

1. Cisztás fibrózis (CF): CFTR gén vizsgálata

A cisztás fibrózis a legtöbb európai populációban mintegy 2500 megszületett gyermekből egyben jelentkezik. A CFTR génnek több mint 1500 különböző mutációja ismert. Laboratóriumunkban közülük a leggyakrabban előforduló 6 mutáció ($\Delta F508$, CFTRdele2,3(21 kb), G542X, R553X, G551D, N1303K) vizsgálatát végezzük rutinszerűen minden betegnél. Ezzel azonban csak a betegek mintegy 70%-ának mutációi válnak ismertté, a többi azonosítatlan marad. A közelmúltban külföldi cégek több különböző, cisztikus fibrózis mutációk kimutatására szolgáló kit-et fejlesztettek ki. Ezek mutációspektrumukban és a kimutatott mutációk számában különböznek. Laboratóriumunk egy olyan kit használatát vezette be, amellyel párhuzamosan 31 mutáció vizsgálható. A bővített vizsgálatot azoknál a betegeknél végeztük el, akiknek az egyik mutációját sikerült azonosítanunk, de a másikat nem, illetve, akiknél az egyik mutációt sem találtuk meg, de a klinikai tünetek alapján a cisztikus fibrózis diagnózisa kétségtelen. Természetesen az igazolt hordozók családalapítása előtt is nagyon fontos a partner legszélesebb spektrumú genetikai vizsgálata a hordozóság megállapítása céljából. Mivel a mutációk nagy száma miatt a hordozóságot kizárni sajnos nem tudjuk, törekszünk arra, hogy annak kockázatát a tőlünk telhető legkisebbre csökkentsük. A beteg gyermek mutációinak azonosítása a szülőpár következő gyermekvállalása esetén lehetőséget ad praenatalis diagnosztikai vizsgálat elvégzésére. Amennyiben a beteg mutációi nem, vagy csak részben azonosíthatók, a mutációelemzésen alapuló praenatalis diagnosztikai vizsgálat egyáltalán nem, vagy csak részben ad információt a magzatnak a betegségben való érintettségéről. A családok döntő többségében ezekben az esetekben is van azonban megoldás. Indirekt úton, ún. mikroszatellita vizsgálat segítségével állapíthatjuk meg, vajon az új terhességben fejlődő magzat érintett-e a cisztikus fibrózis betegségben. A laboratóriumunkban használt két különböző mikroszatellita (IVS17BTA és IVS8CA) a családok 95%-ában informatív. Azokban az igen ritka esetekben, amikor a beteg mutációja laboratóriumunkban nem azonosítható és a mikroszatellita elemzés eredménye sem informatív, de a szülők újabb gyermeket terveznek, nemzetközi együttműködés igénybe vételével tudjuk mégis megadni a családoknak a szükséges segítséget. Betegeink vizsgálatát a berlini Humángenetikai Intézetben (Prof. K. Sperling) illetve a prágai Klinikai Genetikai Intézetben (Dr. M. Macek Jr.) végzik. Saját laboratóriumunkban 2005. évben 87 cisztikus fibrózis (CF) betegségben szenvedő beteg és 32 családtag molekuláris genetikai elemzését végeztük el. 2 esetben végeztünk praenatalis diagnosztikai vizsgálatot. Közülük egy magzat sem bizonyult betegnek. Napjainkban egyre inkább előtérbe kerül a CFTR gén mutációinak azonosítása mellett ún. modifikáló gének hatásának vizsgálata CF betegeknél. A modifikáló

gének hatása lehet a CF tünetegyüttesén belül valamely tünet súlyosabb megjelenése a betegben. Ennek terápiás következményei vannak. Laboratóriumunkban a hemochromatosis két mutációjának (H63D, C282Y) vizsgálatát kezdtük meg CF betegekben. Tapasztalatunk szerint a hemochromatosis valamely mutációját heterozigóta formában hordozó CF betegek gastrointestinalis tünetei jelentősen súlyosabbak azon társaikénál, akik hemochromatosis mutációt nem hordoznak.

2. Congenitális adrenalis hyperplasia (CAH): CYP21 gén vizsgálata

22, pontos klinikai diagnózissal rendelkező congenitális adrenalis hyperplasiás (CAH) beteg és családtagjai (23 személy) CYP21 génjének mutációelemzését végeztük el a 2005. évben, allél specifikus PCR módszerrel. A CYP21 génben előforduló deléción, ill. a 7 leggyakoribb mutáció (8bpDel, P30L, I172N, V281L, R356W, ClusterE6, Q318X, L307insT) azonosítása megtörtént a fenti betegekénél, illetve családtagjaikénál. Hasonló megfontolásból, mint a cisztás fibrózis betegség esetében, bevezettük, illetve beállítottuk a mikroszatellita elemzést. Két, a CYP21 génnel kapcsolatos öröklődő mikroszatellita (62, 82-1) vizsgálatát végezzük. Ez utóbbi módszert azoknál a családoknál alkalmazzuk, amelyeknél direkt mutációelemzéssel nem, vagy csak részben kaptunk eredményt, és várhatóan (pl. a szülők életkorából adódóan) még szeretnének újabb gyermeke(ke)t vállalni. Eddig 10 ilyen családot vizsgáltunk, amelyek mindegyike informatívnak bizonyult mindkettő, de minimum az egyik mikroszatellitára nézve. Ebből következően a jövőben, a kétféle módszer kombinálásával biztonsággal ajánlhatunk fel praenatalis diagnosztikát az azt igénylő családoknak.

3. Glükokortikoid receptor gén (GR) vizsgálata

Bevezettük a glükokortikoid-receptor (GR) gén egyik polimorfizmusának vizsgálatát. A közelmúltban azonosítottak a humán glükokortikoid-receptor génben olyan SNP-eket (single nucleotid polymorphism), melyek módosítják a receptor aktivitását. Az általunk megcélzott, gyakorinak mondható polimorfizmust (AAT/AGT az 1220-as pozícióban) a vizsgált populációban 6%-ban írták le. Randomizált vizsgálatainkkal (kb. 240 egyén) ezt az értéket mi is igazoltuk. A polimorfizmust hordozó egyének klinikailag egészségesek voltak, de érzékenyebbek voltak az exogén glükokortikoidokra, mint a polimorfizmust nem hordozók. Napjainkban az elhízás súlyos népbetegségnek számít a világ legtöbb fejlett országában, így hazánkban is. A fenti GR-polimorfizmus obesitást okoz(hat) felnőttekben, gyermekekről

nincs ilyen adat az irodalomban. Ezért fontosnak tartottuk az ilyen irányú vizsgálatokat gyermekekre is kiterjeszteni. 2005-ben 10 obes gyermekben kerestük az említett GR-polimorfizmust. Ebben az esetben az un. RFLP (restriction fragment length polymorphism) módszerrel dolgoztunk. A vizsgálatok 2006-ban is folytatódnak. Az adatok, eredmények elemzése folyamatban van. Ennek szempontjai: a polimorfizmust hordozó obes gyermekek minél több szintű összehasonlítása a polimorfizmust nem hordozóakkal, illetve ennek segítségével terápia, esetleg preventív megoldások keresése.

4. Fabry betegség: alfa-galaktozidáz gén vizsgálata

8, Fabry betegségben érintett beteg és 6 családtag (összesen 14 fő) esetében történt enzimaktivitás vizsgálat és molekuláris genetikai vizsgálat annak érdekében, hogy a Fabry betegség molekuláris genetikai hátterének tisztázásával a klinikai tünetek alapján felállított diagnózist alátámasszuk. A betegekből és hozzátartozóikból vettük a plazmát, DNS valamint RNS izolálás történt. A klinikai diagnózis igazolása a vérplazmából történt az alfa-galaktozidáz enzim aktivitásának meghatározásával, fluoreszcensen jelölt, mesterséges szubsztrát felhasználásával. A detektálás fluoriméteren történt. Ezt követte az RNS és DNS mintákból a betegség hátterében álló mutáció azonosítása az alfa-galaktozidáz gén direkt szekvenálásával. Munkánk eredményeképpen 4 új, eddig nem publikált mutációt tudtunk detektálni. A családtagok vizsgálata során 3, már nem élő rokon paraffinos blokkjaiból nyert DNS mintán sikerült a betegségért felelős mutációt azonosítani és igazolni a betegség öröklődését a családon belül. Mivel a fiúk hemizigóták az alfa-galaktozidáz génre nézve, így ha anyjuktól egy hibás allélt hordozó X kromoszómát kapnak, az a betegség korai manifesztációját okozza. A lányok esetén egy hibás allél kissé csökkent enzimaktivitást eredményez, ami miatt a heterozigóta nők esetén a betegség manifesztációja jóval későbbi, és enyhébb lefolyású. Ezért van nagy jelentősége annak, hogy a beteg mutációjának azonosításával lehetőség nyílik a prénatalis diagnosztikai vizsgálat elvégzésére a gyermeket vállaló betegek, valamint genetikai vizsgálattal előzetesen igazolt hordozó családtagok esetén. Országos felmérést követően megkezdtük a magyarországi Fabry-betegséggel diagnosztizált betegek nyilvántartásba vételét. A Fabry betegség esetén lehetőség van az enzimpótlásra, és ezáltal a csökkent enzimaktivitás következtében kialakuló szövődmények megelőzésére. Klinikánk gondozásában két beteg részesül Fabrazyme (agalsidase beta) enzim kezelésben.

5. Veleszületett sükettség: GJB2 gén vizsgálata

Bevezetésre került az un. nem-szindrómás, recesszív módon öröklődő, veleszületett sükettség kialakulásáért leginkább felelős GJB2 gén mutációinak vizsgálata. A GJB2 gén egy connexin 26 nevű fehérjét kódol, ami a cochlea szőrsejtjeinek nátrium transzportjában játszik szerepet. Ez a gén a 13. kromoszóma hosszú karján található. A GJB2 génben a 35delG nevű mutáció a leggyakoribb, halláskárosodást okozó génelváltozás. Ennél a mutációnál a 30-35-ös pozícióban az egyik guanin deléciója megy végbe, ez egy stop kodon képződéséhez vezet, melynek következtében a fehérje transzkripció megszakad, és a sejtek közötti jelátvitel sérül. A betegség gyakorisága: 1000 újszülött közül 1.

A genetikai vizsgálat eredménye lehetőséget nyújt a cochlearis implantátum minnél korábbi műtéti alkalmazására, hiszen a beszédtanulás és beszédértés szempontjából az életkornak nagy jelentősége van, így az érintett gyerekeknek lehetősége van időben megtanulni kommunikálni, életminőségük, társadalomba való beilleszkedési képességük a hallóékhöz hasonló lehet.

Eddig 86 beteg és 45 szülő vizsgálatát végeztük el, ebből 44 betegnél találtuk meg a betegség kialakulásához vezető mutációt.

Szignifikáns hasonlóság mutatkozik a mutáció és a halláskárosodás kialakulásának ideje között.

6. Biobank

Magyarország első, gyermekgyógyászati profilú, itt létrehozott DNS bankja napjainkra mintegy hatezer személy DNS mintáját őrzi. Számuk 2005. év folyamán 698 személy DNS mintájával gyarapodott. Jelenleg közel 6,650 mintával rendelkezünk. Ezek egy részénél ma még nincs lehetőségünk a génhiba megállapítására, de a minta őrzése nagy jelentőségű lehet a jövő generációk számára egy esetleges későbbi genetikai vizsgálat során.

7. Nemzetközi együttműködés

A cisztikus fibrózis gén vizsgálat minőségbiztosítását az alábbi nemzetközi együttműködés keretében végezzük: „The European Thematic Network for CF is a European project of the 5th Framework” program. 2004-től laboratóriumunk tagja az Eurogentest nemzetközi programnak.