

Ritka mendeli kórképek kialakulásában szerepet játszó kópiaszámbeli eltérések vizsgálata

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS



Büki Gergely

Témavezető: Dr. Bene Judit

A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Gallyas Ferenc

A Doktori program vezetője: Prof. Dr. Melegh Béla

Interdiszciplináris Orvostudományi Doktori Iskola, Orvosi Kar, Pécsi
Tudományegyetem

Pécs, 2022

Bevezetés

A 20. század második felében és a 21. század elején bekövetkezett technológiai újítások nagyban hozzájárultak a tudomány számos területének fejlődéséhez, beleértve a humángenetikát is. A neurofibromatózisban vagy Marfan szindrómában szenvedő betegek kópiaszámbeli eltéréseinek jellemzésére modern módszereket, köztük a multiplex ligációfüggő szondaamplifikációt (MLPA) és az array komparatív genomiális hibridizációt (aCGH) alkalmaztunk kutatómunkánk során. Továbbá a kimutatott eredmények és a klinikai adatgyűjtés alapján genotípus-fenotípus analízist állítottunk fel. Dolgozatunk során a betegség lefolyása és súlyossága, valamint a bemutatott genetikai eltérések közötti összefüggések vizsgálatát végeztük el. Mindezek mellett a kimutatott nagy CNV-k és a Marfan szindróma kardiovaszkuláris manifesztációinak súlyossága közötti összefüggés vizsgálatát végeztük el és mutattuk be kutatásunkban. A szabályozó elemek szerepének feltárását végeztük el, különös tekintettel az *FBN1* génben található transzkripciósfaktorok kötőhelyeire. Ezen kívül megvizsgáltuk az ebben a génben található nagy *de novo* deléció töréspontjait, és javaslatot tettünk a nem rekurrens kópiaszámbeli eltérés (CNV) kialakulásának molekuláris mechanizmusára.

Kópiaszámbeli eltérések

Az abnormális kópiaszámbeli eltérések a strukturális variációk (SV) egyik típusa, amely igen gyakran jelenik meg az egyén genomjában. Az SV-k a nukleotidszekvencia hosszú szakaszait érintő genomiális átrendeződések egy csoportja. Ezek finom, közepes és nagyméretű SV-kre csoportosíthatók. A CNV-t általánosságban olyan kópiaszámbeli eltérésként határozzák meg, amely egy 1 kb vagy annál nagyobb DNS-szegmenst érint. A mutációs ráták nagymértékben eltérnek a különböző lókuszek között, és a CNV-k esetében sokkal magasabbnak tűnnek, mint az SNP-k esetében. A CNV-k hozzájárulnak az egyének közötti genomikai diverzitáshoz, és jelentős szerepet játszanak az evolúcióban.

Kópiaszámbeli eltérések típusai

A CNV-k töréspont-elemzései alapján két fő csoportot különböztethetünk meg: a rekurrens és a nem rekurrens CNV-ket. A rekurrens CNV-k többé-kevésbé ugyanazon a genomi helyen helyezkednek el, azonos töréspontokkal, így hasonló méretű DNS szegmenseket érintenek a nem rokon egyének között. Ezzel szemben a nem rekurrens CNV-ket különböző helyeken észlelik,

töréspontjaik és méreteik tekintetében megfigyelhető különbséggel. Megkülönböztethetünk egy harmadik csoportot is, amelyet csoportosítással nem rekurrens CNV-knek nevezünk. Ebben az esetben a CNV-k egyik oldala nagyjából hasonló genomi helyre lokalizálódik, míg a töréspont a másik oldalon változik.

A kópiaszámbeli eltérések kialakulásának mechanizmusa

A CNV-k rekombináción és replikáción alapuló mechanizmusok során is kialakulhatnak. Emellett számos esetben kimutatható a transzpozázilis elemek (TE) hozzájárulása számos CNV kialakulásához. Az egyenlőtlen meiotikus rekombináción alapuló mechanizmusok a nem-allelikus homológ rekombináció (NAHR), a nem-homológ végcsatlakozás (NHEJ) és a mikrohomológiával közvetített végcsatlakozás (MMEJ). A replikációs hibákon alapuló javasolt mechanizmusok a sorozatos replikációs csúszás (SRS), a villa megakadása és a templát váltás (FoSTeS) és a mikrohomológia által közvetített törés-indukált replikáció (MMBIR). Korábbi tanulmányok alapján úgy tűnik, hogy bizonyos körülmények vagy kémiai ágensek replikációs stresszhez vezethetnek, ami potenciálisan káros CNV-ket alakíthatnak ki.

Az egyik legismertebb mechanizmus a NAHR, amely a legtöbb rekurrens CNV-hez járul hozzá. A CNV-k gyakran szegmentális duplikációk vagy LCR-ek közvetlen közelében találhatók, bár más hosszú homológia szakaszok is felelősek lehetnek a NAHR mechanizmusaért, például Alu- vagy L1-elemek. Az NHEJ az egyik legfontosabb javító mechanizmus a kettősszál-törések (DSB-k) helyreállítására, különösen a G0 és G1 fázisokban. Az MMEJ a NHEJ egy hibatűrőbb, független, alternatív formája.

A FoSTeS modell szerint a replikációs villa valamilyen esemény miatt megáll, majd egy közeli replikációs villa komplementer mikrohomológ régiójához kapcsolódva más templátra vált, és ennek következtében folytatja a replikációt. Az MMBIR a törés-indukált replikáció (BIR) javasolt, specifikus formája, amely az összeomlott replikációs villákból származó kettős szálú DNS-végeket javítja. Az MMBIR egy másik, közeli replikációs villából származó rövid mikrohomológiát használ a templátváltáshoz. Az SRS alapvetően az előre- és hátrafelé történő replikációs csúszás több fordulója, amelyek gyakran kisebb komplex átrendeződéseket hoznak létre. A mobilis elemek, más néven transzpozázilis elemek, olyan genetikai anyagok, amelyek képesek áthelyezni magukat a genomban, ezért az emberi genom jelentős részét alkotják.

Ritka betegségek

Az Európai Közegészségügyi Bizottság meghatározása szerint a ritka betegségek "olyan életveszélyes vagy krónikusan legyengítő betegségek, amelyek olyan alacsony gyakorisággal fordulnak elő, hogy kezelésükhöz különleges, együttes erőfeszítésekre van szükség". A gyakorisági számot úgy határozzák meg, hogy az kevesebb embert érint, mint 1/2000. Jelenleg mintegy 7000 ritka betegséget ismernek el. A rendellenességek öröklhetők a szülőktől vagy kialakulhatnak *de novo*. Jelenlegi ismereteink szerint a ritka betegségek kb. 50%-a érinti a gyermekeket. Mind a betegség lefolyása, mind a betegség megnyilvánulása különböző a betegek között.

Marfan szindróma

A Marfan szindróma (MFS; OMIM #154700) egy autoszomális domináns, multisisztémás betegség, amely nagy klinikai heterogenitással rendelkezik, és elsősorban a csontváz-, szem-, szív- és érrendszert érinti. Az MFS-ben a legéletveszélyesebb szövődmény a kardiovaszkuláris rendszerhez kapcsolódik, beleértve az aorta gyökerének és a felszálló aortának a tágulását, ami aorta disszekciót és hirtelen halált eredményezhet. A betegséget a fibrillin-1 (*FBN1*) gén mutációi okozzák, amely 65 kódoló exonból áll, és a 15. kromoszóma hosszú karján (15q21.1) helyezkedik el. A gén az extracelluláris mátrixban (ECM) található mikrofibrillumok egyik fő alkotóelemét, a fibrillin-1-et kódolja. Egyetlen, több exonból álló, és teljes *FBN1* deléciókról egyaránt beszámoltak eddig. Az *FBN1* esetében az MFS-betegek 2-7%-ában találtak kópiaszámbeli eltérést.

Neurofibromatózis

A neurofibromatózisnak több különböző típusa van, bár a három leggyakoribb az 1-es, 2-es típusú neurofibromatózis (NF1 és NF2) és a schwannomatózis. A leggyakoribb típus, a autoszomális domináns öröklődést mutató neurofibromatosis 1 (NF1; MIM#162200), amelyet az *NF1* nevű gén genetikai elváltozása okoz. Az NF1 fő klinikai jellemzői a café-au-lait foltoknak (CALs) nevezett hiperpigmentált bőrfelzínnek és a patognomikus neurofibromák. Számos jellegzetesség gyakorisága az életkor előrehaladtával növekszik, és életkorfüggő penetranciát mutat. Az *NF1* egy tumorsuppresszor gén, amely a 17. kromoszómán (17q11.2) lokalizálódik, és egy Ras-specifikus GTPáz-aktiváló fehérjét, az úgynevezett neurofibromint kódolja.

Napjainkban az NF1-es betegek 5-11%-ának van kópiaszámbeli eltérése, amely az NF1 és a szomszédos régiókban található géneket érinti. Jelenleg a mikrodélációknak 4 típusa létezik, amelyeket 1-es, 2-es, 3-as és atípusos típusoknak neveznek. A fő különbség közöttük a töréspont helye, az érintett méret és régió, s ezáltal a deléció tartományon belüli érintett gének. Az 1., 2. és 3. típusokat a NAHR okozza akár a meiózis (1. típus, 3. típus), akár a mitózis (2. típus) során. Az atipikus mikrodélációk esetében az okok heterogének.

Célok

Célunk az volt, hogy

1. meghatározzuk a kópiaszámbeli eltérések gyakoriságát és típusát az 1-es típusú neurofibromatózisban szenvedő betegek körében;
2. feltárjuk a genotípus-fenotípus korrelációt a különböző típusú kópiaszámbeli eltérések között az NF1 mikrodélációs betegcsoportban;
3. összehasonlítsuk az 1. típusú neurofibromatózisban szenvedő intragenikus és mikrodélációs betegcsoport klinikai lefolyásának különbségeit;
4. összefüggést tárunk fel az eddig kimutatott nagy *FBN1* deléciók és a kardiovaszkuláris manifesztációk súlyossága között;
5. megvizsgáljuk a szabályozó elemek deléciójának hozzájárulását a Marfan szindróma klinikai lefolyásához;
6. feltárjuk az *FBN1* nagy deléciójának hátterében álló mechanizmust.

Anyagok és módszerek

Intézetünkbe (Orvosi Genetikai Intézet) genetikai vizsgálatra olyan betegeket utaltak, akiknél felmerült a Marfan szindróma vagy a neurofibromatózis gyanúja. Kutatásunkba 41 olyan beteget vontunk be, akiknél felvetődött a Marfan szindróma vagy valamely egyéb kötőszöveti rendellenesség gyanúja. Az *FBN1*, *TGFBR1* és *TGFBR2* gének előzete Sanger szekvenálással történő vizsgálata negatív eredménnyel zárult. Kontrollként 15 intragenikus *FBN1* mutációval

rendelkező beteget is bevontunk a vizsgálatba. Valamennyi beteg megfelelt a felülvizsgált Genti kritériumoknak. Kutatásunkban 640 nem rokon beteget vontunk be, akinél felvetődött a neurofibromatózis gyanúja. Az *NF1* gén Sanger szekvenálását vagy az *NF1*, *NF2*, *KIT*, *PTPN11*, *RAF1*, *SMARCB1* és *SPRED1* gének NGS analízisét követően 252 betegnél nem sikerült betegséget okozó mutációt azonosítani. Közülük 17 betegnél nagy *NF1* deléciót azonosítottunk MLPA-val. A betegcsoport főleg gyermekekből állt (a 17-ből 14), akiknek életkora 2 és 17 év között volt. Kontrollként 33 intragenikus *NF1* mutációval rendelkező beteget is bevontunk a vizsgálatba.

A perifériás vér leukocitáiból E.Z.N.A.® Blood DNA Maxi kit segítségével DNS-t izoláltunk, majd MLPA és Whole Genome aCGH elemzést végeztünk el. A CNV-k interpretációját in silico végeztük el, valamint elvégeztük a szomatikus mozaikosság meghatározását.

Az *FBN1* deléció megerősítésére és a töréspontok meghatározására az in silico elemzés segítségével célzott primerekkel végzett long range PCR-t és Sanger-szekvenálást alkalmaztunk. Az *FBN1* génen belül a szabályozó elemeket az UCSC genom böngésző segítségével elemeztük. Statisztikai elemzést (two-tailed Fisher-féle egzakt teszt) alkalmaztunk a klinikai jellemzők gyakoriságában mutatkozó különbségek mérésére a kópiaszám variációkkal (*NF1* mikrodeléció és *FBN1* nagy deléció) és az intragenikus mutációkkal rendelkező betegek között. A $p < 0,05$ értékű különbséget szignifikánsnak tekintettük.

Eredmények

Marfan szindróma

Az MLPA analízis során egy 22 éves nőnél és egyéves fiánál egy két exont (46-47) érintő új, nagy deléciót azonosítottunk. Ennek következtében a fibrillin-1 fehérje 31. és 32. kalciumköti EGF-szerű doménje deletálódik, amely hozzájárul a Marfan szindróma kialakulásához. Az *FBN1* deléció pontos töréspontjainak azonosítása egy 4916 nukleotid hosszúságú szekvencia elvesztését mutatta ki "TG" nukleotidok beillesztődésével.

A kardiovaszkuláris manifesztációk súlyossága és a CNV-k közötti összefüggés vizsgálata

A kardiovaszkuláris (CV) tüneteket két különböző csoportba soroltuk, az úgynevezett minor és major CV csoportba. Az előbbi csoportba tartozik az annulus mitralis meszesedés (a tünetek

megjelenésének kora <40 év), a tüdőartéria tágulata, a mitrális billentyű prolapsus, az aorta descendens vagy az aorta abdominalis tágulata vagy disszekciója (a tünetek megjelenésének kora <50 év). A major tünetek közé tartozik az aorta ascendens, az aorta ascendens tágulata aorta regurgitációval vagy anélkül, valamint a Valsalva-színuszok érintettsége.

Az egy exon deléciót hordozó betegek nagy részénél (16-ból 10; 63%) major CV-tünetek jelentkeztek, emellett egy betegnél minor tünetek jelentkeztek, két betegnél pedig nem volt kardiovaszkuláris manifesztáció. A több exon deléciót hordozó betegeknél sokkal gyakrabban fordultak elő súlyos CV tünetek (19-ből 16; 84%). Továbbá 11 betegnek a fő CV-tünetek mellett kevésbé súlyos tünetek is tapasztalhatók voltak. Teljes géndeléción 16 betegből 11 betegnél (69%) jelentkeztek súlyos CV-tünetek, ahol nyolc beteg két családhoz tartozott. Kontroll betegeink közül (intragenikus mutációk) hat betegnél major (40%), négy betegnél minor CV manifesztáció (csak mitrális billentyű prolapsus, 27%), öt betegnél pedig semmilyen CV tünet nem volt. A major CV-manifesztációk megfigyelt gyakorisága szignifikáns különbséget mutatott (73 vs. 40%; $p=0,031$) a nagy delécióval rendelkező betegek és a kontrollbetegek csoportja között. A több exon delécióval rendelkező betegek esetében az eredmények meglehetősen hasonlóak voltak (84% vs 40%; $p=0,012$). Végül nem mutatkozott szignifikáns különbség az egy exon deléciót hordozó betegek és az intragenikus *FBN1* mutációval rendelkező betegek között.

Az *FBN1* génen belüli szabályozó elemek elemzése a transzkripciós faktorok kötőhelyeire összpontosítva

Az *FBN1* gén különböző CNV-k által érintett régióiban számos transzkripció faktor kötőhelyet (TFBS) találtak. Az előzetes in silico elemzés szerint a bemutatott TFBS-ek közül a STAT3 mutat potenciális korrelációt a CV tünetekkel, és feltételezhetően szerepet játszik a kardiovaszkuláris manifesztációk kialakulásában. Őt esetben a STAT3 kötőhelyeket érintő deléciót mutattunk ki. Közülük négy betegnél aortatágulat alakult ki, egy betegnél pedig a felszálló aorta és a jobb koszorúér akut disszekciója is előfordult. Ezenkívül számos, az aortában aktívnak ismert szabályozó elemet (promóter és/vagy enhancer) találtunk az *FBN1* gén különböző CNV-k által érintett régiójában.

Neurofibromatózis

17 betegnél a teljes *NF1* gén és több szomszédos gén heterozigóta deléciója volt kimutatható. Az MLPA analízis tizenkét 1-es típusú és öt atípusos deléciót mutatott ki. Tíz betegnél aCGH-analízist alkalmaztak az MLPA-eredmények megerősítésére. Összességében tizenkét 1-es típusú, egy 2-es típusú és négy atípusos deléciót (három különböző új atípusos deléciót) azonosítottunk a betegcsoportunkban. Emellett nem észleltünk 3. típusú mikrodeléciót. Az aCGH-val vizsgált tíz beteg közül egy atípusos delécióval rendelkező beteg mutatott szomatikus mozaikosságot, kb. 30%-os mértékben.

Az *NF1* mikrodeléció különböző típusaiban szenvedő betegek klinikai jellemzése

Hét fő kategóriát (dysmorphiás jellemzők, bőrmanifesztációk, neurofibromák és egyéb tumorok, csontvázanomáliák, szemészeti manifesztációk, neuropszichológiai tünetek, kötőszöveti anomáliák és szívrendellenességek) határoztunk meg és választottunk ki a genotípus-fenotípus asszociációs elemzéshez.

A 17 betegből 9-nél (53%) az arc dysmorphiája jelentkezett. Hasonló gyakoriság volt tapasztalható a hypertelorismus esetében is. Úgy tűnik, hogy a durva arckifejezés és a nagy kezek és lábak az *NF1* mikrodeléciós betegek jellegzetes dysmorphiás jellemzői, mivel ez gyakori volt az 1. típusú deléciós betegeinknél (12-ből 8, 67%), és mindkét tünetet a 2. típusú deléciós betegnél is észleltük. Ezzel szemben intragenikus *NF1*-es betegpopulációnkban a dysmorphiás vonások ritkán voltak tapasztalhatók.

A deléció típusától függetlenül minden betegnél café-au-lait foltokat (CALs) figyeltünk meg. A hónalji és a lágyéktáji szeplő azonban hiányzott a 2-es típusú deléciós betegnél, ezek nagy gyakoriságot mutattak az 1-es típusú (12-ből 10; 83%) és az atipikus (4-ből 3; 75%) deléciós csoportban. A kezek és a lábak lágyyszöveti feleslege a mi betegeink között is előfordult, bár kisebb gyakorisággal. A bőr manifesztációi, beleértve a CALs-okat (33-ből 30; 91%) és a hónalji és inguinális szeplőket (33-ből 17; 52%) szintén jellemzőek voltak az intragenikus *NF1*-es betegekre.

Eredményeink szerint a neurofibromák típusai közül a subcutan neurofibromák voltak a leggyakoribbak, bár érdemes megemlíteni, hogy az egész test és a gerinc MRI nem része a

rutineljárásnak a betegellátásunkban, és a 17 betegből 14 gyermek volt, ráadásul a 14-ből 10 beteg a vizsgálat idején 10 év alatti volt. Az optikai pálya gliomáját (OPG) négy betegnél mutattuk ki MRI-vel, és egyik esetben sem volt tünetmentes. A kontrollbetegek közül két tünetes és két tünetmentes OPG-t figyeltek meg.

Rosszindulatú perifériás ideghüvelydaganatot (MPNST) két betegünkön észleltük, egy felnőtt és egy majdnem felnőtt (36 éves, illetve 17 éves), és mindketten az 1. típusú deléciós csoportba tartoztak. Érdekes megemlíteni, hogy az MPNST korfüggő penetranciát mutat. Intragenikus NF1-es betegek között 30%-os gyakorisággal találtunk subcutan fibromákat, a cutan és plexiform neurofibromák előfordulása 18%, illetve 6% volt. A gerincevelői neurofibromákat betegek 3%-ánál figyeltük meg. Továbbá a kontrollbetegek közül 33-ból 4-ben (12%) alakult ki OPG, és nem figyeltünk meg MPNST-t.

Betegeink többségénél a csontrendszer valamilyen rendellenessége mutatkozott (17-ből 16; 94%). A makrokefália volt a leggyakoribb. Az intragenikus NF1-es betegcsoportban ritkábban (33%) volt tapasztalható csontrendszeri rendellenességek.

Szemészeti manifesztációkat 17 betegünk közül 7-nél (41%) észleltünk. Bár a Lisch-góc az 1-es típusú neurofibromatózisa jellemző, az 1-es típusú delécióval rendelkező 12 betegből 3 betegnél és a 2-es típusú delécióval rendelkező betegnél is megfigyelhető volt. Valamelyest hasonló gyakoriságot figyeltek meg az intragenikus NF1-es betegcsoportban.

Az 1-es típusú betegeknek viszonylag nagy gyakorisággal figyeltünk meg jelentős késést a kognitív fejlődésben és általános tanulási nehézségeket (75%), valamint beszédzavarokat (67%). Betegeink többségénél T2 hiperintenzitást észleltünk (76%). A neuropszichológiai manifesztációk ritkák voltak az NF1 intragenikus betegcsoportban. A T2 hiperintenzitásoknak volt a legmagasabb a prevalenciája 39%-kal (33 betegből 13).

Diszkusszió

Marfan szindróma

A detektált nagy *FBN1* deléciók és a kardiovaszkuláris manifesztációk súlyossága közötti összefüggés vizsgálata

Betegcsoportunkban az *FBN1* génben egy új, nagyméretű, a 46. és 47. exont érintő deléciót azonosítottunk heterozigóta formában MLPA segítségével. A találat validálása és a *de novo* eredet meghatározása molekuláris genetikai vizsgálattal megtörtént.

Az *FBN1* gén teljes deléciói mellett 34 különböző CNV létezik, amelyek egy vagy több exont érintenek. A bemutatott esetek részletes klinikai értékelése a betegek többségénél (34-ből 26-nál) súlyos kardiovaszkuláris manifesztációkat (a mellkasi aorta tágulása és/vagy disszekciója) tárt fel. Hat esetben nem álltak rendelkezésre egyértelmű vagy semmilyen klinikai információ. A proband esetében csak mitrális billentyű prolapsus volt látható, és az 1 éves csecsemőjének szív- és érrendszere ép volt. Ezáltal a CNV-ken kívül feltehetően más tényezők is szerepet játszanak a súlyos kardiovaszkuláris manifesztációk kialakulásában. Az eredmények értelmezése azt mutatta, hogy a CNV-k által érintett betegeknél a kardiovaszkuláris manifesztációk súlyosabbak és gyakoribbak, mint az intragenikus *FBN1* gén mutációban szenvedő betegeknél.

Feltételezésünk szerint a betegeknél a TB-domének (nevezetesen a TB6, TB7 és TB8) deléciója az aktív TGF- β felszabadulását okozza az aortafal ECM-jébe, ami viszont túlaktiválja a kanonikus TGF- β jelátviteli útvonalat. Ez a hatás aztán a mikrofibrillák degenerációját szuperponálhatja, és végül együttesen súlyos kardiovaszkuláris manifesztációkhoz (azaz aortatágulathoz és aorta disszekcióhoz) vezethet ezekben az esetekben.

Átfogó értékelés után az *FBN1* gén *in silico* analízise során bizonyos esetekben kimutattuk a STAT3 potenciális transzkripció kötőhelyeinek jelenlétét. Feltételezzük, hogy a STAT3 kötőhelyeket tartalmazó deléciót hordozó CNV-s betegeknél maga a deléció is hatással van a STAT3 jelátviteli útvonalakra, ami felülírhatja az *FBN1* génhibát, és együttesen súlyos kardiovaszkuláris manifesztációhoz vezethet ezeknél a betegeknél.

A nagy *FBN1* deléció mögött meghúzódó mechanizmus megvitatása

Feltételezéseink szerint egy lehetséges dinukleotid inszerció ("TG") egy "CCTTGCCTTG" direkt ismétlődő szekvenciát hozott létre, amely megszakíthatja a replikációs gépezetet. Maga az inszerció vagy a létrehozott ismétlődés potenciálisan a replikációs villa lelassulását, megtorpanását és végül összeomlását okozhatta. Feltehetően ez az esemény egyetlen DSB-t eredményezett, ahol az 5'-ről 3'-ra történő reszekció egy rövid 3'-es túlnyúlással rendelkező szekvenciát hozott létre. A reszekció eredményeképpen egy DNS-szegmens egy másik

potenciálisan mikromolológiát tartalmazó DNS-szegmensnek volt kitéve. Ennek következtében egy D-hurok alakult ki, amelyben a kettős szálú DNS 3' túlnyúló része behatolt a mikromolológ régióba, ahol megtörtént az összekapcsolódás és a szintézis újraindult. Másrészt egy hibás DNS-javítás következtében egyidejű adeninről guaninra történő szubsztitúciót feltételezünk, amely ebben a pozícióban kialakította a mikromolológiát a másik DNS-szegmensen, így végül a töréspontoknál egy "TG" dinukleotid inszercióval kiegészített ~5 kilobázis hosszú delécióval kialakult a végső szekvencia. Ezáltal azt sugalljuk, hogy esetünkben az MMBIR volt felelős a CNV kialakulásáért, amit alátámaszt az a tény, hogy az MMBIR gyakran lép fel olyan esetekben, melyeknél mikromolológ (1-4bp) szakasz áll rendelkezésre.

Neurofibromatózis

A genotípus-fenotípus összefüggések feltárása érdekében összehasonlítottuk betegeink klinikai jellemzőit a mikrodeléciós és intragenikus NF1-es betegekről publikált adatokkal. Figyelemre méltó különbséget figyeltünk meg számos manifesztációban, mint például a dysmorphiás jellegzetességek, a subcutan neurofibromák, a csontrendszeri anomáliák, és a tanulási és magatartási problémákban. Bár jelentős különbségeket ismertünk fel bizonyos klinikai jellemzőkben a korábban publikált nagy NF1 mikrodelécióval rendelkező esetek és a mi mikrodeléciós betegeink között, érdemes megemlíteni, hogy egyes manifesztációk életkorfüggők.

A dysmorphiás jellegzetességek különösen az 1. típusú delécióval rendelkező egyéneknél figyelhetők meg, amelyet alátámaszt, hogy a betegcsoportunkban az érintett egyének 67%-a rendelkezik ezzel a jellegzetességgel.

A nagy kezek és lábak a mi betegcsoportunkban kissé nagyobb gyakoriságot mutattak (67%) a korábban kimutatott 46%-os arányhoz képest. Korábbi tanulmányok a neurofibromák korai megjelenését állapították meg az NF1 mikrodeléciós betegek körében. Amellett, hogy a mi betegeinknél és másoknál megfigyelt közel azonos gyakorisággal (58%, illetve 76%) észleltek subcutan neurofibromákat, a mi betegeinknél a cutan vagy plexiform neurofibromák előfordulása jóval alacsonyabb volt a többi betegcsoportéhoz képest (8% vs. 86%, 17% vs. 76%). A subcutan neurofibromákkal rendelkező betegeknél nagyobb a kockázata az MPNST kialakulásának, a plexiform neurofibromák jelenléte pedig magában foglalja a rosszindulatú daganat

kialakulásának kockázatát. Az 1. típusú betegeinknél gyakrabban találtunk jelentős késést a kognitív fejlődésben, de az értelmi megkésettség előfordulása kevésbé volt kifejezett.

Az 1-es típusú deléción tizennégy fehérjekódoló gént és négy mikroRNS-gént rejt. Egyes NF1-gyel együtt deletált gének kaploinsufficienciája befolyásolhatja bizonyos klinikai manifesztációkat, és hozzájárulhat a betegség súlyosságához. A korábbi esetekkel ellentétben a mi 2-es típusú betegünk fenotípusában nem fordultak elő tanulási és magatartási problémák, szív-, és érrendi manifesztációk, szeplősödés, az ízületek hiperhajlékonysága és külsőleg megfigyelhető neurofibromák. Érdekes módon az egész klinikai képet a csontrendszeri anomáliák uralják.

Az NF1 mikrodelációval rendelkező betegek mintegy 8-10%-ánál figyelhető meg atipikus deléción. Ezek heterogén csoportot alkotnak különböző lokalizációjukkal és érintett méretükkel, valamint a bemutatott változatos klinikai képpel. Betegcsoportunkban magasabb gyakoriságot (23%) figyeltünk meg, és csak egy betegnél mutatkozott mozaikosság. Kutatásunk során három különböző, újszerű deléciót találtunk. Az NF1 mikrodelációk jellegzetes ismertetőjegyei, mint az arc dysmorphiája, az arc aszimmetriája, a nagy kezek és lábak, valamint a durva arc az eddig azonosított atipikus esetek legalább felénél jelentkeztek. A mi betegcsoportunkban azonban csak egy betegnél fordult elő arcdysmorphia, egy másiknál pedig hipertelorismus. Neuropszichológiai megnyilvánulások nem voltak tapasztalhatók a mi betegeinknél, csak egy betegnél mutatkozott jelentős késés a kognitív fejlődésben.

Korábbi tanulmányok szerint az NF1 mikrodelációval rendelkező betegeknél alacsonyabb kognitív képességet mutattak ki az intragenikus mutációval rendelkező betegekhez képest. Az *RNF135* és az *OMG* gének együttes deléciónja feltehetően szerepet játszik a csökkent kognitív képesség kialakulásában. Az *OMG*-t, amely fontos szerepet játszik a korai agyfejlődésben, összefüggésbe hozták bizonyos neuropszichiátriai rendellenességekkel és az értelmi fogyatékoság progressziójával. Az *RNF135*-t és az *OMG*-t magában foglaló betegeink azonban alig mutattak neuropszichiátriai tüneteket, így további tényezők is szükségesek lehetnek ezen megnyilvánulások kialakulásához NF1 mikrodelációval rendelkező betegeknél.

A 17q11.2 régióban több gén (*ATAD5*, *COPRS*, *UTP6* és *SUZ12*) is feltételezhetően részt vesz a tumorigenezisben, ezért a magas tumorterhelés fokozott kockázatáért ezek is felelősek lehetnek.

Következtetés

1. Az NF1 mikrodéláció három típusát (1. típusú, 2. típusú és atípusos) azonosítottuk NF1-es betegcsoportunkban. A kimutatott 17 mikrodéláció közül összesen tizenkét 1-es típusú (~70%), egy 2-es típusú (~6%) és négy atípusos deléciót (~24%) azonosítottunk. Három különböző új atípusos deléciót és egyetlen 3. típusú mikrodélációt sem észleltünk.
2. A betegeink körében végzett genotípus-fenotípus elemzések kimutatták, hogy a specifikus klinikai manifesztációk, mint például dysmorph arcvonások, macrocephalia, nagy kezek és lábak, késleltetett kognitív fejlődés és/vagy tanulási nehézségek, beszédzavarok, subcutan neurofibromák és túlnövekedés jellemzőek az 1. típusú NF1 mikrodélációval rendelkező betegcsoportra. A nem-mozaikos, 2. típusú *NF1* nagy delécióban szenvedő betegünknel az NF1 mikrodélációban megfigyelhető tipikus klinikai tünetek közül csak néhányat észleltünk: macrocephalia, nagy kezek és lábak, valamint tanulási nehézségek, továbbá az atipikus NF1 mikrodélációban szenvedő betegünknel arc dysmorphiája, a subcutan neurofibromák jelenléte, késleltetett kognitív fejlődés és macrocephalia volt megfigyelhető.
3. Megfigyeltük, hogy az *NF1* nagy delécióval rendelkező betegek súlyosabb klinikai fenotípust mutattak az intragenikus NF1 mutációval rendelkező egyénekhez képest, ami valószínűleg az érintett gén tartalmának és/vagy más szabályozó DNS-elemek elvesztésének köszönhető.
4. Az irodalmi adatok és eredményeink segítségével kimutattuk, hogy a nagy különböző CNV-k gyakran társulnak súlyos kardiovaszkuláris manifesztációkkal Marfan-szindrómában.
5. Feltételeztük, hogy a súlyos kardiovaszkuláris tünetek és az *FBN1* gén nagy deléciói közötti összefüggés található, és megállapítottuk, hogy a szabályozó elemek érintettsége (a STAT3 transzkripció kötőhelyének hiánya) szerepet játszhat a kardiovaszkuláris tünetek kialakulásában.
6. Az *FBN1* génben észlelt nagy deléció töréspontjainak jellemzése egy 4916 nukleotid hosszú deléciót mutatott, amely kiegészült egy TG-dinukleotid inszercióval. Korábbi modellek és bioinformatikai elemzés segítségével azt javasoltuk, hogy a nagy delécióért egy ritka mechanizmus, az úgynevezett mikrohomológia által közvetített törés indukált replikáció lehet a felelős.

A szakdolgozat alapjául szolgáló tanulmányok

1. Genotype-Phenotype Associations in Patients With Type-1, Type-2, and Atypical NF1 Microdeletions

G Büki, A Zsigmond, M Czakó, R Szalai, G Antal, V Farkas, G Fekete, D Nagy, M Széll, Tihanyi, B Melegh, K Hadzsiev, Judit Bene

Frontiers in Genetics 2021 Jun 8;12:673025. doi: 10.3389/fgene.2021.673025. eCollection 2021.

Impact factor: 4.772

2. Microhomology-Mediated Break-Induced Replication: A Possible Molecular Mechanism of the Formation of a Large CNV in FBN1 Gene in a Patient with Marfan Syndrome

G Buki, K Hadzsiev, J Bene

Current Molecular Medicine April 2022 DOI: 10.2174/1566524022666220428111943

Impact factor: 2.616

3. Neurofibromatosis-1 microdeletiós szindróma: Molekuláris genetika és klinikai heterogenitás

G Buki, A Till, A Zsigmond, J Bene, K Hadzsiev

Orvosi Hetilap 2022; 163(51): 2041–2051. DOI:10.1556/650.2022.32673

Impact factor: 0.707

Summed impact factor: 8.095

4. Potential association between large FBN1 deletions and severe cardiovascular phenotype in Marfan syndrome due to probable tissue specific enhancers abolishment

G Buki, R Szalai, A Pinter, K Hadzsiev, B Melegh, T Rauch, J Bene

Under publication

Impact factor: -

Egyéb közlemények

1. Identification, presence, and possible multifunctional regulatory role of invertebrate gonadotropin-releasing hormone/corazonin molecule in the great pond snail (*Lymnaea stagnalis*)

I Fodor, Z Zrinyi, R Horváth, P Urbán, R Herczeg, G Büki, J M Koene, P-S Tsai, Z Pirger

Gen Comp Endocrinol. 2020 Dec 1;299:113621. doi: 10.1016/j.ygcen.2020.113621. Epub 2020 Sep 20.

Impact factor: 2.63

2. Revealing the impact of the Caucasus region on the genetic legacy of Romani people from genome-wide data

Z Bánfai, V Ádám, E Pöstyéni, G Büki, M Czakó, A Miseta, B Melegh

PLoS One. 2018 Sep 10;13(9):e0202890. doi: 10.1371/journal.pone.0202890. eCollection 2018.

Impact factor: 3.24

3. A rare form of ion channel gene mutation identified as underlying cause of generalized epilepsy

Á Till, R Szalai, M Hegyi, E Kövesdi, G Büki, K Hadzsiev, B Melegh

Orv Hetil. 2019 May;160(21):835-838. doi: 10.1556/650.2019.31404.

Impact factor: 0.41

4. Genome-Wide Marker Data-Based Comparative Population Analysis of Szeklers From Korond, Transylvania, and From Transylvania Living Non-Szekler Hungarians

V Ádám, Z Bánfai, K Sümegi, G Büki, A Szabó, L Magyar, A Miseta, M Kásler, B Melegh

Front Genet. 2022 Mar 28;13:841769. doi: 10.3389/fgene.2022.841769. eCollection 2022.

Impact factor: 4.599

Summed impact factor: 10,879

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megragadni az alkalmat, hogy köszönetemet fejezzem ki mindazoknak, akiknek a segítségével hozzájárult doktori munkámhoz.

Elsősorban hálás vagyok témavezetőmnek, Dr. Bene Juditnak, aki bátorított és segített abban, hogy bekerüljek a Pécsi Tudományegyetem Orvostudományi Kar Interdiszciplináris Orvostudományi Doktori Iskolájába. Végig figyelemmel kísérte és irányította szakmai tevékenységemet. Kezdetől fogva támogatott és kiemelkedő szakmai tudással és tapasztalattal látott el.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Melegh Béla professzor úrnak, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy az Orvosi Genetikai Intézetben kezdhessem meg doktori munkámat és mindvégig támogatott. Szintén hálás vagyok Dr. Hadzsiev Kingának a folyamatos támogatásért és segítségnyújtásért.

Külön köszönet az Orvosi Genetikai Intézet munkatársainak, köztük Bánfai Zsoltnak, Szabó Andrásnak, Czakó Márta, Maász Anita, Magyar Lili, Mikó Alexandra, Sümegi Katalin, Szalai Renáta, Till Ágnes, Zsigmond Anna, akik hozzáértő, lelkiismeretes munkájukkal és szakmai tapasztalataikkal segítettek munkámat. Munkámat nem tudtam volna elvégezni az asszisztensek segítségével, akiknek szaktudása felbecsülhetetlen értékű volt a munka során.

Végül köszönettel tartozom családomnak, akik végtelen támogatással lehetővé tették ezt a munkát. Végezetül fontos, hogy köszönetet mondjak Horváth Henriettának a tőle érkező hatalmas türelemért és bátorításért, valamint hasznos tanácsaiért.