

Szegedi Tudományegyetem
Elméleti orvostudományok doktori iskola

**Nem-szindrómás halláskárosodások Magyarországon:
molekuláris biológia és klinikai adatok**

PhD értekezés tézisei

Nagy Attila

Témavezető
Dr. habil. Kiss József Géza



Fül-orr-gégészeti és fej-, nyaksebészeti klinika

Szeged
2010

1. Bevezetés

A halláskárosodások a leggyakoribb érzékszervi rendellenességek. Az esetek mintegy 40%-ában ismeretlen az eredetük. Körülbelül 30%-ban genetikai hátterű a probléma, ebből 3% a szindrómás, 27% körüli a nemszindrómás esetek aránya. Prenatális okok (rubeola, intrauterin CMV fertőzés, anya alkohol abúzus, malformációk, stb) 11-12%-ban, míg perinatális okok (születéskori oxinénhiányos állapot, koraszülés) 9%-ban felelősek a halláskárosodásokért. Postnatális okok (meningitis, traumák, kemo- és antibiotikum terápiák) 6-8%-ot tesznek ki. A nem-szindrómás, genetikai eredetű hallásvesztés körülbelül minden ezredik újszülöttnél tapasztalható. Az esetek 60-70%-ban öröklődik, az érintettek mintegy négyötödénél autoszómás recesszív módon. Ezeknél a pacienseknél a fenotípus változatos lehet. Éppúgy előfordulhat súlyos fokú halláskárosodás, vagy teljes hallásvesztés, mely már csecsemő korban jelentkezik, stabilan megmarad és a teljes hallható frekvenciatartományt érinti, mint a beteg 20-as, 30-as éveiben kezdődő, lassan progrediáló, közepes fokúnál nem súlyosabbá váló hallásromlás. Akiknél a születés után, vagy kisgyermekkorban jelentkezik a probléma, legtöbbször nem tanulnak meg beszélni, és jelbeszéddel kommunikálnak. A nem-szindrómás hallásvesztés korai, csecsemőkori detektálása lehetővé teszi, hogy ezek a gyermekek megfelelő célzott kezelésben (pl. cochleáris implantáció) részesüljenek, így teljes értékű tagjává váljanak a társadalomnak. Minél hamarabb megállapítható a hallásvesztés pontos oka, annál nagyobb az esély, hogy ezek a gyermekek megfelelő kezelés hatására jól, vagy akár kitűnően megtanuljanak beszélni.

A hallásvizsgálatok kivitelezése újszülött, illetve kisgyermekkorban nehéz feladat. Az úgynevezett „szubjektív” hallásvizsgálati módszerek a vizsgált személy visszajelzésén alapulnak. Ez olyan szintű tudatosság meglétét feltételezi, mely szerint az illetővel kommunikálni lehet, elmagyarázni neki, milyen jellegű lesz a feladat, és az elvárt visszajelzés módját is meg kell értenie, azaz jeleznie kell, mit hall, mennyire jól hallja (érti) és esetleg azt is, melyik oldalon. Kisgyermekek audiológiai vizsgálata jól képzett asszisztenciát, megfelelően kialakított vizsgálati helységet igényel, valamint jó eredménnyel csak 2-3 éves kortól alkalmazható.

A hallásvizsgálatok másik nagy csoportját az úgynevezett objektív audiometriai vizsgálatok alkotják. Közös jellemzőjük, hogy fizikai, vagy elektrofiziológiai paraméterek mérésével gyűjtünk információt a vizsgált személy hallásának állapotáról. Együttműködést semmilyen formában nem igényelnek. A legfontosabb, rutinszerűen alkalmazott vizsgálatok közül első a tympanometria, amivel a dobhártya állapotát vizsgálhatjuk, és a dobüreg légtartókéességéről, esetleges folyadéktartalmáról is felvilágosítást ad. A hallócsontok láncolatának állapotáról is ad információt az eljárás. A belső fül vizsgálatára a leggyakrabban az úgynevezett otoakusztikus emisszió valamelyik formáját használjuk. Ezen vizsgálat során a cochlea (külső) szőrsejtjeinek az állapotáról kapunk felvilágosítást, megmutatja a szőrsejtek bármilyen okból bekövetkező pusztulását. A szegedi klinikán az úgynevezett disztorziós otoakusztikus emissziót alkalmazzuk (DPOAE). A hallópálya kezdeti szakaszát vizsgálhatjuk az agytörzsi kiváltott válaszok (BERA – Brainstem Evoked Response Audiometry) felhasználásával. Amennyiben az előbb említett (objektív) vizsgálati módszerek egyikével sem sikerül kimutatni a halláskárosodást, de tudjuk, hogy fennáll, nagy valószínűséggel ún. idegi típusú halláscsökkenéssel, retrocochlearis laesioval állunk szemben. A BERA lehetőséget ad arra is, hogy a hallásküszöböt megbecsüljük. Mivel regisztrációja során kicsi,

μV nagyságrendű potenciálokat mérünk, sokáig kell mozdulatlanul feküdni. Ezt kisgyermekes esetekben altatással oldják meg, mely sajnos kockázattal jár.

A nem-szindrómás hallásvesztés hátterében rejlő mutációk detektálása igen komplikált, mivel sok gén sok régiójának mutációja okozhatja. Elsőként a GJB2 (a gap junction beta-2 alegységet kódoló) gént azonosították, melynek mutációja felelős a nem-szindrómás hallásvesztés kialakulásáért. Manapság már körülbelül 40 génről bizonyították be, hogy mutációik felelősek a kórkép kialakulásáért. Az azonosított géneken belül is számos polimorfizmust írtak le. Az európai populációban a GJB2 gén mutációi körülbelül 7-15%-ban felelősek a nem-szindrómás hallásvesztés kialakulásáért. A leggyakoribb GJB2 mutáció a 35delG mutáció, melyre nézve az európai populáció körülbelül 1,5-3%-a hordozó. A GJB2 gén esetén alkalmazott módszer a mutációk felderítésére a többi ismert gén esetében nem alkalmazható a klinikumban, mert azok mérete nem teszi lehetővé a költséghatékony diagnosztizálást. A nem-szindrómás öröklődő hallásvesztés hátterében azonban nem csak a GJB2 gén mutációi állhatnak: például a GJB3, GJB6, GJA1, COCH, KCNQ4, SLC26A4, POU3F4, vagy a MYO6-ban bekövetkező mutációk is okozhatnak ilyen hallásproblémát. Ezen gének defektusai jellemzően a belső fül igen érzékeny ionháztartásában okoznak zavarokat, vagy a szőrsejtek differenciálódásában, vagy érésében játszanak szerepet.

Genomi DNS-t (gDNS) a klinikumban általában EDTA-val antikoagulált, perifériás vénából levett vérből nyerünk. Ennek azonban vannak hátrányai: a vénás vérvétel gyermekek esetében ijesztő lehet, a vér tárolásához hűtő kell, mely a laborban helyet, illetve viszonylag sok energiát fogyaszt, és a DNS kitisztítása sok időt igényel, még drága, jó minőségű kit használatával is.

A világ fejlett államaiban az 1950-es évek óta zajlanak anyagcsere-betegségeket szűrő programok, melyek a levett vér tárolását úgynevezett Guthrie-papíron, vagy Guthrie kártyákon oldják meg. Ezek a kártyák speciálisan kezelt itatóspapírok, amelyekre a 2-4 napos újszülöttek sarkát megszűrve, 4-6 csepp vért szárítanak, majd postai levélként eljuttatják őket a megfelelő diagnosztikai centrumba. Ezekben a centrumokban a papírra szárított vérből az arra alkalmas módszerekkel olyan metabolitok meglétét, hiányát, vagy mennyiségét lehet megállapítani, amik jelzik a kérdéses anyagcsere-betegségek esetleges fennállását. Történtek ugyan kísérletek nukleinsavak (mind RNS, mind DNS) Guthrie-papírokra szárított vérből történő kitisztítására és felhasználására genetikai analízisre, de ezek a módszerek széles körben nem terjedtek el, és nem vizsgálták az alkalmazhatóságukat részletekbe menően. Így a szárított vért továbbra is elsősorban fehérjék, metabolitok kimutatására használják.

2. Célkitűzések

Célkitűzéseink egyik csoportja az volt, hogyan lehetne a következő paramétereket optimalizálni, illetve meghatározni:

1. Megvizsgáltuk három különböző módszer alkalmazhatóságát genomi DNS Guthrie papírra szárított vérből történő kitisztítására.
2. A szárított vérek Guthrie papíron történő eltarthatóságának korlátai: a kinyerhető DNS minősége és mennyisége a papírra szárított vér korának függvényében.
3. Egy szárított vércseppből kivont genomi DNS-oldatból elvégezhető PCR reakciók számának meghatározása.

A következő kérdésekre kerestük a választ a vizsgált populáció alapján:

4. A GJB2 gén 35delG mutációjának előfordulási gyakorisága a vizsgált populációban.

5. A GJB2 gén egyéb mutációinak előfordulási gyakorisága ugyanezen pácienseink körében.
6. Más (nem GJB2) génekben előforduló mutációk gyakoriságának vizsgálata.
7. Annak vizsgálata, hogy más (nem GJB2) génekben előforduló mutációk hogyan befolyásolják az alany hallását.
8. A genetikai és az audiológiai profil között meghatározható-e összefüggés?
9. A talált eredmények használatából a cochleáris implantáció profitálhat-e: a genetikai profil alapján az audiológiai profil megjósolható-e egyes személyek esetén?

3. Anyagok és módszerek

3.1. Guthrie papírok

A Szegedi Tudományegyetem Gyermekgyógyászati klinikájára érkeznek az ország keleti-délkeleti részéből az újszülött osztályokról a Guthrie-papírra szárított vérek. 576 db-ot választottunk ki közülük véletlenszerűen, ezekből a mintákból állt az egyik vizsgált populáció. 48-48 db minta 1996 és 1997-ből származott, további 96-96 db-ot válogattunk az 1999, 2000, 2001, 2004, 2005-ös évekből.

3.2. Pácienseink

A másik vizsgált csoport 318 egyénből állt. Elsősorban a klinikánkon cochlearisan implantált (CI), ismeretlen eredetű halláskárosodásban szenvedő betegeink (52), illetve CI-jelöltek (56), valamint hozzátartozóik (n=163) adták a vizsgált populáció nagy részét. CI-használók és CI jelöltek esetében a beszédértés 25%, a hallásküszöb pedig 70dB alatt volt. 20 CI-vel rendelkező páciensünk családtagjainak szűrésére nem volt módunk. Néhány klinikai betegünk is részt vett a programban, ők a fenti feltételeknek egyénenként szintén megfeleltek (n=47).

3.3. Az általunk vizsgált gének, régiók

Gén	Exon				Amplifikátum							
	#	kezd	vége	hossz	kezd	vége	hossz	név				
GJB2	1	1430	2110	681	1385	1804	420	DF1f				
					1798	2121	324	DF2f				
12SrRNA	1	650	1603	954	1400	1620	221	DF3f				
					TRNS1- TRND	7446	7586	141	7336	7600	265	DF4f
COCH	4	4235	4386	152	4192	4477	286	DF5f				
					5	4865	4927	63	4733	5125	393	DF6f
					6 and 7	5894	6176	283	5854	6196	343	DF7f
GJA1	1	11207	12355	1149	11201	11335	135	DF8f				
GJB3	1	1674	2486	813	1636	1979	344	DF9f				
						1961	2240	280	DF10f			
						2239	2492	254	DF11f			
GJB6	1	734	1519	786	724	1082	359	DF12f				
						1077	1340	264	DF13f			
						1272	1583	312	DF14f			

Gén	Exon				Amplifikátum			
	#	kezd	vége	hossz	kezd	vége	hossz	név
KCNQ4	1	83	396	314	8	415	408	DF15f
	5	35336	35461	126	35281	35477	197	DF16f
	6 and 7	35864	36249	386	35861	36262	402	DF17f
SLC26A4	4	13530	13714	185	13463	13829	367	DF18f
	6 and 7	22568	22903	336	22524	22920	397	DF19f
	10 and 11	33769	34082	314	33764	34143	380	DF20f
	13	37408	37477	70	37358	37555	198	DF21f
	17	43697	43751	55	43648	43799	152	DF22f
	19	51905	51988	84	51858	52086	229	DF23f
POU3F4	1	33	1119	1087	15	405	391	DF24f
					401	783	383	DF25f
					777	1132	356	DF26f
MYO6	2	68301	68464	164	68259	68570	312	DF31f
		91363	91504	142	91332	91518	187	DF32f
		92003	92199	197	91872	92216	345	DF33f
	31	164846	165097	252	164830	165193	364	DF34f
GJB2	1	1430	2110	681	1798	2124	327	DF35f
					1651	1804	154	DF36f
GJB6	1	734	1519	786	734	981	248	DF37f
					978	1233	256	DF38f
					1226	1531	306	DF39f
POU3F4	1	33	1119	1087	20	277	258	DF40f
					259	571	313	DF41f
					454	809	356	DF42f
					803	1134	332	DF43f
SLC26A4	4	13530	13714	185	13523	13733	211	DF44f
	6 and 7	22568	22903	336	22558	22837	280	DF45f
					22690	23042	353	DF46f
KCNQ4	6 and 7	35864	36249	386	35864	36152	289	DF47f
					36059	36263	205	DF48f
COCH	5	4865	4927	63	4733	4959	227	DF49f
GJB2	1	1430	2110	681			809	DF2 F/R

1. Táblázat

A kiválasztott gének és vizsgált régiók. Az általunk használt primerek nevét és hosszát is feltüntettük.

3.4. A DNS kitisztítása, PCR reakciók

A genomi DNS-t a levett vénás, EDTA-val antikoagulált 3 ml vérből a Gentra „Versagene Blood Kit”-jével extraháltunk. Egy alkalommal 400 µl vérből tisztítottunk DNS-t, a DNS-oldat koncentrációját a 260 és 360 nm-en mért adszorpciójából becsültük.

A Guthrie papírra szárított vérek esetében 4 mm-es korongokat vágunk ki a papírból. 3 genomi DNS-tisztító módszer hatékonyságát vizsgáltunk.

Az első módszer esetében a korongokat 200 µl Eppendorf Hotmaster Taq pufferbe, PCR csövekbe helyeztük. Ezután 10 percig 96 °C, 10 percig 25 °C, végül ismét 10 percig tartó 96

°C-os hőkezelés után 16 000g-n centrifugáltuk a mintákat 2 percig. A felülúszót ezután átpipettáztuk steril csövekbe, majd hűtőben tároltuk 4°C-on további felhasználásig.

A második módszer szerint a papírkorongokat 200 µl Eppendorf Hotmaster Taq pufferbe helyezés után 55°C-os vízfürdőben inkubáltuk 10 percig, majd 16 000 g-n centrifugáltuk 2 percig. A felülúszót szintén 4°C-on tároltuk további felhasználásig.

A harmadik módszer a második módszer kiegészítése azzal, hogy a mintákat az 55°C-os vízfürdőben történő inkubálás közben (10 percig) ultrahangos szonikálással is kezeltük. Ezután szintén ugyanúgy centrifugáltuk, majd tároltuk őket.

A mintákból ezek után PCR kísérleteket végeztünk. Vizsgáltuk mind a minták korának hatását, mind a gDNS híghíthatóságát. A 2. Táblázatban található primerekkel dolgoztunk.

Primer név	Szekvencia	Leírás
ICF	CCC ACC TTC CCC TCT CTC CAG GCA AAT GGG	Belső kontrol (serine proteinase inhibitor gene)
ICR	GGG CCT CAG TCC CAA CAT GGC TAA GAG GTG	Belső kontrol (serine proteinase inhibitor gene)
GJC	AGT GAT CGT AGC ACA CGT TCT TGC A	Közös reverz primer a GJB2-höz
GJW	GCA CGC TGC AGA CGA TCC TGG GGA G	Primer a GJB2 35delG vad allél detektálásához
GJM	CAC GCT GCA GAC GAT CCT GGG GAT	Primer a GJB2 35delG allél detektálásához
DF2F	TCT CCC TGT TCT GTC CTA GC	GJB2 exon és flanking régió szekvenálásához
DF2R	TTT CCC AAG GCC TCT TCC AC	GJB2 exon és flanking régió szekvenálásához

2. Táblázat

A PCR, és AS-PCR kísérletek során, a GJB2 gén 35delG mutációjának kimutatására alkalmas primerek, valamint a GJB2 kódoló exonjának szekvenálásához használt primerek szekvenciái

PCR reakciókkal vizsgáltuk a minták korának (a tárolás során eltelt idő) hatását, a gDNS oldat híghíthatóságát a PCR reakciókban történő felhasználás során, valamint a PCR primereink specificitását. Allél-specifikus PCR (AS-PCR) reakciókat végeztünk a GJB2 gén 35delG mutációjának meghatározására minden (318+576=794) mintán.

A DF2F/DF2R primerek termékeit megszekvenáltuk mind a 318 páciensünk mintáján.

3.5. dHPLC

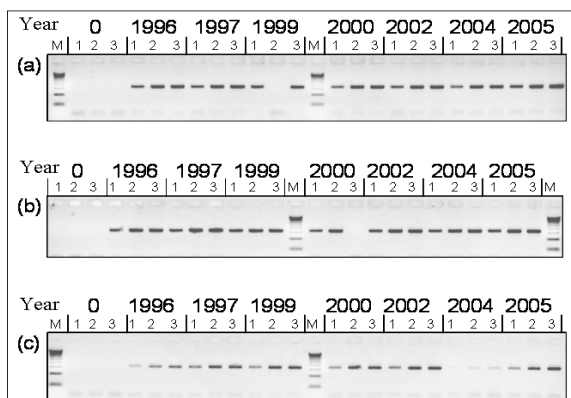
A Helix System-et és a Varian Star Workstation szoftvert használtuk az SZTE ÁOK II. sz. Belgyógyászati klinikáján a dHPLC mérések elvégzéséhez. Mind a 49 primer vizsgálata más dHPLC beállításokat igényelt, ezek részletezésétől terjedelmi okok miatt eltekintünk.

3.6. Audiológiai vizsgálatok

A klinikai audiológiai vizsgálatokat a nemzetközileg elfogadott sztenderdek alapján végeztük. A tisztahang küszöböt rendre 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000, 8000 Hz-en határoztuk meg. A következő kategóriákra osztottuk az audioramok alapján a hallásvesztéseket: -10-20 dB: normál hallás 20-30 dB: enyhe fokú halláskárosodás 30-70 dB: közepes fokú halláskárosodás 70-90 dB: súlyos fokú 90< dB: siketséggel határos halláskárosodás. A mérések nagy részét a klinikánkon található GSI 16 típusú audiométeren végeztük, mindössze néhány páciensünk leletei készültek más intézetben.

4. Eredmények és diszkusszió

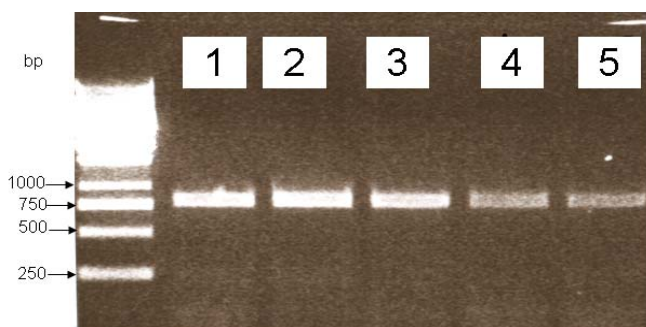
4.1. DNS preparálása, PCR optimalizálás



Rendre 0,5, 2, és 10 µl genomi DNS templát oldat felhasználásával megmutattuk, hogy az általunk vizsgált szárított vérből történő DNS extrakciós módszerek közül a 96°C-on forralás adja a legmegbízhatóbb eredményt. A másik két módszerrel, a minták korától függetlenül, a PCR-ek nem adnak kielégítő, megbízható eredményt (1. ábra)

1. ábra

1 = 0,5µl, 2 = 2,5µl, 3 = 10 µl gDNS templát oldat (a): 10 perc@96°C 1 perc@25°C 10 perc@96°C percig, PCR-eszközben (b): 10 perc@55°C vízfürdőben (c): 10 perc@55°C vízfürdőben, ultrahang szonikálással. Az 1,2,3-as számmal jelzett minták mindig ugyanabból a gDNS oldatból származnak, mind a 3 ((a), (b), (c)) mérés-sorozatban.

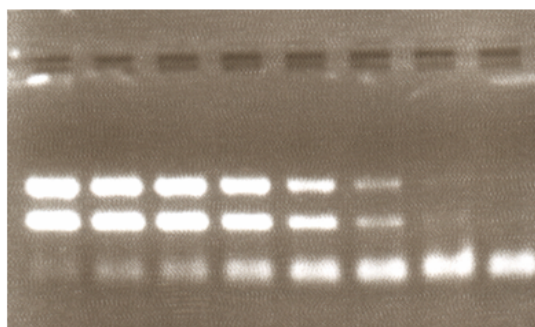


A mérések során a gDNS templát hígításának lehetőségét is vizsgáltuk. Azt kívántuk megbecsülni, hogy egy csepp szárított vérből mennyi PCR reakció elvégzése lehetséges, lehetőség van-e nagyobb gének (néhányszor tíz kilobázis) szekvenciájának meghatározására. (2. ábra)

2. ábra

A PCR termékek hozzávetőleges mennyisége, a Guthrie papírból extrahált gDNS hígításával összevetve 1. nincs hígítás, 2. 5x hígítás, 3. 50x 4. 500x, 5. 1000x hígítás. "bp": létra. A DF2F primerrel végzett kísérlet. Ezen primer termékének a hossza 809 bp. A sávok intenzitása a hígítással fordítottan arányosan csökken.

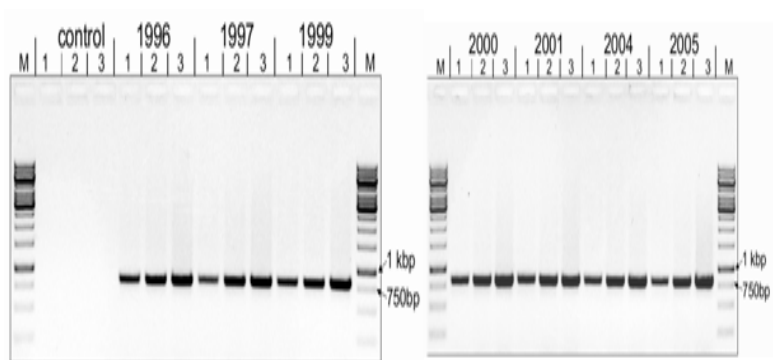
1x 5x 10x 50x 100x 500x 1000x 5000x



Az EDTA-val antikoagulált vénás vérből kitisztított gDNS különböző hígításaival készült PCR-kísérletek eredménye. Mintegy 500x-os hígítást lehet elérni. (3. ábra)

3. ábra

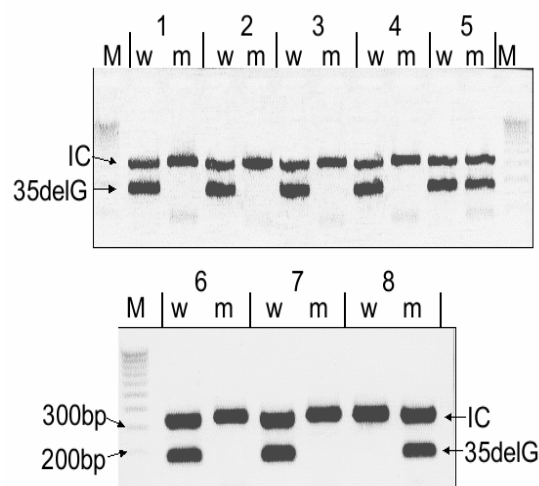
A GJW primerrel készült PCR (35delG vad genotípust detektál) A számok a hígítás mértékét jelzik. A legelső sorban a PCR-primer dimerek láthatók, melyekből egyre több van, ahogy a PCR termékből egyre kevesebb keletkezik.



A minták (Guthrie papírok) korának hatása a PCR minőségére. Megfelelő DNS extrahálás és hígítás esetén akár tíz éves mintákon is megbízható, aspecifikus PCR termékektől mentes PCR végezhető. (4. ábra)

4. ábra

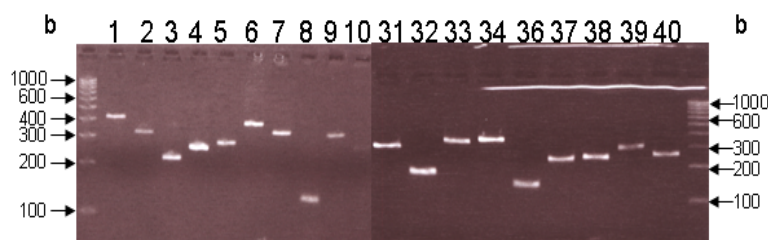
A DF2F primerrel végzett kísérletek. 1 kbp és 750 kbp: molekulatömeg-kalibráció („M”). Nem voltak aspecifikus PCR termékek ezzel a primerrel, ha az (a) módszert használtuk. Itt az 1, 2, 3 mind más-más minta volt. Minden évből 3-3 mintát teszteltünk.



35delG AS-PCR kísérlet, mely mindhárom genotípust mutatja (5. ábra). Az AS-PCR során két primer-párral dolgozunk, úgy, hogy az egyik csak a vad, a másik csak a mutáns szekvencia esetén elongálódik, azaz képez PCR terméket. Az 1,2,3,4,6,7 számú minták vad genotípusú egyénektől származnak, az 5-ös minta heterozigóta, a 8-as pedig homozigóta recesszív genotípusú páciensből származik.

5. ábra

M: molekulatömeg-kalibrálás („létra”), w: vad típusú allélt detektáló primer terméke (GJW primer), m: 35delG+ allél (GJM primer) IC: belső kontrol (ICF és ICR primerek). Itt sem figyelhetők meg aspecifikus termékek



6. ábra

A számok az 1. Táblázatban található gének megfelelő primereit takarják, a „DF” jelölés elhagyásával: 1, 2, 36: GJB2; 3, 4: 12SrRNS; 5, 6, 7: COCH; 8: GJA1; 9, 10: GJB3; 31, 32, 33, 34: MYO6; 37, 38, 39: GJB6; és 40: POU3F4. A gélekép két oldalán található számok („b” jelölés) a PCR termékek hosszát jelzik, bázispár egységben.

A kísérleteink során használt többi primerrel végezve PCR-t sem keletkeztek aspecifikus termékek. A dHPLC kísérletek során használt primerek termékei mintegy 150-400 bp nagyságúak voltak (6. ábra)

4.2. Mutációk detektálása

Munkánk során a GJB2 gén 35delG mutációját külön vizsgáltuk, mert a Kaukázusi rasszban a nem-szindrómás, öröklődő halláskárosodások nagy százalékáért ez az egy pontmutáció a felelős, és megléte korai életkorban kialakuló, mindkét oldalt, a teljes frekvenciatartományt érintő súlyos fokú halláskárosodást okoz. Minden mintán AS-PCR-t végeztünk. A Guthrie papirokról származó mintákat mint „általános”, a magyar lakosságot jellemző mintát tekintettük, és megállapítottuk, hogy a 35delG- allél gyakorisága mintegy 2,3%, azaz megegyezik az irodalomban közölt adatokkal. Az 576 mintából egy esetben sem találtunk homozigóta recesszív genotípust, ami várható volt, tekintve a 35delG-- 1/1000 - 1/2000 előfordulási arányát. 13 35delG+- genotípusú egyént találtunk.

A klinikai pácienseink között 51 heterozigóta, és 24 homozigóta recesszív 35delG

	Összesen	35delG +/-	35delG -/-	# 35delG allélek
A - Guthrie papír				
Személy	576	13	0	563
%	100	2.3	0	97.7
B - EDTA-antikoagulált vér				
Személy	318	51	24	243
%	100	16.0	7.6	76.4
C - CI felhasználók (EDTA- EDTA-antikoagulált vérből)				
Személy	52	5	11	36
%	100	9.6	21.2	69.2

genotípusú páciens találtunk, ami rendre 16% és 7,6%-ot tesz ki a 318 vizsgált mintából.

A 318-ból 52 CI használó, vagy CI-re jelölt személy volt, közöttük 5 heterozigótát, és 11 homozigótát találtunk (9,6% és 21,2%)

3. Táblázat

A GJB2 gén 35delG mutációjának előfordulása a vizsgált populációkban

A GJB2 gén egyéb mutációit szekvenálással határoztuk meg. Ezeket a méréseket csak a klinikai beteganyagban végeztük el, mert előfordulási valószínűségük nagyon kicsi, így az „általános” populációban nagy valószínűséggel csak néhányat, vagy egyet sem találtunk volna. Az általunk talált mutációkat és százalékos előfordulási arányukat a 4. Táblázatban foglaltuk össze.

Number of GJB2 mutations	Percent of GJB2 mutations	G109A +/- V37I	T269C+/- L90P	G95A-/+R32H +/-	T101C-/+M34T +/-	G380A +/- R127H	G380A +/- R127H
15		2	1	2	1	2	7
	5.66	0,63	0,31	0,63	0,31	0,63	2,20
		G71A +/- W24STOP	G139T+/- /E47STOP +/-	C164T+/-	G478 A+/-	176 delG +/-	A341G+/- / E114G+/-
10		3	2	1	1	1	2
	3.14	0,94	0,63	0,31	0,31	0,31	0,63
25	7.86						
Total = 318	100						

4. Táblázat

A GJB2 génben talált egyéb (nem 35delG) mutációk, és százalékos előfordulásuk a vizsgált populáción (n=318) belül.

A dHPLC mérések során arra kerestünk választ, hogy a genom egyéb, általunk a szakirodalom alapján kiválasztott régióiban milyen gyakorisággal található SNP-k (nukleotid polimorfizmusok, azaz pontmutációk, melyek vagy okoznak problémát, vagy nem), illetve ezek SNP-k az általunk vizsgált populációban megfeleltethetők-e az audiológiai eredményeknek. A dHPLC méréseket a GJB2 gén kódoló exonjának vizsgálatával ellenőriztük. Mivel ezt az exont mind a 318 egyén mintáján megszekvenáltuk, így a dHPLC mérésekkel összevetve meghatározhattuk ezen módszer megbízhatóságát. Úgy találtuk, hogy minden, a szekvenálás során talált SNP esetében a megfelelő mintánál a dHPLC is kimutatta a polimorfizmust. Egyébként ezt irodalmi adatok is alátámasztják, létezik közlemény, mely szerint a dHPLC 100%-os pontossággal használható mutáció-detektálásra. A vizsgált populáció 318 tagjának mind a 49 régióját megvizsgálva, és nem számítva a GJB2 gént, - körülbelül 15 000 mérés adatait összegezve – 131 SNP-t detektáltunk dHPLC-vel. Két gén egy vizsgált régiójában sem találtunk polimorfizmust (GJA és POU3F4). A talált SNP-k számát az 5. Táblázat foglalja össze. Méréseink alapján elmondható, hogy a rutinszerű, teljes körű genetikai szűrés – azaz szekvenálás – még válogatott esetekben is viszonylag ritkán vezetne eredményre.

Összesen	12s rRNS	COCH	GJA1	GJB3	GJB6	KCNQ4	SLC26A4	POU3F4	MYO6
131	29	6	0	32	5	37	2	0	21

5. Táblázat

A gének vizsgált régióiban talált polimorfizmusok száma (a GJB2 gént nem tüntettük fel)

mutáció	db
csak 35delG--	6
csak 35delG-+	2
T269C+- L90P	1
G109A +- V37I	1
G380A +- R127H	1
G 478 A+-	1

6. Táblázat

Cochlearis implantatum használóknál 35 esetben találtunk genetikai eltérést, amely felelőssé tehető a súlyos fokú halláskárosodásért. Ebből 12 esetben csak a GJB2 gén vizsgált szakaszában találtunk mutációt, 4 esetben a GJB2-ben és más génben találtunk eltérést. 17 esetben más génben is találtunk SNP-t. A korábban tisztázatlan eredetű halláskárosodások (alapos anamnézis felvétel, radiológiai, fül-orr-gégészeti kivizsgálás után is rejtve maradt a kiváltó ok) mintegy kétharmadát tudtuk genetikai problémára visszavezetni. 19 esetben azonban a halláskárosodásnak nem találtuk genetikai hátterét, ami az esetek 36,5%-a. Fontos kiemelni, hogy jelen vizsgálatok során csak olyan régiókat ellenőriztünk, melyekről már az irodalomban korábban megjelentek közlések. Természetesen a tisztázatlan esetek mögött - a nem ellenőrzött régiókban – állhat örökletes probléma. A fenti eredményeket a 6. Táblázatban (azon CI páciensek, akiknél csak a GJB2 gén exonjában találtunk eltérést), és a 7. Táblázatban foglaltuk össze.

Páciens	1	2	3	4	5	6	7
GJB2 mutáció	35 delG --				35 delG --		
dHPLC primer	DF33	DF33	DF9,DF11,DF33	DF9,DF33	DF33	DF33	DF9,DF17
Gén	MYO6	MYO6	12srRNS, GJB3, MYO6	12srRNS, MYO6	MYO6	MYO6	12srRNS, KCNQ4

Páciens	8	9	10	11	12	13	14
GJB2 mutáció				35 delG+-			
dHPLC primer	DF17	DF17	DF6	DF9	DF33	DF9	DF48
Gén	KCNQ4	KCNQ4	COCH	GJB3	MYO6	GJB3	KCNQ4
Páciens	15	16	17	18	19	20	21
GJB2 mutáció			35 delG+- G95A-				
dHPLC primer	DF33	DF33	DF9, DF11, DF17	DF4	DF4	DF12	DF4
Gén	MYO6	MYO6	KCNQ4, GJB3, KCNQ4	12srRNS	12srRNS	GJB6	12srRNS

7. Táblázat

A táblázat azon CI-s páciensek adatait tartalmazza, akiknél a GJB2 génben nem, de máshol igen, vagy a GJB2 génben is, és máshol is találtunk SNP-t

5. Összefoglalás

1. Megvizsgáltunk és összehasonlítottunk 3 eljárást a genomi DNS vérből történő kitisztítására Guthrie papírból. Bebizonyítottuk, hogy egy viszonylag egyszerű eljárással több száz kísérlethez elegendő mennyiségű DNS-t lehet extrahálni a papírra szárított vérekből. 96 mintából mintegy fél óra alatt kinyerhető a fenti mennyiség. Szignifikánsan kevesebb munkával pucolható DNS szárított papírról, mint EDTA-s vérvételi csőben tárolt vérből, miközben a tárolás költségei is jóval alacsonyabbak, és a vérvétel is kevésbé traumatikus a gyermek számára.
2. Munkánk során megmutattuk, hogy a Guthrie papírra szárított vérből kitisztított DNS legalább 10 évig PCR és szekvenálás céljára használható marad, még abban az esetben is, ha kifejezetten mostoha körülmények között tárolják a papírokat. A GJB2 gén teljes kódoló exonját meg tudtuk szekvenálni papírra szárított vérből tisztított DNS-ből.
3. Megmutattuk, hogy egy darab Guthrie papírra szárított vérből (3-4 csepp) kitisztított genomi DNS-ből legalább ezres nagyságrendű PCR végezhető. Így, ha szükséges, lehetőségünk van akár nagyobb gének szekvenciáinak a meghatározására is.
4. Megmutattuk, hogy az általunk vizsgált, véletlenszerűen összeválogatott, Magyarország déli-, délkeleti régióiból származó mintákból álló populációban a GJB2 gén 35delG mutációja az irodalomban közölt, a Kaukázusi populációra vonatkoztatott adatokkal megegyezik, mintegy 2-2,5%. Az ismeretlen eredetű halláskárosodásokkal rendelkező pácienseink esetében ez az arány mintegy 31-32%, ami 16-szor magasabb arány, mint amit normál populáció esetében találtunk.
5. Számos más mutációt is találtunk a GJB2 gén kódoló exonjában. Leírtuk a C164T és 176delG polimorfizmusokat, ezeket eddig nem közölték a szakirodalomban. Adataink alapján a 176delG autoszómális domináns öröklésmentet mutató mutáció is lehet. A

C164T valószínű fenotípusos eltérést nem okozó polimorfizmus. A többi leírt mutációt sem tanulmányozták részletekbe menően a magyar populációban.

6. A 318-ból 29 olyan esetben, ahol valamilyen fokú halláskárosodás is fennáll, találtunk a GJB2- génen kívül más genomi régiókban is eltérést. Ez mintegy 11%-a a vizsgált mintának.
97 SNP-t találtunk a 318 páciens vizsgált genomi régióiban. 17 esetben két régióban is találtunk SNP-t (két esetben ugyanabban a génben), 8 esetben 3 SNP-t találtunk, ebből 5 esetben a hátról kettő SNP ugyanabban a génben, de másik régióban volt.
7. Habár sok SNP-t találtunk, a kiterjedt rokonsági kapcsolatok hiánya a populáció-mintánkban nem teszi lehetővé, hogy pontosan megfeleltethessük egymásnak a genetikai és audiológiai leleteket. A genetikai kutatásokhoz kitűnően használható kiterjedt, nagy családok és a rokonsági kapcsolatok részletes számontartása a Nyugat-Európai és a magyar családok körében kevésbé elterjedt, így az ilyen adatokra épülő kutatások nehezebben kivitelezhetők ezen országokban.
8. Adataink alapján csak néhány, jól meghatározott, alaposan tanulmányozott esetben lehetséges az audiológiai profil meghatározása a genetikai leletek alapján, jellemzően egy-egy gén bizonyos régiói esetében. Mivel ezen mutációk előfordulási gyakorisága nagyon alacsony, még „válogatott populáció” esetén is, megfelelő genetikai-audiológiai megfeleltetés eléréséhez az ország lakosságának minél nagyobb hányadát kellene audiológiai és hallásgenetikai szűrőprogramokba bevonni.
9. Eredményeink alapján a cochlearis implantációra történő kivizsgálás során a genetikai teszteknek az elvégzett vizsgálatok részét kellene képezniük, erre utal a CI-s populációban talált genetikai eltérések relatíve nagy száma. Vizsgálataink alapján a genetikai profilból az audiológiai problémákra csak becslést tudunk adni, pontos képet nem, mégis a talált mutációk nagy száma arra utal, hogy sokkal több halláskárosodás esetében állhat genetikai ok a háttérben Magyarországon, mint eddig gondoltuk volna.

6. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban köszönetemet szeretném kifejezni dr. habil. Kiss József Géának, témavezetőmnek. További köszönettel tartozok a Fül-orr-gégészeti és fej-nyaksebészeti klinika előző, és jelenlegi intézetvezetőjének, Czigler Jenő és Jóri József professzoroknak, valamint Kovács Kornél professzornak, a Biotechnológia tanszék vezetőjének, hogy lehetővé tették számomra, hogy az intézetükben dolgozhattam.

Külön köszönettel tartozom dr. Csáki Róbertnek, aki a munka végzése során volt segítségemre, mint munkatárs, és mint barát egyaránt. Köszönettel tartozom Nánai László professzornak barátságáért, aki ha, kezdtem elveszíteni a hitemet a tudományban, mindig vissza tudta azt adni.

Köszönet jár Tóth Ferenc kollegámnak a segítségért, amit tőle kaptam, és Klem József PhD hallgatónak, a Biotechnológia tanszékről, az ötletekért és a laborban nyújtott segítségért.

Dr. Tálosi Gyula a Gyermekklinikáról biztosította számunkra a Guthrie papírokhaz való hozzáférést, ezúton is köszönjük neki. Az SZTE II. Belgyógyászti klinikáján dr. Sepp Róbertnek és Csanádi Miklós professzornak tartozom köszönettel, hogy a dHPLC labort a rendelkezésükre bocsájtották, és egyaránt köszönöm a mérések kezdetén és a későbbiekben nyújtott segítségüket.

Köszönet a kaposvári Somogy Megyei Önkormányzat Duráczky József Óvodája, Általános Iskolája, Egységes Gyógypedagógiai Módszertani Intézménye, Diák- és Gyermekotthona, és a szegedi Klúg Péter Óvoda, Általános Iskola, Szakiskola, Alapfokú művészetoktatási Intézmény vezetőinek és dolgozóinak és dr. Totth László főorvosnak Kaposvárról a fáradozásért és a segítségért, amit nyújtottak nekünk.

Köszönet a klinika audiológus asszisztenseinek az audiológiai mérésekért, valamint az ambulancia dolgozóinak a vérvételek során nyújtott segítségükért. A biotechnológia tanszék laboránsainak és a dHPLC laboratórium laboránsainak a néha hosszadalmas mérések során a társaságukért és az elvégzett munkáért egyaránt köszönet jár.

Köszönöm dr. Fodor Barnának, barátomnak, aki, ha kellett, szakmailag a rendelkezésemre állt, alaposan átolvasta és kritikai észrevételeivel jobbá tette értekezésemet.

Köszönjük dr. Nagy Elemérnek a munka tervezése során adott ötleteit, valamint hogy néhány páciensét volt szíves hozzánk irányítani.

Nem utolsósorban hálás köszönettel tartozom családomnak: szüleimnek, és barátnőmnek, dr. Fazekas Piroskának, hogy mindvégig kitartottak mellettem és bíztattak, ha kellett.

A munkát a "Gazdasági és versenyképességi operatív program" támogatta, a GVOP-3.1.1-2004-05-0498/3.0 számú pályázattal.

7. Publikációk

A tézisekhez kapcsolódó közlemények

A. L. Nagy, R. Csáki, F. Tóth, R. Sepp, M. Csanády Sr., M. Csanády Jr., Gy. Tálosi, J. Klem, K. Kovács, J. Jóri, J. G. Kiss: Possibilities of early detection of hearing disturbances of genetic origin. Proceedings of the 8th International Congress of The Mediterranean Society of Otolology & Audiology, 17 - 21 May 2006 Dubrovnik, Medimond. Srl. Bologna, Italy Pp:15-18 (2006).

A. Nagy, R. Csáki, J. Klem, L. Rovó, F. Tóth, G. Tálosi, J. Jóri, K. Kovács, J. Kiss: Minimally invasive genetic screen for GJB2 related deafness using dried blood spots *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, Volume 74, Issue 1, Pages 75-81

A GJB2 gén 35delG mutációjának vizsgálata a Szegeden cochlearisan implantáltak és rokonaik populációjában allél specifikus polimeráz láncreakcióval. Nagy L. Attila, Dr. Csáki Róbert, Dr. Tálosi Gyula, Klem József, Dr. Jóri József, Dr. Kovács Kornél, Dr. Kiss József Géza (közlésre elfogadva)

Egyéb közlemények

Idézhető abstractok

KISS J. G., NÁNAI L., BERKESI O., PACZONA R., **NAGY A.**, TÓTH F., JÓRI J., CZIGNER J.:

UV resonance RAMAN spectroscopy of human tissues. 2nd *Congress of European Laryngological Society* Roma, Italy, 23-26 March 1998. *Eur.Arch.Oto-Rhino-L.* 255 (Supplement 1): S39 (153) 1998.

KISS J. G., TÓTH F., SZAMOSKÖZI A., NAGY A., JÓRI J., CZIGNER J.: Results of neural response telemetry (NRT) measurements in Hungary. 4th *European Congress of Oto-Rhino-Laryngology Head and Neck Surgery* Berlin, Germany May 13-18, 2000. *Laryngo Rhino Otol*, 79 (Supplement 1): S146, 2000.

Kiss J. G., Tóth F., Jarabin J., **Nagy A. L.**, Torkos A., Szamosközi A., Jóri J., Czigner J.: Objective measurements in cochlear implant users. 73. *Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie* Baden-Baden, Deutschland, 8-12, Mai 2002 *Eur Arch Otorhinolaryngol*

Folyóiratcikkek:

J. JANICSKÓ-CSÁTHY, **A. NAGY**, L. NÁNAI, W. MARINE, S. P. A. SOUTO, M. BALKANSKI AND T. F. GEORGE Comparative Study of Single Crystals and Laser-Grown Films of V2O5 *Journal of Materials Research* 17, 1096-101 (2002)

NAGY L. A., TÓTH F., VAJTAI R., GINGL Z., JÓRI J., KISS J. G.: Effects of noise on the intensity of DPOAE's. *Int Tinnitus J* 8(2): 94-96. 2002.

KISS J. G., TÓTH F., **NAGY L. A.**, JARABIN J., SZAMOSKÖZI A., TORKOS A., JÓRI J., CZIGNER.: Neural response telemetry in cochlear implant patient. *Int Tinnitus J* 9(1): 59-60. 2003

TÓTH F., KISS J.G., **NAGY L. A.**, JÓRI, J.: Kognitív eseményfüggő potenciálok és a beszédmegértés. *Fül-Orr-Gégegyógyászat* 49(3), 136-140. 2003.

TÓTH F., KISS J.G., **NAGY L. A.**, JÓRI, J.: Agytörzsi kiváltott potenciálok karakterisztikája fülcimpa elektróda alkalmazásakor *Fül-Orr-Gégegyógyászat* 50(3): 245-247. 2004.

Szendi I, Racsmány M, Cimmer C, Csifcsák G, Kovács ZA, Szekeres G, Galsi G, Tóth F, **Nagy A**, Garab EA, Boda K, Gulyás G, Kiss JG, Dombi J, Pléh C, Janka Z.: Two subgroups of schizophrenia identified by systematic cognitive neuropsychiatric mapping. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2009 Oct 15. [Epub ahead of print]