

# A nagy géndeletiók kimutatásának módszerei és alkalmazásuk egyes örökletes betegségekben

GERGICS PÉTER DR.<sup>1</sup> ■ TÓKE JUDIT DR.<sup>1</sup> ■ SZILÁGYI ÁGNES<sup>2</sup>  
 SZAPPANOS ÁGNES DR.<sup>1</sup> ■ KENDER ZOLTÁN DR.<sup>1</sup> ■ BARTA GYÖRGY DR.<sup>3</sup>  
 TÓTH MIKLÓS DR.<sup>1</sup> ■ IGAZ PÉTER DR.<sup>1</sup> ■ RÁCZ KÁROLY DR.<sup>1</sup>  
 PATÓCS ATTILA DR.<sup>4</sup> \*

<sup>1</sup>Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, II. Belgyógyászati Klinika, Budapest

<sup>2</sup>Magyar Tudományos Akadémia–Semmelweis Egyetem Gyulladásbiológiai és Immungenomikai Kutatócsoport, Budapest

<sup>3</sup>Jász-Nagykun-Szolnok Megyei Hetényi Géza Kórház-Rendelőintézet, Szolnok

<sup>4</sup>Magyar Tudományos Akadémia, Molekuláris Medicina Kutatócsoport, Budapest

Számos monogénesen öröklődő kórképben a betegséget okozó gén teljes vagy részleges deletiója, illetve kópiaszámának megváltozása patogenetikai tényezőként jön számításba. A direkt DNS-szekvenálás nem alkalmas a gén nagy deletiójának, illetve kópiaszám-változásának kimutatására. Az összefoglalóban a szerzők áttekintik a nagy géndeletio vizsgálmódszereit, és két, monogénesen öröklődő betegségben végzett saját vizsgálataik példáján keresztül bemutatják a módszerek gyakorlati alkalmazásának lehetőségeit. Vázolják a géndeletio-vizsgálat hagyományos (kromoszóma-sávtechnika, Southern-blot, fluoreszcens in situ hibridizáció) és polimeráz láncreakcióra alapozott módszereit (denaturáló nagy felbontóképességű folyadékkromatográfia, kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció, mikrosatellitmarker-analízis, multiplex amplifikálhatópróba-hibridizáció, multiplex ligációspróba-analízis), valamint a technikai és informatikai haladás legújabb vívmányait (komparatív genomhibridizálás, „array” analízis). Saját vizsgálataikban von Hippel–Lindau-szindrómában szenvedő betegekben kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció és multiplex ligációspróba-amplifikálás alkalmazásával bemutatják a *VHL*, illetve congenitalis adrenalis hyperplasiás betegekben a *CYP21A2* géndeletio-vizsgálat eredményeit és ezek klinikai jelentőségét.

**Kulcsszavak:** nagy géndeletio, kópiaszám-variáció, molekuláris biológiai módszerek, genetikai diagnosztika

## Methods for the analysis of large gene deletions and their application in some monogenic disorders

Complete or partial gene deletions and copy number variations of disease-causing genes have pathophysiological significance in several monogenic hereditary diseases. Direct DNA sequencing is not suitable for the detection of these genetic abnormalities. In this work, authors review methods of large gene deletion testing and present their own results in two monogenic diseases to demonstrate the application of current methods in clinical practice. Classical methods (chromosome banding, Southern-hybridisation, fluorescent in situ hybridisation), polymerase chain reaction-based techniques (denaturing high performance liquid chromatography, quantitative real-time polymerase chain reaction, microsatellite marker analysis, multiple amplifiable probe hybridisation, multiple ligation probe amplification) as well as techniques based on recent advances in bioinformatics (comparative genome hybridisation, array-based analysis) are presented. Finally, authors present their own findings on large deletion testing of the *VHL* gene using quantitative real-time polymerase chain reaction and multiple ligation probe amplification in patients with von Hippel–Lindau disease and review a simple polymerase chain reaction method for the detection of large deletion of the *CYP21A2* gene in patients with congenital adrenal hyperplasia.

**Keywords:** large deletion, molecular biological methods, genetic diagnosis, multiplex ligation probe analysis, quantitative polymerase chain reaction

(Beérkezett: 2009. október 10.; elfogadva: 2009. október 29.)

\* Patócs Attila dr. Bolyai János-ösztöndíjas kutató.

**Rövidítések**

bp = bázispár; BRCA1 = (breast cancer 1) öröklődő emlőrák 1 gén; CAH = congenitalis adrenalis hyperplasia; CT = komputertomográfia; CGH = (comparative genome hybridisation) komparatív genomhibridizáció; CYP21A2 = 21-hidroxiláz enzimet kódoló gén; CNV = (copy number variation) kópiaszám-variáció; DNS = dezoxiribonukleinsav; DMD = Duchenne-féle izomdisztrófiáért felelős gén, disztrófin; FISH = (fluorescent in situ hybridisation) fluoreszcens in situ hibridizáció; HPLC = (high performance liquid chromatography) nagy felbontóképességű folyadékromatográfia; MAPH = (multiplex amplifiable probe hybridisation) multiplex amplifikálhatópróba-hibridizáció; MLPA = (multiplex ligation probe amplification) multiplex ligációspróba-amplifikáció; MRT = mágnesesrezonancia-tomográfia; NF1 = neurofibromatosis 1. típusáért felelős gén; PCR = (polymerase chain reaction) polimeráz láncreakció; SNP = (single nucleotide polymorphism) egyetlen nukleotidot érintő polimorfizmus; STR = (short tandem repeat) rövid ismétlődő DNS-szakasz; VHL = von Hippel-Lindau-szindróma

A molekuláris biológiai vizsgálómódszerek egyre gyakrabban jelennek meg a rutin klinikai gyakorlatban [1]. Monogénes öröklődésű betegségek esetén a betegség háttérben álló gén hibájának kimutatása jelenti a genetikai diagnosztikai feladatot. Poligénes öröklődésűnek tartott betegségekben a betegségre való hajlam nem egyetlen gén hibájával, hanem több génvariáns (polimorfizmus) együttes előfordulásával hozható összefüggésbe [2]. A génpolimorfizmusok a népesség legalább 1%-ában, de akár jóval nagyobb gyakorisággal is előfordulhatnak. Természetesen az öröklött hajlamot környezeti tényezők is módosíthatják.

A betegségek okozó, illetve betegségre hajlamosító génhibák és génvariánsok minőségi és mennyiségi szempontok alapján csoportosíthatók. A részleteket illetően utalunk egyes adatbázisokra, mint például a Humán Gén Mutációs Adatbázisra ([www.hgmd.org](http://www.hgmd.org)), illetve a jelenleg érvényes mutációs nevezéktanra [3].

A genetikai variabilitás egyik nem ritka formája az adott gén vagy DNS-szakasz nagy részére vonatkozó úgynevezett kópiaszám-variáció (CNV), amely legalább 1000 bázispárt érint ([Database of Genomic Variants: http://projects.tcag.ca/variation/](http://projects.tcag.ca/variation/)). A humán genom körülbelül 12%-a kópiaszám-variációt tartalmaz [4]. A génkópiaszám megváltozásának betegségek okozó vagy betegségre hajlamosító szerepe is lehet; a Duchenne- és Becker-féle izomdisztrófia, a Prader-Willi-szindróma és számos egyéb betegség a kóros génkópiaszámmal hozható összefüggésbe [5, 6].

Külön csoportnak tekinthetjük azokat a génhibákat, amikor az adott génnek egy jelentősebb szakasza hiányzik (>100, de rendszerint <1000 bázispár). Ilyen esetben úgynevezett nagy géndeletiőről beszélünk, szemben a kisszámú nukleotid hiányával jellemzett úgynevezett kis (mikro-) géndeletiőkkel [7]. A monogénesen öröklődő betegségek jelentős része nemcsak a betegségek okozó gén csírasejtes pontmutációjával, hanem a gén teljes vagy részleges csírasejtes deleitójával is összefügg. A szomatikus nagy géndeletiők különösen a tumor-suppresszor gének esetében bírnak kiemelt jelentőség-

gel (Knudson-féle kettős sérülés hipotézise). Elsősorban nagy metabolikus aktivitású daganatok, illetve izombetegségek esetében a mitokondriális DNS-ben is nagy géndeletiők, illetve CNV-k lehetnek jelen [8].

Összefoglalónk célja, hogy áttekintsük a nagy géndeletio-kimutató módszereit, és két, monogénesen öröklődő betegségben végzett saját vizsgálataink példáján keresztül bemutassuk a módszerek gyakorlati alkalmazásának lehetőségeit.

## A DNS-szekvenálás alkalmatlan módszer a nagy géndeletiők kimutatására

Napjainkban a genetikai diagnosztika egyik leggyakoribb vizsgálómódszere az adott gén bázissorrendjének meghatározása, amelyet rendszerint direkt DNS-szekvenálással végeznek. Ennek során perifériás vér fehérvérsejtjeiből kivont genomiális DNS-mintában a vizsgálni kívánt gént vagy génszakaszt polimeráz láncreakcióval sokszorozzák, majd DNS-szekvenáló automatával meghatározzák a DNS bázissorrendjét, és az eredményt a referenciaszekvenciához hasonlítják. A DNS-szakasz bázissorrendjének azonosítására több kémiai módszert fejlesztettek ki, mint például a Sanger-féle didezoxi vagy láncterminációs szekvenálást, a Maxam-Gilbert-féle limitált hasítós szekvenálást, a Nyren-Ronaghi-féle pirosekvenciót, valamint legújabban az úgynevezett egymolekula-szekvenálást (single-molecule sequencing) [9]. Az eredményt szinkódolt kromatográfias kép formájában jelenítik meg. Ha a két allélon ugyanazon pozícióban a nukleotidok egymástól eltérőek, akkor a kromatográfias képen a két különböző nukleotidnak megfelelő jel alapján a heterozigóta genetikai eltérés könnyűszerrel azonosítható. Az egyik allél hiánya (hemizigóta allél) vagy nagy génszakasz deleitója (heterozigóta deleitio) esetén azonban a direkt DNS-szekvenálás nem alkalmas a génhiba kimutatására, ugyanis a két azonos génkópia közül az egyik hiánya a kromatográfias képen nem hoz létre eltérést. Ezért a gén nagy deleitójának vagy kópiaszám-változásának kimutatására más módszerek alkalmazása szükséges (*1. táblázat*).

## A géndeletio-kimutató hagyományos módszerei

A nagy géndeletiők kimutatására alkalmas első genetikai módszereket az 1970-es években dolgozták ki. A legkorábbi módszerek közé az úgynevezett kromoszóma-sávtechnikák tartoztak, amelyek a kromoszómák szintjén mutatták ki a kromoszómaszakaszok eltéréseit. Az izolált kromoszómákészletet tárgylemezen Giemsa-festékkel festették és mikroszkóp alatt vizsgálták a kromoszómaszerelvény G-sáv-mintázatát. A kromoszóma-sávtechnikák (G-, R-, C-, T-, Q-sáv) felbontóképessége 5-10 megabp [10]; alkalmazásuk például a myelodysplasiás

1. táblázat | A Nagy géndeletio és kópiaszám-változás kimutatására alkalmazható módszerek jellemzői

Módszer	A minta jellemzői, a vizsgálathoz szükséges DNS	Felbontóképesség nagy deletióra vonatkozóan	Egy időben vizsgálható locusok	Előny	Hátrány	Költség
Kromoszóma-sávtechnikák	Izolált kromozómakészlet	5–10 megabp	Teljes genom	Direkt analízis, nincs további jelfeldolgozás	Kis felbontóképesség	Közepes
Southern-blot	Mikrogramm	5–10 megabp	1	Pontosság	Radioaktív izotóp, időigényes	Közepes
FISH	Izolált kromozómakészlet	5–10 megabp	<10	Fluoreszcens jelölés	Intakt sejtek vizsgálhatók	Közepes
DHPLC	Pikogramm	100 bp–100 kilobp	<10	Kis bázispár- és intenzitáskülönbség jól mérhető	Ismert locus vizsgálható	Közepes
Multiplex PCR	Pikogramm	100 bp–100 kilobp	<10	Gyors	Ismert locus vizsgálható	Alacsony
Kvantitatív PCR	Nanogramm	100 bp–1 kilobp	<10	Nagy pontosság	Ismert locus vizsgálható	Magas
Mikroszatellitamarker-analízis	Pikogramm	100 kilobp	<10	Nagy pontosság	Heterozigóta locus vizsgálható	Közepes
MAPH MLPA	Pikogramm	100 bp–2 megabp	1–40	Jó felbontás, nagy pontosság	A teljes genom nem vizsgálható	Közepes
CGH	Mikrogramm	100 kilobp	Teljes genom	A teljes genom vizsgálható	Alacsony felbontás	Közepes
Array CGH	Nanogramm	500 bp	Teljes genom	Nagy felbontás	Bonyolult bioinformatikai feldolgozás	Magas

A rövidítéseket lásd a rövidítésjegyzékben!

szindrómák diagnosztikájában még napjainkban sem szorult háttérbe [11].

Egy másik módszer, a Southern-blot azon alapul, hogy a gélelektroforézissel méret szerint szétválasztott és vizsgálómembránra áthelyezett DNS-t a vizsgálandó DNS-szakaszra specifikus radioizotóppal jelölt oligonukleotidpróbával hibridizálják, majd a próba DNS-hez kötődését autoradiográfiával jelenítik meg. Elsősorban restrikciósenzim-felismerő helyet érintő mutációk azonosítására alkalmazzák [12]. A géndózis pontosabb meghatározása a Southern-blot továbbfejlesztett változatával lehetséges (kvantitatív Southern-blot).

A fluoreszcens oligonukleotidpróbák kifejlesztése lehetővé tette az interfázisban vagy metafázisban levő intakt sejtek vizsgálatát (fluoreszcens in situ hibridizáció, FISH). Ezzel a módszerrel akár több locus egy időben is vizsgálható (multiplex FISH, spektrális karyotipus-analízis, digitális kariotipizálás) [13]. Bizonyos esetekben a módszerrel nemcsak a nagy géndeletiók, hanem a génduplikációk és génáthelyeződések (transzlokációk) is kimutathatók. A Southern-blot és a FISH felbontása a sávtechnikáékéval megegyező.

### A géndeletio-vizsgálat PCR-alapú módszerei

Homozigóta nagy géndeletio kimutatására a legegyszerűbb PCR-alapú módszer, ha a deletio helyének ismer-

tében a PCR-vizsgálathoz olyan oligonukleotidpróbákat alkalmazunk, amelyek a templát DNS-láncon csak akkor kerülnek a fragmentumszintézishez megfelelő térközelségbe, ha a köztes szakasz homozigóta deletio következtében hiányzik [14].

#### *Denaturáló nagy felbontóképességű folyadékkromatográfia*

A nagy felbontóképességű folyadékkromatográfia (HPLC) alkalmas fluoreszcens jelölés nélküli PCR-termékek hatékony szétválasztására és mennyiségének meghatározására. Reverz fázisú (RP) HPLC során a denaturált (D) PCR-terméket nagy nyomáson, egy, az elválasztást biztosító oszlopon átáramoltatják, majd a kontrollmintához való hasonlítással határozzák meg a DNS-fragmentumok mennyiségét [D(RP)HPLC]. A módszerrel a DNS-fragmentumok kicsiny méret- és jelintenzitásbeli eltérései is detektálhatók, ezért egy gén több exonjának egyidejű vizsgálatára is alkalmazható [15].

#### *Kvantitatív, valós idejű (real-time) PCR-alapú módszerek (qPCR, RT-PCR)*

A valós idejű PCR a fluoreszcens fotometria és a PCR együttes alkalmazásán alapul. A PCR-termociklusokban

keletkező fluoreszcens termék egyre növekvő intenzitású fényjelet ad, amelyet valós időben detektálnak. A kémiai módszer a kettős szálú DNS-be nem specifikusan interkalálódó fluoreszcens festéken (például SYBRGreen) vagy kettős fluoreszcens jelölésű specifikus próbák hibridizációján alapul (például TaqMan). A SYBRGreen-alapú módszer nagy specificitását a PCR-hez alkalmazott oligonukleotid próbák fajlagossága adja. A TaqMan módszer alkalmazása esetén a különbözően jelölt fluoreszcens próbák igen nagy specificitása lehetőséget ad több locus egyidejű vizsgálatára. Az alkalmazott kontrolloktól és a bioinformatikai adatfeldolgozástól függően a mért értékek abszolút vagy relatív mennyiségeket jelezhetnek; pontos moláris mennyiségű kontroll templát DNS-hez viszonyítás esetén meghatározható a vizsgált PCR-termék abszolút mennyisége, míg a PCR-termék mennyiségének relatív mérésekor az eredményeket azonos mennyiségű mintában mért más géntermék mennyiségéhez viszonyítják. A PCR-termék mennyiségének relatív mérése kiválóan alkalmas egyetlen nukleotidot érintő polimorfizmusok (SNP-k) vizsgálatára, ugyanis a polimorf és vad allélra specifikus TaqMan próbák használatával a homozigóta és heterozigóta genotípusok jól elkülöníthetők. A SYBRGreen módszer exonok sokszorosítása esetén alkalmas heterozigóta nagy géndeletiók, illetve CNV-k detektálására.

### *Mikroszatellitamarker- (vagy short tandem repeat – STR) analízis*

A mikroszatelliták 2–6 nukleotidból álló, ismétlődően jelen levő DNS-szakaszok [16, 17]. Adatbázisokból elérhető próbák segítségével (UNISTS <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists>) az adott gént környező szakasszal együtt sokszorosítva a kromoszómarégióra specifikus polinukleotid lánc keletkezik. Kapilláris elektroforézissel szétválasztás során megállapítható a mikroszatellita marker jelenléte, illetve kópiaszáma. Az összesen mintegy hétezer mikroszatellitával átlagosan 100 kilobázis méretű kromoszómaszakaszok kópiaszámáról nyerhetünk adatokat [18]. A módszer fő hátránya, hogy csak olyan régiókról szolgáltat eredményt, amelyekben heterozigóta mikroszatellita marker található (informatív marker), illetve két közeli mikroszatellita marker deletiója esetén valószínűsíthető a köztes szakasz deletiója.

### *Multiplex amplifikálhatópróba-hibridizáció (MAPH)*

A denaturált DNS-t nejlonmembránon való immobilizálást követően különböző hosszúságú specifikus próbákkal hibridizálják. A próbák a kópiaszámmal arányosan kötődnek a templát DNS-hez; a hibridizált próbák később PCR-rel sokszorosíthatók és elektroforézissel elválaszthatók [19].

### *Multiplex ligációspróba-analízis (MLPA)*

A módszer elve a MAPH-hoz nagymértékben hasonló, azonban a hibridizáláshoz a próbát kettéhasított állapotban adják hozzá a denaturált, szolúbilis DNS-hez, majd ligáz segítségével az illeszkedő végeket összekapcsolják. A ligáz csak kettős szálú DNS esetén, a próba és a denaturált DNS pontos összekapcsolódásakor működik [20]. Mind a MAPH, mind az MLPA akár 40 locus egyidejű vizsgálatára alkalmas, és mindkét módszer jelentősen nagyobb felbontással bír, mint a mikroszatellitamarker-analízis. Alkalmasak olyan nagyméretű gének hatékony vizsgálatára, mint a neurofibromatosis I. típusáért felelős gén (*NFI*, 60 exon), a Duchenne-féle izomdisztrófiáért felelős gén (*DMD*, 79 exon) vagy az öröklődő emlőrák I-es génje (*BRCAl*, 24 exon).

### *A komparatív genomhibridizálás (CGH)*

A komparatív genomhibridizálás a FISH módszerhez hasonlít [21, 22]. A vizsgálat során két különböző fluoreszcens jelöléssel ellátott, azonos mennyiségű egészséges kontroll (például Cot 1 DNS) és vizsgálandó teljesgenom-DNS-t hibridizálnak tárgylemezen rögzített egészséges metafázisos kromoszómákkal. A fluoreszcens fragmentumok a kópiaszámtól függően kapcsolódnak a kromoszómákhoz. Azokon a kromoszómaszakaszokon, ahol a kétféle jelölésű templátok kiegyenlítően hibridizálnak, a fluoreszcens jelek aránya azonos (=1). Ha a vizsgált mintában a genom fragmentumai intenzívebb fluoreszcens jelet adnak (relatív hányados >1,2), mint az egészséges kontrollok fragmentumai, akkor a vizsgált genom megfelelő szakaszán kópiatöbblet állapítható meg, míg a kevésbé intenzív jel (relatív hányados <0,85) a vizsgált szakaszon kópiahiányt jelez. A CGH alkalmas például tumorsejtek CNV-, illetve nagy géndeletiós profiljának, valamint a daganat és metasztázis közös klonális eredetének kimutatására [22, 23]. A CGH felbontása 100 kilobp [10].

### **Géndeletiók kimutatása csip- (array-) alapú módszerekkel**

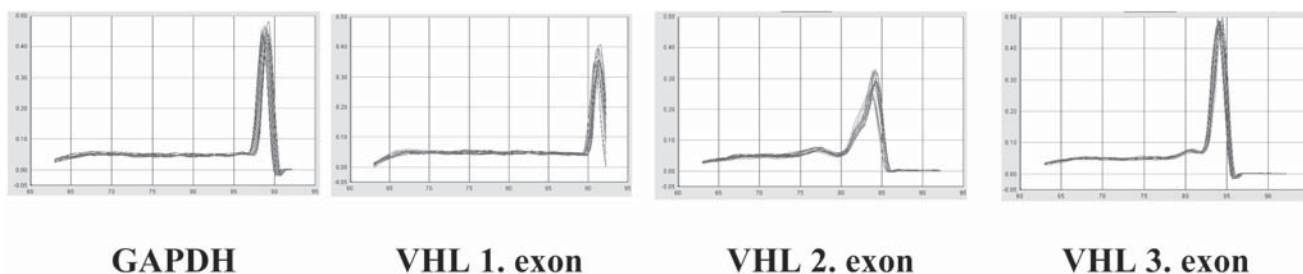
A CNV-k, illetve a nagy géndeletiók kimutatásának jelenlegi legkorszerűbb módszere az array-alapú CGH (Nimblegen-array) [24]. Az array-k integrált rendszerekben egyszerre nagyszámú, automatizáltan végrehajtható vizsgálat elvégzését teszik lehetővé. Az array tervezése, a templát precíz előkészítése és a mért adatok informatikai feldolgozása jelentik a mérés legkritikusabb lépéseit. A vizsgálat pontossága és gyors információ szerzhetőség a templát kópiaszám-variációjáról, akár az összes humán kromoszómára, akár 200 bp méretű szakaszokra vonatkozóan (nagy felbontású CGH).



2. táblázat | Von Hippel–Lindau-szindrómában szenvedő hazai indexbetegekben kimutatott heterozigóta *VHL* gén mutációk és deletiók

Indexbeteg sorszáma	Életkor, nem	A betegség klinikai megjelenése	A <i>VHL</i> gén nagy deletiója	A <i>VHL</i> gén egyéb hibája
1.	22 év, nő	VHL 1. típusa (KIR + Ret)	–	L158V
2.	19 év, férfi	VHL 1. típusa (KIR + Ret)	–	R161X
3.	33 év, férfi	VHL 1. típusa (Vese + KIR)	3. exon deletiója	–
4.	22 év, nő	VHL 1. típusa (KIR + Ret)	2. exon deletiója	–
5.	21 év, férfi	VHL 1. típusa (Vese + KIR + Ret)	–	354_355delCT
6.	27 év, férfi	VHL 2B típusa (Phaeo + Ret + (Vese))	–	R167Q
7.	34 év, nő	VHL 2B típusa (Phaeo + Ret + Vese + KIR)	–	S80I
8.	19 év, nő	VHL 1. típusa (KIR, Ret)	–	IVS1 + 1G>A (c.340 + 1G>A) splice mutáció
9.	24 év, nő	VHL 1. típusa (KIR, Ret)	–	N78Y
10.	9 év, nő	VHL 1. típusa (KIR, Ret)	1. és 2. exon deletiója	–
11.	42 év, nő	VHL 2. típusa (Phaeo, Ret)	2. és 3. exon deletiója	–

KIR = központi idegrendszeri haemangioblastoma; Ret = retinaangiomatosis; Vese = világos sejtes veserák; Phaeo = phaeochromocytoma



1. ábra | A *GAPDH* gén 8. exonjának és a *VHL* gén 1., 2. és 3. exonjának SYBRGreen módszerrel való sokszorosításakor keletkező specifikus fragmentumok olvadáshőmérséklet-analízise

### Saját vizsgálataink

A nagy géndeletiók kimutatásának jelentőségét az autoszomális domináns módon öröklődő von Hippel–Lindau-szindróma (VHL) és az autoszomális recesszív öröklődésű congenitalis adrenalis hyperplasia (21-hidroxiláz-defektus, CAH) példáján keresztül mutatjuk be. VHL-szindrómás betegekben a *VHL* gén csírasejtes betegségkókozó eltérései, így a nagy deletiók is heterozigóta formában vannak jelen, míg CAH-os betegekben a *CYP21A2* gén csírasejtes eltérései homozigóta vagy összetett (compound) heterozigóta formában fordulnak elő.

#### A *VHL* gén heterozigóta nagy deletiójának kimutatása

Irodalmi adatok szerint VHL-szindrómás betegek mintegy 80%-ában a *VHL* gén 3. exonjának valamelyikén hagyományos DNS-szekvenálással heterozigóta betegségkókozó mutáció mutatható ki, míg az esetek fennmaradó 20%-ának többségében a betegség a *VHL* gén DNS-szekvenálással nem kimutatható nagy deletióval áll összefüggésben [25].

A Semmelweis Egyetem II. Sz. Belgyógyászati Klinikáján előzetes genetikai tanácsadást és írásos beleegyező nyilatkozat aláírását követően 11, VHL-szindrómában szenvedő család 42 tagjának végeztük el a *VHL* gén vizsgálatát. A 11 indexbeteg közül 7 betegben találtunk direkt DNS-szekvenálással betegségkókozó heterozigóta *VHL* gén eltérést. Ezek közül 6 különböző pontmutációt már korábban ismertettek a nemzetközi irodalomban, míg az ötödik esetben észlelt heterozigóta génhiba (354\_355delCT) új betegségkókozó mutációnak bizonyult (2. táblázat). A DNS-szekvenálással eltérést nem mutató 4 indexbetegben a *VHL* gént érintő nagy deletio vizsgálatára az MLPA és a SYBRGreen-alapú valós idejű PCR módszert alkalmaztuk.

Az MLPA-vizsgálat során a kereskedelmi forgalomban kapható kit (SALSA MLPA kit, MRC-Holland, Amsterdam, Hollandia) [20] felhasználásával a *VHL* gén, illetve annak környezetében elhelyezkedő gének (*FANCD*, *IRAK2*, *GHR*) meghatározott szakaszairól 13 különböző specifikus fragmentumot és további 17 referenciafragmentumot képeztünk; a keletkező fragmentumok és a belső kontrolltermékek fluoreszcens jelölést (6-FAM) tartalmaztak. A ligációt, majd a PCR-t követően a keletkezett fragmentumokat kapilláris elektroforézissel szétválasztottuk. A kiértékeléshez

PeakScanner szoftvert használtunk (Applied Biosystems, Foster City, CA, Amerikai Egyesült Államok). Az adatfeldolgozás MS-Excel programmal történt. A *VHL* gén 1. exonját négy, a 2. és 3. exont két-két specifikus fragmentum jelenléte jellemezte. Deletiót akkor állapítottunk meg, amikor az érintett görbe alatti terület a kontrollhoz képest legalább a felére ( $\leq 50\%$ ) csökkent.

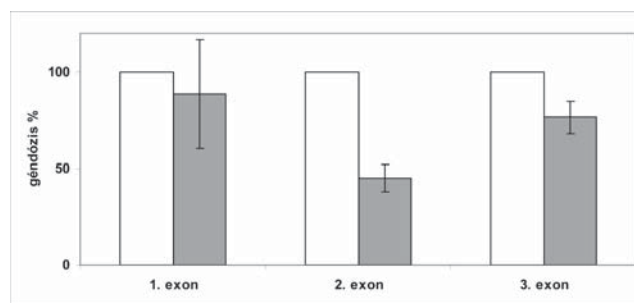
A SYBRGreen-alapú valós idejű PCR-vizsgálatot *Ponchel és mtsai* módszerével végeztük [26]. A Primer3 szoftver [27] felhasználásával oligonukleotidpróbákat terveztünk, és a primerek specificitását az NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) program segítségével ellenőriztük. A valós idejű PCR-módszer fajlagosságát a fragmentumok olvadási hőmérséklet-analízise szemlélteti (1. ábra). Belső kontrollként a glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz gén (*GAPDH*) 8. exonját használtuk. Az eredményeket a küszöbciklusok összehasonlítása alapján (comparative threshold,  $C_t$ ), a  $\Delta C_t = C_t(\text{vhl\_exon}) - C_t(\text{GAPDH})$  egyenlet segítségével értékeltük [26]. A mért  $C_t$ -értékeket akkor fogadtuk el, ha a triplikátumban mért  $C_t$ -értékek szórása 5% alatt volt. A *VHL* gén vizsgált exonjának deletióját 0,6 (60%) alatti  $\Delta C_t$  küszöbérték esetén állapítottuk meg.

Az MLPA (2. ábra) és a valós idejű PCR (3. ábra) módszerrel azonos eredményeket kaptunk. A DNS-szekvenálással eltérést nem mutató 4 indexbetegben kimutatott heterozigóta nagy deletio a *VHL* gén különböző exonjait érintette (2. exon, 3. exon, 1. és 2. exon, 2. és 3. exon) [28].

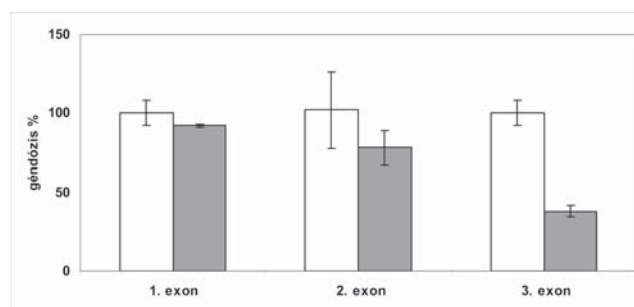
### A *CYP21A2* gén homozigóta nagy deletiójának vizsgálata

A congenitalis adrenalis hyperplasia leggyakoribb formáját a 21-hidroxiláz enzimet kódoló *CYP21A2* gén veleszületett defektusai okozzák. A korai, akár életet veszélyeztető klinikai tünetekkel járó sóvesztő, valamint az egyszerű virilizáló altípusoknak együtt mintegy 10–20%-a a *CYP21A2* gén homozigóta deletiójával áll összefüggésben [29].

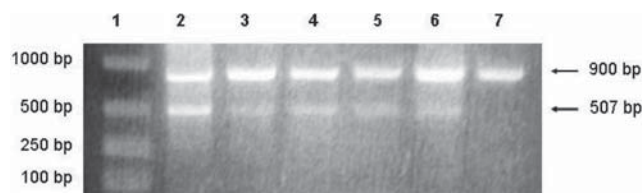
A *CYP21A2* gén homozigóta deletiójának és a leggyakoribb homozigóta és heterozigóta mutációinak vizsgálatára megbízható, gyors és egyszerűen kivitelezhető PCR-alapú módszert dolgoztak ki [30], amelynek továbbfejlesztett változata hazai munkacsoportok tevékenységéhez kötődik [31, 32]. A *CYP21A2* gén vizsgálatát nehezíti a vele nagy hasonlóságot mutató pszeudogén (*CYP21A1*) jelenléte. A hosszabb valódi génhez képest a pszeudogénen hiányzik egy 8 bázispárból álló génszakasz, ezenkívül a pszeudogén számos mutációt tartalmaz, ezért funkcióképtelen fehérjét eredményez. A *CYP21A2* gén homozigóta nagy deletiójának kimutatására kidolgozott PCR-reakció során két „forward” oligonukleotidpróbát használunk, amelyek közül az egyik a valódi gén szekvenciájára specifikus 8 bp-t tartalmazó szakaszához, míg a másik ettől 5' irányban tapad. A „reverz” primer a *CYP21A2* gén 5. exonjára



2. ábra A *VHL* gén 2. exonja deletiójának kimutatása MLPA módszerrel. Az üres oszlopok egészséges kontrollszemély, míg a sötét oszlopok von Hirschman-Lindau-szindrómában szenvedő beteg vizsgálati eredményeit illusztrálják



3. ábra A *VHL* gén 3. exonja deletiójának kimutatása valós idejű PCR módszerrel. Az üres oszlopok egészséges kontrollszemély, míg a sötét oszlopok von Hirschman-Lindau-szindrómában szenvedő beteg vizsgálati eredményeit illusztrálják



4. ábra A *CYP21A* gén homozigóta nagy deletiójának kimutatása allélspecifikus PCR módszerrel. 1. minta: DNS-marker; 2–6. minta: legalább egy *CYP21A2* alléllal rendelkező egyének; 7. minta: *CYP21A2* gén homozigóta deletiója congenitalis adrenalis hyperplasia sóvesztő formájában szenvedő betegben

specifikus. A PCR-reakciót követően a gélelektroforézissel méret szerint elválasztott reakciótermékek közül 900 bp méretű termék a belső kontrollként szolgál, míg a kisebb, 507 bp méretű termék a *CYP21A2* gén legalább egy alléljának jelenlétét jelzi (4. ábra, 2–6. minta). A *CYP21A2* gén homozigóta deletiója esetén az 507 bp méretű specifikus termék hiányzik (4. ábra, 7. minta).

### Következtetés

A betegségokozó vagy betegségre hajlamosító géndeletiók, illetve kópiaszám-változások kimutatására alkalmas módszerek az elmúlt évtizedekben jelentős mértékben fejlődtek. Gyakorlati alkalmazásuk számos esetben jelentősen elősegíti a betegségek hátterében álló genetikai eltérések azonosítását.

## Irodalom

- [1] Cooper, G. M., Nickerson, D. A., Eichler, E. E.: Mutational and selective effects on copy-number variants in the human genome. *Nat. Genet.*, 2007, 39, S22–S29.
- [2] Beckmann, J. S., Estivill, X., Antonarakis, S. E.: Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability. *Nat. Rev. Genet.*, 2007, 8, 639–646.
- [3] den Dunnen, J. T., Antonarakis, S. E.: Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum. Mutat.*, 2000, 15, 7–12.
- [4] Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K. R. és mtsai: Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 2006, 444, 444–454.
- [5] Jakobsson, M., Scholz, S. W., Scheet, P. és mtsai: Genotype, haplotype and copy-number variation in worldwide human populations. *Nature*, 2008, 451, 998–1003.
- [6] Nakamura, Y.: DNA variations in human and medical genetics: 25 years of my experience. *J. Hum. Genet.*, 2009, 54, 1–8.
- [7] Armour, J. A., Barton, D. E., Cockburn, D. J. és mtsai: The detection of large deletions or duplications in genomic DNA. *Hum. Mutat.*, 2002, 20, 325–337.
- [8] Poe, B. G., Navratil, M., Arriaga, E. A.: Absolute quantitation of a heteroplasmic mitochondrial DNA deletion using a multiplex three-primer real-time PCR assay. *Anal. Biochem.*, 2007, 362, 193–200.
- [9] Schuster, S. C.: Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nat. Methods*, 2008, 5, 16–18.
- [10] Carter, N. P.: Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. *Nat. Genet.*, 2007, 39, S16–S21.
- [11] Pozdnyakova, O., Miron, P. M., Tang, G. és mtsai: Cytogenetic abnormalities in a series of 1,029 patients with primary myelodysplastic syndromes: a report from the US with a focus on some undefined single chromosomal abnormalities. *Cancer*, 2008, 113, 3331–3340.
- [12] Ukkola, O., Rosmond, R., Tremblay, A. és mtsai: Glucocorticoid receptor Bel I variant is associated with an increased atherogenic profile in response to long-term overfeeding. *Atherosclerosis*, 2001, 157, 221–224.
- [13] Wang, T. L., Maierhofer, C., Speicher, M. R. és mtsai: Digital karyotyping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 16156–16161.
- [14] Desviat, L. R., Perez, B., Ugarte, M.: Identification of exonic deletions in the PAH gene causing phenylketonuria by MLPA analysis. *Clin. Chim. Acta*, 2006, 373, 164–167.
- [15] Pavlova, A., El-Maarri, O., Luxembourg, B. és mtsai: Detection of heterozygous large deletions in the antithrombin gene using multiplex polymerase chain reaction and denatured high performance liquid chromatography. *Haematologica*, 2006, 91, 1264–1267.
- [16] Weissenbach, J., Gyapay, G., Dib, C. és mtsai: A second-generation linkage map of the human genome. *Nature*, 1992, 359, 794–801.
- [17] Murray, J. C., Buetow, K. H., Weber, J. L. és mtsai: A comprehensive human linkage map with centimorgan density. Cooperative Human Linkage Center (CHLC). *Science*, 1994, 265, 2049–2054.
- [18] Stewart, E. A., McKusick, K. B., Aggarwal, A. és mtsai: An STS-based radiation hybrid map of the human genome. *Genome Res.*, 1997, 7, 422–433.
- [19] Armour, J. A., Sismani, C., Patsalis, P. C. és mtsai: Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucl. Acids Res.*, 2000, 28, 605–609.
- [20] Schouten, J. P., McElgunn, C. J., Waaijer, R. és mtsai: Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucl. Acids Res.*, 2002, 30, 57–69.
- [21] Wong, L. J., Dimmock, D., Geraghty, M. T. és mtsai: Utility of oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization for detection of target gene deletions. *Clin. Chem.*, 2008, 54, 1141–1148.
- [22] Balázs M., Ádány R.: Molekuláris morfológiai módszerek a laboratóriumi medicinában. *LAM*, 2001, 11, 340–346.
- [23] Pinkel, D., Seagraves, R., Sudar, D. és mtsai: High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat. Genet.*, 1998, 20, 207–211.
- [24] Pollack, J. R., Perou, C. M., Alizadeh, A. A. és mtsai: Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat. Genet.*, 1999, 23, 41–46.
- [25] Casarin, A., Martella, M., Polli, R. és mtsai: Molecular characterization of large deletions in the von Hippel–Lindau (VHL) gene by quantitative real-time PCR: the hypothesis of an aluminum-mediated mechanism underlying VHL gene rearrangements. *Mol. Diagn. Ther.*, 2006, 10, 243–249.
- [26] Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K. és mtsai: Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the Taq-Man assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol.*, 2003, 3, 18.
- [27] Rozen, S., Skaletsky, H.: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.*, 2000, 132, 365–386.
- [28] Gergics, P., Patócs, A., Tóth, M. és mtsai: Germline VHL gene mutations in Hungarian families with von Hippel–Lindau disease and patients with apparently sporadic unilateral pheochromocytomas. *Eur. J. Endocrinol.*, 2009, 161, 495–502.
- [29] Tajima, T., Fujieda, K., Nakayama, K. és mtsai: Molecular analysis of patient and carrier genes with congenital steroid 21-hydroxylase deficiency by using polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism. *J. Clin. Invest.*, 1993, 92, 2182–2190.
- [30] Wedell, A., Ritzen, E. M., Haglund-Stengler, B. és mtsai: Steroid 21-hydroxylase deficiency: three additional mutated alleles and establishment of phenotype-genotype relationships of common mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 7232–7236.
- [31] Barta, C., Sasvári-Székely, M., Guttman, A.: Simultaneous analysis of various mutations on the 21-hydroxylase gene by multi-allele specific amplification and capillary gel electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 1998, 817, 281–286.
- [32] Dolzan, V., Sólyom, J., Fekete, G. és mtsai: Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia. *Eur. J. Endocrinol.*, 2005, 153, 99–106.

(Patócs Attila dr.,  
Budapest, Szentkirályi u. 46., 1088  
e-mail: patatt@bel2.sote.hu)