspontjai ritkán esnek ugyanabba a pozícióba, és méretük is nagymértékben eltér. A nem rekurrens CNV-k esetében az eltérő méretű CNV-k átfedőek, ezáltal egy közös genomiális régiót tartalmaznak. Ebben a közös régióban található dózis szenzitív gének kifejeződésének mértéke állhat a megfigyelt fenotípus hátterében.

Array Comparative Genome Hybridization (aCGH)

A 2000-es évek elején indultak útnak a microarray technológiára épülő módszerek. A HGP -nek köszönhetően, minden egyes szekvenciának tudták a pontos elhelyezkedését a genomban, minek köszönhetően nem volt már szükség a kromoszóma preparátumra ahhoz, hogy a hibridizálni kívánt jelölt DNS fragmentumok bekötődésének pontos helyét meghatározzák. A hagyományos CGH felbontási képessége nagyjából 5-10 Mb volt, azonban a humán genom adatokat tartalmazó adatbázisoknak köszönhetően és a mikrotechnika robbanásszerű fejlődésének segítségével létrehozható volt egy sokkal nagyobb felbontóképességű genom hibridizációs technika, az array CGH.

A teljes genomot reprezentáló próbákat szintetizálás során hozzák létre, melyeket egy tárgylemez méretű üvegfelületre kötnek ki. A lemez felületére kikötött próbák pozíciója és szekvenciája ismert. A próbákból 2, 4 vagy akár 8 kópia is kiköthető, aminek köszönhetően több minta elemezhető, azonban az egy lemezen vizsgált minták számának növelésével egyidejűleg az egy mintára eső próbák száma csökken. A módszer során, akárcsak a hagyományos CGH esetében, a vizsgálni kívánt mintánk mellé szükséges egy nemből megegyező referencia DNS is. Izolálás során perifériás vérből nyert genomi DNS-t restrikciós enzimek segítségével fragmentálják. A minta és referencia DNS fragmenteket különböző fluoreszcens festékekkel jelölték. A minta DNS jelölésére használt fluoreszcens festék Cyanine (Cy5), míg a referencia DNS-ek jelölésére a Cyanine (Cy3) szolgál. Bizonyos gyártók esetében a fordított jelölés is elterjedt. A minta és referencia DNS-eket egyidejűleg viszik fel a lemez felületére és hibridizáltatják a lemezen kikötött próbákhoz. A lemezt egy lézer scanner segítségével olvassák be. A scanner által generált lézer megvilágítja a lemez felületére kikötött próbákhoz hibridizált fluoreszcens festékekkel jelölt fragmenteket. A scanner detektora a lézer hatására felvillanó festékek intenzitását detektálja. A scanner ezt a műveletet a lemez teljes felületén elvégzi, és minden próbapozícióban detektálja a fluoreszcens jeleket. Abban az esetben, ha a két festék intenzitása megegyezik, az adott próbához hibridizált genomi fragmentek dózisa megegyezik. Amint ez az irány eltolódik valamelyik festék jelintenzitásának irányába, úgy delécióról vagy duplikációról beszélhetünk. Fontos megemlíteni, hogy a technika nem alkalmas minden genomi eltérés detektálására. Technikájából adódóan az array CGH módszer a genomban előforduló kópiaszám eltéréseket, dóziseltéréseket képes detektálni.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataim elvégzéséhez 140 mintát gyűjtöttünk össze a PTE Orvosi Genetikai Intézet Genetikai tanácsadásán többszörös fejlődési rendellenesség miatt vizsgált betegektől, amely mintákat array CGH módszerrel vizsgáltunk. Vizsgálataimhoz azokat a betegeket választottam ki, akiknél pszichomotoros elmaradás és izomhipotónia mellett agyi malformáció és/vagy szívfejlődési rendellenesség, valamint növekedési elmaradás is észlelhető. A beszéd késése, hiánya, az epilepszia, valamint a sztereotíp kézmozgás szintén fontos szempontot képviselt. A kiválasztott betegeknél a tünetek alapján kezdeményezett rutin diagnosztikai eljárások során a fenotípus háttérében álló kóroki eltérés nem volt kimutatható.

A vizsgálataim céljai a következők voltak:

- az olyan kóros fenotípust mutató komplex fejlődési rendellenességben szenvedő betegek várható genomi eltéréseinek detektálása, akiknél a hagyományos kromoszómvizsgálat normál kariotípust mutatott;
- a kimutatott eltérések által érintett gének, genomi régiók funkciójának elemzése a szakirodalom és a publikus adatbázisok adatainak segítségével;
- az érintett génekre vonatkozó irodalmi adatok elemzése a megváltozott géndózis hatásának értékelése szempontjából;
- a talált eltérések genotípus fenotípus korrelációjának feltárása, összehasonlítva a szakirodalomban közölt, hasonló fenotípussal és eltéréssel rendelkező esetekkel;
- a fenti összehasonlítás alapján további adatok gyűjtése annak megállapítására, hogy a hasonló esetekben mely szűkebb régió, illetve melyik érintett gén lehet felelős a fenotípusos eltérésekért;
- a talált eltérések (CNV-k) típusának meghatározása, és azok összehasonlítása a szakirodalomban közölt esetekkel, illetve az eltérések típusaira jellemző vonások összehasonlítása;
- a ritka CNV-k típusainak összehasonlítása szakirodalmi adatokkal a klinikai tüneteken keresztül;
- A feltárt genomi eltérések és a megfigyelt fenotípus alapján az array CGH vizsgálat indikációjának pontosabb meghatározása a többszörös fejlődési rendellenesség által érintett betegek csoportján belül.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

VIZSGÁLT BETEGEK

Első eset

Az első beteg egy kislány, aki a 39. héten császármetszéssel született egészséges szülőktől. A családi anamnézis negatív, a szülők közt rokoni kapcsolt nem áll fenn. Születési súlya 2160g, Apgar értéke 8/9. Szívzörej miatt kardiológiai vizsgálatokat végeztek, ahol subaortikus ventrikuláris szeptum defektust észleltek, emellett perzisztáló foramen ovale és perzisztáló ductus arteriosus volt megfigyelhető. Hasi ultrahang vizsgálat során normális szerkezetű, de kisebb méretű veséket találtak. Koponya ultrahang a corpus callosum diszgenezisének mutatta. Két hónapos korában kórházba került étkezési zavarok és hipoglikémia (vércukor szintje 1,2 mmol/L) miatt. A betegen megfigyelhető volt a súlyos disztrófia, az izom hipotónia, dizmorfiás arcvonások, mint az arc aszimmetriája (hemihipertrófia az arc baloldalán), rövid jobboldali szemrés, hosszú szempillák, aszimmetrikus fülek ahol a jobb fül diszplasztikus, kisebb és alacsonyabban volt található, mint a bal fül, rövid philtrum és magas szájpaddás. A kórházi tartózkodás alatt tudatzavart és atóniás periódusokat figyeltek meg, ami miatt konvulzióra gyanakodtak, de ezt az elvégzett EEG nem támasztotta alá. Három hónapos korában a veleszületett szív defektusok (nyitott kamrai szeptum, foramen ovale és ductus arteriosus) miatt műtétre szorult, a posztoperatív időszak eseménytelenül telt, a pulmonális nyomás normalizálódott. Egy előre haladott atrioventriculáris (AV) elzáródás miatt ideiglenesen pacemakerre volt szüksége. Miután kiengedték a kórházból, rendszeresen vizsgálták a kardiológiai klinika járóbeteg rendelésén. Négy hónappal a műtét után ismét kórházba került pulmonális hipertenzió miatt. Mellkasi röntgen vizsgálat során észlelték, hogy a bal tüdőben az artériák elágazásának száma alacsonyabb. Felmerült, hogy ez veleszületett rendellenesség, azonban a perzisztens nem recanalizálható trombózis lehetősége sem volt kizárható. Ezt követően kardiomegáliát (jobb szívfél megnagyobbodás) és megnövekedett tágult pulmonális törzset észleltek, ami a megnövekedett pulmonális artériás nyomás következtében alakult ki. Axiális és rekonstruált CT felvételeken baloldali (balra helyezett) vena cava superior és egy atípusosan (baloldalon) elhelyezkedő, nem azonosítható véna volt megfigyelhető. Az emelkedett nagyvérköri nyomás miatt a vena cava inferior és a máj vénák kitágultak. Majd a jobb mellkásfélben hydrothorax alakult ki, és tüdő parenchyma károsodott. A súlyos visszatérő gyulladások immunhiányos állapotra utaltak, amit a fehér vérszámok flow citometriai vizsgálata alátámasztott, mivel szignifikánsan csökkent limfocitákat detektáltak.

Bár a neonatális időszakban csökkent kalcium szintet és magas parathormon szintet találtak, a klinikai kép alapján felmerült a DiGeorge szindróma lehetősége, azonban az elvégzett vizsgálattal a mikrodéliót kizárták. A gyermek betegsége folyamatos progressziót mutatott, generalizált ödéma jelentkezett, jobb szívfél elégtelenség lépett fel, és visszatérő fertőzések miatt a betegnek folyamatos gépi lélegeztetésre volt szüksége. A kezelés ellenére a gyermek 9 hónapos korában meghalt. Anyagcsere betegségek gyanúja miatt vizelet szerves sav, szérum aminosav és ammónia vizsgálatot, valamint szérum transferrin izoelektromos fókuszálást végeztek a congenitális glikozilációs zavarok kizárása céljából, ezek a vizsgálatok azonban mind negatív eredményt adtak. Kariotipizálás során kromoszómális eltérést nem találtak, és a DiGeorge régió (22q11.2) FISH analízise sem mutatott deléciót.

Második eset

A második beteg egy 5 éves kislány, aki császármetszéssel született a 39. héten egészséges, magyar származású szülők második gyerekeként. A szülők közt rokon kapcsolat nem áll fenn. A családi anamnézisben komolyabb betegség nem fordult elő. Születési súlya 2750 g (25-50 pc), hossza 49 cm (5-10 pc) a fej körfogata 36 cm (+1SD). Az 5 és 10 perces Apgar értéke 9/10. A perinatális időszakban enyhe sárgaságot, csípőízületi lazaságot, axiális hipotóniát és etetési nehezítettséget figyeltek meg. Egy hetes korában súlyos axiális hipotóniát és spasztikus alsó végtagok miatt neurohabilitációt indítottak, azonban csak minimális javulás volt észlelhető. Három hónap múlva a szomatikus és pszichomotorikus fejlődése lelassult, ami azóta is nagyon lassú. Hat hónapos korában obstruktív bronhitisz miatt hospitalizálták, az első életévben számos felső légúti infekció zajlott, krónikus hasmenés lépett fel, ezért CFTR gén vizsgálata megtörtént, azonban eltérést nem észleltek. 14 hónapos korában agyi MR vizsgálat történt, ventrikulomegáliát, csökkent periventrikuláris fehérállományt és a corpus callosum hipopláziát detektáltak. A beteg 8 hónapos korában került Intézetünk genetikai tanácsadójába a súlyos hipotónia és minor anomáliái miatt. Ekkor a beteg súlya 9,5 kg (5-10 pc), magasság 68 cm (< 3 pc), és a fejkörfogat 48,5 cm (+ 1 SD) volt. Dizmorfiás státuszában a széles homlok, frontális kiboltosulás, lefelé ívelő szemrész, távol álló szemek, alacsonyan ülő fülek, antevertált orr, rövid philtrum, kicsi száj, magasan ívelő szájpadlás és rövid kicsi lábak és kezek, elvékonyodó ujjak, és ízületi lazaság volt megfigyelhető. Neurológiai státuszában változtalanul súlyos izom hipotónia és a beszédfejlődés jelentős elmaradása volt detektálható, motoros fejlődése mindvégig jelentős késést mutatott, 2,5 éves korában még nem ült, nem mászott és nem állt, járni 5 éves korában tanult meg. Ekkor már megértette a beszédet és gesztusokat, és kézjelekkel kommunikált. Beszédfejlődése még nem indult meg.

Viselkedésében sztereotíp mozgások (tapsolás, csapkodás), hiperaktivitás, hetero-és autoagresszió volt. Széles körű metabolikus (karnitin vizsgálat, aminosav, vizelet szerves sav, izoelektromos fókuszálás CDG-re) és genetikai vizsgálatok (kariotipizálás, CFTR, szekvenálás, mitochondriális mutáció vizsgálat) negatívak voltak, mint ahogy az EEG vizsgálat is.

VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

DNS izolálás

A kiválasztott betegek és családtagjaik részletes fizikális vizsgálata, valamint a mintavétel genetikai tanácsadás keretében, tájékoztatás és a vizsgálatba való beleegyezésük után történt. A laboratóriumi vizsgálatok céljára 8-12 ml EDTA-val alvadásgátolt vénás vért vettek, amelyek feldolgozás után biobanki tárolásra kerültek. A DNS izolálást Omega E.Z.N.A. Blood Maxiprep kittel a gyártó által készített leirat alapján végeztük, mely alkalmas nagy mennyiségű (akár 20ml) vérből való DNS izolálására. A DNS kötő filteres oszlopok kapacitása 1,5 mg DNS. Az izolálás során a DNS tisztaságát és koncentrációját NanoDrop műszerrel ellenőriztük. Amennyiben a DNS tisztasága nem érte el az általunk kívánt értéket, a DNS-t tovább tisztítottuk. Erre Macherey-Nagel NucleoSpin gDNA Clean-up Purification Kit-et alkalmaztuk.

G-sávós kromoszómafestés

A tenyésztés menete és a feldolgozás: A kromoszómavizsgálathoz sterilen vett, Na-Heparinnal alvadásgátolt perifériás vért használtunk. Két tenyésztőcsőben 4-4 ml táptalajt olvasztottunk fel, és 5-5 csepp vért cseppentettünk bele steril körülmények között. A csöveket 37 °C-os termosztátba helyeztük, 72 óráig inkubáltuk. Két órával a feldolgozás kezdete előtt 2 csepp Colcemidet adtunk a sejt kultúrához, ezzel metafázisban blokkoltuk a sejtosztódást, majd újabb két órára a 37 °C-os termosztátba helyeztük. Előkészítettük a hypotonizáláshoz (37 °C) és a fixáláshoz (4 °C) az oldatokat. A blokkolási idő lejártával, a mintát lecentrifugáltuk (10 perc 2000 rpm, szobahőn) és a felülúszót eltávolítottuk. Az üledékhez hypotonizáló oldatot adtunk, majd 30 percig 37 °C-on inkubáltuk. Fél óra elteltével a mintát lecentrifugáltuk, a felülúszó nagy részét vízsugár szivattyúval eltávolítottuk, az üledékre enyhe rázogató mellett fixálót pipettáztunk, majd ismételtén 2000 rpm-en lecentrifugáltuk. A folyamatot addig ismételtük (kb. 3x), amíg tiszta szuszpenziót nem kaptunk. Ezután a mintát - 20 °C-ra tettük 20 percre. Újabb centrifugálás után a felülúszó egy részét ismét leszívtuk. Az

üledéket felszuszpendáltuk, majd a szuszpenzióból 1 cseppet 4 tisztított tárgylemezre helyeztünk.

Értékelés: A tárgylemezre kicseppentett preparátumot Giemzával megfestettük (festőküvetába 80 ml Giemsa festéket töltöttünk, a kicseppentett lemezeket beleállítottuk 15 percre, majd desztillált vízzel leöblítettük), száradás után mikroszkóp alatt értékeltük: 15 metafázisban lévő kromoszómát megszámloltunk, majd csoportokba soroltuk őket. A Giemsa festés és értékelés után *G-sávozást* végeztünk: a preparátumból újabb tárgylemezre cseppentettünk, majd 24 órán keresztül állni hagytuk. Ezután 2,5 órára 65°-os 2 x SSC oldatot tartalmazó festőküvetába állítottuk. A sávozott készítményt Leishmann's festékkel kezeltük. A mikroszkópos elemzés során minden mintából 5 kariotípust készítettünk.

Metafázis FISH

A vizsgálatra humán perifériás vért használtunk. A 2x4 ml phytohemagglutinin tartalmazó táptalajhoz (Chromosome Medium 1A) egyenként 5 csepp vért adtunk, majd összerázás után a 37 °C-os termosztátban 72 órán keresztül inkubáltuk. A kultúrához a vizsgálatot megelőzően 2 órával colcemidet (0,1 µg/ml) adtunk. A sejtek hipotonizálását 37°C-on 30 percig 0,075 M KCl-os oldattal végeztük, majd fixálóval többszöri atmoszással fixáltuk (3:1 arányú metanol és jégecet elegy). A preparátumot -20°C-ra helyeztük min. 30 percig, majd tárgylemezre cseppentettük ki a sejteket. A preparátumokat a vizsgálat elvégzéséig -20°C-on tároltuk. A vizsgálati folyamat első lépéseként a -20°C-on tárolt preparátumokat szobahőmérsékleten felmelegítettük.

Előkezelés: A mintákat fehérjementesítés céljából pepszines emésztésnek vetettük alá, majd azt követően fixáltuk. A munkafázisokat festőküvetában végeztük. Az előkezelt lemezek hibridizációra alkalmas területeit fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgáltuk, majd a kiválasztott területet a tárgylemez karcolásával jelöltük.

Denaturálás és hibridizáció: az általunk használt codenaturációs módszer szerint a fluorochrome vagy haptén jelölésű próbához hibridizációs puffert adtunk, majd szükség szerint desztillált vízzel 10 µl végtérfogatra egészítettük ki az elegyet. Az oldatot az előre kiválasztott, hibridizációra alkalmasnak ítélt területre cseppentettük. A fedőlemezzel lefedtük a területet, majd hot plate-en 80 °C-on 3 percig denaturáltuk a próbát és a kromoszómális DNS-t. Utána a fedőlemezt leragasztottuk, majd lefordítva egy fekvő küvetában 37 °C-on párakamrában egy éjszakán át hibridizáltuk.

Poszthibridizációs mosás: Az oldatokat frissen készítettük, és a festőküvetákkal együtt fűthető vízfürdőben 37 °C-ra előmelegítettük. A munkaoldatok pH értékét 7,0-ra

állítottuk be. A fluorochrome jelölésű próbáknál a lemezeket desztillált vízzel öblítettük, majd szobahőmérsékleten szárítottuk. A hibridizált területet DAPI magfestéssel lefedtük. A denaturálási fázistól a preparátumokat fénytől védve helyeztük. A haptén jelölésű próbák alkalmazásakor a mintákat az első 4T mosási lépést követően 100 µl előhívó oldattal (a próba jelölésének megfelelő antitestblokkoló reagenssel hígítottuk) buborékmentesen lefedtük, majd 30 percre 37 °C-os pára kamrába helyeztük. Az inkubáció után a 4T mosási lépésektől folytattuk a protokollt, szem előtt tartva a preparátum fénytől való védelmét. A lemezek desztillált vizes öblítése után a lemezeket szobahőmérsékleten megszárazítottuk, majd a hibridizált területet DAPI magfestéssel lefedtük. A lemezeket a fluoreszcens festékeknek megfelelő filtereket alkalmazva, fluoreszcens mikroszkóp segítségével értékeltük.

Array CGH

A vizsgálathoz Agilent Human Genome G3 SurePrint 8x60K-s array-t használtunk.

Minták és referenciák előkészítése a vizsgálatra: A vizsgálathoz perifériás vérből izolált DNS-t használtunk. A DNS izolálás eredményeként kapott DNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, NanoDrop Products, 3411 Silverside Road, Bancroft Building, Wilmington, DE 19810 USA) segítségével ellenőriztük. Az izolálás során használt elúciós puffert használtuk negatív kontrollként a méréshez. Mintánként 1,5 µl DNS-t pipettáztunk a NanoDrop 2000 detektor felületére, majd a fedél zárásával elindítottuk a mérést. A program a negatív kontroll és a minták közti abszorbancia különbséget detektálja, melynek köszönhetően megkaptuk a DNS koncentrációt illetve a minták tisztaságát.

A minták DNS koncentrációjának el kell érnie a 100 ng/µl-t, hogy a protokoll első lépéseként megadott volumenben (10,1 µl) a minták DNS koncentrációja elérje az 1 µg koncentrációs értéket. A DNS tisztaságának értékeit a 260/280 és 260/230 arányszámok jelzik. A 260/280 arányszám a DNS és RNS abszorbanciájának egymáshoz viszonyított aránya. Normál körülmények között a kétszálú DNS 260 nm hosszúságú UV fényt nyel el. Ezzel ellentétben az egyszálú RNS, 280 nm hosszúságú UV fényt abszorbeál. A két érték egymáshoz viszonyított aránya a minta DNS-ben található RNS „szennyezettséget” adja meg. A minta RNS-el való „szennyezettsége” 1,8 feletti érték esetén már elfogadható. A másik arányszám a 260/230 pedig a minta DNS tartalmának szerves oldószerrel való „szennyezését” jelzi. Ez többségében magasabb értékét mutat, mint a 260/280 arányszám. Itt 1,9 – 2,0 felett elfogadható a szerves oldószerrel való „szennyezettség”. Miután mintáinkat a protokollnak megfelelően az array CGH vizsgálatra előkészítettük, a minták térfogatát (10,1 µl) és

koncentrációját (1µg/10,1µl) egységesítettük. A nem megfelelő koncentrációjú és tisztaságú DNS mintákat Macherey-Nagel gDNA Clean-up Purification Kit segítségével tisztítottuk meg.

Minták és referenciák fragmentálása restrikciós enzimek segítségével: A vizsgálathoz mind a referencia DNS-ből mind a vizsgálni kívánt DNS mintából 1 µg mennyiséget fragmentáltunk. A kiindulási minta és referencia DNS-ek térfogatát 10,1 µl-ben maximalizáltuk. A minták és az emésztő master mix együttes végtérfogata 13µl. A reakcióelegyet PCR készülékben a következő programon inkubáltuk: 37 fok – 2 óra, 65 fok – 10 perc, 4 fok (vagy jégre). A restrikciós enzimeknek köszönhetően a genomi DNS fragmentálódott. A fragmentek méretének meghatározásához Agilent BioAnalyzer 2100 műszert alkalmaztunk. A mintákból és referenciákból az emésztést követően 1 µl-t megfuttattunk. Az elhasznált volument desztillált vízzel pótoltuk.

Minta és referencia fragmentek sokszorozása és jelölése: Minden mintához illetve referenciához 2,5 µl random primert adtunk, majd vortexeltük. A mintákat PCR készülékben a következő programon inkubáltuk: 95 fok – 5 perc, 4 fok – 3 perc. A mintákat 1 perig 6000g-n centrifugáltuk, majd hozzáadtuk a jelölő master mixet (9,5 µl). Jelölésnél fontos, hogy a mintáinkat és referenciáinkat különböző fluoreszcens festékkel jelöljük (minták: Cy5/Cyanin5, referenciák: Cy3/Cyanin3). Az elegyet pipettával összekevertük, majd minden csőbe 9,5 µl jelölő mixet pipettáztunk, ügyelve hogy a mintákat tartalmazó csövekbe Cy5-öt tartalmazó mix kerüljön, míg a referenciákba Cy3-at tartalmazó mixet pipettáztunk. A csöveket PCR készülékben a következő programon inkubáltuk: 37 fok – 2 óra, 65 fok – 10 perc, 4 fok

Minták és referenciák tisztítása: A mintákat 1 percig 6000 g-n lecentrifugáltuk. A tisztításhoz Amicon AU-30-as filteres csöveket alkalmaztunk. A filteres csövekbe 430 µl TE puffert pipettáztunk, majd ehhez adtuk a mintáinkat ügyelve a komponensek keveredésére. A csöveket 10 percig 14000 g-n centrifugáltuk. A centrifugálás után az átfolyót kiöntöttük, majd a filterbe 480 µl TE puffert pipettáztunk. A centrifugálási lépést megismételtük, és az átfolyót ismételen kiöntöttük a gyűjtőcsőből. Ilyenkor a jelölt DNS-ünk a filterhez kötődött, és a mosási folyamat alatt megszabadultunk a nem jelölődött DNS-ek nagy részétől. Utolsó lépésként a filtert megfordítva helyezük egy új gyűjtőcsőbe és 1 percig 1000 g-n centrifugáltuk. A filterektől megszabadulva a jelölt DNS volumenünk 20-32 µl között volt mérhető. A megfelelő térfogat eléréséhez (9,5 µl), a mintáinkat Thermo blokk segítségével bekonzentráltuk. Ha a minták végtérfogata a 9,5 µl-t nem érte el, akkor TE pufferrel egészítettük ki. A festék beépülését NanoDrop készülék segítségével mértük meg. A méréshez 1,5 µl mintát használtunk. A mérés során a koncentráció-, illetve a festékek abszorbancia

értékekből kiszámoltuk a festék beépülését. A beépülés optimális, ha értéke minták esetében 20-35, referenciák esetében 25-40. A megfelelő minta-kontroll párokat egybemértük (16 µl).

Minta-referencia párok hibridizáltatása a lemez felületére: A jelölt DNS-ekhez hozzáadtuk az előre elkészített hibridizációs mixet (29 µl/minta), majd 95 fokon 3 percig, majd 37 fokon 30 percig PCR készülékben inkubáltuk. A mintákból 40 µl-t a gasket slide megfelelő pozíciójába pipettáztunk („drag and dispense”). A minták felpipettázása után az array lemezt aktív felszínével a gasket slide-ra helyeztük. A hibridizációs kamrát lezártuk, majd 65 fokon 20 rpm-en 24 órán keresztül inkubáltuk.

Lemez/ek mosása: A hibridizáció után a kamrát szétszedtük. A gasket slide – array slide -okat egyben kiemeltük a kamrából, majd az erre a célra használt 1-es mosó pufferrel töltött mosókádban a két lemezt elválasztottuk egymástól, ügyelve hogy a lemezek a folyadék felszín alatt maradjanak. A lemezt mosóállványba tettük, majd folyamatos mágneses keverés mellett az 1-es mosó pufferbe helyeztük 5 percre. A 2-es mosó puffert „overnight” 37 fokra előmelegítettük és mágneses keverővel kevertettük. Az 1-es mosó pufferben töltött 5 perc után a lemezt áthelyeztük a 2-es mosó pufferbe 1 percre, majd a lemezt sötétkamrában szárítottuk.

Lemezek scannelése: A megszáradt lemezt egy tartóba helyeztük, mely kompatibilis az array szkener foglalatával. A szkener elindítása után az array lemezt behelyeztük a szkenerbe. Az Agilent ScanControl elindítása után a lemezeket beszkeneltük. A szkennelés termékeként létrejövő kép (.TIFF) fájlt az Agilent Feature Extraction program segítségével hoztuk feldolgozható formába. A program a képfájltra ráhelyezi az úgynevezett grid fájlt, mely meghatározza a lemez különböző pontjain előforduló próbákat. Az output fájlokat az Agilent Cytogenomics program segítségével jelenítettük meg.

Adatok értékelése: Az adatok kiértékelése az Agilent Cytogenomics program segítségével történt. A program a Feature Extraction program által generált fájlokat analizálja és teszi vizuálisan is értékelhetővé. A program segítségével megállapítható az érintett gének neve és a genomiális eltérések pontos helye és töréspontjai is. Mindemellett a program számos adatbázissal is kapcsolatot létesít, így a kiértékelőnek lehetősége nyílik az adott eltérés patogenitásának megállapítására.

EREDMÉNYEK

Az általunk aCGH-el vizsgált 140 komplex fejlődési rendellenességben szenvedő beteg közül a disszertációmban bemutatott két esetenél találtunk olyan eltérést, amelyek azonos – mégpedig a 4-es – kromoszómát érintenek. Az egyik egy recurrens, a másik egy non-recurrens kópiaszám-eltérés, amelyek méretük, illetve géntartalmuk révén a kóros fenotípus kialakításáért felelősek.

Első eset

A látott klinikai kép alapján a beteg kislánynál genomi rendellenesség volt feltételezhető, ezért elsőként kromoszóma vizsgálatra került sor, amely normál kariotípust mutatott. Mivel a hagyományos sávozás nem észlelt eltérést, következő lépésként végeztük el az array CGH vizsgálatot. Array CGH vizsgálat során egy 14,56 Mb kiterjedésű deléciót detektáltunk a 4-es kromoszóma hosszú karjának 4q28.3-31.23-as szakaszán. A deletált szakasz töréspontjainak ismeretében (GRCh37, ch4:136.127.048 – 150.690.325) azonosítottuk a kiesett szakaszban elhelyezkedő géneket. A deletált szakasz 47 gént tartalmaz: *PCDH18*, *LOC641365*, *SLC7A11*, *CCRN4L*, *ELF2*, *C4orf49*, *NDUFC1*, *NAA15*, *RAB33B*, *SETD7*, *MGST2*, *MAML3*, *SCOC*, *LOC100129858*, *CLGN*, *ELMOD2*, *TBC1D9*, *RNF150*, *ZNF330*, *IL15*, *INPP4B*, *USP38*, *GABI*, *SMARCA5*, *LOC441046*, *FREM3*, *GYPE*, *GYPB*, *GYPA*, *LOC646576*, *HHIP*, *ANAPC10*, *ABCE1*, *OTUD4*, *SMAD1*, *MMAA*, *C4orf51*, *ZNF827*, *LSM6*, *SLC10A7*, *POU4F2*, *TTC29*, *EDNRA*, *TMEM184C*, *PREMT10*, *ARHGAP10*, *NR3C2*. Ebből a 47 génből 8 gén esetében véltünk felfedezni kapcsolatot a beteg fenotípusával. Ez a 8 gén a *PCDH18*, *SETD7*, *ELMOD2*, *IL15*, *GABI*, *HHIP*, *SMAD1*, *NR3C2*. A beteg szüleinek aCGH vizsgálatát is elvégeztük annak megállapítása érdekében, hogy öröklött vagy *de novo* kópiaszám eltérésről van-e szó. A szülők egyike sem hordozta a gyermekben talált deléciót. Az aCGH eredményeket a családtagokban metafázis FISH segítségével konfirmáltuk.

Az első beteg összehasonlítása a szakirodalomban közölt esetekkel

Az első betegben észlelt, a 4q28 régiót érintő deléciónak megfelelő eltérések meglehetősen ritkán fordulnak elő a szakirodalomban, különösen az olyan publikációk, amelyek értékelhető fenotípusos leírást is tartalmaznak a betegekről. Bár a betegekben detektált CNV-k töréspontjai viszonylag közel esnek egymáshoz, az észlelt fenotípusos jellemzők rendkívül heterogén képet mutatnak. Ennek oka, hogy az adatbázisokba felvitt beteg fenotípus adatok hiányosak, nem azonos részletességgel és szempontok alapján íródtak. Ez a jelenség jól tetten

érhető olyan nagyméretű deléciók esetében, melyek részben vagy egészben átfednek az általam detektált eltéréssel azonban a betegek fenotípusos eltérései a deléció méretéhez képest szegényesek, pedig ezt a géndenzitás és dózisszenzitivitás nem indokolná. Az adatok értékelését nehezíti a DECIPHER adatbázisban rögzített eltérések esetében a betegek korának hiányos feltüntetése így nem tudhatjuk, hogy a töréspontok alapján feltételezhetően megjelenő tünetek hiánya abból fakad, hogy túl fiatal volt a beteg és vizsgálatakor még nem jelentek meg a tünetek, vagy pedig a későbbiekben sem mutatta a tüneteket.

Második eset

A beteg negatív kromoszóma vizsgálata után került aCGH vizsgálatra, mely során egy 4,85 Mb méretű intersticiális deléciót mutattunk ki a 4-es kromoszóma hosszú karjának 4q21.21-21.23 szakaszán. A töréspontok ismeretében (GRCh37, ch4: 81.408.980 – 86.261.953) megállapítottam, hogy a deletált szakasz a következő géneket tartalmazta: *BMP3*, *PRKG2*, *RASGEF1B*, *HNRNPD*, *HNRPDL*, *ENOPH1*, *COQ2*, *MRPS18C*, *THAP9*, *HPSE*, *CDS1*. A beteg szüleinek vizsgálata során nem detektáltunk a beteghez hasonló eltérést a 4-es kromoszóma hosszú karján, mely így *de novo* eredetűnek bizonyult. Az eredményeket metafázis FISH segítségével konfirmáltuk.

A második beteg összehasonlítása a szakirodalomban közölt esetekkel

Ellentétben az első betegben detektált eltéréssel, a második betegben talált eltérés egy 2010 óta ismert mikrodeléciós szindróma. Azonban ezzel együtt is csak kevés olyan esetet közöltek eddig a szakirodalomban, mely a 4q21-es régiót érinti.

Nem rekurrens és rekurrens CNV-k összehasonlítása

Az első betegben detektált 14,56 Mb méretű deléció által érintett genomi régiót és a beteg fenotípusát a szakirodalmi esetekkel összevetve elmondható, hogy az esetek sem töréspontban, sem pedig klinikai tünetekben nem mutatnak nagyfokú hasonlóságot. Ellentétben ezzel, a második betegben detektált 4,85 Mb méretű deléció által okozott fenotípusos tüneteket összevetve az irodalomban ismeretes hasonló töréspontú betegek tüneteivel megállapítható, hogy a tünetek előfordulása a betegekben sokkal egységesebb. Az első betegben és a második betegben a leggyakrabban előforduló tünetek többsége megegyezik egymással, azonban azok előfordulási aránya nagymértékben különbözik egymástól. Míg a második beteg és csoportja esetében az alacsony termet, mint tünet a betegek több mint 80 %-ában fordult elő, addig ez az arány az első beteg és csoportjában nem haladja meg az 50 %-ot. A leggyakoribb tünetek a második csoport esetében kivétel nélkül 50

%-ot meghaladó előfordulási arányt mutatnak. Ennek oka vélhetően a kialakulásuk különböző mechanizmusa lehet.

Az 4q28.3-as esetek töréspontjait összehasonlítva felfedezhető egy közös szakasz a deletált régiókban, melyet minden deléció tartalmaz. Ezt a szakaszt hívják legkisebb átfedő régiónak. A deléciós töréspontok nem LCR régió közelében helyezkednek el. A töréspontokból jól látszik, hogy nincs egy meghatározott hotspot, ahol a CNV-k kialakulása megjósolható lenne. Ennek okán kimondható, hogy a 4q28.3-as régióban általunk detektált deléció nem rekurrens CNV, tehát a betegünkben talált deléció vagy NHEJ vagy pedig FoSTeS mechanizmus segítségével alakulhatott ki. A CNV-k különböző típusait az általunk bemutatott két eseten keresztül ismertetve elmondható, hogy a nem rekurrens CNV-k által okozott fenotípusos jellemzők nem mutatnak egységes klinikai képet. Ennek oka a nem rekurrens CNV-k-re jellemző nem determinált töréspont, s ezáltal annak mérete és géntartalma sem megjósolható, melynek következtében a kialakult klinikai kép fenotípusosan variábilis lesz. Ezzel ellentétben a 4q21 mikrodéléciós szindrómára jellemző rekurrens CNV-k LCR mediálta töréspontjaik révén determináltak. Ennek következtében klinikai képük sokkal homogénebb, fenotípus alapján való detektálásuk sokkal valószínűbb.

ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Az általunk alkalmazott array CGH módszer segítségével megállapítottuk, hogy a 9 hónapos leánygyermek tüneteier (első eset), aki növekedési zavarral, fejlődésbeli késéssel, szív-fejlődési és tüdő rendellenességekkel, valamint craniofaciális dysmorfizmussal rendelkezett, egy a négyes kromoszóma hosszú karján (4q28.3-31.23) elhelyezkedő *de novo* 14,56 Mb méretű deléció a felelős, mely 8 gént: *PCDH18*, *SETD7*, *ELMOD2*, *IL15*, *GAB1*, *HHIP*, *SMAD1* és az *NR3C2* érintett.
2. A deletált gének által kiesett funkciók magyarázatul szolgálhatnak az első beteg esetében a disszertációban részletesen ismertetett klinikai tünetekre (kognitív képességek: *PCDH18*, *SETD7*; immunodeficiencia: *IL15*; alacsony Na ion szint: *NR3C2*), különösen a tüdőbeli vaszkuláris rendellenességek egyedülálló mivoltára (*ELMOD2*, *GAB1*, *HHIP*), valamint a pulmonáris hipertenzióra (*SMAD1*). Mindezen eredmények nagyban hozzájárulhatnak a 4q CNV-k genetikai spektrumának részletesebb feltárásához és jobb megértéséhez.
3. A második áltatunk vizsgált 5 éves leánygyermek a Magyarországon első ízben azonosított, jellegzetes 4q21 mikrodéléció szindrómás fenotípust mutató eset (Második eset). A beteg klinikai tünetei (súlyos fejlődési zavar, beszéd hiánya, magatartásbeli zavar) részben átfedtek a szakirodalomban korábban már ismertetett 4q21 mikrodéléció szindrómás esetekkel. Betegünknel egy *de novo* 4,85 Mb nagyságú deléciót mutattunk ki array CGH segítségével a négyes kromoszóma hosszú karján (4q21.21-4q21.23). A deletált régió 10 gént *BMP3*, *PRKG2*, *RASGEF1B*, *HNRNPD*, *HNRPDL*, *ENOPH1*, *COQ2*, *MRPS18C*, *THAP9*, *HPSE*, és *CDS1* érintett.
4. A fent említett régió 10 érintett génjéből, 5 gén a szindrómára jellemző 1.37 Mb méretű, ún. minimális kritikus régió génjei: *PRKG2*, *RASGEF1B*, *HNRNPD*, *HNRPDL*, *ENOPH1*. Ezek közül a *PRKG2* (súlyos növekedésbeli késés) és a *RASGEF1B* (kognitív funkciók) a 4q21 fenotípus fő meghatározó génjei. A *BMP3* gén haploinsufficienciája szerepet játszhat a csont deformitások kialakulásában, mint a frontális kiboltosulás és a széles homlok. A másik 5 érintett gén a *BMP3*, *COQ2*, *MRPS18C*, *THAP9*, *HPSE*, és *CDS1* esetében nem találtunk összefüggést a gének által kódolt fehérjék funkciói, valamint a beteg klinikai tünetei között. Vizsgálatunk eredményei nagyban hozzájárulhatnak a 4q21 mikrodéléció szindrómában szenvedő betegek szakszerűbb jövőbeli egészségügyi

ellátásához, továbbá kiemeli az array CGH módszer fontosságát az intellektuális zavarok mögött álló lehetséges genetikai háttér feltárásában.

5. Betegeinket array CGH eredményei alapján talált eltéréseket összevetve megállapítottuk, hogy míg az első beteg esetében a megfigyelt deléció töréspontjai nem esnek egybe szegmentális duplikációkkal, addig a második beteg esetében detektált eltérés töréspontjai LCR hotspotokhoz orientálódnak.
6. Az első betegben detektált eltérés töréspontjait összehasonlítva a szakirodalomban publikált hasonló esetekkel megállapíthatjuk, hogy a 4q28.3-31.23 és szomszédos régióiba eső eltérések töréspontjai nem mutatnak egységes képet, töréspontjaik nem mutatnak kapcsolatot szegmentális duplikációkkal. A deletált régiókban azonban minden esetben előfordul egy közös szakasz, a legkisebb átfedő régió. Megállapítottuk, hogy az első beteg esetében detektált kópiaszám variáció egy nem rekurrens CNV.
7. A második beteg esetében a töréspontokat összevetve a publikált esetekkel felfedezhető, hogy a töréspontok jól meghatározható LCR gazdag területen mentek végbe. Ezeket a töréspontok a szegmentális duplikációk mediációján keresztül lejátszódó NAHR hozza létre. Ennek alapján megállapíthatjuk, hogy a második beteg esetében detektált eltérés egy rekurrens CNV.
8. A két esetünetet összehasonlítva a szakirodalomban publikált esetek klinikai tüneteivel megállapítható, hogy míg a nem rekurrens CNV-k variábilis genetikai régiójuknak köszönhetően nem mutatnak egységes klinikai képet (a leggyakrabban előforduló tünetek előfordulási aránya max 50 %). A rekurrens CNV-k determinált töréspontjaik révén ezzel ellentétben egységesebb klinikai képet mutatnak, klinikai képe a determinált töréspontnak köszönhetően sokkal egységesebb (a leggyakrabban előforduló tünetek előfordulási aránya 80% feletti).
9. Pontosabb indikációt sikerült meghatároznom elsőként Magyarországon a komplex fejlődési rendellenességben szenvedő betegek array CGH vizsgálatára.

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

1. Phenotypic variability in a Hungarian patient with the 4q21 microdeletion syndrome.

Komlósi K, **Duga B**, Hadzsiev K, Czakó M, Kosztolányi G, Fogarasi A, Melegh B. Mol Cytogenet. 2015 Mar 3;8:16. doi: 10.1186/s13039-015-0118-7. eCollection 2015. Impakt Faktor: 2,140

2. Deletion of 4q28.3-31.23 in the background of multiple malformations with pulmonary hypertension.

Duga B, Czako M, Komlosi K, Hadzsiev K, Torok K, Sumegi K, Kisfali P, Kosztolanyi G, Melegh B. Mol Cytogenet. 2014 Jun 5;7:36. doi: 10.1186/1755-8166-7-36. eCollection 2014. Impakt Faktor: 2,140

További közlemények:

Folyóirat cikkek:

1. Common functional variants of APOA5 and GCKR accumulate gradually in association with triglyceride increase in metabolic syndrome patients.

Hadarits F, Kisfali P, Mohás M, Maász A, **Duga B**, Janicsek I, Wittmann I, Melegh B. Mol Biol Rep. 2012 Feb;39(2):1949-55. doi: 10.1007/s11033-011-0942-8. Epub 2011 Jun 4. Impakt Faktor: 2,506

2. Mutations of the apolipoprotein A5 gene with inherited hypertriglyceridaemia: review of the current literature.

Melegh BI, **Duga B**, Sümegi K, Kisfali P, Maász A, Komlósi K, Hadzsiev K, Komoly S, Kosztolányi G, Melegh B. Curr Med Chem. 2012;19(36):6163-70. Impakt Faktor: 4,070

3. Hodgkin disease therapy induced second malignancy susceptibility 6q21 functional variants in roma and hungarian population samples.

Varszegi D, **Duga B**, Melegh BI, Sumegi K, Kisfali P, Maasz A, Melegh B.

Pathol Oncol Res. 2014 Jul;20(3):529-33. doi: 10.1007/s12253-013-9724-z. Epub 2013 Dec 5. Impakt Faktor: 1,855

4. Marked differences of haplotype tagging SNP distribution, linkage, and haplotype profile of IL23 receptor gene in Roma and Hungarian population samples.

Magyari L, Varszegi D, Sarlos P, Jaromi L, Melegh BI, **Duga B**, Kisfali P, Kovesdi E, Matyas P, Szabo A, Szalai R, Melegh B. Cytokine. 2014 Feb;65(2):148-52. doi: 10.1016/j.cyto.2013.11.011. Epub 2013 Dec 11. Impakt Faktor: 2,664

5. [Identifying rare genomic disorders with array comparative genomic hybridization in Hungary].

Duga B, Czakó M, Hadzsiev K, Komlósi K, Sümegi K, Kisfali P, Kosztolányi G, Melegh B. Orv Hetil. 2014 Mar 2;155(9):358-61. doi:10.1556/OH.2014.29825. Hungarian. Impakt Faktor: 0

6. Admixture of beneficial and unfavourable variants of GLCCI1 and FCER2 in Roma samples can implicate different clinical response to corticosteroids.

Szalai R, Matyas P, Varszegi D, Melegh M, Magyari L, Jaromi L, Sumegi K, **Duga B**, Kovesdi E, Hadzsiev K, Melegh B.

Mol Biol Rep. 2014 Nov;41(11):7665-9. doi: 10.1007/s11033-014-3659-7. Epub 2014 Aug 5. Impakt Faktor: 2,024

7. [Attention deficit hyperactivity disorder analyzed with array comparative genome hybridization method. Case report].

Duga B, Czakó M, Komlósi K, Hadzsiev K, Sümegi K, Kisfali P, Melegh M, Melegh B. Orv Hetil. 2014 Oct 5;155(40):1598-601. doi: 10.1556/OH.2014.30006. Hungarian. Impakt Faktor: 0

8. Significant interethnic differences in functional variants of PON1 and P2RY12 genes in Roma and Hungarian population samples.

Janicsek I, Sipeky C, Bene J, **Duga B**, Melegh B, Sümegi K, Jaromi L, Magyari L, Melegh B. Mol Biol Rep. 2015 Jan;42(1):227-32. doi: 10.1007/s11033-014-3762-9. Epub 2014 Oct 9. Impakt Faktor: 2,024

9. Genetic polymorphisms in promoter and intronic regions of CYP1A2 gene in Roma and Hungarian population samples.

Szalai R, Magyari L, Matyas P, **Duga B**, Banfai Z, Szabo A, Kovesdi E, Melegh B. Environ Toxicol Pharmacol. 2014 Nov;38(3):814-20. doi: 10.1016/j.etap.2014.09.012. Epub 2014 Sep 28. Impakt Faktor: 2,084

10. Functional Variants of Lipid Level Modifier MLXIPL, GCKR, GALNT2, CILP2, ANGPTL3 and TRIB1 Genes in Healthy Roma and Hungarian Populations.

Sumegi K, Jaromi L, Magyari L, Kovesdi E, **Duga B**, Szalai R, Maasz A, Matyas P, Janicsek I, Melegh B. *Pathol Oncol Res.* 2015 Jan 9. Impakt Faktor: 1,855

11. Partial tetrasomy of the proximal long arm of chromosome 15 in two patients: the significance of the gene dosage in terms of phenotype

Szabo A, Czako M, Hadzsiev K, **Duga B**, Komlosi K, Melegh B. *Mol Cytogenet.* 2015 Jun 25;8:41. doi: 10.1186/s13039-015-0137-4 Impakt Faktor: 2,14

12. Increased prevalence of functional minor allele variants of drug metabolizing CYP2B6 and CYP2D6 genes in Roma population samples.

Weber A, Szalai R, Sipeky C, Magyari L, Melegh M, Jaromi L, Matyas P, **Duga B**, Kovesdi E, Hadzsiev K, Melegh B. *Pharmacological Reports* 67:(3) pp. 460-464. (2015 June) doi: 10.1016/j.pharep.2014.11.006. Impakt Faktor: 1,928

13. Erratum to: Significant interethnic differences in functional variants of PON1 and P2RY12 genes in Roma and Hungarian population samples.

Janicsek I, Sipeky C, Bene J, **Duga B**, Melegh BI, Sümegi K, Jaromi L, Magyari L, Melegh B., *Mol Biol Rep.* 2015 Jan;42(1):317. doi: 10.1007/s11033-014-3798-x. Impakt Faktor: 2,024

Könyv fejezetek:

1. Role of Functional Variants and Mutations of the Apolipoprotein A5 Gene in Human Pathology

Balázs Duga, Béla I.Melegh, Katalin Sümegi, Anita Maász, Péter Kiszfali, Katalin Komlósi, Béla Melegh B.: *Apolipoproteins: Regulatory Functions, Health Effects and Role in Disease*, New York: **Nova Science Publishers Inc.**, 2012. pp. 75-92, (ISBN:978-1-62257-484-1)

2. Ischemic Stroke Susceptibility Gene Research: Lessons We Learned

Bela I. Melegh, Anita Maasz, Peter Kiszfali, Katalin Sumegi, **Balazs Duga**, Gyorgy Kosztolanyi, Samuel Komoly, Bela Melegh: *Ischemic Stroke: Symptoms, Prevention and Recovery*, New York: **Nova Science Publishers Inc.**, 2013. pp. 117-144. (ISBN:978-1-62257-799-6)

3. Role of Triglyceride Modifier Genetic Variants in Development of Metabolic Syndrome

Anita Maasz, Peter Kisfali, Bela I. Melegh, **Balazs Duga**, Katalin Sümegi, Bela Melegh:
Handbook on Metabolic Syndrome: Classification, Risk Factors and Health Impact, New
York: **Nova Science Publishers Inc.**, 2012. pp.95-119. (ISBN: 978-1-62257-025-6)

Összesített Impakt Faktor: 29,454