

Molekuláris genetikai vizsgálatok primer immundefektusokban

Erdős Melinda dr.

¹Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Infektológiai és Gyermekeimmunológiai Tanszék, Debrecen

²St. Giles Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, The Rockefeller University, New York, NY, Amerikai Egyesült Államok

Mottó:

Ha nem ismered a tűt, nem találsz rá a szénakazalban.

Az új generációs szekvenálási módszerek a molekuláris genetikai diagnosztika legújabb korszakát jelképezik. A szerző a primer immundeficienciákról írt általános bevezetőt követően összefoglalja a molekuláris genetikai vizsgálatok, különösen az új generációs szekvenálás jelentőségét a primer immundeficienciák diagnosztikájában. A közlemény célja továbbá, hogy rövid történeti áttekintésen keresztül megismertesse az új generációs szekvenálás módszertani alapjait. A szerző összehasonlítva elemzi a primer immundeficiencia génpanel-szekvenálás, valamint a teljesexom- és a teljesgenom-szekvenálás előnyeit és hátrányait. Összefoglaló táblázatban kerülnek bemutatásra az új generációs szekvenálásnak köszönhetően eddig felismert primer immundeficiencia gének és betegségek. A szerző végül részletesen ír arról, hogy primer immundefektusokban a génszintű diagnosztika miért nem nélkülözhető, és bemutatja a Magyarországon korábban elért eredményeket.

Orv Hetil. 2018; 159(49): 2095–2112.

Kulcsszavak: primer immundeficiencia, új generációs szekvenálás, molekuláris genetikai

Molecular genetic studies in primary immunodeficiencies

Next generation sequencing methods represent the latest era of molecular genetic diagnostics. After a general introduction on primary immunodeficiencies, the author summarizes the importance of molecular genetic studies, especially next generation sequencing in the diagnosis of primary immunodeficiencies. Another purpose of the manuscript is to give a brief summary on the methodological basis of next generation sequencing. The author analyzes the advantages and disadvantages of primary immunodeficiency gene-panel sequencing and whole-exome and whole-genome sequencing. Primary immunodeficiency genes and diseases recognized by next generation sequencing is also summarized. Finally, the author emphasizes the indispensability of gene level diagnostics in primary immunodeficiencies and presents the results achieved in this field in Hungary.

Keywords: primary immunodeficiency, next generation sequencing, molecular genetics

Erdős M. [Molecular genetic studies in primary immunodeficiencies]. Orv Hetil. 2018; 159(49): 2095–2112.

(Beérkezett: 2018. június 5.; elfogadva: 2018. július 7.)

Rövidítések

AD = autoszomális domináns; AF = (allele frequency) allél frekvencia; AID = (activation-induced cytidine deaminase) aktiváció-indukált citidin deamináz; APECED = autoimmun polyendocrinopathia, candidiasis, ectodermalis dystrophia; AR = autoszomális recesszív; CADD = (combined annotation dependent depletion) kombinált annotáció-függő depléción (egy nukleotidot érintő változások, inszerciók és deléción károsító hatásának meghatározására szolgáló módszer, amely több vizs-

gálómódszer eredményeit integrálja egy számértékbe); CD = (coverage depth) lefedettség mélység; CGD = (chronic granulomatous disease) krónikus granulomás megbetegedés; CNV = (copy number variation) kópiaszám-variáció; DNS = dezoxiribonukleinsav; FISH = fluoreszcens *in situ* hibridizáció; GDI = (gene damage index) génkárosodási index; GOF = (gain-of-function) funkciónyerő mutáció; GQ = (genotyping quality) genotipizálási minőség; HTP = (high-throughput) nagy át-eresztőképességű; Ig = immunoglobulin; IPEX = immundiszre-

guláció, polyendocrinopathia, enteropathia, X-hez kötött; IUIS = (International Union of Immunological Societies) Immunológiai Társaságok Nemzetközi Szövetsége; LOF = (loss-of-function) funkcióvesztő mutáció; MPS = (massively parallel sequencing) masszív parallel szekvenálás; MRR = (minor read ratio) legkisebb olvasási arány; MSC = (mutation significance cutoff) szignifikáns mutáció küszöbérték (a várható legalacsonyabb, klinikailag/biológiailag még releváns CADD-érték egy adott gén esetében); NGS = (next generation sequencing) új (következő) generációs szekvenálás; PCR = (polymerase chain reaction) polimeráz-láncreakció; PID = (primary immunodeficiency) primer immunodeficientia; PIDD = (PID disorder) PID-betegség; RAG1 = recombination activating gene 1; RC = (read coverage) olvasási lefedettség; SCID = (severe combined immunodeficiency) súlyos kombinált immunodeficientia; SDS = (Shwachman–Diamond syndrome) Shwachman–Diamond-szindróma; SMRT = (single molecule real-time) egymolekulás, valós idejű; WAS = Wiskott–Aldrich-szindróma; WES = (whole-exome sequencing) teljesexom-szekvenálás; WGS = (whole-genome sequencing) teljesgenom-szekvenálás; WHIM = (warts, hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis) szemölcsök, hypogammaglobulinaemia, infekciók, myelokathexis; WHO = (World Health Organization) Egészségügyi Világszervezet; XLP = (X-linked lymphoproliferative disease) X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív betegség

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) égisze alatt működő IUIS (International Union of Immunological Societies – Immunológiai Társaságok Nemzetközi Szövetsége) legutóbbi, 2017. februárban közzétett klasszifikációja szerint jelenleg 354, genetikailag meghatározott primer immunodeficientia (PID-) betegség ismert, amelyek hátterében 344 különböző gén defektusa igazolható [1, 2]. Az első veleszületett immunhiány-betegség, az X-kromoszómához kötött agammaglobulinaemia felismerése óta (1952, Ogden Bruton amerikai katonaoorvos [3]) eltelt évtizedekben tehát a molekuláris genetika nagy léptékű és lenyűgöző fejlődésének köszönhetően a primer immunodeficientiák jelentős részében a betegség molekuláris genetikai háttere és patomechanizmusa tisztázható volt. Az immunodeficientiák molekuláris genetikai kutatása területén tapasztalható hatalmas fejlődés ellenére azonban maradtak kihívások.

A primer immunodeficientiákról általában

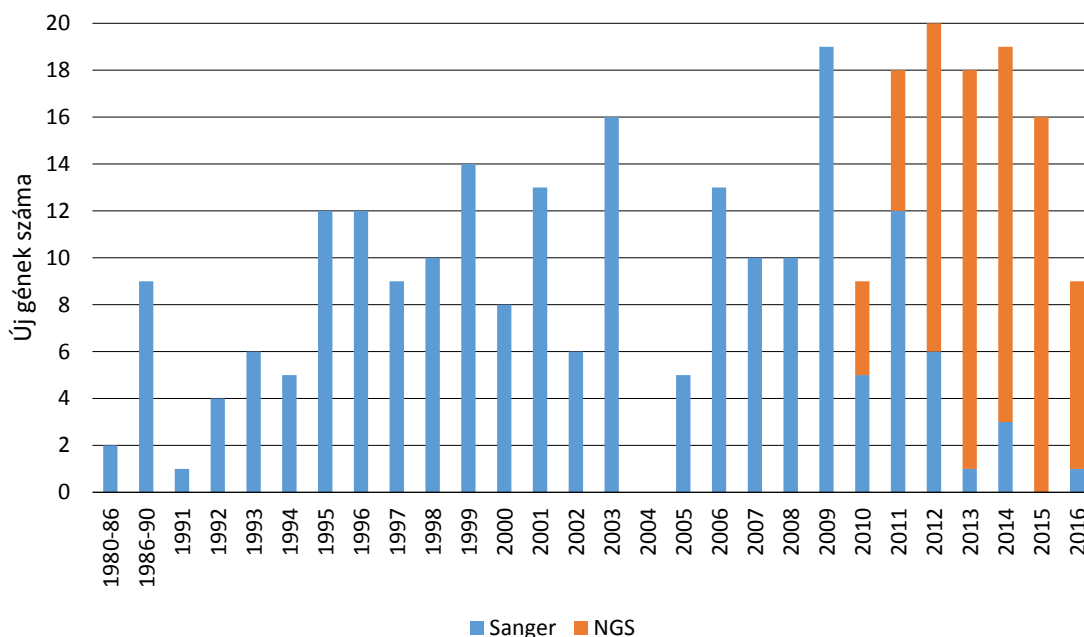
A veleszületett immunhiány-betegségek az immunitás monogénesen öröklődő defektusai, amelyekben a következők legalább egyike fenotípusosan is kifejeződik: fertőzés, autoimmunitás, autoinflammatio, allergia és tumor [4–6]. A legtöbb PID változó expresszivitással és gyakran inkomplett penetranciával jellemezhető, így a PID-betegségek klinikailag rendkívül heterogén körkép. Az immunodeficientiák egy része a típusos klinikai tünetek és a jellegzetes kórokozóspektrum alapján egyértelműen felismerhető, az esetek nagyobb százalékában azonban az immunodeficientiák tünettanában átfedések észlelhetők. A diagnózis megállapításához sokszor a

részletes anamnézis, a fertőzések etiológiájának, lefolyásának, típusának, lokalizációjának gondos elemzése, az ismételt elvégzett fizikális vizsgálat, a rutin laboratóriumi vizsgálatok és az *in vivo* és az *in vitro* immunológiai tesztek elvégzése sem elegendő; az immunhiányos állapotok idejekorán történő felismeréséhez genetikai vizsgálatra is szükség van. Az egyes immunhiány-betegségek ritkák, ugyanakkor összességükben gyakoriak [7, 8]. Jelenleg az immunitás veleszületett zavarával járó betegségeket az alábbi csoportokra osztjuk:

- 1) kombinált immunodeficientiák,
- 2) kombinált immunodeficientiák szindrómajellelkel,
- 3) antitestdeficientiák,
- 4) immundiszregulációs szindrómák,
- 5) phagocytadefektusok,
- 6) a természetes immunitás veleszületett zavarai,
- 7) autoinflammációs betegségek,
- 8) komplementdeficientiák.

Azon PID-ek esetében, amelyekben a molekuláris genetikai háttér már 2010 előtt, vagyis az új generációs szekvenálási (next generation sequencing, NGS) érárt megelőzően tisztázható volt, döntő többségben (több mint 230 PID-génről van szó) a Sanger-szekvenálásnak volt köszönhető a diagnózis [9]. Elenyésző számban más molekuláris genetikai vizsgálati módszer segítségével volt azonosítható a betegséget okozó gén. Ennek legismertebb példája talán a FISH- (fluoreszcens *in situ* hibridizáció) technika alkalmazása Di George-szindróma esetében. Napjainkban, ha az NGS-technika hozzáférhető, a PID első diagnosztikus lépéseként ennek alkalmazása javasolt, míg a Sanger-féle szekvenálás már csak a diagnózis megerősítésére szolgál. A Sanger-féle szekvenálás kutatási célokra történő felhasználása mint első megközelítés szintén elavulttá vált. Ez a technika csak azon ritka esetekben marad diagnosztikai módszer, amikor a beteg fenotípusa egy jól meghatározott genotípusra specifikus. Mindezek miatt a közlemény a génszekvenálás történetének és különböző módszertani lehetőségeinek bemutatására fókuszál, és eltekint a génszekvenáláson kívül esetlegesen alkalmazható további molekuláris genetikai vizsgálati módszerek bemutatásától, mivel azoknak a PID-diagnosztikában nem volt számottevő, jelenleg pedig nincs gyakorlati jelentőségük.

A molekuláris genetikai vizsgálati módszerek robbanásszerű fejlődése ellenére még mindig jelentős azon betegek száma, akikben az immunhiányos állapot klinikailag és laboratóriumiilag egyértelmű, de a genetikai diagnózis nem ismert. Az NGS-eljárások ezekben az esetekben rendkívül hatékony eszközt jelentenek a betegségek genetikai azonosításában. Az ezredfordulót követően és különösen 2010-től kezdődően az NGS nagymértékben hozzájárult az újonnan leírt, illetve a már ismert PID-fenotípusok genetikai hátterének megismeréséhez (1. ábra). A különböző génszekvenálási technológiákról jó áttekintést ad két közelmúltban megjelent magyar nyelvű összefoglaló is [10, 11].



1. ábra

A Sanger-féle szekvenálás és az NGS segítségével felismert PID-gének számának változása 1980-tól

A diagram jól érzékelteti az NGS térhódítását a már klasszikusnak mondható Sanger-féle szekvenálással szemben. Látható, hogy 2010-től a Sanger-féle szekvenálás fokozatosan átadta helyét az új generációs technikáknak (2004-ben nem volt felismert új gén)

NGS = új generációs szekvenálás; PID = primer immundeficiencia

A génszekvenálás fejlődése

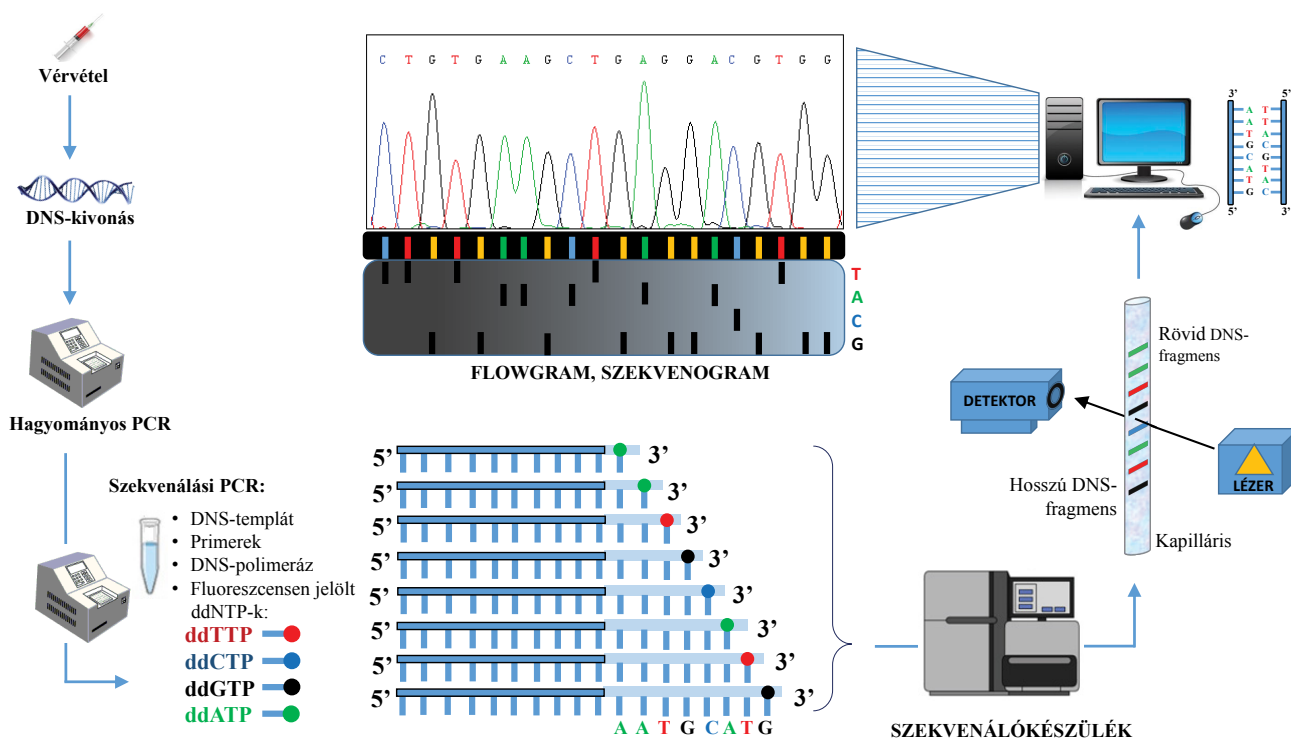
Első generációs szekvenálási módszerek

A DNS nukleotidsorrendjének meghatározása, vagyis a génszekvenálás időrendben első, meghatározó jelentőségű módszere az úgynevezett Sanger-féle klasszikus láncterminációs módszer volt, amelynek kifejlesztéséért *Frederick Sanger* 1980-ban megkapta második Nobel-díját (2. ábra) [12]. Az eredeti sangeri DNS-szekvenálási módszer a DNS-szintézis során radioaktívan jelölt didezoxinukleotidokat használt, a különböző hosszúságú DNS-fragmentek elválasztása pedig gélelektroforézissel történt. Autoradiográfiai előhívást követően, körülbelül egy nap múlva manuálisan történt a DNS-szekvenancia leolvasása. A módszer legnagyobb hátrányát az jelenti, hogy a leolvasási bázishossz korlátozott, egyszerre csak 500–600 bázis detektálható. Az 1980-as években vezették be a DNS-bázisok eltérő színű fluoreszcens jelölését, a gélelektroforézis után kapott kromatogramból pedig már számítógép segítségével történt a szekvenancia meghatározása [13]. Az 1990-es években a bázisspecifikus terminációval lehetővé vált az úgynevezett sokciklusos szekvenálás, a kapillárislektroforézis-technika kifejlesztésével pedig megoldhatóvá vált igen kis DNS-mennyiség rövid idő alatt történő szétválasztása, így nőtt a leolvasható bázisszám (1000 bázis/80 perc) [14, 15] (2. ábra). A DNS-szekvenancia-adatok feldolgozásához szükséges számítógépes szoftverek fejlődésével egyre nagyobb teljesítményű, a szekvenancia leolvasását automatikusan végző génszekvenáló készülékek jelentek meg.

A kezdeti egycsatornás automata génszekvenálóktól a technikai fejlődés elvezetett a 32–48 csatornás készülékekig, amelyekkel már akár 800 bázishosszúságú DNS-szakaszok szekvenálhatók voltak. Az úgynevezett piro-szekvenálási eljárásnak köszönhetően 1996-tól már lehetőség volt valós idejű szekvenálásra is [16]. A biolumineszcencián alapuló piro-szekvenálás során a DNS-t építő polimeráz enzim aktivitását valós időben mérik. A nukleotidok DNS-száiba történő beépülésekor pirofoszfát szabadul fel, amelynek mennyisége a kapcsolt enzimreakciókat követő fénykibocsátás révén mérhető. Mivel fényjelenség csak komplementer nukleotid beépülése esetén észlelhető, a rendszerhez pedig egyszerre csak egyféle nukleotidot adnak, meghatározható, hogy éppen milyen nukleotid épült be a DNS-láncba. Az eljárás diagnosztikus korlátja hasonló a Sanger-féle módszeréhez, azaz hosszabb DNS-lánccok nem szekvenálhatók. A Sanger-féle láncterminációs módszert és a kezdeti piro-szekvenálási eljárást nevezik első generációs szekvenálási módszereknek is.

Új generációs szekvenálás, második generációs szekvenálás

Az időrendben a Sanger-féle láncterminációs módszert és a kezdeti piro-szekvenálást követően kifejlesztett eljárásokat nevezzük összefoglalóan NGS-nek. A különböző NGS-eljárásokban közös, hogy egyszerre több százmillió, előzetesen clonalisan amplifikált DNS-szakaszt képesek párhuzamosan (masszívan) szekvenálni, így rövid idő



2. ábra Fluoreszcens, automatizált Sanger-szekvenálás

Hagyományos PCR: A DNS kivonását a DNS bizonyos szakaszainak specifikus amplifikációja követi, amelyet polimeráz-láncreakciónak (polymerase chain reaction, PCR) nevezünk. A PCR során hőstabil DNS-polimeráz enzimet használnak, amely csak kétszálú DNS-hez tud hozzákötődni. Az egyszálú DNS egy rövid, körülbelül 10–20 bázisnyi szakaszához ezért 10–20 bázisnyi komplementer oligonukleotidot, úgynevezett primert kötnek, létrehozva egy rövid, kétszálú DNS-szakaszt, amelyhez az enzim már kötődhet. Primerpárok segítségével meghatározható, hogy a teljes genomias DNS mely szakasza sokszorozódják meg. Az enzim bizonyos funkciói csak adott, viszonylag szűk hőmérsékleti skálán működnek, így a hőmérsékleti értékek ciklusos változtatásával újra meg újra megduplázódik a lemásolandó DNS-szakasz, ezáltal többmilliószorosára sokszorosítva azt.

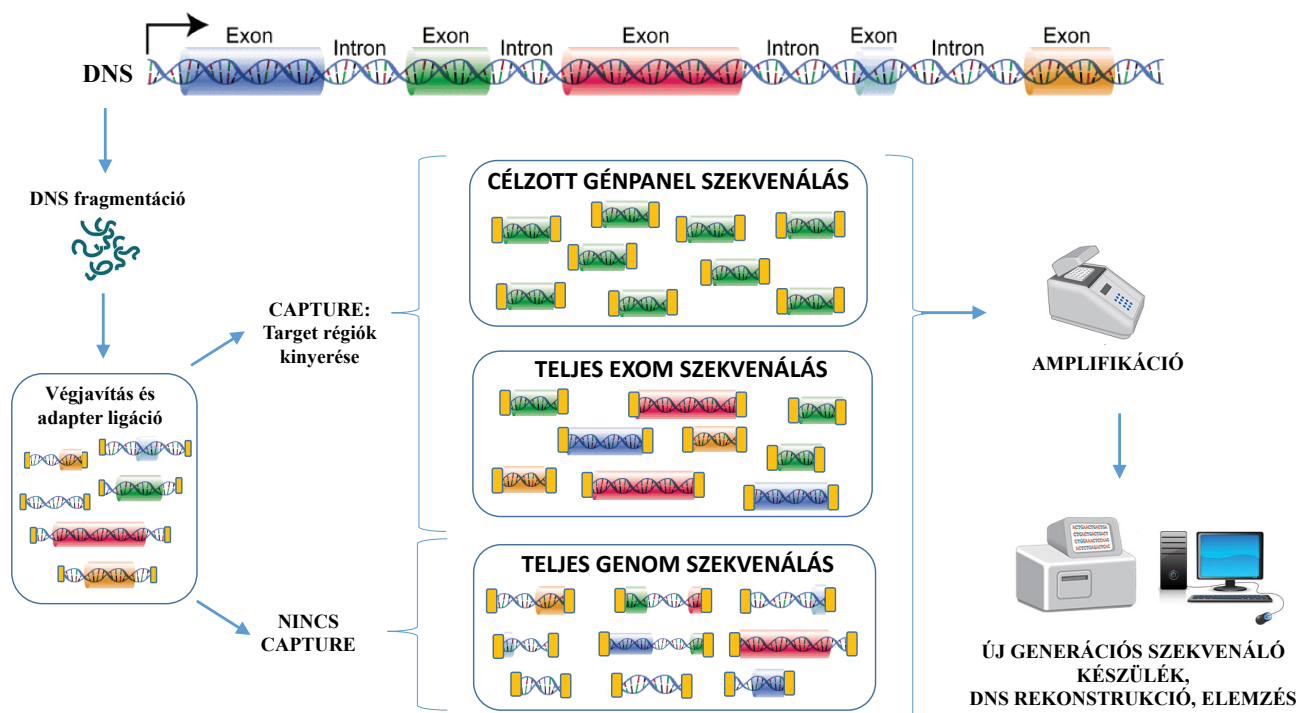
Szekvenálási PCR: A reakcióhoz a hagyományos PCR során felamplifikált kétszálú DNS-szakaszra van szükség. A reakcióelegyhez a primerpárnak csak az egyik tagját adják, így ebben a reakcióban csak egyszálú DNS-szakaszt sokszoroznak meg. Ehhez a DNS-polimeráz enzim mellett a normál dNTP-k mellé fluoreszcens festékkel jelölt ddNTP-eket is adnak, amelyek véletlenszerűen beépülnek az új szálba leállítják a polimerizációt (lánctermináció). A négy különböző nukleotidot négy eltérő fluoreszcens festékkel jelölik (A-T, C-G), ezáltal olyan, eltérő hosszúságú másolatokat kapunk, amelyek 3' végén jelölt és így azonosítható nukleotid található.

Szekvenálás: Az eljárás a DNS-minta bázissorrendjének meghatározására szolgál. Ehhez a szekvenálási reakció során amplifikált és a végén fluoreszcens festékkel jelölt egyszálú DNS-termékekre van szükség. A kapillárisban a különböző hosszúságú DNS-szakaszok az elektrokinetikus injekció hatására a katódtól az anódig haladnak hosszuk szerint elkülönülve (lefelől a rövidebb, a „sor” végén a leghosszabb DNS-szakaszok haladnak). Amikor a nukleotidok elérik a detektorablakot, a készülék által kibocsátott lézersugár hatására a festék emittált fluoreszcenciája egy kamera segítségével detektálható. A keletkező fluoreszcens képet a számítógépes szoftver a végső szekvenációvá dekódolja: minden fluoreszcens sávban (adatpontban) a fluoreszcencia hullámhossza alapján a bázis megnevezhető. A Sanger-szekvenálás kifejezetten lassú és drága az újabb módszerekhez képest, ugyanakkor megbízhatósága jól ismert

dNTP = dezinukleotid-trifoszfát; ddNTP = didezinukleotid-trifoszfát

alatt rendkívül nagy mennyiségű adatot képesek előállítani, azaz nagy áteresztőképességűek (high-throughput, HTP). Az angol irodalomban az NGS-t nevezik mély szekvenálásnak (deep sequencing), masszív parallel szekvenálásnak (massively parallel sequencing, MPS) és második generációs szekvenálásnak (second generation sequencing) is. A párhuzamos feldolgozásnak köszönhetően a módszer gyors, az időegység alatt leolvasható bázisok száma egyre nő (több ezer bázis/másodperc), vagyis a végteljesítmény nagyobb. Az NGS a korábbi technológiákhoz képest költséghatékonyabb bázissorrend-meghatározást tesz lehetővé, a fajlagos költség pedig fokozatosan csökken. Míg egy bázis vizsgálata például 1985-ben még tíz dollárba került, addig az ezredfordulóra ugyanennyi ráfordítással már tízezer bázis volt analizálható. Jelenleg több mint 30 különböző

módszerű NGS-platform érhető el. A szekvenált DNS-szakasz hossza szerint az NGS-technológiákat rövid és hosszú leolvasásokat lehetővé tevő platformokra osztják. Az NGS lehet úgynevezett célzott (targeted, t-MPS [rövid leolvasás]), illetve az egész genomot (whole-genome sequencing, WGS) vagy a teljes exomot, az úgynevezett „transzkriptom”-ot (whole-exome sequencing, WES) átfogó (shotgun, s-MPS [hosszú leolvasás]) szekvenálási reakció (3. ábra). A célzott vizsgálatoknál a szekvenálást megelőzi egy előzetes szelektálási lépés, így csak a számunkra érdekesnek gondolt génszakasz(oka)t vizsgáljuk. A célgénnek számától függően a vizsgálni kívánt génpanel lehet kicsi – ilyen például, ha minden olyan gén, amelyről ismert, hogy immunhiányt okoz, bekerül a vizsgálni kívánt génpanelbe –, de akár az egész exomot felölelően széles is (3. ábra). A hosszú leolvasású NGS-



3. ábra Új generációs szekvenálási technológiák

Új generációs szekvenálás (NGS) esetén a DNS kionása és fragmentációja után a végek javítása (end repair) következik, majd az adott készülettől (platformtól) függő adapterszekvenciák bekötése (ligálása) történik. Teljesgenom-szekvenálás (WGS) esetén a következő lépés az adapterszekvenciákkal kiegészített DNS-molekulák amplifikációja, amelyet a masszív párhuzamos szekvenálás követ. Ezzel szemben a célzott génpanel-szekvenálás és a teljesexom-szekvenálás (WES) esetén a DNS-szekvenálás nem a teljes genomon, hanem annak célzott régióin (az utóbbi esetben az exonokon) történik. A DNS-fragmentációt és az adapterligációt tehát a target régiók kinyerése (úgynevezett „capture”) és azok sokszorosítása követi, amelyet DNS-könyvtár-készítésnek nevezünk. A WES target régiója lényegesen szélesebb, hiszen célpontjai nem konkrét gének, hanem maguk az exonok, így a vizsgálat eredményeként kapott adatmennyiség is sokkal nagyobb lesz. A capture történhet például polimeráz-láncreakcióval, amelynek során olyan egyedi primert használnak, amely a genomban csak egyetlen helyre köthet be, a jelen esetben a target régió elejére vagy végére. A génpanel-szekvenálás és a WES esetében a szekvenálási lépés csak a könyvtárkészítés után következik. A szekvenálás eredményeként többmilliónyi DNS-olvasatot (DNS-fragmentum-szekvenciát, úgynevezett „reads”) kapunk, amelyekből – mint kirakós játék darabjaiból a kép – számítógépes szoftverek segítségével áll össze a teljes szekvencia, amelyen a végső elemzés elvégezhető.

eljárások közé tartozik az úgynevezett félvezető szekvenálási technika (szemikonduktorszekvenálás), amely a piroszekvenálásra emlékeztető elven nyugszik, de nem fény-, hanem protonemissziót mér. A komplementer nukleotid DNS-láncba történő beépülésekor ugyanis hidrogénion szabadul fel, amely pH-mérők segítségével érzékelhető (például *Ion Torrent™*; *Thermo Fischer Scientific*, Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok [USA]). A DNS-fragmentumok clonális amplifikációja a piroszekvenáláshoz hasonlóan emulziós PCR segítségével történik. A rövid leolvasást lehetővé tévő NGS-platformok egyik típusa a szintézisen alapuló szekvenálás, amelynél DNS-polimerázokat és szolid felülethez rögzített, amplifikált DNS-szakaszokat alkalmaznak. A rendszerhez adott, fluoreszcensen jelölt nukleotid beépülését a kötődés után keletkező fluoreszcens jel segítségével detektálják. A festék lemosása után a nukleotid természetes bázisként működik tovább, és a ciklus egy újabb nukleotid beépülésével újraindul (például *Illumina*; San Diego, CA, USA). A rövid leolvasást lehetővé tévő NGS-technológiák másik típusa az úgynevezett ligáción alapuló szekvenálás, amelynél szintén szolid fázisú (híd)amplifikáció segítségével történik a DNS-fragmentumok ampli-

fikációja. Az egyik vagy mindkét végén fluoreszcensen jelölt, két ismert bázisból álló próba a komplementer DNS-szakaszhoz kötődik. A fluoreszcens jel alapján a kötések első és második bázisa meghatározható, a reakció pedig ciklikusan megismételhető (például *SOLID™*; *Thermo Fisher Scientific*).

Harmadik generációs szekvenálás

Az elmúlt évtizedben megjelent az NGS következő generációja. Harmadik generációs az azon szekvenálási technikák tekinthetők, amelyekre a hosszú DNS-leolvasás mellett jellemző, hogy a DNS előzetes amplifikációja nélkül alkalmasak egyetlen molekula detektálására is. Ezek a készülékek a korábbiak teljesítményét jelentősen felülmúlják, a teljesítmény maximalizálása ugyanakkor a költségek és a munkaidő minimalisra szorítása mellett történik. A leolvasás így nemcsak pontos és nagyon gyors, de olcsó is. Az egymolekulás, valós idejű DNS-szekvenálási módszert alkalmazza a *Pacific Biosciences* (Menlo Park, CA, USA) *SMRT* (single molecule real-time) szekvenátora. Az *SMRT* a szintézisen alapuló szek-

venálás elvét követi. A polimeráz enzim aktivitásának vizsgálatához a négy nukleotidnak megfelelően különböző színekkel fluoreszcensen jelölt és mindkét végükön foszforilált nukleotidokat használnak. A DNS-replikáció során a nukleotid beépülésekor a DNS-polimeráz a fluoreszcens, foszforilált véget lehasítja, a gerjesztő fény hatására kibocsátott fényt pedig egy detektor érzékeli. A nagy mennyiségű fluoreszcensen jelölt nukleotidok zavaró háttérfluoreszcenciáját a korábbi szekvenálási módszerek mosási lépésekkel küszöbölték ki, ami jelentősen lassítja a leolvasást, és anyagvesztést is okoz, így növeli a költségeket. A SMRT-módszerhez speciális vizualizálókamrákra van szükség, amelyek lehetővé teszik egyetlen DNS-polimeráz enzim működésének megfigyelését, vagyis egyetlen DNS-molekula valós idejű szintézisének detektálását. A közelmúltban megjelent és a korábbiaktól merőben eltérő *Nanopore* technológia lényege röviden az, hogy a DNS-szálakat egy félvezető lapra kötött nanoméretű fehérjéből álló póruson vezetik át, és a póruson folyó áram erősségéből következtetnek a DNS-szál bázissorrendjére. A molekuláris genetikai fejlődés mindezen vívmányainak köszönhetően 2011-ben már forgalomban voltak olyan szekvenálókészülékek, amelyekkel a humán genomot akár 15 perc alatt meg lehet szekvenálni alig 100 dollár költségen.

Bioinformatikai háttér

Az NGS alkalmazása elképzelhetetlen bioinformatikai háttér és nagy teljesítményű számítógépek, illetve szoftverek nélkül, hiszen az eredményként megkapott óriási adattömeg (például egy teljes genom-szekvencia) csak előzetes bioinformatikai feldolgozást követően válik diagnosztikai vagy kutatási célra további elemzésre alkalmassá. A bioinformatikai feldolgozás során a kapott szekvenciát referenciaszekvenciákhoz hasonlítják (ez az úgynevezett alignment), és az így előszűrt szekvencia az, amellyel a részletes kiértékelés megtörténhet. Az összehasonlításhoz a nyilvános adatbázisokban több mint tízezer referencia-genomszekvencia adatai férhetők hozzá, így szűrhetők ki például a nagy gyakoriságú polimorfizmusok, amelyek valószínűleg nem okoznak betegséget. Minden egyes beteg esetében a kódoló génszakaszokat 10–100-szor kell szekvenálni ahhoz, hogy a valódi DNS-szekvenciavariánsokat biztosan el tudjuk különíteni a polimeráz enzim vagy a szekvenálókészülék működéséből fakadó hibáktól, és azonosítani tudjuk a heterozigóta eltéréseket.

Mutációk azonosítása

A szekvenciavariánsok vizsgálata, ismert vagy addig nem leírt mutációk azonosítása vagy adott esetben új betegségek felismerése – már bioinformatikai segítség nélkül – megfelelő molekuláris genetikai ismeretekkel és kellő gyakorlattal is elvégezhető. Ez az egyik legnehezebb feladat, hiszen a bioinformatikai feldolgozás után

kézhez kapott, többzernyi szekvenciavariánst tartalmazó adathalmazból kell kiválasztanunk az(oka)t a variáns(oka)t, amely az adott beteg esetében betegség- okozó lehet. A közlemény kereteit meghaladja azon filterparaméterek bemutatása, amelyek például a leolvasás minőségi mutatói (például CD = coverage depth, GQ = genotyping quality, MRR = minor read ratio, RC = read coverage) alapján vagy az adott gén (például GDI = gene damage index, MSC = mutation significance cutoff), illetve az adott szekvenciavariáns (például AF = allele frequency, CADD = combined annotation dependent depletion) tulajdonságai alapján próbálnak következtetni a genetikai eltérés súlyosságára, vagyis betegségek okozó voltára.

Az immunológiai hipotézis

A keresés leszűkítésében a számítógépes szűrőmódszerek (úgynevezett filterezés) mellett az immunológiai hipotézisnek legalább ilyen nagy jelentősége van. A jó immunológiai hipotézis három pilléren nyugszik: az öröklés módjának, a klinikai penetranciának (annak valószínűsége, hogy egy adott genotípust hordozó egyén egy adott fenotípust mutat) és az adott betegség genetikai heterogenitásának (különböző gének mutációja ugyanazt a fenotípust okozza) ismerete meghatározó jelentőségű, hiszen a keresési/szűrési stratégiánkat alapvetően ezek határozzák meg.

Funkcionális vizsgálat

A diagnosztikai folyamat következő kritikus és nélkülözhetetlen állomása a kiszűrt szekvenciavariáns betegség- okozó hatásának funkcionális bizonyítása. Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy ma már a legmodernebb „száraz” (szekvenáló-) laboratóriumok sem létezhetnek „nedves” laboratóriumok nélkül, ahol a hagyományos molekuláris genetikai vizsgálómódszerekkel (például Western blot, transzfekció stb.) lehetőség van a szekvenciavariáns kóroki szerepének igazolására. Ez különösen fontos PID esetében, hiszen az eddig azonosított PID-betegségek több mint 20%-a egy beteget érintő vizsgálatokból származik, ami a talált genetikai eltérés validálását jelentősen megnehezíti. Egy beteget érintő új betegségek esetén nincs összehasonlítási alap, nincs másik beteg, akivel a talált klinikai, immunológiai vagy genetikai eltéréseket összevethetnénk. A legegyszerűbb a helyzet akkor, ha a génszekvenálás eredménye egy korábban már leírt, igazolt patogénitáshoz szekvenciaeltérést mutat. A bizonyítási folyamat lehet tehát egyszerű (ez a ritkább), de szükségessé teheti jelentős mennyiségű és időigényű további experimentális vizsgálat elvégzését is, amíg a szekvenálástól eljutunk a végső bizonyításig és a genetikai diagnózis kimondásához. A vizsgálatok során igazolnunk kell, hogy a szekvenciavariáns megszünteti, csökkenti vagy megváltoztatja a géntermék expresszióját vagy funkcióját. Az első lépés minden esetben a feltételezett

variáns hatásának vizsgálata a fehérjeexpresszióra. A csökkent fehérjekifejeződés erős bizonyíték a variáns patogénitása mellett, de nem szükséges vagy elégséges annak kimondásához. A fehérjeexpressziós vizsgálatokat követően a variáns funkcionális hatását egy-egy sejttípusban is demonstrálni kell. Végül, de nem utolsósorban igazolni kell, hogy a megváltozott génfunkció hatással (lehet pozitív, nem csak negatív) van egy PID-hez kapcsolódó biológiai folyamatra. Ha ezek a sejtszintű kísérletek sem szolgáltatnak szilárd bizonyítékot, akkor állatmodelles kísérleteket kell végezni az ok-okozati összefüggések kimutatására. Az egérikísérletek során azonban figyelembe kell venni, hogy a laboratóriumi egerek nem feltétlenül ideális betegségmodellek, mivel beltenyésztettek és erősen kontrollált körülmények között tartottak. Az általánossal gondolttal ellentétben tehát új betegségi gének és/vagy új szekenciavariánsok esetében a molekuláris genetikai diagnosztika nem ér véget a szekvenálással és a genetikai eltérés(ek) azonosításával, hanem hosszú, éveket is igénybe vevő bizonyítási folyamat következik, amíg a talált genetikai eltérés patogénitása bizonyítást nyer.

Génpanel- versus teljesgenom- versus teljesexom-szekvenálás

PID esetében az NGS-alapú technikák – mint a génpanel-szekvenálás, a WES és a WGS – mind a kutatási, mind a diagnosztikai célokra ideálisnak mondhatók, mivel a genetikai pleiotropia (egy adott gén mutációja több különböző fenotípust eredményez) és a genetikai heterogenitás (különböző gének mutációja ugyanazt a fenotípust okozza) különösen jellemzi ezt a betegségecsoportot. Az NGS-technikák azért is célravezetőek, mert még mindig nagy az ismeretlen genotípusú PID-fenotípusok száma, és hasonlóan sok klinikai és/vagy immunológiai fenotípus esetében még nem is sejtjük, hogy a háttérben egy PID-gén mutációja áll [17, 18].

Génpanel-szekvenálás

A génpanel-szekvenálás elviekben egy gyors, első vonalbeli diagnosztikai tesztnak tűnik. Előnye, hogy jelenleg még kevésbé költséges, mint a WES és a WGS, és minimális a véletlen leletek kockázata, hiszen előre meghatározott a vizsgálni kívánt génpaletta (3. ábra). A génpanel-szekvenálás kutatási célokra nem ideális módszer, és számos ok miatt PID-ben a diagnosztikai célú felhasználása sem ideális. 2010 óta átlagosan tíz új PID-betegségi gént fedeztek fel évente. A panelszekvenálás ezzel az óriási „tempóval” nem tud lépést tartani, hiszen ez a panel folyamatosan frissítését igényelné. A génpanelek használata kizárja az új betegségi gének felfedezését is, PID-ben ugyanakkor magas azon betegek száma, akiknél a WES vagy a WGS később új betegségi gént igazol. Félrevezető lehet tehát, ha a klinikus csak a panelben

szereplő génekre fókuszál, miközben a valódi betegségi gének hiányoznak az adott panelből. További hátrány, hogy nincs lehetőség a célterületen kívüli keresésre abban az esetben, ha a vizsgálat mutációt nem igazol. Nem közömbös az sem, hogy a szekvenálás fajlagos költsége WES és WGS esetében folyamatosan csökken, a génpanel-szekvenálásé viszont növekszik. Bár a panelszekvenálás hatékonysága a vizsgált betegpopulációtól és az alkalmazott panelektől függően változhat, nagy esetszámú vizsgálatok alapján a panelszekvenálás a betegek mindössze 15%-ában eredményez genetikai diagnózist [19, 20].

WES és WGS

A PID-kutatás és diagnosztika számára jelenleg a leginkább költséghatékony eljárást a WES jelenti, ugyanakkor a WGS több előnyt kínál. A WGS-nek egyértelmű technikai előnyei vannak a WES-sel szemben, mivel egységes lefedést biztosít, és képes érzékelni az intron és intergenikus mutációkat (3. ábra). Fontos, hogy a WGS a CNV- (copy number variation, kópiaszám-variáció) régiókat is felismeri. Az ember egyes DNS-szakaszai nem feltétlenül két kópiában fordulnak elő, bizonyos DNS-szegmensek kópiaszámában a populáción belül komoly változékonyság lehet. A kópiaszám-változás jelenthet növekedést, duplikáció révén, vagy csökkenést is, deletiók révén. A CNV különösen gyakori az immunrendszer és az agy fejlődésében szerepet játszó génekben. A WGS további előnye, hogy a vizsgálat eredményeként a teljesgenom-szekvenancia rendelkezésre áll, így specifikus elemzőszoftverek segítségével virtuálisan a kezdeti teljesgenom-vizsgálat „panelszerű elemzésre” vagy „exomszerű elemzésre” konvertálható.

A WES esetében fontos, hogy a DNS-templát exonokban gazdag legyen, míg ez értelemszerűen WGS esetében nem szükségszerű (3. ábra). Ez egyben magában rejti a WES egyik legnagyobb hibalehetőségét is, hiszen az úgynevezett exondúsítás nem teljesen homogén folyamat az összes exon esetében, ami az eredményeket torzíthatja. A PID-esetek túlnyomó részében a WES elegendő diagnosztikai vizsgálat, és felesleges a WGS-nek, vagyis a teljesgenom-szekvenanciának a meghatározása. Ennek egyik oka az, hogy az elmúlt évtizedek humángenetikai kutatásai azt mutatják, hogy a monogén betegségek esetében a mutációk túlnyomórészt az exomban találhatók, és még inkább annak kódoló régiójában [21]. A másik ok az, hogy az exom az egész genom legkonzerváltabb régiója, vagyis az exomon kívül, a kevésbé konzervált régiókban elhelyezkedő szekenciavariánsok nem valószínű, hogy megzavarják egy gén expresszióját és működését, ami azt jelenti, hogy itt ritkább a patogén variánsok előfordulása. A WES egyik hátránya, hogy az RNS-géneket jellemzően kevésbé fedi le, mint a WGS [22]. Fontos annak ismerete is, hogy vannak olyan ismert gének, amelyeket a WES nem érzékel, például azért, mert mélyen az intronban helyezkednek el. Ennek

eklatáns példája a X-kromoszómához kötötten öröklődő dermatopathia pigmentosa reticularis, amelynek génjét két évtizedes kutatómunka után végül WGS-sel sikerült azonosítani, mivel a mutáció mélyen az intronban helyezkedett el [23]. Egy negatív WES-lelet tehát nem zárja ki egyértelműen a mutáció lehetőségét.

A WGS jelenleg drágább vizsgálat, mint a WES, de remény van arra, hogy a költségek további csökkenésével a WES-hez hasonló költségkategóriába kerüljön. A genetikai technológia gyorsan fejlődő területén így a WES várhatóan átadja majd a helyét a WGS-nek, amely jobb lefedettséget biztosít a kódoló és a nem kódoló DNS-szakaszokra, az intronokra és a szabályozó DNS-régiókra egyaránt.

A molekuláris genetikai vizsgálatok jelentősége PID-ben

Az NGS egyre szélesebb körű alkalmazásának köszönhetően jelentősen nőtt a diagnosztizált PID-betegek száma. Az 1. ábra szemléletesen mutatja az NGS kedvező hatását a PID-betegségek diagnosztikájára. Az NGS többek között hozzájárult a monogénes hátterű hypogammaglobulinaemiák és az úgynevezett immundiszregulációs szindrómák nagyobb számban történő felismeréséhez, és a módszer segítségével számos olyan PID-betegségben is sikerült a patomechanizmust tisztázni, amelyben a fenotípust egyetlen, jól meghatározott kórokozóval vagy kórokozócsoporttal szembeni fokozott fogékonyság jellemzi. A részben vagy teljes egészében az NGS-technikának köszönhetően felismert PID-géneket és az általuk meghatározott fenotípust az 1. táblázat foglalja össze [23, 24]. Az NGS-diagnosztika elterjedésének egyik legfontosabb hozadéka, hogy lehetőség nyílt addig ismeretlen, új PID-betegségi gének felfedezésére. A módszer lehetőséget teremtett arra, hogy egyetlen vagy kevés beteget érintő immunhiányos állapotok esetében is genetikai diagnózis születhessen.

A genetikailag igazolt esetek számának növekedésével a fenotípusspektrum is könnyebben vizsgálható. Az NGS-módszernek köszönhetően ma már tudjuk, hogy a PID-fenotípus meglepően heterogén, így például a betegségi tünetek még azonos génmutációt hordozó betegekben is eltérőek lehetnek, akár ugyanazon családon belül. A fenotípus markáns heterogenitásának oka ugyanazon gént érintő mutációk esetében lehet az, hogy az adott gén különböző mutációi nagyon eltérő hatást gyakorolnak a fehérje működésére. Ennek egyik iskolapéldája az X-kromoszómához kötötten, recesszíven öröklődő Wiskott–Aldrich-szindróma kialakulásáért felelős gén, a WAS. Nullmutációk vagy úgynevezett funkcióvesztő (loss-of-function [LOF]) mutációk esetében a klasszikus triásszal (thrombocytopenia, ekcéma és visszatérő fertőzések) jellemzett klinikai képet látjuk [25]. Ezzel szemben úgynevezett funkciónyerő (gain-of-function [GOF]) mutációk esetén a fenotípust neutropenia jellemzi, thrombocytaérintettség és infekciók nélkül [26]. A feno-

típusos sokszínűség hátterében az autoszomális domináns (AD) immunhiány-betegségek nagyobb arányú felismerése is állhat, amelyek igen gyakran változó penetranciájúak. Az NGS-t megelőző érában az autoszomális recesszív (AR) öröklődésű PID-betegségek előfordulási gyakorisága körülbelül a négyszerese volt az AD öröklődésű formáknak, hiszen a klasszikus molekuláris genetikai vizsgálómódszerekkel egy AR eltérés sokkal könnyebben diagnosztizálható. Az NGS térhódításával azonban folyamatosan növekszik az AD öröklődésű felismert PID-betegségek száma, mert ez a módszer lehetővé teszi a mutációk felismerését egy vagy kisszámú nem rokon, de azonos fenotípusú beteg esetében is [27]. Domináns öröklődésű esetén (az autoszomális és az X-hez kötött formákban egyaránt) a LOF és a GOF mutációk mellett előfordulhat haploinsufficiencia is, amikor az egyetlen fennmaradó funkcionális allél nem képes elegendő génterméket (jellemzően fehérjét) biztosítani a vad (egészséges) fenotípus megőrzéséhez, ami a betegség kialakulásához vezethet. A fenotípust tovább színeztetik az úgynevezett hipomorf mutációk (domináns és recesszív egyaránt lehet), amelyekről régóta ismert, hogy enyhébb fenotípust vagy a betegség késői kialakulását idézhetik elő. Ez úgy lehetséges, hogy a gén által kódolt fehérjéből kevesebb termelődik, vagy a fehérje szerkezete módosul, így funkciója csökken a vad típuséhoz képest, de teljesen nem szűnik meg. Kiváló példa erre a RAG1, amelynek nullmutációi klasszikus SCID-et okoznak, a T- és a B-sejtek teljes hiányával. Néhány RAG1-mutáció esetében ugyanakkor Omenn-szindróma, granulomatosis betegsége, autoimmun manifesztációk, illetve gyulladásoos osteomyelitis megjelenése észlelhető [24]. A mutációk funkcionális következményeinek megértését tovább bonyolítja az a tény, hogy ugyanaz a mutáció különböző sejtvonalakban különböző következményekkel járhat. Ugyanakkor néhány mutáns gén szöveti és szervi expressziója rendkívül széles, a fenotípusra mégis a nagyon szűk klinikai spektrum jellemző. Az NGS-nek köszönhetően meglepő gyakorisággal kerülnek felismerésre úgynevezett *de novo* mutációkat hordozó, negatív családi anamnéziséű betegek, akikre nagyon súlyos vagy rendkívül szokatlan klinikai kép jellemző, korai megjelenéssel és gyakran halálos kimenetellel. Az NGS-érát megelőzően ezeknek a betegeknek a nagy része is diagnosztizálatlan maradt, így a PID-fenotípus skáláján nagy részük korábban nem volt reprezentálva.

A PID-betegségek száma olyan gyorsan növekszik, hogy szükségessé vált a korábbi terminológia felülvizsgálata is. A PID, illetve a PIDD (PID disorders, PID-betegségek) rövidítéseken ma már az immunhiány-betegségek egy szűkebb csoportját értjük, amelyekben a betegség fő megnyilvánulása a fertőzésekre való fogékonyság. Ugyanakkor az immundiszregulációs szindrómák növekvő száma miatt, amelyek magukban foglalják az autoinflammációs szindrómákat [28, 29] és az interferonopathiákat is, egy sokkal tágabb értelmű terminoló-

1. táblázat | Az új generációs szekvenálásnak köszönhetően felismert primer immundeficiencia gének, a fémisérés évével

Év	Gén	Laboratóriumi eltérések	Fenotípus	Öröklődésmenet
2010 (4)	FADD	T: DNT↓; B: N; károsodott lymphocytaapoptózis	Bacterialis és vírusfertőzések, recidív encephalopathia, májfunkációs zavar	AR
	MASPI	A lektinaktivációs útvonal deficienciája	Pyogen fertőzések, gyulladásoos tüdőbetegség, autoimmunitás	AR
	STIMI	T: N; károsodott TCR-mediált aktiváció; B: N; Ig: N	Autoimmunitás, anhidrotikus ectodermális dysplasia, nonprogresszív myopathia, Kaposi-sarcoma	AR
	USB1	Neutropenia	Clericuzio-szindróma: poikiloderma és neutropenia, retinopathia, fejlődési retardáció, arcdysmorphia	AR
	ADAM17	Károsodott TNF α -termelés	Korai kezdetű diarrhoea, bőrlaesiók	AR
	BLOC1S6p (PLDN)	Leukopenia, thrombocytopenia	Hermansky-Pudlak-szindróma 9. típusa: oculocutan albinismus, nystagmus, visszatérő bőrfertőzések, haemorrhagia nélkül	AR
	GATA2	Több sejtvonalat érintő cytopenia	MonoMac-szindróma (decreased monocytes with increased susceptibility to atypical mycobacterial infection), mycobacterialis és HPV-fertőzések, histoplasmosis, alveolaris proteinosis, MDS/AML/CMMoL, lymphoedema	AD
	MAGT1	T: CD4+-deficiencia, ↓proliferatio anti-CD3-stimulációra; B: N; Ig: N	EBV-fertőzés, egyéb vírusfertőzések, légúti és gastrointestinalis fertőzések, lymphoma	XL
	STAT1	T, B és monocytasejt-eltérések, az IL17-termelő T sejtek képződésének vagy funkciójának zavara	Krónikus mucocutan candidiasis, bacterialis, vírus (HSV)- és gombafertőzések, autoimmunitás (thyreoiditis, diabetes, cytopeniák), enteropathia	AD (GOF)
	ZBTB24 (ICF2)	T, B: N/↓; Ig: ↓/Ø, variábilis antitestdeficiencia	ICF2-szindróma: immundeficiencia, centromer instabilitás és facialis anomáliák	AR
2011 (6)	ACTB	β-aktin-deficiencia, a neutrophil sejtek és a monocyták motilitászavara	Mentális retardáció, alacsonyövé	AD
	ADAR	Fokozott I. típusú interferon termelése	Aicardi-Goutières-szindróma 6. típusa (AGS6-, ADARI-deficiencia), bilaterális striatalis necrosis, spasticus paraparesis	AR
	CARD11	B: ↑ (az NF-κB-aktiváció miatt), ↓oltási válasz-készség	Splenomegalia, lymphadenopathia	AD (GOF)
	CARD14 (CAMPS)	Keratinocytacérintettség, NF-κB-aktiváció↑, IL8-termelés↑	Psoriasis	AD
	CD27	T: N; memória B: Ø; Ig: ↓EBV-fertőzést követően; iNKI: ↓	EBV-fertőzés, haemophagocytás lymphohistiocytosis, aplasticus anaemia, lymphoma	AR
	ISG15	Az IFN γ -termelés zavara	Mycobacterialis fertőzések (BCG), központi idegrendszeri calcificatio	AR
	LRBA	T: CD4+ N/↓, T-sejt-diszreguláció; B: N/↓; Ig: a legtöbb esetben IgG↓ és IgA↓	Visszatérő fertőzések, EBV-fertőzés, gyulladásoos bélbetegség, autoimmunitás	AR
	MCM4	T és B: N; Ig: N; NK: ↓	Vírusfertőzések (EBV, HSV, VZV), alacsonyövé, B-sejtes lymphoma, mellékvese-elégtelenség	AR
	PIK3CD/R1	pro-B: ↓/Ø; Ig: ↓	EBV-fertőzés	AD (GOF)
	PIK3R1	Memória B: ↓; Ig: ↓	Súlyos bacterialis fertőzések, EBV-fertőzés	AD (LOF)
2012 (16)	PIK3R1 (P85)	pro-B: ↓/Ø; Ig: ↓	Súlyos bacterialis fertőzések	AR
	PLCG2 (PLC γ 2)	Az IL1-aktivációs útvonal fokozott aktivációja	Visszatérő fertőzések, autoinflammatio, hideg urticaria	AD (GOF)
	POLE (POL ϵ 1)	T: ↓proliferatio; memória B: ↓; Ig: IgG2↓ és IgM↓, PPS-stimulációra hiányzó antitestválasz	FILS- (facialis dysmorphia, immundeficiencia, livedo, short stature [alacsonyövés]) szindróma: visszatérő légúti fertőzések, meningitis, arcdysmorphia, livido, alacsonyövé	AR

1. táblázat folyt.

Év	Gén	Laboratóriumi eltérések	Fenotípus	Öröklődésmenet
2012 (16)	RBCK1 (HOIL1)	T: N; memória B: N/↓; Ig: ↓antitestválasz poliszacharidstimulációra	Bacterialis fertőzések, autoinflammatio, amylopectinosis	AR
	RHOH	T: N; ↓proliferáció anti-CD3-stimulációra; naiv T: ↓; B: N; Ig: N	HPV-fertőzés, tüdőgranulomák, molluscum contagiosum, lymphoma	AR
	TBKI	A TBKI-dependens IFN α -, β - és γ -válasz zavara	Herpes simplex vírus-1, encephalitis	AD
	CARD11	T: N; ↓proliferáció, dominálónan naiv T-sejtek, B: N; dominálónan átmeneti B-sejtek; Ig: ↓/Ø	<i>Pneumocystis jirovecii</i> pneumonia, bacterialis és virális fertőzések	AR (LOF)
	CD59	Az erythrocyták fokozott komplementmediált lízise a membrán attack complex inhibitor (CD59) deficienciája miatt	Hemolitikus anaemia, polyneuropathia	AR
	IKKB (IKK β)	T: N; Treg és γ/δ T-sejtek: Ø; ↓TCR-aktiváció; B: N; Ig: ↓	Visszatérő bacterialis, vírus- és gombafertőzések, opportunistai fertőzések	AR
	IL2IR	T: N; ↓citokintermelés, ↓proliferáció; B: N; Ig: N; ↓spec. antitestválasz	Visszatérő fertőzések, <i>Pneumocystis jirovecii</i> - és <i>Cryptosporidium</i> -fertőzések, májbetegség	AR
	MALTI	T: N; ↓proliferáció; B: N; Ig: N; ↓spec. antitestválasz	Bacterialis, virális és gombás fertőzések	AR
	NFKB2 (p105/p52)	B: ↓; Ig: ↓	Visszatérő sinupulmonalis fertőzések, alopecia, endocrinopathiák	AD
	PIK3CD (p110 β)	pro-B: ↓/Ø; Ig: ↓	Súlyos bacterialis fertőzések, EBV-fertőzés	AD (GOF)
	PRKCD (PKC δ)	T: N; B: memória B↓, CD5 B†; a B-sejtek apoptózisának zavara, Ig: IgG↓	Visszatérő fertőzések, krónikus EBV-fertőzés, lymphoproliferáció, SLE-szerű autoimmun betegség (vesecíntettség és antifoszfolipidszindróma)	AR
	RPSA	Az RPSA a riboszomális SA proteint kódolja, amely a riboszóma kis alegysége	Izolált congenitalis asplenia, bacteraemia (tokos baktériumok)	AD
	RTEL1	T: ↓; B: változó; Ig: változó; pancytopenia (csontvelő-elégtelenség)	Dyskeratosis congenita: intrauterin növekedési retardáció, microcephalia, kóróm dystrophia, ritka hajzat és szemöldök, bőrhíperpigmentáció, palmaris hyperkeratosis, premalignus orális leukoplakia, myelodysplasia, ± visszatérő fertőzések. Súlyos esetben fejlődési retardáció, enteropathia és cerebellaris hypoplasia társul (Hoyeraal-Hreidarsson-szindróma)	AR/AD
	STAT2	Károsodott STAT2-dependens IFN α -, β - és γ -válasz	Súlyos vírusfertőzések (disszeminált kanyaróoltás után)	AR
	TCF3 (E47)	Ig: ↓	Visszatérő bacterialis fertőzések	AD
	TNFRSF4 (OX40)	T: N; ag spec. CD4+-memória↓; B: N; memória B↓; Ig: N	Kaposi-sarcoma, csökkent HHV8 elleni immunitás	AR
	TNFSF12 (TWEAK)	Ig: IgM↓ és IgA↓, anti- <i>Pneumococcus</i> -antitest Ø; thrombocytopenia, neutropenia	Pneumonia, bacterialis fertőzések, szemölcsök	AD
TRAF3IP2 (ACT1)	Károsodott IL17E-dependens T-sejt, illetve IL17A- és IL17F-dependens fibroblastválasz	Krónikus mucocutan candidiasis, blepharitis, folliculitis, macroglossia	AR	
TTC7A	T: változó, időnként ↓/ØTREC; B: N/↓; Ig: ↓↓	Bacteraemia, szeptisz, vírus- és gombafertőzések, multiplex bélátresia, gyakran intrauterin polyhydramnion, koraszülöttség, korai magzati halál	AR	
VPS45	Neutropenia	Súlyos congenitalis neutropenia 5. típusa (SCN5): neutropenia, extramedullaris haematopoiesis, csontvelőfibrosis, vesemegnagyobbodás	AR	

2013 (17)

1. táblázat folyt.

Év	Gén	Laboratóriumi eltérések	Fenotípus	Öröklődésmenet
2014 (16)	ACD	T: változó; B: változó; Ig: változó; pancytopenia	Dyskeratosis congenita (a tüneteket lásd az RTEL1-nél)	AR
	BCL10	T: N; ↓ memória T és Treg, ↓ proliferáció ag és anti-CD3-stimulációra; B: N; ↓ memória és izotípus váltott B-sejt; Ig: ↓	Visszatérő bacterialis és vírusfertőzések, candidiásis, gastroenteritis	AR
	CECR1	Az extracelluláris adenoazin inaktivációja, az adenozinreceptorokon keresztül történő jelátvitel felüggesztése	ADA2-deficiencia: polyarthritis nodosa, gyermekkori kezdet, visszatérő ischaemiás stroke és láz	AR
	CSF3R	Neutropenia	Súlyos congenitalis neutropenia akut myeloid leukaemia vagy myelodysplasiás szindróma kifizással	AR
	CTLA4	T: ↓, Treg: ↓ funkció; B: ↓	Autoimmun lymphoproliferatív szindróma (Canale-Smith-szindróma V. típusa (ALPS5): visszatérő fertőzések, autoimmun cytopeniák, enteropathia, interstitiális tüdőbetegség, extralymphoid lymphocytafiltráció	AD
	CTPS1	T: N/↓, ag-stimulációra ↓ proliferáció; B: N/↓; Ig: N/↑ IgG	Visszatérő, krónikus bacterialis és vírusfertőzések (EBV, VZV), lymphoproliferatív, B-sejtes non-Hodgkin-lymphoma	AR
	IFIH1	T és B: NI; fokozott I. típusú interferon termelés	Aicardi-Goutières-szindróma 7. típusa (AGS7): klasszikus AGS, SLE, spasticus paraparesis, Singleton-Merten-szindróma	AD (GOF)
	IL21	T: N; funkció N/↓; B: ↓; IgG: ↓	Súlyos, korai kezdetű colitis, visszatérő sinopulmonalis fertőzések	AR
	INO80	Ig: ↓ IgG, ↓ IgA, ↑ IgM	Súlyos bacterialis fertőzések	AR
	MAP3K14	T: N; ↓ proliferáció ag-stimulációra; B: ↓, izotípus váltott memória B-sejt ↓; Ig: ↓; NK: ↓	NIK- (NF-κB-inducing kinase) deficiencia: visszatérő bacterialis, vírus- és <i>Cryptosporidium</i> -fertőzések	AR
	NLR4	Fokozott IL1β- és IL18-szekréció és makrofágaktiváció	Visszatérő fertőzések, autoinflammatio, hideg urticaria, makrofágaktivációs szindróma, súlyos enterocolitis	AD (GOF)
	PCNA	A DNS-repair-mechanismusok zavara	Ataxia teleangiectasia-szerű betegség 2: fejlődési retardáció, ataxia, sensorialis halláskárosodás, alacsony növés, bőr- és szemteleangiectasia, fotoszenzibilitás	AR
	PGM3	T: CD8 és CD4 ↓; B és memória B: ↓; Ig: IgG és IgA: N/↑, IgE: ↑; cosinophilia	Bacterialis és vírusfertőzések, autoimmunitás, súlyos atopia, mentális retardáció, hypomyelinisatio, csontrendszeri eltérések: alacsony növés, brachydactyly, arcdysmorfia	AR
	STAT4	Csökkent IL12-dependens IFNγ-termelés	Intracelluláris korozókkal szembeni fokozott fogékonyság	AR
	TMEM173	T és B: NI; fokozott az interferonexpresszió	STING (stimulator of interferon genes)-asszociált vasculopathia (bőr), újszülöttkori kezdet, gyulladásos tüdőbetegség, szisztémás autoinflammatio, intracranialis calcificatio, familiaris lupus	AR
	2015 (16)	XRCC4	Lymphopenia, a DNS-repair-mechanismusok zavara	Alacsony növés, microcephalia, endocrinopathiák
CDC47		T: PHA-stimulációra csökkent válasz; Ig: N/↓/Ø; változó antitestdeficiencia	ICF3-szindróma: immundeficiencia, centromer instabilitás és facialis anomáliák	AR
CLPB		Neutrophil sejt éréstettsége, a myeloid differenciáció zavara	3-metilglükonsav-aciduria, a neurokognitív fejlődés zavara, microcephalia, hypoglykaemia, hypotonia, ataxia, rohamok, cataracta, intrauterin növekedési retardáció	AR
COPA		Th17-diszreguláció és autoantitest-termelés	Autoimmun arthritis, interstitialis tüdőbetegség	AD

1. táblázat folyt.

Év	Gén	Laboratóriumi eltérések	Fenotípus	Öröklődésmenet
	DOCK2	T: ↓; B: N; IgG: N/↓, csökkent antitestválasz; NK: N, funkció kóros, csökkent interferonválasz a haematopoieticus és a nonhaematopoieticus sejtekben	A súlyos kombinált immundeficienciától enyhébb kombinált immundeficiencia	AR
	HELLS	T: N/↓; B: N/↓; Ig: ↓/Ø, változó antitestdeficiencia	ICF4-szindróma: immundeficiencia, centromer instabilitás és facialis anomáliák	AR
	IL17RC	Az IL17RC szignalizációs útvonal működése	Krónikus mucocutan candidiasis	AR
	IRF3	HSV1-stimulációra ↓IFN α /β termelése és ↓IRF3-foszforiláció	HSV1-encephalitis	AD
	IRF7	Kóros IFN α -, β- és -γ-, illetve IFN λ -termelés	Súlyos influenzazabetegettség	AR
	MYSM1	T: ↓, naiv T: ↓; B: éretlen; Ig: ↓	Visszatérő fertőzések, congenitális csontvelő-elégtelenség, myelodysplasia, csontrendszeri eltérések, alacsonyynövés, cataracta, fejlődési retardáció	AR
	NFAT5	T: N; B: N, memória B↓, plazmablast↓	Visszatérő sinopulmonalis fertőzések, gyulladásoos bélbetegettség	AD haplo-in-sufficiencia
2015 (16)	NFKB1	B: N, memória B↓; Ig: N/↓	Visszatérő sinopulmonalis fertőzések, krónikus obstruktív tüdőbetegettség, EBV-proliferáció, autoimmun cytopeniák, autoimmun thyroiditis, alopecia	AD
	PARN	T: változó; B: változó; Ig: változó; pancytopenia	Dyskeratosis congenita (a tüneteket lásd az RTEL1-nél)	AR
	RNU4ATAC	T: N; B: N; Ig: N; spec. antitestdeficiencia	MOPD1- (microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism) deficiencia: visszatérő bakteriális fertőzések, lymphadenopathia, spondyloepiphysealis dysplasia, súlyos intrauterin növekedési retardáció, retinadystrophia, arc dysmorphia, microcephalia	AR
	RNF31 (HOIP)	T: N; B: N; memória B↓; Ig: ↓	Bacterialis fertőzések, autoinflammatio, amylopectinosis, lymphangiectasia	AR
	RORC	IL17A/F-termelő T-sejt Ø, ROR γ T-protein Ø, az IFN γ -termelés zavara	<i>Mycobacterium</i> - és <i>Candida</i> -fertőzések	AR
	TTC37	↓ <i>Pneumococcus</i> elleni antitestválasz	Visszatérő bakteriális és vírusfertőzések, abnormális haj: trichorrhexis nodosa	AR
	AP3D1	T: N; B: N; NK- és CTL-aktivitás↓ (cytototoxicitás és/vagy degranuláció), súlyos neutropenia	Hermansky-Pudlak-szindróma 10. típusa: oculocutaneous albinismus, visszatérő fertőzések, rohamok, halláskárosodás, meglassult idegrendszeri fejlődés	AR
	ERCC6L2	T: ↓; B: ↓; Ig: N	Hebo-deficiencia: arc dysmorphia, microcephalia, csontvelő-elégtelenség	AR
	IRF2BP2	IgG↓, IgM↓, IgA Ø	Visszatérő fertőzések, autoimmunítás, autoinflammatio	AD
	LAT	T: N/↓; B: N/↓; Ig: ↑	Visszatérő fertőzések, autoimmunítás, adenopathia, splenomegalia	AR
	NSMCE3	T: ↓, mitogénre és ag-re ↓válaszkészség; B: N; Ig: IgG: N, IgA: N, IgM: ↑, PPS-stimulációra ↓antitestválasz	Súlyos tüdőbetegettség (valószínűleg vírusos eredetű), thymus hypoplasia, kromoszómatörékenységek, sugárterékenységek	AR
2016 (8)	POLE2	T: ↓, TRECS: Ø, ag-stimulációra nincs proliferáció; B: ↓↓, Ig: ↓	Visszatérő fertőzések, diszeminált BCG-fertőzés, autoimmunítás (1-es típusú diabetes, hypothyreosis), arc dysmorphia	AR
	TFRC	T: N, ↓proliferáció, B: N, memória B↓; Ig: ↓; neutropenia, thrombocytopenia	Visszatérő fertőzések	AR
	POLAI	T és B: NI; az 1. típusú interferonok fokozott termelődése	X-kromoszómához kötött reticularis pigmentációs betetegettség: hiperpigmentáció, jellegzetes facies, tüdő- és gastrointestinalis érintettség	XL

ag = antigén; AML = akut myeloid leukaemia; CMMoL = (chronic myelomonocytic leukemia) krónikus myelomonocytar leukaemia; DC = (dendritic cell) dentritikus sejt; DNT = (double negative T cells) kettős negatív T-sejtek; EBV = Epstein-Barr-vírus; HSV = herpes simplex vírus; Ig = immunglobulin; MDS = myelodysplasiás szindróma; N = normálszámú, illetve immunglobulinszint; NI = nem ismert; PMN = polimorfonukleáris leukocytar; PPS = (purified capsular polysaccharides) tisztított tokpoliszacharidok; SLE = szisztémás lupus erythematosus

gia, az úgynevezett „inborn errors of immunity” (az immunitás veleszületett hibái) kifejezés alkalmazása javasolt.

PID esetén a génszintű diagnosztika a következők miatt nem nélkülözhető:

1. A molekuláris genetikai vizsgálatok megerősítik a feltelezett diagnózist, ami különösen fontos, ha a laboratóriumi leletek és a klinikai kép a megszokottól eltérő, szokatlan.
2. A molekuláris genetikai diagnózis végleges diagnózis, így a PID-betegek esetében sajnos gyakran tapasztalt elhúzódozó és céltalan kivizsgálások, illetve a tartós „diagnózisnélküliség” okozta bizonytalanság végére pont tehető.
3. A genetikai vizsgálattal egy potenciálisan halálos kimenetelű betegség már a tünetek megjelenése előtt felismerhető, ami lehetővé teszi az időben történő beavatkozást. A korai, biztos diagnózis lehetővé teszi a fertőzések kialakulásának megelőzését és a korai adekvát immunterápiát, így csökkenthető a szövődmények és a maradandó szervi károsodások kialakulásának veszélye.
4. A PID által érintett családokban lehetőség nyílik a genetikai tanácsadásra, amely csak akkor lehet releváns, ha a genetikai diagnózis már a kezünkben van. A hordozóállapot kiszűrése és a praenatalis diagnosztika

óriási jelentőségét a családtervezésben nem kell hangsúlyozni.

5. A genetikai vizsgálatok segítségével tisztázható az immunhiányos betegség patomechanizmusa.
6. Erős genotípus-fenotípus korreláció esetén a molekuláris diagnózis prognosztikai információt nyújthat.
7. Az esetek egy kis részében a molekuláris genetikai vizsgálatok után is maradnak nyitott kérdések, hiszen ugyanaz a fenotípus különböző géndefektusok következménye is lehet, illetve ugyanaz a génmutáció sokszor egy családon belül is teljesen eltérő fenotípust eredményez. A genotípus-fenotípus összefüggések vizsgálatával ugyanakkor más genetikai faktorok és további környezeti tényezők pontos szerepe is tisztázható.

PID-diagnosztika – magyarországi előzmények és helyzetkép

Magyarországon 2003-ig döntően a humoralis és a celluláris immunválasz felmérésére alkalmas funkcionális, immunkémiai és biokémiai módszereket alkalmazták a primer immunhiány-betegségek diagnosztikájában. A korszerű diagnosztikai feltételek biztosítása azonban szükségessé tette molekuláris genetikai vizsgálatmódsze-

2. táblázat | A Debreceni Egyetem Infektológiai és Gyermekimmunológiai Tanszékének Molekuláris Genetikai Laboratóriumában diagnosztizált primer immunhiányos betegek genotípusa

Betegség	Mutáns gén (öröklődésmenet)		A mutáció típusa	Esetszám
	Nukleotidcsere	Aminosavcsere		
KOMBINÁLT IMMUNDEFICIENCIÁK (B- ÉS T-SEJT-DEFEKTUSOK)				
T-B+ súlyos kombinált immundeficiencia (SCID)				
<i>X-kromoszómához kötött SCID (közös gamma-lánc-deficiencia, CD132-deficiencia)</i>	<i>IL2RG</i> (XL)			4
	<i>c.802G>C</i>	<i>p.G268R</i>	Missense	2
	<i>c.295insA</i>	<i>p.V99fsX110</i>	Insertio	2
T-B-SCID				
<i>RAG2-deficiencia</i>	<i>RAG2</i> (AR)			2
	<i>c.645_646insAC/c.1563delT</i>	<i>p.T215fsX5/p.P422fsX3</i>	Insertio/deletio	2
Kombinált immundeficiencia, a SCID-hez képest enyhébb fenotípussal				
<i>CD40L-deficiencia (CD154-deficiencia)</i>	<i>CD40LG (TNFSF5)</i> (XL)			16
	<i>c.216C>A</i>	<i>p.C72X</i>	Nonsense	2
	<i>c.430G>A</i>	<i>p.G144R</i>	Missense	1
	<i>c.521A>G</i>	<i>p.Q174R</i>	Missense	2
	<i>c.654C>A</i>	<i>p.C218X</i>	Nonsense	5
	<i>c.694C>T</i>	<i>p.Q232X</i>	Nonsense	1
	<i>c.IVS3 + 1G>T</i>	–	Splice site	1
	<i>c.58delA</i>	<i>p.S20fsX21</i>	Deletio	2
	<i>c.77_89del13bp</i>	<i>p.Y26fsX33</i>	Deletio	1
	<i>c.470delA</i>	<i>p.N157fsX161</i>	Deletio	1
<i>DOCK8-deficiencia</i>	<i>DOCK8</i> (AR)			2
	del1–14 exons/del18–18 exons		Nagydeletio	2

2. táblázat folyt.

Betegség	Mutáns gén (öröklődésmenet)		A mutáció típusa	Eset-szám
	Nukleotidcsere	Aminosavcsere		
KOMBINÁLT IMMUNDEFICIENTIÁK SZINDRÓMAJELEKKEL				
Immundeficientia congenitalis thrombocytopeniával				
<i>Wiskott–Aldrich-szindróma</i> (WAS)	WAS (XL)			10
	c.121C>T	p.R41X	Nonsense	1
	c.190T>C	p.W64R	Missense	1
	c.221T>C	p.F74S	Missense	1
	c.257G>A	p.R86H	Missense	1
	c.397G>T	p.E133X	Nonsense	2
	c.106-108delTT	p.F36X	Nonsense	1
	c.278-279delGT	p.G93fsX121	Deletio	1
	c.1075delC	p.P359fsX444	Deletio	1
	c.IVS9 + 1G>A	–	Splice site	1
Kromozómatörékenységgel és/vagy DNS-repair-defektussal társuló immundeficienciák				
<i>Nijmegen breakage szindróma</i> (NBS)	NBN (AR)			3
	c.657_661del5bp/ c.657_661del5bp	p.K219fsX234/p.K219fsX234	Deletio	3
Thymusdeficientia egyéb társuló congenitalis anomáliával				
<i>Di George/velocardiofacialis szindróma</i>	22-es kromoszóma (AD)			1
	c.del22q11.2		Nagydeletio	1
Immunoosseous dysplasiák				
<i>Porc-haj hypoplasia</i> (PHH)	RMRP (AR)			1
	dupTACTACTCTGTGAAat-12 (TATA boks és a transzkripció kezdőhelye között)/c.236A>G	Az RMRP a mitokondriális RNS feldolgozásában szerepet játszó endoribonukleáz RNS komponensét kódolja	Duplikáció	1
Hiper-IgE-szindróma (HIES)				
<i>Autoszomális domináns HIES (STAT3 deficiencia, Jób-szindróma)</i>	STAT3 (AD LOF)			11
	c.994C>T	p.H332Y	Missense	3
	c.1144C>T	p.R382W	Missense	4
	c.1825 A>G	p.R609G	Missense	1
	c.1865C>T	p.T622I	Missense	1
	c.1909G>T	p.V637L	Missense	1
	c.IVS8-3C>G	–	Splice site	1
Dyskeratosis congenita (DKC), myelodysplasia, rövid telomerek				
<i>Dyskerindeficientia okozta XL-DKC</i>	DKC1 (XL)			1
	c.IVS2-5C>G	–	Splice site	1
ANTITESTDEFICIENTIÁK				
Agammaglobulinaemia csökkent B-sejt-számmal vagy B-sejt-hiánnyal				
<i>X-kromoszómához kötött agammaglobulinaemia</i> (XLA, BTK-deficientia)	BTK (XL)			18
	c.115T>A	p.Y39N	Missense	2
	c.1025C>T	p.R288W	Missense	1
	c.1064T>A	p.I355N	Missense	2

2. táblázat folyt.

Betegség	Mutáns gén (öröklődésmenet)		A mutáció típusa	Esetszám
	Nukleotidcsere	Aminosavcsere		
<i>X-kromoszómához kötött agammaglobulinæmia (XLA, BTK-deficientia)</i>	c.1087C>T	p.Q363X	Nonsense	1
	c.1184G>A	p.W395X	Nonsense	1
	c.1337T>C	p.L402P	Missense	1
	c.1574G>A	p.R525Q	Missense	1
	c.1631G>C	p.R544T	Missense	1
	c.1699G>A	p.E567K	Missense	1
	c.1846C>G	p.L616V	Missense	1
	c.1952T>G	p.I651S	Missense	1
	c.89_101del13 bp	p.F30fsX52	Deletio	1
	c.472_475delACAG	p.T158fsX174	Deletio	1
	<i>c.1777delC</i>	<i>p.L593fsX649</i>	<i>Deletio</i>	1
	c.IVS8-1G>A	–	Splice site	1
	c.IVS14 + 5G>A	–	Splice site	1
Hiper-IgM-szindróma (HIGM), súlyosan csökkent IgG és IgA, normál- vagy emelkedett IgM, normál-B-sejtszám				
<i>AID- (aktivációindukált citidin-dezamináz) deficientia</i>	AICDA (AR)			7
	c.172G>A/c.259T>C	p.E57K/p.C87R	Missense/missense	1
	c.259T>C/c.259T>C	p.C87R/p.C87R	Missense/missense	2
	c.259T>C/c.338T>C	p.C87R/p.L113P	Missense/missense	4
IMMUNDISZREGULÁCIÓS SZINDRÓMÁK				
Regulatorikus-T-sejt-deficientia				
<i>IPEX-szindróma (immundiszreguláció, polyendocrinopathia, enteropathia, X-linked)</i>	FOXP3 (XL)			1
	<i>c.1207G>T</i>	<i>G403W</i>	<i>Missense</i>	1
Autoimmunitás lymphoproliferációval vagy a nélkül				
<i>APECED-szindróma (APSI, autoimmun polyendocrinopathia, candidiasis, ectodermális dystrophia)</i>	AIRE (AR vagy AD)			13
	c.769C>T/c.769C>T	p.R257X/p.R257X	Nonsense/nonsense	7
	c.769C>T/c.44_66dup23bp	p.R257X/p.R15fsX19	Nonsense/duplikáció	1
	c.769C>T/c.965_977del13bp	p.R257X/p.L323fsX373	Nonsense/deletio	1
	c.769C>T/c.1148insG	p.R257X/p.E383fsX423	Nonsense/insertio	1
	c.769C>T/c.1344delC	p.R257X/p.C449fsX479	Nonsense/deletio	2
	c.IVS9 + 6G>A/c.1411C>T	–/p.R471C	Splice site/missense	1
Autoimmun lymphoproliferatív szindróma (ALPS, Canale-Smith-szindróma)				
<i>ALPS-FASLG (ALPS Ib)</i>	FASLG (CD95L) (AR)			3
	<i>c.776T>G/vt</i>	<i>p.I259R/vt</i>	<i>Missense</i>	1
	<i>c.335_443del109bp/vt</i>	<i>p.G112fsX151/vt</i>	<i>Deletio (a 4. exon deletiója)</i>	1
	<i>c.38insA/vt (domináns negatív)</i>	<i>p.T13fsX17/vt</i>	<i>Insertio/vt</i>	1
EBV iránti fogékonyság és lymphoproliferatív állapotok				
<i>X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív szindróma (XLP, SH2D1A-deficientia, SAP-deficientia, XLPI)</i>	SH2D1A (XL)			14
	c.47G>A	p.G16D	Missense	4
	c.92T>C	p.L31P	Missense	4
	c.102C>G	p.S34R	Missense	2
	c.125G>A	p.C42Y	Missense	2
	<i>c.IVS1 + 5G>A</i>	–	<i>Splice site</i>	2

2. táblázat folyt.

Betegség	Mutáns gén (öröklődésmenet)		A mutáció típusa	Eset-szám
	Nukleotidcsere	Aminosavcsere		
PHAGOCYTADEFEKTUSOK				
Congenitalis neutropeniák				
<i>Elasztázdeficientia</i> (<i>severe congenital neutropenia 1, SCN1</i>)	<i>ELANE (ELA2)</i> (AD)			6
	<i>Promoter -199C>A</i>	-	-	3
	<i>c.182C>T</i>	<i>p.A61V</i>	Missense	1
	<i>c.377C>T</i>	<i>p.S126L</i>	Missense	1
	<i>c.IVS4 + 1G>A</i>	-	Splice site	1
A motilitás zavarai				
<i>Shwachman–Diamond-szindróma (SDS)</i>	<i>SBDS (AR)</i>			2
	<i>c.362A>C/c.523C>T</i>	<i>p.N121T + p.R175W</i>	Missense/missense	1
	<i>c.IVS2 + 2T>C/del872bp incl. exon 3</i>	<i>-/872 bázispár deletiója</i>	Splice site/nagydeletio	1
A respiratorikus burst defektusai				
<i>X-kromoszómához kötött krónikus granulomás betegség (CGD [chronic granulomatous disease], <i>gp91^{phox}</i>, <i>CYBB-deficientia</i>)</i>	<i>CYBB (XL)</i>			8
	<i>c.283C>T</i>	<i>p.R91X</i>	Nonsense	1
	<i>c.793C>T</i>	<i>p.Q261X</i>	Nonsense	2
	<i>c.880C>T</i>	<i>p.R290X</i>	Nonsense	1
	<i>c.967C>T</i>	<i>p.Q323X</i>	Nonsense	1
	<i>c.1169 C>T</i>	<i>p.P390L</i>	Missense	1
	<i>1–10. exon deletiója*</i>	<i>1–10. exon deletiója</i>	Nagydeletio	2
AZ IMMUNITÁS INTRINZIK ÉS VELESZÜLETETT ZAVARAI				
Epidermodysplasia verruciformis (HPV)				
<i>WHIM-</i> (<i>warts, hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis</i>) szindróma	<i>CXCR4</i> (AD GOF)			1
	<i>c.1013 C>G</i>	<i>p.S338X</i>	Nonsense	1
Mucocutan candidiasisra való hajlam				
<i>Krónikus mucocutan candidiasis (CMC)</i>	<i>STAT1</i> (AD GOF)			3
	<i>c.820C>T</i>	<i>p.R274W</i>	Missense	2
	<i>c.1219C>G</i>	<i>p.L407W</i>	Missense	1
A TLR szignalizációs útvonal deficienciája bacterialis fogékonyással				
<i>IRAK4-deficientia</i>	<i>IRAK4</i> (AR)			1
	<i>IVS10-1G>T/IVS10 + 520A>G</i>	-	Splice site	1
KOMPLEMENTDEFICIENTIÁK				
<i>C2-deficientia</i>	<i>C2</i> (AR)			2
	<i>c.841_849del9bp, IVS6 + 1_19del19bp (p.V281Pfs)</i>		Nagydeletio	2
Összesen				130

Jelölések:

Félkövér mutáció: a Tanszék által diagnosztizált és publikált új mutáció.

Dólt mutáció: a Tanszék által diagnosztizált, korábban még nem publikált új mutáció.

*: *Prof. Dirk Roos* (Sanquin Research and Karl Landsteiner Laboratory, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands) munkacsoportjával közös vizsgálat.

AD = autoszomális domináns; AR = autoszomális recesszív; GOF = funkciónyerő mutáció; LOF = funkcióvesztő mutáció; RMRP = RNA component of mitochondrial RNA-processing endoribonuclease; XL = X-hez kötött; vt = vad típus

rek beállítását is. 2003-ban a Debreceni Egyetem Infektológiai és Gyermekegyesületi Tanszékén jött létre immunodeficientia molekuláris genetikai központ, amely országos igényt elégített ki, és a J Project révén kelet- és közép-európai centrummá vált. A hagyományos vizsgál-

lómódszerekén kívül a mutációanalízis és más molekuláris genetikai vizsgálatok elvégzése is biztosított volt. A ritka, öröklődő PID-ben szenvedő betegek és családtagjaik számára a prae-natalis genetikai diagnosztika is hozzáférhető lett. A Tanszéken a 2003 és 2015 közötti idő-

szakban genetikailag igazolt 130 magyarországi beteg genotípusát a 2. táblázat foglalja össze a legújabb PID-klassifikációnak megfelelő felbontásban. A táblázat csak a betegek számadatait tartalmazza, a családészítés során kiszűrt hordozók nem kerültek feltüntetésre.

Súlyos kombinált immundeficienciát (SCID) 6 esetben diagnosztizáltunk (ILRG-, illetve RAG2-mutáció), közel 20 esetben pedig a kombinált immundefektusok enyhébb formáit (CD40LG-, illetve DOCK8-mutáció) igazoltuk [30–33]. Az egyéb szindrómajelekkel társuló kombinált immundeficienciák között hiper-IgE-szindróma (11) [34], Wiskott–Aldrich-szindróma (WAS) (10) [35, 36], Nijmegen breakage szindróma (3) [37, 38], Di George-anómia (1), porc-haj hypoplasia (1) [39] és dyskeratosis congenita (1) [40, 41] fordult elő. Az antitestdeficienciák csoportjában X-kromoszómához kötött agammaglobulinaemia (18) [42] és AID-mutáció okozta hiper-IgM-szindróma (7) [31, 43] volt genetikailag igazolható. Az immuniszregulációs szindrómák között a legnagyobb számban X-kromoszómához kötött lymphoproliferatív szindrómát (XLP) (14) [44, 45] és APECED- (autoimmun polyendocrinopathia, candidiasis, ectodermalis dystrophia) szindrómát (13) [46] mutattunk ki, de előfordult autoimmun lymphoproliferatív szindróma (3) [47] és egy esetben IPEX- (immuniszreguláció, polyendocrinopathia, enteropathia, X-hez kötött) szindróma is. A phagocytadefektusok csoportjára X-kromoszómához kötött krónikus granulomás megbetegedés (CGD) (8) [48], congenitalis neutropenia (6) és Shwachman–Diamond-szindróma (SDS) (2) [49, 50] előfordulása volt jellemző. A természetes immunitás veleszületett zavarait krónikus mucocutan candidiasis (3), WHIM-szindróma [51, 52] és IRAK4-deficientia (1) [53, 54] formájában diagnosztizáltuk. Komplementdeficientia két esetben fordult elő. Praenatalis genetikai diagnosztikára 30 esetben került sor, ebből három esetben ikerterhességben. A praenatalis vizsgálatokra CD40LG-mutáció okozta kombinált immundeficientia (7), WAS (7), XLP (5), IL2RG-génmutáció okozta SCID (3), SDS (3), RAG2-mutáció okozta SCID (1), CYBB-génmutáció okozta CGD (1), ELANE-génmutáció okozta neutropenia (1), WHIM-szindróma (1) és IPEX-szindróma (1) miatt került sor [55, 56].

Következtetés

Megállapítható, hogy az NGS a veleszületett immunhiány-betegségek történetében is új fejezetet nyitott. A molekuláris genetikai vizsgálómódszerek lenyűgöző léptékű fejlődése nemcsak a PID-diagnosztikát forradalmasította, de lehetőséget teremtett új terápiás eljárások bevezetésére is. A terápiás kihívások egyike a mutánsgén-összejt transzfeccióval történő korrekciója, amelynek kezdeti eredményei több esetben biztatónak tűnnek, így remény van arra, hogy a génterápia hamarosan az első vonalbeli terápiás eljárások között szerepeljen.

Anyagi támogatás: A közlemény megírása, illetve a kapcsolódó kutatómunka anyagi támogatásban nem részesült.

A cikk végleges változatát a szerző elolvasta és jóvá hagyta.

Érdekeltségek: A szerzőnek nincs érdekeltisége.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok *Bertrand Boissomnak* (St. Giles Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, The Rockefeller University, New York, USA) hasznos javaslataiért.

Irodalom

- [1] Bousfiha A, Jeddane L, Picard C, et al. The 2017 IUIS phenotypic classification for primary immunodeficiencies. *J Clin Immunol.* 2018; 38: 129–143. [Epub 2017 Dec 11]
- [2] Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, et al. International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee report on inborn errors of immunity. *J Clin Immunol.* 2018; 38: 96–128. [Epub 2017 Dec 11]
- [3] Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics* 1952; 9: 722–728.
- [4] Maródi L. Inborn errors of T cell immunity underlying autoimmune diseases. *Expert Rev Clin Immunol.* 2017; 13: 97–99.
- [5] Maródi L, Casanova JL. Novel primary immunodeficiencies relevant to internal medicine: novel phenotypes. *J Intern Med.* 2009; 266: 502–506.
- [6] Maródi L, Notarangelo LD. Immunological and genetic bases of new primary immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7: 851–861.
- [7] Bousfiha AA, Jeddane L, Ailal F, et al. Primary immunodeficiency diseases worldwide: more common than generally thought. *J Clin Immunol.* 2013; 33: 1–7.
- [8] Kobrynski L, Powell RW, Bowen S. Prevalence and morbidity of primary immunodeficiency diseases, United States 2001–2007. *J Clin Immunol.* 2014; 34: 954–961.
- [9] Picard C, Fischer A. Contribution of high-throughput DNA sequencing to the study of primary immunodeficiencies. *Eur J Immunol.* 2014; 44: 2854–2861.
- [10] Babay LÉ, Horányi D, Rigó J Jr, et al. Next generation sequencing and its applications in non-invasive prenatal testing of aneuploidies. [Új generációs szekvenálás és használata az aneuploidák nem invazív praenatalis vizsgálatában.] *Orv Hetil.* 2015; 156: 1041–1048. [Hungarian]
- [11] Mihály Z, Györfly B. Next generation sequencing technologies (NGST) development and applications. [Következő generációs szekvenálási technológiák kifejlődése és alkalmazásai.] *Orv Hetil.* 2011; 152: 55–62. [Hungarian]
- [12] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463–5467.
- [13] Smith L, Sanders J, Kaiser R, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 1986; 321: 674–679.
- [14] Metzker ML, Raghavachari R, Richards S, et al. Termination of DNA synthesis by novel 3'-modified-deoxyribonucleoside 5'-ribosephosphates. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22: 4259–4267.
- [15] Ruiz-Martinez MC, Berka J, Belenkii A, et al. DNA sequencing by capillary electrophoresis with replaceable linear polyacrylamide and laser-induced fluorescence detection. *Anal Chem.* 1993; 65: 2851–2858.

- [16] Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, et al. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem.* 1996; 242: 84–89.
- [17] Erdős M. Neonatal screening of severe combined immunodeficiencies. [A súlyos kombinált immundefektusok újszülöttkori szűrővizsgálata.] *Orv Hetil.* 2018; 159: 948–956. [Hungarian]
- [18] Itan Y, Casanova JL. Novel primary immunodeficiency candidate genes predicted by the human gene connectome. *Front Immunol.* 2015; 6: 142.
- [19] Nijman IJ, van Montfrans JM, Hoogstraat M, et al. Targeted next-generation sequencing: a novel diagnostic tool for primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 133: 529–534.
- [20] Stoddard JL, Niemela JE, Fleisher TA, et al. Targeted NGS: a cost-effective approach to molecular diagnosis of PIDs. *Front Immunol.* 2014; 5: 531.
- [21] Meyts I, Bosch B, Bolze A, et al. Exome and genome sequencing for inborn errors of immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2016; 138: 957–969.
- [22] Belkadi A, Bolze A, Itan Y, et al. Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112: 5473–5478.
- [23] Starokadomskyy P, Gemelli T, Rios JJ, et al. DNA polymerase- α regulates the activation of type I interferons through cytosolic RNA:DNA synthesis. *Nat Immunol.* 2016; 17: 495–504.
- [24] Conley ME, Casanova JL. Discovery of single-gene inborn errors of immunity by next generation sequencing. *Curr Opin Immunol.* 2014; 30: 17–23.
- [25] Albert MH, Notarangelo LD, Ochs HD. Clinical spectrum, pathophysiology and treatment of the Wiskott–Aldrich syndrome. *Curr Opin Hematol.* 2011; 18: 42–48.
- [26] Devriendt K, Kim AS, Mathijs G, et al. Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nat Genet.* 2001; 27: 313–317.
- [27] Boisson B, Quartier P, Casanova JL. Immunological loss-of-function due to genetic gain-of-function in humans: autosomal dominance of the third kind. *Curr Opin Immunol.* 2015; 32: 90–105.
- [28] Erdős M, Maródi L. Autoinflammatory syndromes – recurrent fever syndromes. [Autoinflammációs szindrómák – visszatérő lázszindrómák.] *Focus Medicinae* 2010; 12: 3–16. [Hungarian]
- [29] Erdős M, Maródi L. Fever and fever syndromes. [Láz és lázszindrómák.] *Gyermekorv Továbbk.* 2010; 9: 9–11. [Hungarian]
- [30] Erdős M, Alapi K, Maródi L. Retrospective diagnosis of X-linked hyper-IgM syndrome in a family with multiple deaths of affected males. *Haematologica.* 2007; 92: 281–282.
- [31] Erdős M, Lakos G, Dérfalvi B, et al. Molecular genetic analysis of Hungarian patients with the hyper-immunoglobulin M syndrome. *Mol Immunol.* 2008; 45: 278–282.
- [32] Kellermayer R, Hsu AP, Stankovics J, et al. A novel IL2RG mutation associated with maternal T lymphocyte engraftment in a patient with severe combined immunodeficiency. *J Hum Genet.* 2006; 51: 495–497.
- [33] Tóth B, Pistár Z, Csorba G, et al. Novel dedicator of cytokinesis 8 mutations identified by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Eur J Haematol.* 2013; 91: 369–375.
- [34] Jiao H, Tóth B, Erdős M, et al. Novel and recurrent STAT3 mutations in hyper-IgE syndrome patients from different ethnic groups. *Mol Immunol.* 2008; 46: 202–206.
- [35] Alapi K, Erdős M, Nagy A, et al. Mutation of Wiskott–Aldrich syndrome gene in a congenital thrombocytopenic infant. [Wiskott–Aldrich-szindróma génjének mutációja congenitalis thrombocytopeniás csecsemőben.] *Gyermekgyógyászat* 2005; 56: 135–139. [Hungarian]
- [36] Gulácsy V, Freiberger T, Shcherbina A, et al. Genetic characteristics of eighty-seven patients with the Wiskott–Aldrich syndrome. *Mol Immunol.* 2011; 48: 788–792.
- [37] Erdős M, Tóth B, Veres I, et al. Nijmegen Breakage syndrome complicated with primary cutaneous tuberculosis. *Pediatr Infect Dis J.* 2011; 30: 359–360.
- [38] Erdős M, Tóth B, Juhász P, et al. Nijmegen breakage syndrome. [Nijmegen–Breakage-szindróma.] *Orv Hetil.* 2010; 151: 665–673. [Hungarian]
- [39] Erdős M, Tóth B, Almássy Z, et al. Cartilage-hair hypoplasia. [Porc-haj hypoplasia.] *Orv Hetil.* 2008; 149: 209–217. [Hungarian]
- [40] Reiger Z, Varga G, Tóth B, et al. Molecular diagnosis and therapeutic measures in patients with dyskeratosis congenita. [Dyskeratosis congenita: molekuláris diagnosztika és terápiás lehetőségek.] *Orv Hetil.* 2010; 151: 285–292. [Hungarian]
- [41] Reiger Z, Varga G, Tóth B, et al. Dyskeratosis congenita diagnosed in adulthood. [Felnőttkorban diagnosztizált dyskeratosis congenita.] *Gyermekgyógyászat* 2010; 61: 66–70. [Hungarian]
- [42] Tóth B, Volokha A, Mihás A, et al. Genetic and demographic features of X-linked agammaglobulinemia in Eastern and Central Europe: a cohort study. *Mol Immunol.* 2009; 46: 2140–2146.
- [43] Erdős M, Maródi L. Autosomal recessive hyper-IgM syndrome. [Autoszmális recesszív hyper-IgM-szindróma.] *Gyermekgyógyászat* 2003; 54: 117–125. [Hungarian]
- [44] Erdős M, Uzvölgyi É, Nemes Z, et al. Characterization of a disease-causing mutation of SH2D1A in a family with X-linked lymphoproliferative disease. *Hum Mutat.* 2005; 25: 506.
- [45] Tóth B, Soltész B, Gyimesi E, et al. Severe XLP phenotype caused by a novel intronic mutation in the SH2D1A gene. *J Clin Immunol.* 2015; 35: 26–31.
- [46] Tóth B, Wolff AS, Halász Z, et al. Novel sequence variation of AIRE and detection of interferon- ω antibodies in early infancy. *Clin Endocrinol.* 2010; 72: 641–647.
- [47] Erdős M, Maródi L. The clinics and molecular genetics of autoimmune lymphoproliferative syndrome. [Az autoimmun lymphoproliferatív szindróma klinikuma és molekuláris genetikája.] *Gyermekgyógy Továbbk Szle.* 2003; 8: 4–9. [Hungarian]
- [48] Székely A, Péter M, Erdős M, et al. Hepatic abscess as the single manifestation of X-linked chronic granulomatous disease. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 58: 828–829.
- [49] Erdős M, Alapi K, Balogh I, et al. Severe Shwachman–Diamond syndrome phenotype caused by missense mutation in the SBDS gene. *Exp Hematol.* 2006; 34: 1517–1521.
- [50] Erdős M, Maródi L. Shwachman–Diamond syndrome: clinical manifestations and molecular genetics. [Shwachman–Diamond-szindróma: Klinikai manifesztációk és molekuláris genetikai vizsgálatok.] *Orv Hetil.* 2007; 148: 513–519. [Hungarian]
- [51] Alapi K, Erdős M, Kovács G, et al. Recurrent CXCR4 sequence variation in a girl with incomplete WHIM syndrome. *Eur J Haematol.* 2007; 78: 86–88.
- [52] Erdős M, Maródi L. WHIM syndrome. [WHIM-szindróma.] *Orv Hetil.* 2007; 148: 1173–1179. [Hungarian]
- [53] Erdős M, Maródi L. Selective anti-polysaccharide antibody deficiency syndrome and IRAK-4 deficiency in invasive pneumococcal infection. [Szelektív antipoliszacharidantitest-hiány szindróma és IRAK-4-deficiencia invazív pneumococcus fertőzésben.] *Gyermekgyógyászat* 2005; 56: 115–121. [Hungarian]
- [54] Ku CL, Picard C, Erdős M, et al. IRAK-4 and NEMO mutations in otherwise healthy children with recurrent invasive pneumococcal disease. *J Med Genet.* 2007; 44: 16–23.
- [55] Alapi K, Erdős M, Török O, et al. Prenatal diagnosis of the WAS R86H sequence variation in heterozygous twins. *Clin Chem.* 2006; 52: 901–903.
- [56] Török O, Tóth B, Erdős M, et al. Molecular diagnostic challenges and complex management of consecutive twin pregnancies in a family with CD40 ligand deficiency. *Scand J Immunol.* 2012; 75: 227–230.

(Erdős Melinda dr.,

The Rockefeller University, 1230 York Avenue, Box 163,

New York, NY 10065, USA

e-mail: merdos@rockefeller.edu)