

## Bevezetés – A Humán Genom Project

A Humán Genom Project (HUGO) 1989-ben indult hatalmas tudományos vállalkozás, melynek célja a teljes emberi genom szekvenciájának meghatározása. A terv 2001-ben megvalósult, s ezzel lezárult a „genomika” (genomics) korszaka, és megkezdődött az ún. „post-genomic” era (másnéven funkcionális genomika, vagy proteomika), amikor a megismert gének által kódolt fehérjék funkciójának megértésén van a legnagyobb hangsúly. Így a nyers szekvencia adatokból a kutatás, a diagnosztika és a gyógyítás céljaira felhasználható értelmes információ válik. Ezen kívül a következő néhány év feladata az egyének közötti variációk, polimorfizmusok megismerése is, azaz egy polimorfizmus térkép megalkotása.

Az **emberi genom**  $\sim 3 \cdot 10^9$  bázispárból (bp) áll és jelenleg  $\sim 35\,000$ -re teszik a benne található **gén**ek várható számát (a néhány évvel ezelőtt gondolt 100 000 körüli helyett). Egy átlagos gén exonjainak hossza kb. 1000 bp, tehát a teljes génállománynak csak az 1-1,5%-a a fehérjéket kódoló exonszakasz. Az egyének közötti variancia fokára jellemző, hogy két nem rokon személy között  $\sim 0,1\%$ -os különbség van, tehát a szekvencia 99,9%-a teljesen azonos, ami átlagban 1 báziskülönbséget jelent 1000 bp-ként, azaz összesen 3 millió különbséget. Legközelebbi rokonainkkal a csimpánzokkal és a gorillákkal a homológia 99%-os.

Korábban mutációknak azokat a genetikai variációkat neveztük, amelyek valamely betegséghez vezetnek, és polimorfizmusoknak azokat, amelyek semleges, illetve nem ismert hatásuk volt. Manapság a genetikai információ mennyiségének növekedésével azonban az utóbbiak közül is egyre többről derül ki, hogy komplexebb módon jelentőségük van egyes betegségekre való hajlam, illetve személyiségvonás kialakításában, így mára ez a két kategória összemosódott. A korábbi pontmutáció kifejezés helyett ma már célszerűbb az SNP (Single Nucleotide Polymorphism, magyarul: „egyponos nukleotid polimorfizmus”) megjelölést használni. Az egyéni variációk  $\sim 90\%$ -a SNP, ami tehát több, mint 2 millió bázist érint személyenként, de ezeknek persze csak a töredéke fejeződik ki hibás fehérje formájában. A fennmaradó 10% főként rövidebb-hosszabb szekvenciák ismétlődési szám polimorfizmusa, illetve mikro-, makrodeléciók, inzerciók.

A még felderítetlen genetikai hátterű monogénes betegségek számának jelentős csökkenésével mára az érdeklődés egyre inkább a poligénes betegségekre, illetve az olyan genetikai polimorfizmusok felé fordult, amelyek nem egyértelműen valamely betegséget okoznak, hanem – bizonyos környezeti hatásoktól függően – önmagukban illetve bizonyos kombinációban csak hajlamosítanak betegségekre, betegségcsoportokra. Emellett napjainkban nagy lendülettel folyik az egyénre jellemző személyiségvonásokat meghatározó polimorfizmusok kutatása is.

## **A molekulától a betegágyig**

A következőkben két konkrét klinikai példán keresztül mutatjuk be a molekuláris genetikai kutatások jelenlegi eredményeit, az új molekuláris diagnosztikai eljárásokat, és ezek szerepét a betegségek pathogenezisének, lefolyásának, terápiájának jobb megértésében. A két példa - a **21-hidroxiláz defektus** és a **cysticus fibrosis** - részben klinikai jelentőségük, részben szemléletességük miatt kerültek kiválasztásra. A betegségek bemutatásánál a pathobiokémia és molekuláris biológia tárgykörébe nem tartozó részeket (tünetek, hagyományos diagnosztika, kezelés) is röviden áttekintjük különös tekintettel a biokémiai kapcsolatok sokrétűségére. Ezen részek csak a kép teljessége és a könnyebb érthetőség érdekében kerültek az anyagba, és természetesen nem részei a biokémia vizsga követelményeinek. Célunk az volt, hogy a sejtben zajló molekuláris folyamatokból kiindulva, a következmények sorát követve fokozatosan eljussunk a betegségek klinikai jellegzetességeihez, és rávilágítsunk a **kutatás és gyógyítás közötti szoros kapcsolatokra**.

# A 21-hidroxiáz defektus molekuláris genetikája és pathobiokémiája

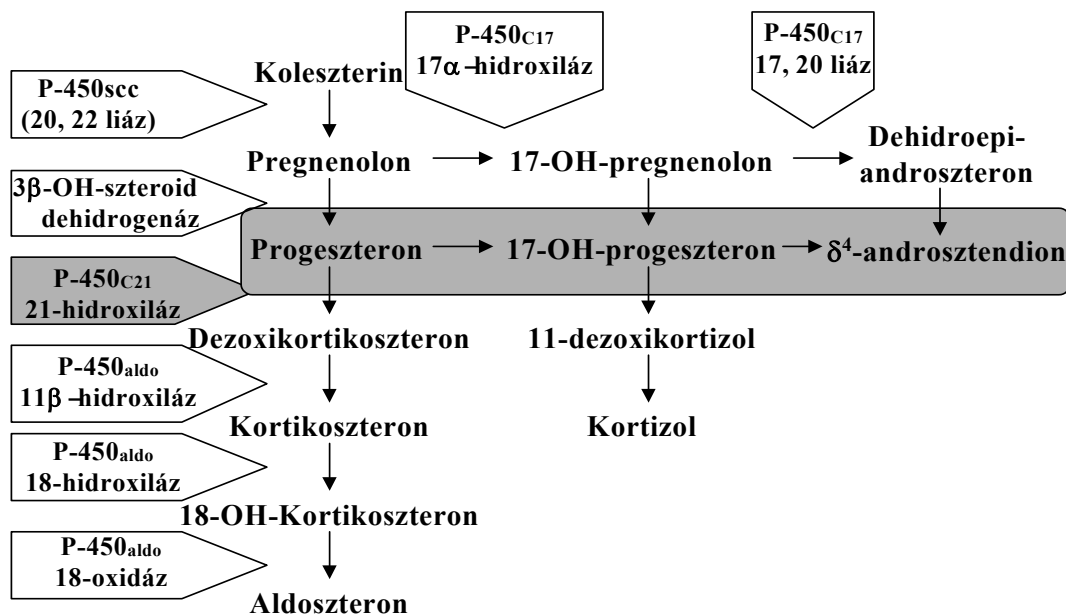
(Hallgatói verzió)

## Bevezetés

A szteroid 21-hidroxiáz enzim defektusa (21-OHD) a congenitalis adrenalis hyperplasiás (CAH) esetek több, mint 95%-ának kialakulásáért felelős. A hibát a 6-os kromoszóma rövid karján található CYP21 gén mutációi okozzák, melyek az enzimaktivitás részleges, közel teljes, illetve teljes mértékű kieséséhez vezethetnek. Ennek tükrében a betegségnek három különböző súlyosságú klinikai formáját különböztetjük meg: a legsúlyosabb sóvesztő (SW), a közepesen súlyos szimpla virilizáló (SV), és a legenyhébb nem klasszikus (NC) (korábbi nevén: későn manifesztálódó) formát. A klasszikus formák (SW és SV) gyakorisága Magyarországon 1/15000 élveszületés, míg a nem klasszikus forma gyakorisága ~ 1/1000.

A 21-hidroxiáz defektus esetében az enzim által katalizált progoszteron→11-dezoxikortoszteron, ill. a 17-OH-progoszteron→11-dezoxikortizol átalakulás sérül, melynek következtében az aldoszteron és a kortizol keletkezése elégtelenné válik (1. ábra).

## Szteroid hormonok bioszintézise:



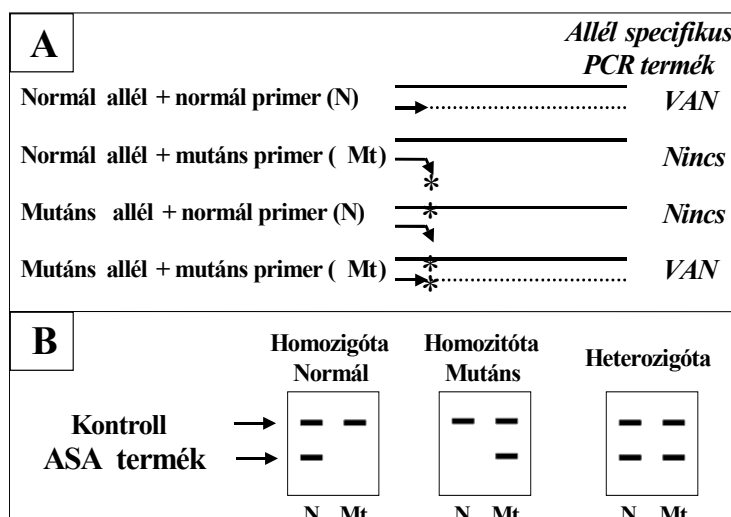
## Genotipizálás

A CAH diagnosztikája szempontjából rendkívül fontos a genotípus meghatározása, mert ez lehetővé teszi a **prenatális diagnózist**. A leány magzat virilizációja a terhesség alatt adott dexamethazon terápiával részben vagy teljesen megelőzhető. A CYP21 gén különféle mutációi a betegség klinikai megjelenési formáinak jellegzetesen széles spektrumát hozzák létre, és a **genotípus-fenotípus korrelációk** meglehetősen egyértelműek. A különböző deléciók, nonszensz mutációk és olyan változások, melyek olvasási kereteltolódáshoz (frameshift) vezetnek, az enzimaktivitás teljes elvesztését okozzák. Egyes pontmutációk azonban egyáltalán nem, vagy csak kismértékben érintik a kódolt fehérje szerkezetét és működését, alig csökkentve az enzim aktivitását. A 21-hidroxiáz defektus egyik leggyakoribb

oka egy 8 bázispárnyi (bp) deléción a 3. exonban, mely inaktív gént eredményez (**pszeudogén**, CYP21P). A szintén igen gyakori ún. G-mutáció esetében a pontmutáció a 2. intron egyik végén van, és a mutáció következménye a intron kivágási (splicing) szekvenciájának hibája. A fent említett két leggyakoribb mutáció mellett vannak ritkábban előfordulók is, létük valószínűleg a pszeudogén jelenlétével függ össze.

A CYP21 gén és pszeudogénje (CYP21P) között igen nagyfokú (~98%-os) a homológia. A leglényegesebb különbség a pszeudogén 3. exonjában létrejött 8 bázispárnyi deléción, ami eltolja az olvasási keretet (frameshift). Így a pszeudogénről aktív enzim nem íródhat át. Ugyanakkor az aktív CYP21 génben eddig észlelt mutációk többsége megtalálható a pszeudogénben is, és valószínű, hogy a mutációk jelentős része a pszeudogénből kerül át az aktív génbe különböző rekombinációs események során. Módszertani szempontból a pszeudogén jelenléte nagyon zavarja az aktív génben keresendő mutációk vizsgálatát, mivel egy adott pontmutáció és környezetének szekvenciája teljesen azonos az aktív és az inaktív génben. Ugyanakkor betegséget kizárólag az aktív gén mutációja okoz.

Pontmutációk kimutatására sokféle módszert használnak. Egyik elterjedt módszer az **allél-specifikus amplifikáció (ASA)**, mely a különböző allélokat (normális illetve mutáns allél) szelektíven amplifikálja. A szelektivitást olyan primer párok tervezésével lehet elérni, melyek 3' vége vagy a normál (N), vagy a mutáns (Mt) szekvenciával komplementer. Egy olyan DNS polimeráz, amelyik nem rendelkezik 3'→5' exonukleáz aktivitással, csak akkor tudja meghosszabbítani a primert – azaz csak akkor hoz létre **PCR** terméket –, ha a 3' vége komplementer a templáttal. Tehát a normál szekvenciának megfelelő primer (N) jelenlétében csak a normál allélről készül másolat, míg a mutáns szekvenciával komplementer primer a mutáns allél felsokszorozására alkalmas (**2.A. ábra**).



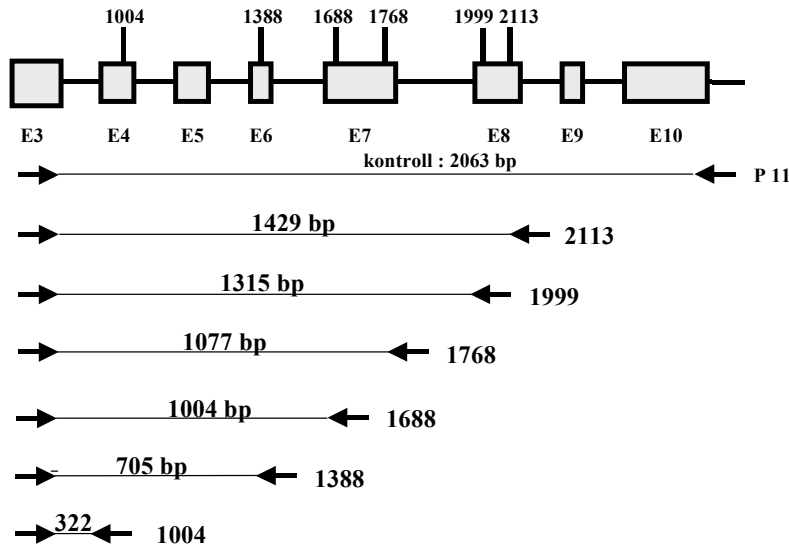
A módszert a CYP21 gén mutációinak vizsgálatára is alkalmaztuk. Így minden egyes mutáció kimutatásához két PCR reakció tartozik (**2.B. ábra**). Az egyik reakcióban a normál (N), a másik reakcióban a mutáns (Mt) szekvenciának megfelelő primert használjuk. Ha csak a normál szekvenciájú primerrel keletkezik PCR termék, akkor a genom nem tartalmazza az adott mutációt.

Ha a mutációnak megfelelő primer hoz létre PCR terméket, akkor a DNS az adott helyen mutációt szenvedett. Ha mindkét reakcióban keletkezik PCR termék, akkor az egyed heterozigóta hordozó. Az, hogy nem keletkezik termék egy adott reakcióegyben, csak akkor informatív, ha egy kontroll PCR termék igazolja a reakció megbízhatóságát, ezért minden reakcióban készül egy kontroll termék is.

## Vizsgálatok

A betegek véréből izolált DNS amplifikáció polimeráz láncreakcióval (PCR) történt. Harminc ciklust végeztünk a következő programmal: 1 perc denaturáció 96 °C-on; 30 sec annelálás 56 °C-on; 3 perc polimerizáció 72 °C-on. A PCR reakciót 10 perces lánchosszabbítással zártuk 72 °C-on.

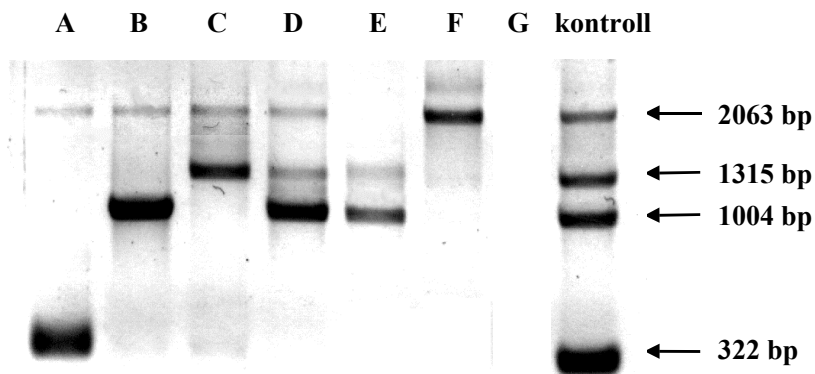
A **3. ábrán** a CYP21 gén egy részlete látható (3-10. exon). A génen szürke téglalapok az



exonokat, felettük a számok a mutációs helyek pozícióját jelölik a génen, a PCR termékek felett azok mérete látható bázispárban (bp), nyilak jelölik a primereket. Az ábrán látható, hogy a PCR „sense” primere minden esetben abból a régióból indul, amely a pszeudogénben nincs jelen. Ezzel a módszerrel kizárható a pszeudogén

amplifikációja. Az allél-specifikus „antisense” primerek mindegyike egy-egy vizsgált mutációnak felel meg, kivéve a legnagyobb DNS fragmentumot meghatározó „antisense” primert, mely a kontroll PCR termék képződéséhez szükséges. Egy reakcióban akár több, a mutációt tartalmazó allél-specifikus primert is használhatunk egyszerre, így több mutáció egyidejű vizsgálata lehetséges. A keletkező termék mérete mutáció-specifikus, így az eredmény nemcsak a mutáns CYP21 gén jelenlétét, de a mutáció pozícióját is meghatározza.

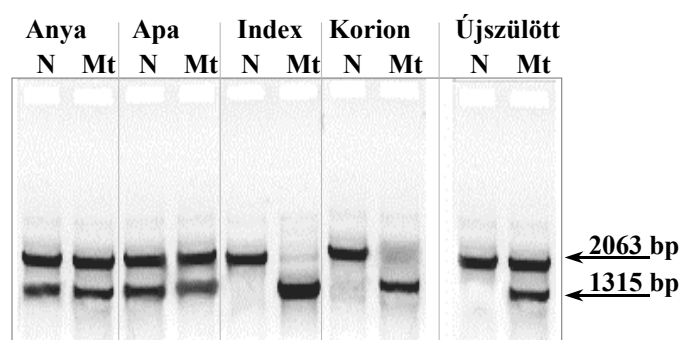
**4. ábra:** Állapítsuk meg a következő példában a betegek genotípusát, azaz melyikben hol található mutáció! Mi a helyzet a G mintával? Eldönthető-e ezekből az eredményekből, hogy a mutáció homozigóta vagy heterozigóta formában van jelen a betegben. Ha igen, miből, ha nem, hogyan lehetne ezt eldönteni? (A kontroll sávban 3, az adott pozíciókban mutációt hordozó beteg mintáinak keverékét használtuk létraként). A nyilak a PCR termékek méretét jelölik. Megjegyezzük, hogy a kontroll fragment képződése csak abban az esetben informatív, ha nincs más



PCR termék. A mutáció-specifikus PCR termékek mérete mindig kisebb, mint a kontroll fragment, képződésük – az adott kísérleti körülmények között – preferenciális. Így a mutáció-specifikus fragmentek mellett a kontroll fragmentek képződése esetenként nagyon gyenge (E minta), azonban ennek nincs informatív értéke.

## Prenatális diagnózis

A 21-hidroxiláz defektus egyike azon kevés betegségeknek, amelyek prenatálisan sikeresen kezelhetők, így a **leánymagzatok virilizációja megelőzhető**. Prenatális vizsgálatokat olyan családokban végeznek, ahol már született beteg gyermek. Ilyenkor az anyával az újabb terhesség megállapítása után rögtön dexamethason kezelést kezdenek, ami megakadályozza a magzat külső nemi szerveinek a magas androgénszint miatti torzulását. A dexamethason a placentán átjutva szupresszálja a magzati hypophysis ACTH túlprodukciónak, ezzel megelőzve az androgénszint túlzott emelkedését. Bár a kezelés a magzat virilizációját segít megakadályozni, tartós adása mellékhatásokkal járhat az anyára nézve, ezért szükség van a magzat érintettségének mielőbbi tisztázására. A rögtön elkezdett prenatális terápia ugyanis tulajdonképpen egy vak terápia; a korábban született beteg testvér alapján feltételezzük csupán, hogy a magzat beteg. A következő példa az első magyarországi prenatális DNS-analízis 21-hidroxiláz hiányban. Az „index” eset DNS vizsgálata azt mutatta, hogy a családban egy ritkább mutáció fordul elő, az 1999-es pozícióban. Az 1999-es báziscsere egy **Gln→STOP** kodonra változását eredményezi, és a legsúlyosabb sóvesztő formához vezet. A korionboholyból izolált DNS-t az 1999-es



mutációra vizsgáltuk ASA-val, annak eldöntésére, hogy a mutáció jelen van-e, és homozigóta vagy heterozigóta formában van-e jelen a magzatban (6. ábra). *Érintett-e a magzat? Mi a szülők genotípusa? Folytatná-e a dexamethason kezelést?* Az eredményeket az újszülött DNS vizsgálata is igazolta, aki nem

virilizált külső nemi szervekkel született.

## Összefoglalás

A magyarországi CAH betegek országos szűrésére az elmúlt években bevezetett allél-specifikus amplifikáció (ASA) eredményei alapján a 2-es intronban található ún. G-mutáció a leggyakoribb, a betegek több, mint a felében megtalálható, és splicing hibát eredményez. Gyakori még a 3. exon 8 bp deléciója, mely pszeudogént hoz létre. Ezenkívül előfordulnak mutációk a 1004, 1388, 1688, 1768, 1999 és a 2113 pozícióban is, ezek azonban ritkák.

### Ajánlott irodalom:

- <sup>1</sup> White P C, New M I, Dupont B. Congenital adrenal hyperplasia. N. Engl. J. Med. 1987. 316:1519-24, 1580-86.
- <sup>2</sup> Miller W L, Morel Y. The molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency. Annu. Rev. Genet. 1989 23:371-3.
- <sup>3</sup> Pang S, Clark A. Newborn screening, prenatal diagnosis, and prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Trends Endocrinol Metab. 1990. 1:300-307.
- <sup>4</sup> Speiser P W, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, New M I. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. Am. J. Hum. Genet. 1985. 37: 650-657.
- <sup>5</sup> Garami, M., Ferenczi A., Kiss E., Sasvári-Székely, M., Barta C., Sólyom, J., Fekete G: Magyarországi 21-hidroxiláz defektusos gyermekek genotípusának meghatározása. Gyermekgyógyászat, 2000, 51, 4, 352-359.
- <sup>6</sup> Theodoropoulou, M., Barta, C., Szőke, M., Guttman, A., Staub, M., Niederland, T., Sólyom, J., Fekete, G., Sasvári-Székely, M: Prenatal diagnosis of steroid 21-hydroxylase deficiency by allele-specific amplification. Fetal Diagnosis and Therapy, 2001, 16:4:237-240.
- <sup>7</sup> Ferenczi A, Garami M, Kiss E, Pék M, Sasvári-Székely M, Barta C, Staub M, Sólyom J, Fekete Gy. Screening for mutation of 21-hydroxylase gene in Hungarian patients with congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab. 1999, 84: 2369-2372.

# A cysticus fibrosis molekuláris genetikája és pathobiokémiája

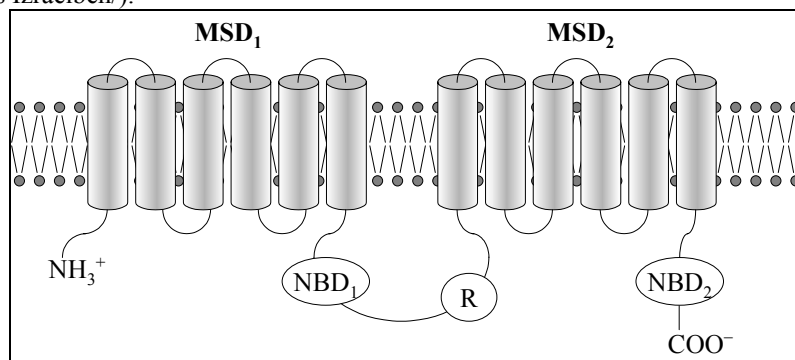
(Hallgatói verzió)

A **cysticus fibrosis (mucoviscidosis)** a gyermekek öröklődő, több szervrendszert érintő betegsége, a fehér bőrű népességben ez a **leggyakoribb életet veszélyeztető genetikai rendellenesség** (1/2500), tehát minden 25. személy hordozó. A fő patogenetikai sajátosság az exocrin mirigyek dysfunctiója, amely a tünetek és szövődmények széles körű együtteséhez vezethet.

## Patogenezis

A cysticus fibrosis **autoszomális recesszív** módon öröklődik, oka egy membrán transzport fehérje defektusa. Jelenleg már több, mint 700 mutációt ismernek, mely a betegség okozója lehet: ezek a mutációk a 7. kromoszóma hosszú karján egyetlen locuson fordulhatnak elő. A CF gén 250 Kb hosszú, 27 exont tartalmaz és egy 1480 aminosavból álló – **cysticus fibrosis transmembrane conductance regulatorknak** (röviden **CFTR-nek**) nevezett – fehérjét kódol. A CFTR ioncsatorna, főleg a légutakban, a gyomor–bél-traktusban, a nyálmirigyekben és az urogenitalis rendszerben fordul elő.

A betegség genetikai vizsgálata azért lehet eredményes, mert – a kórkép hátterében álló lehetséges mutációk igen nagy száma ellenére – a betegek 80–90%-ában ugyanaz a 30 mutáció található meg, s ezek közül is kiemelhető egy, mely a cysticus fibrosisban szenvedő betegek átlagosan 60-70%-ában megtalálható. Ez a **leggyakoribb mutáció** három bázis – CTT – deléciója a 10. exonban, ami az 508. aminosav, egy fenilalanin kiesését eredményezi, a mutációt ezért  **$\Delta F508$** -nak nevezzük. (Maga CTT nem a fenilalanint kódolja, hanem két kodonból – ATC CTT – lesz egy, de a fenotípusban csak a fenilalanin deléciója jelenik meg, mivel mind az ATC, mind az ATT izoleucint jelent.) A mutációk száma és együttes gyakorisága feltehetően azért olyan magas, mert szelekciós előnyt jelent a choleraával szemben: a  $\Delta F508$  homozigóta bélhámsejtek tenyésztete érzéketlen a cholera toxin szekréción fokozó hatására. (Érdekes, hogy a  $\Delta F508$ -as mutáció gyakorisága Európán belül egy jellegzetes északnyugat, dél-kelet tengely mentén csökkenő eloszlást mutat /leggyakoribb Dániában és Svédországban, legritkább Törökországban és Izraelben/).



1. ábra A CFTR feltételezett szerkezetének vázlatja

Az 1. ábra a cysticus fibrosis transmembrán regulátor feltételezett szerkezetét mutatja. A homodimer molekula két transzmembrán doménnel van a sejthártyába horgonyozva. Ezek csatornát alkotnak, amelyen keresztül Cl<sup>-</sup> és vízmolekula haladhat át. A csatorna működéséhez ATP szükséges, ezek az NBD<sub>1</sub>-hez és az NBD<sub>2</sub>-höz (Nucleotide Binding Domain) kapcsolódhatnak, a fehérje tehát egy ABC-transzporter (ATP Binding Cassette). A

gén legtöbb mutációja a két ATP-kötő régióban található. Az R (regulátor) domain cAMP dependens kinázok számára tartalmaz foszforilációs helyeket, s a transzportfolyamatok szabályozásában vesz részt. A  $\Delta F508$  mutáció az NBD<sub>1</sub> régióban okozza a Phe-deléció, ez azonban nem a fehérjeműködés defektusán keresztül vezet a betegség kialakulásához. A nascens CFTR ugyanis először az endoplazmatikus retikulumban glikozilálódik, majd a Golgiban történő végső glikozilációs érés után transzportálódik a membránba. A legtöbb mutáció hatására viszont (ideértve a  $\Delta F508$ -at is) **a natívtól eltérő fehérje az endoplazmatikus retikulumban vagy a lizoszómákban degradálódik.**

CF-es sejtekben azt találták, hogy a megemelkedett cAMP szint hatására elmarad a normális válasz, azaz a Cl<sup>-</sup> áram a légzőhám epithel sejtjeinek membránján keresztül. A cAMP-függő protein kináz aktivációja normális, azonban a PKA már nem aktiválja magát a Cl<sup>-</sup>-csatornát. Kimutatták, hogy az R doménnek szerepe van az aktivációban, számos PKA és C foszforilációs hely található rajta. A **csatorna modellje** a következő: a cAMP szint emelkedésére a PKA négy szerin reziduumon foszforilálja az R domént, minek hatására az ATP kötéshelyek 2 ATP-t kötnek és hidrolizálnak, a csatorna nyit, és megindul a passzív Cl<sup>-</sup> áram.

### ***Tünetek, diagnózis***

A mutációk heterogenitása és a környezeti tényezők hatásának köszönhetően a tünetek igen sokszínűek lehetnek, s az egyes szervek változó mértékben érintettek, az elváltozások mégis mindig visszavezethetőek az alapvető kóros folyamatra, a CFTR csatorna hibás működésére, vagyis arra, hogy a mirigyszekrétrumok alacsony víz- és magas iontartalmúak. A külső elválasztású mirigyek működészavara váladékpanaszt (mucoviscidosis), obstrukciót okoz, és ez cystaképződéshez, később pedig fibrosishoz vezet (cysticus fibrosis).

A tüdők 90%-ban érintettek, ennek legállandóbb jele a köhögés és a gyakori tüdőgyulladások. A csecsemők 10–15%-ában a meconium (béltartalom) teljesen elzárja az ileumot (**meconium ileus**). Az exocrin **hasnyálmirigy** is majdnem mindig érintett, elégtelen működésének következtében emésztési zavar alakul ki. A pancreas endocrin funkciója is gyakran károsodott: 10 éves kor után a betegek 8%-ában diabetes mellitus fejlődik ki. Az iontranszport zavara a **verejtékmirigyek** működését is érinti, erre esetenként a szülők figyelnek föl: a gyermek bőre sós ízű. A verejtékteszt ma is a diagnózis alapja: 60 mM fölötti Cl<sup>-</sup>-koncentráció kórjelző cysticus fibrosusra.

Kezdetben a betegek átlagos életkora nem volt több, mint 2-3 év, sőt a leggyakoribb az újszülöttkori halálozás volt. Azonban a tudomány fejlődése, a diagnosztikus és terápiás eszközök bővülése egyre több CF-es beteg felismerését, és tüneteik egyre hatékonyabb kezelését tette lehetővé. Mára az átlagos túlélés 30 év fölé emelkedett, és egy most születő CF-es beteg több, mint 40 évet élne, még akkor is, ha a mai terápiás lehetőségek nem javulnának. Az enyhe mutációkkal rendelkező betegek várható élettartama 70-80 év.

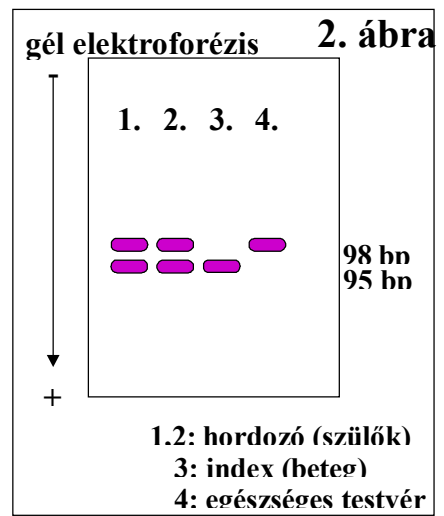
### **A CF molekuláris genetikai diagnózisa**

A CFTR génen eddig leírt mutációk nagy száma miatt a betegség molekuláris diagnózisa különleges stratégiát igényel. Az egyes mutációk eredményeképpen létrejövő különböző súlyosságú defektusok összefüggéseit nevezzük röviden **genotípus-fenotípus korrelációnak**. Ez alapján a mutáns alléleket két csoportra osztjuk: a pancreas

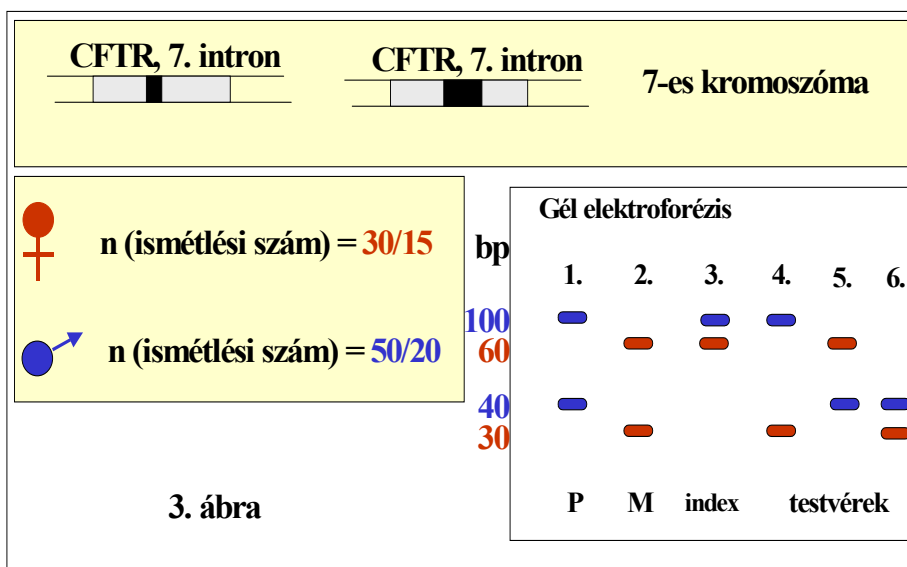


insufficiens (PI), és pancreas sufficiens (PS) típusra. A legtöbb CF-es beteg (85%) a PI csoportba tartozik, tehát a legtöbb mutáció is (beleértve a  $\Delta F508$ -at is) „súlyos” típusú.

A mutációk kimutatásának alapvetően két módja van, a *direkt és az indirekt analízis*. A **direkt DNS vizsgálat** feltétele, hogy előzetesen ismernünk kell hozzá a mutációt (kivéve szekvenálás). Ilyen módszer a korábban említett ASA, vagy az RFLP amennyiben a mutáció restrikciós helyet szüntet meg vagy alakít ki (ha nem, ezt mesterségesen is létrehozhatjuk PCR-rel ún. mismatch oligo-val /lásd DNS rekombináns technika gyakorlat/). A CF esetében így mutatjuk ki a leggyakoribb  $\Delta F508$  mutációt (Magyarországon ~ 60%), ahol a keletkező két lehetséges méretű termék között 3 bp különbség van, amit megfelelően érzékeny elválasztási technika segítségével kimutathatunk (2. ábra).



**Indirekt vizsgálati** módszer például az SSCP (single strand conformation polymorphism /lásd Mol. biol. módszerek I. gyakorlat/), ami a mutáció helyét és minőségét nem, csak a jelenlétét jelzi. Leggyakrabban azonban a mutációhoz kapcsolt polimorf markereket mutatunk ki, főleg a CF-hez hasonló esetekben, ahol a mutációk nagy száma miatt ez sokkal célravezetőbb megoldás, mint az egyes, egyenként rendkívül ritka mutációk keresése. Hátrányuk, hogy csak olyan családokban alkalmazhatók, ahol már született egy beteg gyermek, hiszen csak ebben az esetben lehet követni az allélek öröklődését, illetve, hogy a vizsgálat sohasem 100%-ig informatív. PCR-t követően végezhetünk RFLP-t több enzim kombinációjával, ilyenkor azonban a hasítási és a mutációs hely távolságának függvényében a rekombinációból adódó problémákba ütközhetünk. Ezt küszöböli ki a **mikroszatellita analízis**, amely a CF gén intronjaiban lévő intragénius markerek segítségével következtet arra, hogy a vizsgált minta melyik allélt tartalmazza. A mikroszatelliták 2-4 bp-os ismétlődések, melyekből három különbözőnek az analizisével más-



más színnel jelölt primerek segítségével 95%-ban informatív eredmény nyerhető. (A II. sz. Gyermek-klinikán lévő magyarországi CF centrumban is ezt a módszert alkalmazzák) (3. ábra).

A példában a CFTR gén 7. intronjában lévő egy mikroszatellita vizsgálata látható. Az index alapján (3) mit mondhatunk a születendő testvérek (4,5,6) genotípusáról?

## Prenatális diagnosztika

A génhordozók gyakorisága  $1/25$ , ami azt jelenti, hogy minden  $625$ . ( $1/25^2$ ) házasságkötés két heterozigóta egyed között történik. Ezeknek a pároknak  $25$ – $25\%$ -os eséllyel születhet beteg ill. egészséges gyermeke, s  $50\%$  a valószínűsége, hogy a gyermek egészséges, de génhordozó lesz. Ezek az adatok aláhúzzák a szűrés és a prenatális diagnosztika fontosságát.

Mivel a betegséget igen sok mutáció okozhatja, így a **heterozigóták** szűrése rutinszerűen nem megoldható. A génhordozók kimutatása legfeljebb  $80$ – $85\%$ -ban járna sikerrel, ezért a populáció szűrését – egyelőre – nem tartják megvalósíthatónak. A házaspárok heterozigóta genotípusára így csak akkor derül fény, ha már született egy beteg gyermekük: ezeknek a családoknak a következő terhességben felajánlják a prenatális diagnosztika lehetőségét.

## Kezelés

A CF terápiája komplex, célja az egyes szervrendszerekben kialakuló tünetek enyhítése, mely rendszeres kontrollal és megfelelő otthoni gondozási program kidolgozásával valósítható meg. A terápia két fő eleme légúti és a dietetikai gondozás, légzőtornából, antibiotikumok adásából, a pancreas enzimeinek pótlásából, stb. áll, de ennek részletezésére e konzultációs anyagban nem kerülhet sor.

A CF az egyik első olyan betegség volt, ahol **génterápiás** eljárásokat alkalmaztak. Mint említettük, a morbiditást meghatározó fő tényező a tüdő érintettsége. A CFTR a légutak nyálkahártya sejtjeiben és a submucosalis mirigysejtekben expresszálódik. Ez meglehetősen könnyen hozzáférhető célpont, különösen aerosol pumpás rendszerek alkalmazásával. Ugyancsak kedvező, hogy a génterápiában előszeretettel **vektorként alkalmazott adenovírus** kifejezetten a légutak sejtjeit „betegíti” meg. Bár tudjuk, hogy a géntranszfer közel sem  $100\%$ -os eredményességű, kimutatták, hogy a sejtek kevesebb, mint egytizedében visszaállítva a normális CF-csatorna funkciót, kialakítható a mucos fiziológiás állapota. A génterápiában alapvetően kétféle vektort alkalmazhatunk: olyat amelyik integrálódik a gazdasejt genomjába (pl. a retrovírusok, adeno asszociált vírus, AAV), és olyat, amelyik nem (adenovírus). Az integráció előnye, hogy a bevitt gén tartósabban expresszálódik a célsejtekben, és továbböröklődik a leánysejtekbe, viszont nagyobb a malignus átalakulás kockázata onkogén aktiváción keresztül. A nem integrálódó vektorok alkalmazásával csak átmeneti (néhány hetes) expresszió érhető el, valamint az ismételt alkalmazáskor a vírus ellen kialakuló immunválasz is csökkenti a hatékonyságot. Kísérleteznek még vektortmentes rendszerrel is bejuttatni a CFTR-t: pl. liposomákba csomagolva, DNS-fehérje komplexben, és más, a légúti epithel sejtek által felvett fehérjékhez, illetve IgA-hoz kötve.