

**Kópiaszám eltérések vizsgálata minor anomáliás és  
epilepsziás betegekben**

**DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS**

**SZABÓ ANDRÁS**



Doktori iskola vezetője

**Prof. Dr. Sümegei Balázs**

Program és Témavezető

**Prof. Dr. Melegh Béla**

**Pécsi Tudományegyetem**

**Általános Orvostudományi Kar**

**Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola**

**Klinikai Központ, Orvosi Genetikai Intézet**

**Pécs, 2016**

## ▪ Bevezető

### **Az epilepszia történelmi háttere**

Az epilepszia megjelenése már a Kr.e. 1600-1700-as években felkeltette az orvoslással foglalkozó emberek érdeklődését. A legelső, egyiptomi és kínai írásos bizonyítékok a jellegzetes kórkép alapján az epilepsziát még természetfeletti jelenségként tüntették fel. A XVII-XVIII. századtól kezdődően az epilepszia hátterének tanulmányozása robbanásszerű fejlődésnek indult, melynek során a betegséggel kapcsolatba hozható fiziológiai kísérletek és értelmezések sora került leírásra. Az epilepsziás betegek vizsgálata által nyert eredmények az idő múlásával és a tapasztalatok gyűjtésével az epilepszia és a központi idegrendszer kapcsolatának tanulmányozására helyezték a hangsúlyt. Az újuló diagnosztikai eszközök által nyert tapasztalatok révén az epilepszia megfogalmazása kiterjedt az agy funkcionális és/vagy morfológiai rendellenességeire.

Az International League Against Epilepsy jelenlegi legfrissebb (2014. évi) definíciója alapján epilepsziás betegnek nyilvánítható azon személy, aki az alábbi kondíciók legalább egyikének megfelel:

1. Több, mint 24 óra alatt legalább két nem provokált (vagy reflex) rohamot mutat.
2. Egy nem provokált (vagy reflex) rohamot mutat, és esetében a 10 éven belüli újabb rohamok kialakulási kockázata megfelel a két nem provokált rohamot követő általános kockázatnak (legalább 60%).
3. Esetében egy epilepszia szindróma diagnózisa áll fenn.

### **Az epilepszia demográfiai megoszlása**

Világszerte az emberek közel 1%-a szenved epilepsziás megbetegedésben. Az epilepsziás esetek megközelítőleg 80%-át a fejlődő országok népessége teszi ki. A betegség kialakulásának valószínűsége a kor előrehaladtával nő.

### **Az epilepsziák csoportosítása**

Az epilepsziás rohamok széles spektruma révén osztályozásuk több szempontból történhet. Az agyi érintettség szempontjából megkülönböztetünk fokális, valamint generalizált rohamokat. A fokális rohamok az agykéreg epilepsziás gócaiból indulnak ki, és ennek megfelelő motoros, érző, kognitív, emocionális és összetett jelenségekkel járnak. Generalizált

rohamoknak nevezzük a kétoldali motoros jelenségekkel járó epilepsziás rohamokat, valamint az absence rohamokat. A motoros aktivitást mutató fokális és generalizált rohamok leggyakrabban előforduló típusai a tónusos, atónusos, clonusos, tónusos-clonusos, clonusos-tónusos-clonusos, myoclonusos, myoclonusos-atónusos és hypermotoros rohamok, valamint az epilepsziás spazmus. A motoros aktivitást nem mutató rohamok alkotják a fokális rohamok nem-motoros csoportját, mely kiterjed a szenzoros, kognitív, emocionális, valamint autonóm jegyekre is. Az epilepsziás rohamok csoportosítása során nagy szerepet kap az érintett tudatállapotának megléte vagy hiánya. Az epilepsziás rohamok osztályozása egy másik szempontból a patomechanizmus alapján történik. A tünetek kialakulásában egyaránt nagy szerepet tulajdonítanak mind a veleszületett agyi malformációknak, mind a szerzett lézióknak, valamint a genetikai eredetnek. A mindennapi gyakorlatban még napjainkban is használatos az ILAE egy korábbi definíciója, mely alapján nevezetesen a genetikai háttérrel rendelkező epilepsziák mintegy szinonimájaként használjuk az idiopátiás epilepszia elnevezést. Azok az epilepsziák, amik feltételezhetően nem genetikai okokra vezethetők vissza, azonban a kialakulásukban szerepet játszó pontos szerkezeti károsodás sem ismert, alkotják a kriptogén epilepsziák csoportját. Az utóbbi időben ezt az epilepszia csoportot „feltehetőleg szimptomás” csoportként is emlegetik. Azokban az esetekben, amikor a betegség kialakulásáért egy gén defektusa tehető felelőssé, legnagyobb százalékban ioncsatorna defektusok, enzim defektusok, GABA defektus és G-protein kapcsolt receptor defektusok állnak a háttérben.

### **Az epilepsziák kialakulásával kapcsolatba hozható genomiális eltérések**

A különböző típusú epilepsziák aCGH vizsgálata során detektált CNV-k esetén megkülönböztethetünk ismételt előforduló, úgynevezett rekurrens, valamint egyedi esetekben előforduló nem rekurrens genomiális eltéréseket. Az érintett genomiális régiókban található gének funkciója, deléció vagy duplikáció következtében kialakuló kópiaszám változása együttesen határozzák meg a gyakran összetett klinikai kép kialakulását. Az irodalomban leközölt leggyakoribb, rekurrens mikrodeléciók, melyek az idiopátiás epilepsziák különböző típusaival összefüggésbe hozhatók, az 1q21.1, 15q11.2, 15q13.3, 16p11.2, 16p13.11, 22q11.2 genomi régiókat érintették. A rekurrens mikrodeléciók előfordulási valószínűsége, epilepsziás betegekben való rendszeres detektálásuk ellenére sem haladja meg egyenként a 0,5-1%-ot, összességében pedig a 2,5%-ot. A vizsgált betegszám növekedésével nyilvánvalóvá vált, hogy ezen genomi régiók érintettsége esetén nem csak azok kópiaszám

vesztése állhat a kialakult fenotípusos kép háttérében. Ezen genomi régiókba eső, dóziszérékeny gének kópiaszámának növekedése, a kópiaszám csökkenésükhöz hasonlóan kóros tünettan kialakulásához járulhat hozzá. A nagy felbontóképességű genomanalizáló módszerek elterjedése a mikrodeléciós szindrómák mellett a különböző mikroduplikációs szindrómák fontosságát is előtérbe helyezte. Az említett 1q21.1, 15q11.2, 15q13.3, 16p11.2, 16p13.11, 22q11.2 genomi régiókat érintő változások mellett természetesen egyéb, dóziszérékeny géneket tartalmazó régiók (pl.: 9q34) rekurrens kópiaszám változásai is hozzájárulhatnak meghatározott tünetek, akár szindrómák (pl.: Kleefstra szindróma) kialakulásához.

A teljes genom vizsgálatát lehetővé tevő új-generációs módszerek szélesebb körű alkalmazásával az epilepsziás betegekben detektált nem rekurrens CNV-k meghatározó szerepe a betegség kialakításában egyre nyilvánvalóbbá vált.

### **Az epilepsziák terápiás vonatkozásai**

Az epilepsziás betegek körében leggyakrabban alkalmazott kezelés az antikonvulzáns kezelés. Az alkalmazandó antikonvulzáns szer meghatározását nagymértékben befolyásolja a roham típusa, az epilepsziás szindróma milyensége, egészségügyi problémák megléte, egyéb gyógyszeres kezelések, valamint az illető kora és életformája. A fejlett epilepsziás terápia ellenére az esetek közel 30%-ában a különböző antikonvulzánsok alkalmazása ellenére sem szűnnek meg a tünetek.

### **Genomanalizáló módszerek - aCGH**

Az új-generációs szekvenálás (NGS) és aCGH módszerek megjelenése az új genomiális eltérések detektálásán túl lehetővé tette a hagyományos technológiák eredményeinek megerősítését, illetve az új-generációs módszerek nagy felbontóképessége révén a már meglévő eredmények pontosítását. Az aCGH a tradicionális komparatív genomiális hibridizáció egy fajtája, mely esetén a metafázisos kromoszómák meghatározott hosszúságú (25-60 bp), a genomot lefedő oligonukleotidokkal helyettesítettek. Az oligonukleotidok egy speciális tárgylemezen helyezkednek el, és genomi pozíciójuk a gyártó által meghatározott. A módszer 5-10 kilobázisos felbontóképességével egy specifikus, gyors, érzékeny technikává vált, megkönnyítve a kópiaszám változások detektálását mind a klinikai alkalmazásokban, mind a kutatásban. A hagyományos (Kariotipizálás, FISH) és új keletű (NGS, aCGH)

molekuláris biológiai módszerek együttes alkalmazása, egymást erősítve tette lehetővé az újabb módszerek diagnosztikai alkalmazását. Fontos megjegyezni, hogy a hagyományos és új-generációs módszerek nem felváltották, hanem kiegészítették egymást. A régi és új módszerek korlátainak nagy része egymás melletti alkalmazás esetén kiküszöbölhető (pl.: kiegyensúlyozott transzlokációk detektálása). A tudomány és a módszerek fejlődése az epilepszia genetikai hátterének vizsgálatát is nagyban befolyásolta. Az aCGH és FISH együttes alkalmazása lehetővé tette epilepsziás betegekben nagyobb genomális eltérések kimutatását, ezáltal a klinikai kép és a genotípus közti korreláció mélyrehatóbb tanulmányozását. Az egy gén érintettsége révén kialakult epilepsziák vizsgálata mellett így egyre nagyobb teret kapott a nagyobb kromoszómális változások – deléciók, duplikációk – és az epilepszia kapcsolatának vizsgálata.

## ▪ Célkitűzések

A vizsgálat során céлом volt:

- epilepsziás tüneteket, és minor anomáliákat mutató betegek várható genomi eltéréseinek detektálása;
- rekurrens és nem rekurrens kópiaszám változások detektálása epilepsziával és minor anomáliákkal rendelkező betegekben;
- az epilepsziás tünetek és a minor anomáliák kialakulása és a detektált kópiaszám változások közötti kapcsolat tanulmányozása;
- a detektált eltérések által érintett gének, genomi régiók funkciójának elemzése szakirodalmi adatok és publikus adatbázisokban közölt adatok felhasználásával;
- az érintett gének dóziszérékenysége vonatkozó irodalmi adatok értékelése;
- a talált eltérések genotípus-fenotípus korrelációjának meghatározása, eredményeinket összevetve a szakirodalomban közölt, hasonló genotípussal és fenotípusos megnyilvánulással rendelkező esetekkel;
- saját találataink, valamint a szakirodalmi adatok alapján az érintett, nagyobb genomi régiók leszűkítése a betegség kialakításában szerepet játszó kisebb régiókra, génekre;
- valamint a detektált genomi eltérések és a megfigyelt fenotípus alapján az aCGH vizsgálat alkalmazhatóságának megerősítése az epilepsziás tünetekkel és minor anomáliákkal rendelkező betegek csoportján belül.

## ▪ **Anyagok és módszerek**

A vizsgálatba bevont betegek és családtagjaik klinikai vizsgálata, valamint a mintavétel genetikai tanácsadás keretein belül történt. A tájékoztatást és a vizsgálatba való beleegyezést követően 5-7 ml Etil-diamin-tetraecetsavval (EDTA) alvadásgátolt vér került levételre minden kiválasztott személytől a laboratóriumi vizsgálatok elvégzéséhez. A DNS izolálására Omega E.Z.N.A. Blood Maxiprep Kit-et alkalmaztunk.

A G-sávós kromoszóma festés során elsőként a vizsgálatba bevont személyek lymphocytáit tenyésztettük, majd a tárgylemezre kicseppentett preparátumot Giemzával festettük meg. A száradás után mikroszkópban értékeltük a látottakat, mely során 15 metafázisban lévő kromoszómát számoltunk meg, majd csoportokba soroltuk őket. A Giemsa festést és értékelést követően végeztük el a G-sávozást. A sávozott preparátumot Leishmann's festékkel kezeltük, majd a mikroszkópos elemzés során minden mintából 5 kariotípust készítettünk.

Az uniparentális diszómia vizsgálata során a szülők és a vizsgált személy esetén a polimorf mikroszatellita (STR) markerek amplifikálásra kerültek PCR segítségével. Az értékelés során a gyermek (vizsgált személy) alléljeit a két szülő alléljeihez viszonyítottuk, azaz a kapott termékek mintázatát értékeltük.

A kiválasztott személyek fluoreszcens in situ hibridizációs (FISH) vizsgálatához perifériás vért használtunk. A folyamat során a preparátumok előkezelését követően denaturálási és hibridizációs lépéseket végeztünk, majd a poszthibridizációs mosási és festési lépést követően kiértékeljük a kapott eredményeket.

Az array komparatív genomiális hibridizáció elvégzéséhez Agilent SurePrint G3 Human Gene Expression V2 8x60K Microarray Kit-et alkalmaztunk. A vizsgált minták és referenciák fragmentálását követően, a fragmentált DNS-eket amplifikáltuk, majd megjelöltük különböző fluoreszcens festékekkel (Cy5 és Cy3). A minta és referencia DNS-ek tisztítását és bekonzentrálását követően megmértük a festék beépülésének mértékét, majd a megfelelő minta-referencia párokat egy csőbe pipettáztuk. A minta-referencia párok lemezre történő hibridizálását, majd a mosási lépéseket követően a fluoreszcens intenzitásértékek detektálására alkalmas scanner-be helyeztük a lemezt. A lemezek scannelését követően kiértékeljük az adatokat.

## ▪ **Betegek**

### **1. beteg**

Egy 27 hónapos fiú gyermeket vizsgáltunk intézetünk genetikai tanácsadásán epilepszia és pszichomotoros elmaradás miatt. Az általunk vizsgált gyermek a mater II./2. graviditásából, 40. gesztációs héten, per vias naturales, 9/10-es Apgar ponttal, 3200 gr súllyal született. EEG vizsgálat diffúz működészavart írt le multifokális tüskékkel, ami miatt antiepileptikus terápia került bevezetésre, melyet 3 hónapos koráig kapott. Hosszú időn keresztül az antiepileptikus terápia mellett sem volt rohammentes, az EEG változó rohammintázatot mutatott. Az emiatt elvégzett koponya-MR vizsgálat strukturális eltérést nem mutatott.

Csecsemőkorában etetési nehezítettség miatt csak pohárból tudták etetni. Furcsa sírási hang jellemezte (epiglottis lazaság), izomzata hypoton volt. A gyermek pszichomotoros fejlődése megkésett. Dysmorphiás státuszából lapos occiput, epicanthus, hipertelorizmus, bal fülcimpa hátsó felszínén redő, széles-lapos orrgyök valamint mikrognátia kiemelendő. Neurológiai státuszában generalizált hypotonián kívül durva neurológiai körjel nincsen.

### **2. beteg**

Második betegünk egy 17 hónapos kislány, aki minor anomáliák és epilepszia miatt került intézetünkbe kivizsgálás céljából. A gyermek az édesanya II./2 zavartalan graviditásából született 41. gesztációs héten, per vias naturales, 10/10-es Apgar ponttal, 3520 gr súllyal. Lassú pszichomotoros fejlődés miatt a gyermek neurohabilitációban részesült 4 hónapos korától. Fél éves életkorban bizonytalan eredetű rohamok, megfeszülések miatt kivizsgálás indult, ennek során EEG vizsgálat történt, mely West-szindrómára jellegzetes mintázatot igazolt. Koponya-MR vizsgálat frontálisan és temporalisan tágabb liquor tereket ábrázolt, egyéb agyi strukturális fejlődési rendellenesség nem volt kimutatható. Vigabatrin kezelés mellett jelentősen csökkent a rohamok előfordulása. Fizikális vizsgálata során enyhe craniofacialis dysmorphia mellett (kiugró homlokcsont, lapos occiput, széles arc), széles mellkas és kis lábak voltak megfigyelhetők. Neurológiai státuszában generalizált hypotonia, sztereotíp mozgások és lábujjhegyezés volt észlelhető. Az epilepszia rohammintázata változást mutatott: a vigabatrin kezelést valproátra cserélték.



### **3. beteg**

Harmadik betegünket 3 éves korában vizsgáltuk első alkalommal minor anomáliák és epilepszia miatt. A kislány a mater I./1. zavartalan graviditásából, terminusra született, harántfekvés miatt császármetszéssel, 2600 gr súllyal és 9/10-es Apgar ponttal. A korai kardiorespiratorikus adaptáció rendben zajlott. 2 napos életkorban jelentkezett első epileptiform görcse, mely barbiturát adása mellett oldódott. A rosszullet 3 hét múlva megismétlődött. A convulsiók háttérében koponya ultrahanggal III. fokú intraventricularis haemorrhagia (IVH) igazolódott. EEG vizsgálat negatív eredményt adott; koponya-MR corpus callosum dysgenesiát vetett fel, ezt azonban későbbi ismételt MR vizsgálat nem igazolta.

Újabb MR-vizsgálat az IVH következtében kialakult jobb oldalkamra tágulatot írt le. Kombinált antiepileptikus terápia ellenére sem rohammentes. A gyermek születése óta ismert atrialis és ventrikularis septum defektus miatt rendszeres kardiológiai gondozás alatt állt. Megkésett pszichomotoros fejlődés miatt neurohabilitációban részesült.

Fizikális vizsgálat során a következő minor anomáliákat azonosítottuk: mikrokefália, mikrognátia, besüppedt orrgyök, epicanthus, hipertelorizmus, előre álló philtrum, gótikus szájpad, II-III. lábujjak részleges syndactyliája, testszerte 0,5-2 cm-es café au lait foltok. Bruxizmus, hiperaktivitás és enyhe autisztikus vonások jellemezték a viselkedését.

### **4. beteg**

Negyedik betegünk egy 8 hónapos kislány, akinek kivizsgálása minor anomáliák, halláskárosodás és megkésett pszichomotoros fejlődés miatt indult. A gyermek a mater I./1. graviditásából, terminusra, 2740 gr súllyal, 4/6/8-as Apgar ponttal született. A 26. gesztációs héten foetalis echocardiographiával hypoplasiás aortaívét észleltek. 1 napos életkorban történt kardiológiai vizsgálat aorta stenosist és coarctatio aortae véleményezett. Újszülöttkori koponya ultrahang vizsgálat során enyhe oldalkamra aszimmetriát írtak le, hasi ultrahang enyhe bal oldali pyelectasián kívül kóros eltérést nem talált.

Pszichomotoros fejlődése megkésett volt. Első epilepsziás rohama 22 hónapos korában jelentkezett. EEG vizsgálat generalizált, aktív interiktális epilepsziás mechanizmust mutatott. Kombinált antiepileptikus kezelés mellett a rohamok száma jelentős csökkenést mutatott. Koponya-MR vizsgálat tág liquor teret, gracilis hippocampust és a szubkortikális területen ischaemiás károsodásnak megfelelő képet mutatott. Fizikai vizsgálata során brachykefália,

lapos arc, középarci hypoplasia, ferdén lefelé álló szemrések, konvergens strabizmus, rövid orr, magas szájpad, valamint generalizált hypotonia volt megfigyelhető.

## **5. beteg**

Ötödik betegünk egy 30 hónapos kisfiú, akit minor anomáliák miatt vizsgáltunk genetikai tanácsadónkban.

A fiúgyermek a mater II./2. spontán graviditásából, a 38. gesztációs héten, 2600 gr súllyal, császármetszéssel, 7-es Apgar ponttal született. A 34. gesztációs héttől IUGR miatt fokozott obszerváció történt. 5 hónapos korától kezdődően fejlődésneurológiai gondozás alatt állt megkésett mozgásfejlődés miatt.

Első epileptiform rosszulléte 20 hónapos korában zajlott terápiareszisztens fokális rohamokkal társuló epilepszia képében. Az alkalmazott antiepileptikumok metabolizmusában jelentős eltérést tapasztaltak a szokásostól. Minimális dozírozás mellett is toxikus vérszinteket mértek a gyermeknél. (0,03 mg/kg clonazepam mellett 600 nmol/l gyógyszer szint és 11 mg/kg levetiracetam mellett 330 nmol/l gyógyszer szint)

Informatív morfogenetikai variánsok közül a következők voltak megfigyelhetők: brachymikrokefália, lapos arc, középarc hypoplasia, hipertelorizmus, rövid orr, vastag alsó ajak, hegyes áll, deformált fül. Neurológiai státuszában enyhe hypotonián kívül kóros eltérést nem találtunk.

## ▪ **Eredmények**

### **1. beteg**

A G-sávós kromoszóma festés segítségével az 1. beteg vizsgálatakor detektálásra került egy E-méretcsoportba tartozó akrocentrikus számfeletti 15-ös marker kromoszóma. A vizsgált beteg normál 15-ös kromoszómáinak uniparentális diszómiaja a felhasznált STR markerek alkalmazásával kizárásra került.

A metafázisos FISH vizsgálat alapján az 1. beteg kariotípusa 47,XY,+psu idic(15)(pter→q14::q14→pter)-ként határozható meg. Az aCGH vizsgálat alapján az 1. beteg a 15q11.2q13.3 (9,68 Mb, chr15:22,765,628-32,445,252) kromoszómális régiót tekintve 4 kópiát hordoz. Ez alapján a psu idic(15) két 9,68Mb-os 15q11.2q13.3 szegmenetet tartalmaz.

### **2. beteg**

A 2. beteg G-sávós kromoszóma vizsgálata során detektálásra került egy addicionális biszattellit 15-ös kromoszóma. A 2. beteg normál 15-ös kromoszómáinak uniparentális diszómiaja a felhasznált STR markerek alkalmazásával szintén kizárásra került.

A metafázisos FISH vizsgálat alapján a 2. beteg kariotípusa 47,XX,+idic(15)(pter→q14::q14→pter)-ként határozható meg. Az aCGH vizsgálat alapján a 2. beteg a 15q11.2q13.2 (8,42 Mb, chr15: 22,765,628-31,183,907) kromoszómális régiót, illetve a 15q13.3 (1,6 Mb, chr15: 31,261,835-32,861,626) kromoszómális régiót tekintve 4 kópiát hordoz. Ez alapján a +idic(15) két 8,42 Mb méretű 15q11.2q13.2 szegmenetet, valamint két 1,6 Mb méretű 15q13.3 szegmenetet tartalmaz.

### **3. beteg**

A vizsgált beteg G-sávós kariotípus analízise egy 15-ös gyűrűkromoszómát és egy addicionális 15-ös marker kromoszómát tartalmazó kóros női kariotípust detektált. A 3. beteg normál 15-ös kromoszómáinak uniparentális diszómiaja a felhasznált STR markerek alkalmazásával kizárásra került.

A limfociták részletes analízise a 47,XX,r(15),+m[76]/46,XX,r(15)[18]/47,XX,r(15)x2,+m[4]/48,XX,r(15),r(15),+m[2], míg a fibroblaszt sejtkultúrák részletes analízise a 47,XX,r(15),+m[51]/47,XX,r(15)x2,+m[1] kariotípus felállítását eredményezte. A vizsgálat során a 47,XX,r(15),+m kariotípust mutató

sejtek bizonyultak dominánsnak, azonban a másodlagos gyűrű képződés eredményeként detektálhatók voltak a két 15-ös gyűrűkromoszómát és a 15-ös marker kromoszómát tartalmazó, valamint a 15-ös marker kromoszómát nem, azonban a 15-ös gyűrűkromoszómát tartalmazó sejtek is. Az aCGH vizsgálat eredményei alapján az addicionális marker kromoszóma a normál 15-ös kromoszóma egy 22,765,628-tól 25,383,882-ig terjedő, 2,6 Mb méretű régióját tartalmazza, míg a 15-ös gyűrűkromoszóma a gyűrűképződés következtében kialakuló, a 101,373,740 pozíciótól 102,383,473 pozícióig terjedő, 1 Mb méretű régió delécióját hordozza.

#### **4. beteg**

4. betegünk G-sávós kromoszóma vizsgálata 46,XX női kariotípust detektált.

A 4. beteg metafázisos FISH vizsgálata a 9q34.3 terminális régió delécióját mutatta ki. Az aCGH vizsgálat alapján a 4. beteg a 9q34.3 (2,188 Mb, 138,831,145–141,018,984) kromoszómális régiót tekintve 1 kópiát hordoz.

#### **5. beteg**

5. betegünk G-sávós kromoszóma analízise 46,XY férfi kariotípust eredményezett.

Az 5. beteg metafázisos FISH vizsgálata a 9q34.3 terminális régió delécióját mutatta ki. Az aCGH vizsgálat alapján az 5. beteg a 9q34.3 (1,211 Mb, 139,641,471–140,852,911) kromoszómális régiót tekintve 1 kópiát hordoz.

## ▪ Eredmények megbeszélése és következtetések

### 1. és 2. beteg

A szakirodalomban ismertetett, aCGH módszerrel vizsgált és 15q duplikációs szindrómában szenvedő esetek, valamint 1. betegünk összehasonlítása során betegünkben a normális születési súlyt követően egy kifejezett posztnatális növekedési visszamaradottságot észleltünk. Az érintett gének tanulmányozása alapján esetünkben megerősítést nyert, az a megállapítás, miszerint nem csak a *CHRNA7* gén kópiaszám csökkenése, hanem annak növekedési is állhat a posztnatális növekedési visszamaradottság hátterében. A *CHRNA7* érintettsége mellett, betegünkben az *NDN*, *MAGEL2*, *NIPA1* és *NIPA2* gének kópiaszám emelkedése is kapcsolatba hozható a fent leírt fenotípusos kép, valamint az epilepszia kialakulásával.

Az érintett régió *KLF13* génjének kópiaszám változása irodalmi adatok alapján összefüggésbe hozható a szívomorfológiai változások kialakulásával. 1. betegünk vizsgálata során a beteg bigemin extraszisztolóját észleltük, ami nem morfológiai rendellenesség. Ez alapján nem tudjuk megerősíteni azon irodalmi adatokat, miszerint a *KLF13* gén kópiaszám emelkedése minden esetben szerepet játszik a szívomorfológiai változások kialakításában.

1. és 2. betegünk vizsgálata során a GABA receptorok egy-egy alegységét kódoló *GABRB3*, *GABRA5* és *GABRG3* gének kópiaszám növekedését mutattuk ki, mely emelkedett GABA receptor szint kialakulásához vezethet. Az epilepszia terápiája során alkalmazott vigabatrin és valproát a gamma aminobutirát transzamináz gátlásán keresztül megnöveli a GABA fehérjék szintjét, így a kópiaszám növekedés következtében megnövekedett GABA receptor szint és az antiepileptikumok alkalmazása következtében megnövekedett GABA szint együttes jelenléte magyarázhatja a rohamok gyakoriságának csökkenését az alkalmazott antiepileptikumok hatására

A 22,765,628-31,183,907 és 31,261,835-32,861,626 genomi régiókba eső gének átfedése az 1. betegben detektált duplikáció által érintett génekkel, illetve a két beteg tünetei nagy részének azonossága alapján a 2. beteg esetén megfigyeltek az 1. beteg esetén leírt megfigyelések nagy részével megegyeznek. 2. betegünk fenotípus vizsgálata során az érintett *CHRNA7*, *OTUD7A*, illetve *NDN2*, *MAGEL2*, *MKRN3*, *NIPA1* és *NIPA2* gének kópiaszám növekedése jelentős mértékben hozzájárulhat a betegben detektált epilepsziás tünetek, valamint a neuropszichológiai tünetek kialakításához

1. betegünkhöz hasonlóan a 2. betegünknel sem észleltünk szív malformációt. Ennek alapján szintén megállapíthatjuk, hogy a *KLF13* gén kópiaszám növekedése nem feltétlenül vezet szív malformációk kialakulásához.

### 3. beteg

3. Betegünk klinikai adatait és molekuláris diagnosztikai találatait a szakirodalomban ismertetett adatokkal összevetve azt feltételezhetjük, hogy a PWSCR génjeinek kópiaszám növekedése állhat a faciális dysmorphia és a megkésett mentális fejlődés hátterében.

Irodalmi adatok alapján a 15q11.2 régió BP1 és BP2 töréspontjai közé eső *TUBGCP5*, *CYFIP1*, *NIPA2* és *NIPA1* fehérjéket kódoló *TUBGCP5*, *CYFIP1*, *NIPA2* és *NIPA1* gének kópiaszám csökkenése feltételezhetően szerepet játszik a motoros és beszédfejlődés késése mellett epilepsziás tünetek kialakításában is. Ennek alapján feltételezhetjük, hogy esetünkben a *TUBGCP5*, *CYFIP1*, *NIPA2* és *NIPA1* gének kópiaszám emelkedése is szerepet játszhat a motoros és beszédkészség fejlődés, valamint az epilepszia kialakulásában.

3. betegünk esetén a gyűrűkromoszómán a *SELS*, *SNRPA1* és *PCSK6* géneket érintette a deléció, így a betegünknel észlelt CHD és az érintett gének alapján megerősíthetjük az Alenne és Flaquer által korábban leírt eredményeket, miszerint e gének kópiaszám csökkenése összefüggésbe hozható a kamrai vagy pitvari szeptum defektus (ASD/VSD) kialakulásával.

### 4. és 5. beteg

A molekuláris diagnosztikai módszerekkel kapott eredmények, valamint a vizsgált betegek tünetei alátámasztották a Kleefstra szindróma diagnózisát.

A tudomány jelenlegi állása szerint a Kleefstra szindróma genetikai hátterében az *EHMT1* gén deléciója vagy funkcióvesztéses mutációja áll.

4. betegünk aCGH vizsgálata a 9q34.3 (2,188 Mb, 138,831,145–141,018,984) kromoszómális régió deléciójának detektálását eredményezte. Az érintett 2,188 Mb-os genomi régió 78 gént tartalmaz, köztük a Kleefstra szindróma kialakításában szerepet játszó *EHMT1* gént. Tünettanát tekintve a beteg fenotípusa teljes mértékben megfelel a Kleefstra szindrómában szenvedő betegek fenotípusos leírásának.

5. betegünk fenotípusos jegyeit összehasonlítva az irodalomban leírt Kleefstra szindrómás betegekkel, valamint az általunk diagnosztizált 4. beteggel, egy erre a szindrómára nem jellemző antiepileptikum (AED) rezisztenciát észleltünk. 5. betegünkön elvégzett aCGH

vizsgálat alapján az 5., AED rezisztenciát mutató betegünk deletált régiója (1,211 Mb, 139,641,471–140,852,911) beleesik a megfelelő AED választ adó 4. betegünk deletált kromoszómális régiójába (2,188 Mb, 138,831,145–141,018,984). A két beteg deletált régiójába eső gének számának különbsége 21 melyek ezen eredmények alapján feltételezhetően nem játszanak szerepet az 5. beteg esetén tapasztalt AED rezisztencia kialakulásában.

A fenti eredmények alapján a módosult AED válasz kialakulásának hátterében feltételezhetően nem a deléción által érintett genomiális régió kópiaszám csökkenése áll. Más genomi régiók kópiaszám változásai, valamint DNS szekvenciában bekövetkező változások szerepet játszhatnak a Kleefstra szindrómára nem jellemző AED rezisztencia kialakulásában.

## ▪ **Összefoglalás**

- Vizsgálataink során epilepsziával és minor anomáliákkal rendelkező betegekben sikerült kimutatnunk aCGH alkalmazásával a szakirodalomban leírt 15q11.2 és 15q13.3 genomi régiók rekurrens duplikációját, a 15q26.3 régiót érintő nem rekurrens deléció, valamint a Kleefstra szindróma kialakításáért felelős 9q34 genomi régiót érintő deléció.
- Betegeink genomiális eltéréseit és fenotípusos jegyeiket összehasonlítva a szakirodalomban ismertetett betegekkel, meghatároztuk az érintett régiókban található géneket, melyek a klinikai kép kialakításában szerepet játszhatnak.
- A 15q11.2q13.3 régiót érintő kópiaszám változások és az epilepsziás tünetek közti összefüggés tanulmányozása során arra a következtetésre jutottunk, hogy az érintett genomi régióba lokalizálódó *CHRNA7*, *OTUD7A*, *NDN*, *MAGEL2*, *MKRN3*, *TUBGCP5*, *CYFIP1*, valamint *NIPAI* és *NIPAI2* gének kópiaszám többlete jelentős mértékben hozzájárul a posztnatális fejlődési visszamaradottság mellett az epilepsziás rohamok kialakításához is.
- A 15q11.2q13.3 régiót érintő kópiaszám változások és egyéb klinikai tünetek közti összefüggés vizsgálata során arra a következtetésre jutottunk, hogy a 15q13.3 régióba eső *KLF13* gén kópiaszám többlete a szakirodalomban Derwinska által leírtakkal ellentétben nem minden esetben jár szívfejlődési rendellenesség kialakulásával.
- A betegeinkben detektált 15q11.2q13.3 régiót érintő kópiaszám változások tanulmányozása alapján összefüggést feltételezünk a *GABRB3*, *GABRA5* és *GABRG3* gamma aminobutirát receptor alegységeket kódoló gének kópiaszám növekedése, valamint a GABA transzamináz aktivitásának csökkentését, így a GABA szintjének emelését eredményező vigabatrin és valproát pozitív antiepileptikus hatása között.
- A 15-ös gyűrűkromoszómán detektált 15q26.3 terminális deléció és a megfigyelt klinikai tünetek, valamint a szakirodalomban leírt adatok összehasonlítása során megerősítettük a *SELS*, *SNRPA1* és *PCSK6* gének kópiaszám vesztésének és a kialakított szívfejlődési rendellenességeknek ez idáig feltételezett összefüggését.
- A 15-ös gyűrűkromoszóma 15q26.3 régiójának kópiaszám vesztése és a vizsgált 3. beteg dystrophiája közti összefüggés vizsgálata nem támasztotta alá azt a szakirodalmi megállapítást, miszerint az *IGF1R* gént hordozó terminális delécióval rendelkező betegek esetén minden esetben az *IGF1R* gén kópiaszám vesztése áll az alacsony testmagasság



hátterében. Feltételezéseink szerint már a 15-ös gyűrűkromoszóma jelenléte önmagában is hozzájárulhat a tünetek megjelenéséhez, illetve az *IGF1R* géntől disztálisan elhelyezkedő genomi régió haploinsufficienciája is meghatározó lehet a növekedési elmaradás kialakításában.

- A Kleeftstra szindróma kialakításában szerepet játszó 9q34 genomi régió kópiaszám vesztese mind az általunk vizsgált 4., mind az 5. betegben a szindrómára specifikus tünetek kialakulását eredményezte, azonban az 5. beteg klinikai vizsgálata során AED rezisztenciát figyeltünk meg. Eredményeink alapján a módosult AED válasz kialakulásának hátterében feltételezhetően nem a deléción által érintett genomiális régió kópiaszám csökkenése áll. Más genomi régiók kópiaszám változásai, valamint DNS szekvenciában bekövetkező változások szerepet játszhatnak a Kleeftstra szindrómára nem jellemző AED rezisztencia kialakulásában.
- Az epilepsziával és minor malformációkkal rendelkező betegek esetén bizonyítottuk az aCGH alkalmazásának fontosságát a kevésbé specifikus tünettan genetikai hátterének megállapítása érdekében.

## ▪ **Közlemények jegyzéke**

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

**1. Partial tetrasomy of the proximal long arm of chromosome 15 in two patients: the significance of the gene dosage in terms of phenotype**

Szabó A, Czakó M, Hadzsiev K, Duga B, Komlósi K, Melegh B

*MOLECULAR CYTOGENETICS* 2015 June, **8**:41 doi:10.1186/s13039-015-0137-4

Impakt Faktor: 2,14

**2. Kleeftstra syndrome in Hungarian patients: additional symptoms besides the classic phenotype**

Hadzsiev K, Komlósi K, Czakó M, Duga B, Szalai R, Szabó A, Pöstyéni E, Szabó T, Kosztolányi G, Melegh B

*MOLECULAR CYTOGENETICS* 2016 Feb, **9**:22 doi: 10.1186/s13039-016-0231-2

Impakt Faktor: 2,14

Egyéb közlemények

**1. Marked differences of haplotype tagging SNP distribution, linkage, and haplotype profile of IL23 receptor gene in Roma and Hungarian population samples**

Magyari L, Várszegi D, Sarlós P, Járomi L, Melegh B I, Duga B, Kiszfali P, Kövesdi E, Mátyás P, Szabó A, Szalai R, Melegh B

*CYTOKINE* 65:(2) pp. 148-152. (2014)

Impakt Faktor: 2,664

**2. Genetic update on inflammatory factors in ulcerative colitis: Review of the current literature**

Sarlós P, Kövesdi E, Magyari L, Bánfai Zs, Szabó A, Jávornázy A, Melegh B

*WORLD JOURNAL OF GASTROINTESTINAL PATHOPHYSIOLOGY* 5:(3) pp. 304-321. (2014)

Impakt Faktor: 0

**3. Genetic polymorphisms in promoter and intronic regions of CYP1A2 gene in Roma and Hungarian population samples**

Szalai R, Magyar L, Mátyás P, Duga B, Bánfai Z, Szabó A, Kövesdi E, Melegh B

*ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND PHARMACOLOGY* 38:(3) pp. 814-820.  
(2014)

Impakt Faktor: 2,084

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: **4,28**

Egyéb közlemények összesített impakt faktora: **4,748**

Összesített impakt faktor: **9,028**

## ▪ Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom elsősorban témavezetőmnek *dr. Melegh Béla* professor Úrnak, aki által a humán molekuláris genetika és diagnosztika számos területére betekintést nyertem, valamint csatlakozhattam a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Doktori Iskolájában, az Interdiszciplináris Orvostudományok keretén belül zajló „Humán molekuláris genetika” PhD képzéséhez. Szakmai tevékenységemet mindvégig figyelemmel kísérte, kutató munkámat irányította és segítette.

Hálámat szeretném kifejezni *dr. Czako Mártának*, az aCGH vizsgálatok rejtelmeibe, izgalmaiba és szépségeibe való bevezetéséért, valamint baráti támogatásáért a laborban töltött éveim alatt. Türelmével, gyakorlati tapasztalataival és szakmai útmutatásával nagyban elősegítette vizsgálataim sikeres kivitelezését és PhD disszertációm elkészítését.

Köszönettel és hálával tartozom *dr. Hadzsiev Kingának*, *dr. Lőcsei-Fekete Anettnek* és *dr. Komlósi Katalinnak*, akik kiváló klinikai szakértelmükkel és tapasztalatukkal elengedhetetlen segítséget nyújtottak a vizsgálandó beteganyag kiválasztásában, valamint a klinikai adatok szakszerű interpretálásában.

Külön köszönetet szeretnék mondani az Orvosi Genetikai Intézet jelenlegi és volt dolgozóinak és PhD hallgatóinak, így *dr. Berenténé dr. Bene Juditnak*, *dr. Kövesdi Erzsébetnek*, *Duga Balázsnak*, *Bánfai Zsoltnak*, *Szalai Renátának*, *Sümegei Katalinnak*, *Mátyás Petrának*, *Pöstyéni Etelkának* és *Szabó Titanillának*, akik szakmai tanácsaikkal és baráti támogatásukkal elősegítették vizsgálataim kivitelezését.

Hálával tartozom az Orvosi Genetikai Intézet minden munkatársának, akik tanulmányaim alatt hozzáértő, lelkiismeretes munkájukkal és szakmai tapasztalatukkal támogatták munkámat.

Végül, de nem utolsósorban hálás köszönettel tartozom családomnak, akik végtelen és megértő türelmükkel, biztatásukkal és támogatásukkal lehetővé tették e munka elkészültét.