

DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**A 4-ES KROMOSZÓMÁN TALÁLT REKURRENS
ÉS NEM-REKURRENS KÓPIASZÁM VARIÁCIÓK
ÖSSZEHASONLÍTÁSA**

DUGA BALÁZS



TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. MELEGH BÉLA

PROGRAMVEZETŐ: PROF. DR. MELEGH BÉLA

DOKTORI ISKOLA VEZETŐJE: PROF. DR. SÜMEGI BALÁZS

PÉCS, 2015

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR, ORVOSI GENETIKAI INTÉZET

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	2
1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS.....	7
2.1. Humán Genom Projekt (HGP)	8
2.1.1. Humán Genom Projekt	8
2.1.2. A Humán Genom Projekt technikái.....	8
2.1.3. A Humán Genom Projekt eredményeiként létrejött adatbázisok.....	12
2.2. Genomanalizáló módszerek.....	14
2.2.1. Kariotipizálás Giemsa festéssel és Giemsa sávozás	14
2.2.2. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)	15
2.2.3. Comparative Genome Hybridization (CGH).....	15
2.3. Array Comparative Genome Hybridization (aCGH).....	16
2.4. Genomiális betegségek	17
2.4.1. Tandem ismétlődő gének	18
2.4.2. Géntől független repetitív szakaszok	18
2.4.3. Inverz ismétlődések	19
2.5. CNV-k (Kópiaszám eltérések).....	20
2.5.1. CNV-k típusai	21
2.5.2. CNV-k kialakulásának mechanizmusai	22
2.6. Az array CGH vizsgálat elvégzésének feltételei, a célcsoport kiválasztása.....	26
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	27
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	28
4.1. Vizsgálati anyag	28
4.2. DNS izolálás	28
4.3. G-sávok kromoszómafestés	31
4.4. Metafázis FISH.....	32
4.5. Array CGH	35

5. BETEGEK.....	41
5.1. Első eset.....	41
5.2. Második eset.....	42
6. EREDMÉNYEK	44
6.1. Első eset.....	44
6.2. Második eset.....	46
7. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE.....	48
7.1. Első eset.....	48
7.1.1. A detektált eltérés által érintett gének feltételezhető szerepe az első beteg fenotípusának kialakulásában	48
7.1.2. Az első beteg összehasonlítása a szakirodalomban közölt esetekkel	50
7.2. Második eset.....	53
7.2.1. A detektált eltérés által érintett gének feltételezhető szerepe a második beteg fenotípusának kialakulásában	53
7.2.2. A második beteg összehasonlítása a szakirodalomban közölt esetekkel ..	55
7.3. Nem rekurrens és rekurrens CNV-k összehasonlítása.....	57
7.4. Array CGH vizsgálatának prediktálása	61
8. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA.....	62
9. IRODALOMJEGYZÉK	65
10.1. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:	69
10.2. További közlemények:	69
10.2.1. Folyóirat cikkek:	69
10.2.2. Könyv fejezetek:	73
10.3. Idézhető absztraktok:	74
10. MELLÉKLETEK.....	78
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	91

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

.TIFF	–	<i>Tag image file format</i> / Jelölt kép formátum
+ISD	–	<i>Intrinsic sphincter deficiency</i> / Belső záróizom zavar
aCGH	–	<i>array Comparative Genome Hybridization</i> / array Komparatív Genom Hibridizáció
Alu	–	<i>Arthrobacter luteus repetitive element</i> / Arthrobacter luteusban detektált ismétlődő DNS kópiák
AV	–	<i>Atrioventricular</i> / Atrioventrikuláris
BAC	–	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i> / Bakteriális mesterséges kromoszóma
bp	–	<i>Base pair</i> / Bázis pár
BSA	–	<i>Bovine serum albumin</i> / Marha szérum albumin
CDG	–	<i>Congenital disorders of glycosylation</i> / Veleszületett glikozilációs zavar
CFTR	–	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i> / Cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor
CGH	–	<i>Comparative Genome Hybridization</i> / Komparatív Genom Hibridizáció
cGMP	–	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i> / Ciklikus guanozin monofoszfát
CMT	–	<i>Charcot-Marie-Tooth disease</i> / Charcot-Marie-Tooth betegség
CNPs	–	<i>Copy Number Polymorphisms</i> / Kópiaszám polimorfizmusok
CNVs	–	<i>Copy Number Variations</i> / Kópiaszám variációk
COPD	–	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i> / Krónikus obstruktív légúti betegség
CT	–	<i>Computer Tomography</i> / Komputertomográfia
Cy3	–	<i>Cyanine 3</i> / Cyanine 3
Cy5	–	<i>Cyanine 5</i> / Cyanine 5
DGV	–	<i>The Database of Genomic Variants</i> / Genomikai variánsok adatbázisa
DMSA	–	<i>Dimercaptosuccinic acid</i> / Dimerkaptoszukcinát
DNA/DNS	–	<i>Deoxyribonucleic acid</i> / Deoxiribonukleinsav
dNTP	–	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i> / Deoxynukleotid trifoszfát
DoE	–	<i>Department of Energy</i> / Energiaügyi Minisztérium
DSB	–	<i>Double Strand Break</i> / Kettős szálú törés
DSGM	–	<i>Dévény special gymnastics method</i> / Dévény speciális gimnasztika módszer

dUTP	–	<i>Deoxyuridine triphosphate</i>
ECARUCA	–	<i>European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations</i> / Európai citogenetikusok egyesületének nyilvántartása a kiegyensúlyozatlan kromoszóma rendellenességekről
EEG	–	<i>Electroencephalography</i> / Elektroenkefalográfia
EGFR	–	<i>Eukaryotic growth factor receptor</i> / Eukarióta növekedési faktor receptor
FISH	–	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> / Fluoreszcens In Situ Hibridizáció
FoSTeS	–	<i>Fork Stalling and Template Switching</i> / Replikációs Villa késleltetése és Templát Váltás
gDNA/gDNS	–	<i>Genomic DNA</i> / genomi DNS
GRCh	–	<i>Genome Reference Consortium human genome</i> / Genom Referencia Konzorcium humán genom referencia szekvenciája
GTG sávozás		<i>Giemsa banding</i> / Giemsa sávozás
hESC	–	<i>Human embryonic stem cell</i> / Humán embrióonális őssejt
HGP	–	<i>Human Genome Project</i> / Humán Genom Projekt
Hh	–	<i>Hedgehog signaling pathway</i> / Hedgehog jelátviteli útvonál
HNPP		<i>Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsy</i> / Herediter Nyomásérzékeny Neuropátia
HSPGs	–	<i>Heparan sulfate proteoglycans</i> / Heparán-szulfát proteoglikánok
IQ	–	<i>Intelligence quotient</i> / Intelligenciahányados
kb	–	<i>Kilobase</i> / Kilobázis pár
LCR	–	<i>Low Copy Repeat</i> / Alacsony kópiaszámú szekvencia ismétlődés
LH-RH	–	<i>Luteinizing hormone-releasing hormone</i> / Luteinizáló hormont felszabadító hormon
LINE	–	<i>Long Interspersed Element</i> / Hosszú szétszort ismétlődések
Mb	–	<i>Megabase</i> / Megabázis pár
MRI	–	<i>Magnetic Resonance Imaging</i> / Mágneses magrezonancia képalkotás
NAHR	–	<i>Non Allelic Homologous Recombination</i> / Nem Allélikus Homológ Rekombináció
NCBI	–	<i>National Center for Biotechnology Information</i> / Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ
NHEJ	–	<i>Non Homologous End Joining</i> / Nem Homológ Végek Összekapcsolása
NHGRI	–	<i>National Human Genome Research Institute</i> / Nemzeti Humán Genom

Kutatási Intézet

NIH	–	<i>National Institution of Health</i> / Nemzeti Egészségügyi Intézet
PBS	–	<i>Phosphate buffered saline</i> / Foszfát puffer
PCR	–	<i>Poymerase chain reaction</i> / Polimeráz Láncreakció
PolI	–	<i>Polymerase I</i> / Polimeráz I
RAS	–	<i>Rat sarcoma protein</i> / Patkány szarkóma fehérje
RNA/RNS	–	<i>Ribonucleic acid</i> / Ribonukleinsav
SSC	–	<i>Saline Sodium Citrate Buffer</i> / Nátrium-citrát puffer
YAC	–	<i>Yeast Artificial Chromosome</i> / Élesztő eredetű mesterséges kromoszóma

2. BEVEZETÉS

A XIX. század második felében Charles Darwin evolúciós elméletének és Gregor Mendel genetikai felfedezéseinek hatására jelentősen átalakult a tudomány akkori nézete. Bár munkásságukat az utókor csak jóval utánuk fogadta el/értette meg, hatásuk óriási volt. Mendel munkássága során olyan, azóta is használt alaptörvényeket határozott meg, melyek gyökeresen megváltoztatták a biológiai tudományok jövőjét. Gregor Mendel az 1865-ben megjelent „Növényhibridizációs kísérletek” című munkájával megteremtette az addig nem létező tudományterületet, a genetikát.

A genetika kibontakozására azonban a XX. századig várni kellett. Hugo de Vries és munkatársai fedezték fel Mendel munkásságának zsenialitását és nevezték el megfigyeléseit. Ettől a ponttól kezdve a genetika, mint újonnan kialakuló diszciplína ugrásszerű fejlődésnek indult. 1902-ben Sutton és Boveri párhuzamot vontak Mendel borsóinak gamétái és a kromoszómák meióziskor tanúsított viselkedéseivel. Thomas Hunt Morgan bebizonyította, hogy a gének a kromoszómákon helyezkednek el [1], míg tanítványa, Sturtevant a gének linearitását írta le, és a rekombinánsok aránya alapján kapcsoltsági térképet készített [2]. 1941-ben Tatum és Beadle kimutatták, hogy a gének fehérjéket kódolnak [3], majd 1944-ben Avery és munkatársai felfedezték a DNS-t [4], mint „genetikai anyagot”. 1950-ben Erwin Chargaff igazolta, hogy a négy nukleotid nem egyenlő arányban fordul elő, de szabályszerűséget követ [5]. 1953-ban Watson és Crick közlésezik a Nature folyóiratban a DNS szerkezetét [6]. 1956-ban Tjio és Levan megállapítják, hogy az embernek 46 kromoszómája van [7], majd 1958-ban a Meselson-Stahl kísérlet kimondja, hogy a DNS szemikonzervatív replikáción megy keresztül [8]. 1961-ben megállapítják, hogy a genetikai kód tripletékbe rendeződik. 1977-ben Sanger, Gilbert és Maxam DNS-t szekvenáltak, és Sanger befejezi a ϕ -x174 bakteriofág teljes genomjának szekvenálását, ezzel elindítva egy új korszakot a genetikán belül, a genomikát [9, 10]. 1983-ban Kary Mullis felfedezi a polimeráz láncreakciót [11]. 1989-ben Francis Collins meghatározza az első humán gén, a CFTR szekvenciáját [12].

1990-ben megkezdődik minden idők legnagyobb nemzetközi biológiai tudományos kooperációja, a Humán Genom Projekt. Célja a humán haploid genom szekvenciájának meghatározása és a gének feltérképezése volt.

2.1. Humán Genom Projekt (HGP)

2.1.1. Humán Genom Projekt

A projekt hivatalosan 1990-ben indult az NIH (National Institute of Health) és a DoE (Department of Energy) finanszírozásával. A projekt szinte azon nyomban nemzetközivé nőtte ki magát, mely összesen 20 intézet kollaborációjával megalakította a Humán Genom Konzorciumot (International Human Genome Sequencing Consortium). A programhoz angol, francia, német, japán és kínai intézetek csatlakoztak. 1997-től a National Center for Human Genome Research átalakul a National Human Genome Research Institute-tá (NHGRI). A korábban az NIH-nél dolgozó J. Craig Venter azonban elégedetlen a munkamenettel. Véleménye szerint a projektet sokkal gyorsabban és főleg sokkal olcsóbban lehetne és kellene kivitelezni. Ennek érdekében, miután elhagyta az NIH-t, megalapította a Celera Corporationt 1998-ban, melynek célja ugyancsak a humán genom szekvenciájának meghatározása volt. Így kialakult egy kormány által finanszírozott állami és egy magán szektor finanszírozta genom projekt. Ez a versengés valószínűleg nagymértékben lecsökkentette a kezdetben 15 évre tervezett projekt időtartamát.

Az első már teljesnek mondható humán genom szekvenciát, 2003-ban a Watson és Crick által publikált DNS-szerkezetét közlő Nature cikk 50. évfordulóján jelentették be és publikálták [13-15]. A projekt a kezdetben tervezett 15 évnél 2 évvel korábban ért véget, 2003-ban.

2.1.2. A Humán Genom Projekt technikái

Az NHGRI és a Celera Corporation a humán genom szekvenálását két különböző technika segítségével kivitelezték.

2.1.2.1. NHGRI - térkép-alapú genomszekvenálás

A NHGRI térképkészítéssel kezdte meg a munkálatokat. A szekvenálást megelőzően a humán genomot genetikai és fizikai térképezés segítségével feltérképezték [15].

2.1.2.1.1. Térképezések

A genetikai térképezés során csak a gének viszonylagos helye határozható meg, a pontos génpozíciók nem. A rekombináns utódok aránya alapján megállapíthatóak a különböző fenotípusos jegyekért felelős gének egymáshoz viszonyított helyzete.

A fizikai térképezés során a genom restrikciós hasításából kapott hasítási mintázatból határozható meg az egyes szakaszok helye a genomban. A fizikai térképezés során kapott távolságok tényleges bázispár távolságokat jelentenek.

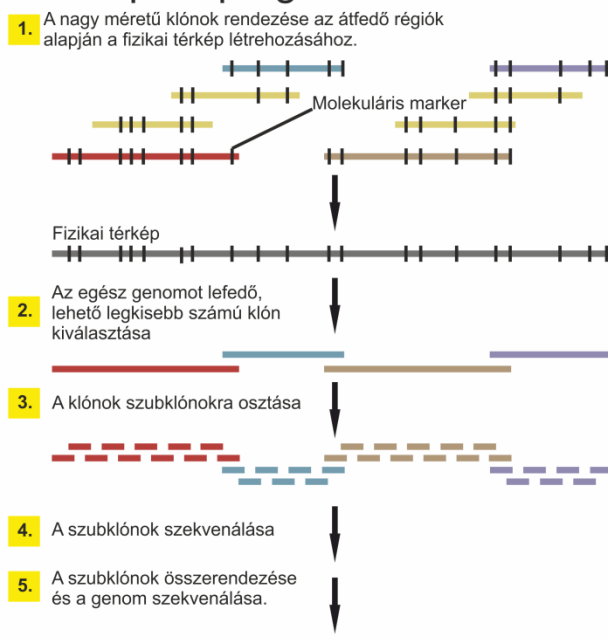
A genetikai térképek felállításához rövid élettartammal rendelkező modellorganizmusokat (pl. *Drosophila melanogaster*) használtak.

Habár a térképek létrehozása hosszadalmas folyamat, a szekvenálás során keletkezett szekvenciák elhelyezését a teljes genomban nagymértékben megkönnyíti (1. ábra).

2.1.2.1.2. Szekvenálás

A teljes genom fragmentálása során keletkező, hozzávetőlegesen 200 kb hosszúságú, DNS fragmenteket BAC (Bacterial Artificial Chromosome) illetve YAC (Yeast Artificial Chromosome) vektorokba inszertálják. A vektorokban elhelyezkedő DNS fragmentek szekvenciái, a véletlenszerű hasítások miatt, részben átfedőek lehetnek egymással. Az átfedő részeket tartalmazó vektorok szelektálásával meghatározhatóak azok a fragmentek, melyekből rekonstruálható a teljes genom. A szelektált klónokat tovább hasítva és a keletkező fragmenteket plazmid vektorokba klónozva, a fragmentek shotgun módszerrel szekvenálhatóak. A kapott szekvenciák az átfedő régióknak köszönhetően illeszthetőek. A szekvenciák a genetikai és fizikai térkép segítségével állíthatóak össze egy teljes genom szekvenciává (1. ábra).

Térkép alapú genom szekvenálás



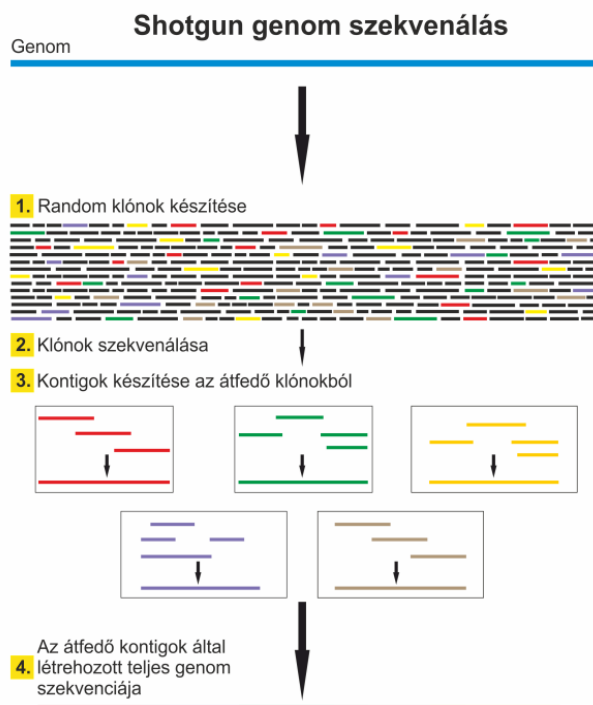
1. ábra: Térkép alapú genom szekvenálás [16]

2.1.2.2. Celera Corporation teljes genom shotgun szekvenálás

A J. Craig Venter által vezetett Celera Corporation a humán genom szekvenálására a korábban már eredményesnek bizonyuló (1995 - *Haemophilus influenzae*) shotgun szekvenálási módszert alkalmazta.

2.1.2.2.1. Teljes genom shotgun szekvenálás (*Whole-genome shotgun sequencing*)

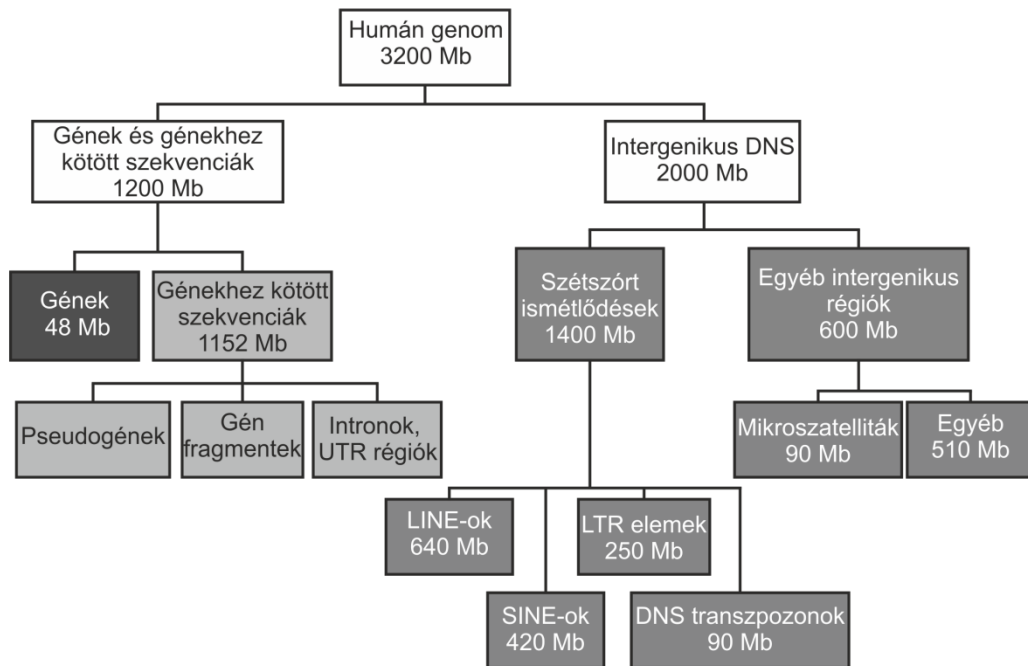
A módszer nem követeli meg a genetikai vagy a fizikai térkép használatát, ezáltal a szekvenálási idő lényegesen lecsökkenthető a fent említett térkép-alapú módszerhez képest. A teljes genom szonikálásával létrehozott rövid DNS fragmenteket, plazmidokba inszertálják, majd a létrehozott klónkönyvtárat szekvenálják (2. ábra). A több millió rövid szekvencia részlet szekvencia kontiggá állítható össze. A szekvencia kontigok illesztéséből meghatározható a teljes genom szekvenciája. A szekvenciák és szekvencia kontigok összeállítását azonban nagyban megkönnyíthetik a genetikai és fizikai térképek[17].



2. ábra: Teljes genom shotgun szekvenálása [16]

A 2000-ben elkészült „draft” szekvenciák azonban még mindkét esetben tartalmaztak hiányosságokat. A hiányosságok kitöltésére mindkét szervezet szekvencia kitöltő módszereket alkalmazott. Ilyen szekvencia kitöltésre szolgáló módszer volt a klónkönyvtár újraolvasása. Ezzel a módszerrel azokat a klónokat keresték ki a klónkönyvtárból, melyek szekvenciája megegyezett a hiányos szakasz előtt és után található szekvenciák végeivel, majd ezeket a klónokat szekvenálták. Ezáltal sikerült ugyan kitölteni sok rést a genom szekvenciában, azonban korántsem az összeset. Ez másik kitöltő technika során a vektorokba klónozott szekvenciákat két irányból szekvenálták. Ezt nevezik paired-end szekvenálásnak.

A humán genom összetétele



3. ábra: A humán genom összetétele [16]

Abban az esetben, amikor egyik szekvencia sem mutatott átfedést a meghatározni kívánt régióval, „primer walking”-ot alkalmaztak. A módszer során az ismeretlen régióval szomszédos ismert szekvencia végére terveztek primert. Az átírás után megismert szakasz végére újfent tervezett primer segítségével megismerhetővé váltak az eddig nem ismert szekvenciariészletek is. A fent említett módszerek segítségével a teljes humán genom szekvenciáját 2003-ra sikerült hiánytalanul megfejteni (3. ábra).

2.1.3. A Humán Genom Projekt eredményeként létrejött adatbázisok

A HGP kezdetekor felmerülő kérdések között már szerepelt a projekt során felhalmozódó adatok tárolásának és hozzáférhetőségének kérdése. A projekt által generált nagymennyiségű adat tárolásának legkézenfekvőbb megoldása a különböző adatbázisok voltak, nem csak nagy tárolókapacitásuk, hanem könnyű kereshetőségük miatt is. Az adatok hozzáférhetőségéről kialakuló viták végeredményeként minden eredményt és adatot publikussá tettek, mely így megnyitotta a lehetőséget a kutatók

számára a szabad felhasználásra. A genomikai adatokat tartalmazó és azokkal foglalkozó adatbázisok megjelenése és elterjedése robbanásszerű volt.

NCBI

A HGP kezdetekor már megalakult az NCBI (National Center for Biotechnology Information), mely biokémiai, molekuláris biológiai és genetikai információkat tárolt. A későbbiekben számos egyéb funkcióval bővült, és online felületet kapott. A projekt befejeztével ugrásszerűen megnőtt a genomi adatokat közlő adatbázisok és könyvtárak száma [18].

HapMap – 2002

A HapMap projekt célja a humán haplotípus térkép felállítása volt, melynek köszönhetően meghatározhatóak azok a genetikai variációk, melyek felelősek lehetnek a betegségek kialakulásáért, környezeti faktorok és a gyógyszerek által kiváltott hatásokért. A projekt keretein belül olyan egy bázist érintő eltéréseket kerestek (SNPs – Single Nucleotide Polymorphisms), melyek szerepet játszhatnak a betegségek kialakulásában. Az eltérések előfordulásából meghatározhatóak a haplotípusok. A beteg és nem beteg csoportok haplotípusainak összehasonlítása során felfedhetők azok a haplotípusok, melyek a betegségért felelősek. A projektben számos populációból származó trio (beteg + a két szülő) mintát elemeztek. Az eredményeket ingyenesen elérhetővé tették mindenki számára [19, 20].

ECARUCA – 2003

2003-ban létrehozott ECARUCA (European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations) egy ingyenes online adatbázis, mely a kutatók számára citogenetikai, molekuláris genetikai és klinikai adatokat tesz elérhetővé a különböző kromoszóma rendellenességekről [21].

DECIPHER – 2004

Nigel Carter (Wellcome Trust Sanger Institute) és Helen Firth (Addenbrook's Hospital, Cambridge) által létrehozott adatbázis, mely segít a molekuláris genetikusoknak, citogenetikusoknak és klinikai genetikusoknak az általuk detektált kópia szám eltérést (CNV – Copy Number Variation) összefüggésbe hozni a klinikai tünetekkel [22].

DGV – 2004

Az új genomanalizáló módszerek megjelenésével már kimutathatóak voltak olyan genomi eltérések, melyek detektálásához a Giemsa sávozás és a FISH felbontóképessége nem elég nagy, azonban 50bp-nál nem kisebbek. Ezeket az

eltéréseket strukturális variánsoknak nevezzük. A 2004-ben alapított DGV célja ezeknek a strukturális variánsoknak a közzététele és tárolása. Az adatbázist egészséges önkéntesek genomi adataival hozták létre [23].

1000 Genomes - 2008

A humán genetikai variációk részletesebb megismerését szolgáló projekt, mely 2008 januárjában indult. Célja, hogy legalább 1000 különböző etnikumokból származó ember mintáit szekvenálják, ezáltal árnyaltabb képet kapjanak a humán genomról és azok eltéréseiről [24].

2.2. Genomanalizáló módszerek

A genomikai eltérések vizsgálata már a XX. század elején megkezdődött. Kezdetben a kutatási célokra használt modell organizmusokkal való kísérletek során fejlődtek ki különféle festési eljárások, melyek megkönnyítették a vizsgálni kívánt metszet/preparátum fénymikroszkópos vizsgálatát. Ilyen festési eljárás volt, az azóta is a citogenetikai laboratóriumokban széles körben elterjedt és használatos Giemsa-festés. A XX. században az érdeklődés egyre inkább a genetikai és genomikai eltérések felé irányult, így a genomanalizáló módszerek fejlődésnek indultak. A 1980-as évek elején kifejlesztették a FISH-t (Fluoreszcens In Situ Hybridization), majd a 1990-es évek elején a CGH-t (Comparative Genome Hybridization). A genomanalizáló technikák folyamatos fejlődése a módszerek felbontóképességének növekedésével járt együtt.

2.2.1. Kariotipizálás Giemsa festéssel és Giemsa sávozás

Gustav Giemsa német kémikus és bakteriológus 1904-ben, továbbfejlesztve a Romanowsky-Nocht féle eozin-metilénkék festést azzal, hogy glicerinnel keverve stabilizálta a festéket, megalkotta a később róla elnevezett Giemsa festési eljárást. A festési eljárást azóta is használják a citogenetikai laborok. Az eljárás alkalmassá teszi a kromoszómákat mikroszkóp alatti megfigyelésre. A kromoszómák csoportokba rendezhetőek méretük és alakjuk szerint, melyet kariogramnak nevezünk. A kariogram elemzése során felfedezhetőek a kromoszómák számbeli rendellenességei, mint a kromoszómavesztés vagy a többletkromoszómák. A GTG (Giemsa banding) sávozás során a preparátumokat SSC oldattal vagy proteázzal kezelik, majd a készítményt

Leishmann's festékekkel festik. Az eredményből már pontosabban megállapítható a kromoszóma részletek hiánya (deléciók), többlete (duplikációk, inszerciók) vagy éppen azok orientációinak megváltozása (inverziók), továbbá a transzlokációk is meghatározhatóak, illetve azok töréspontjának (megabázisos pontossággal) megállapítását is lehetővé teszi a G-sávozás [25].

2.2.2. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

A FISH metodikáját először 1982-ben publikálták [26]. A módszer során fluoreszcens jelölésű próbákat hibridizálunk a kromoszómákhoz. A specifikusan megtervezett FISH próbák csak a velük komplementer régióhoz kötődnek. A jel megléte, hiánya, vagy más lokalizációban történő megjelenése fontos információval bír. Klinikai genetikában az egyik legelterjedtebb módszer az olyan ismert mikrodeléciós szindrómák kimutatásában, mint pl. a Prader-Willi szindróma, Angelman szindróma, 22q11.2 deléció (DiGeorge) szindróma vagy a Cri-du-chat.

2.2.3. Comparative Genome Hybridization (CGH)

Elsőként Kallioniemi és munkatársai [27] alkalmazták a technikát arra, hogy tumor sejtekben tudjanak kimutatni genetikai eltérést. 1993-ban de Manoir és munkatársai már a genomi DNS fragmenteket különböző fluoreszcens festékekkel jelölték, melynek hatására a módszer egy jól felhasználható komparatív technikává vált [28].

A módszer során normál metafázisos kromoszóma preparátum készül. A kontroll mintákból és a vizsgálandó (pl. tumor sejtek) mintákból DNS-t izolálunk. A DNS-eket kétféle fluoreszcens festékekkel jelöljük meg. Jelölés során a DNS-t DNázssal kezeljük, így egyszálú törések keletkeznek azon. A jelölés további lépéseként a mintához és a referenciához adjuk a fluoreszcens festékekkel jelölt nukleotidokat, melyeket a DNS polimeráz I 5'-3' exonukleáz aktivitása révén, az egyszálú törésektől 3' irányba új, fluoreszcens festékekkel jelölt nukleotidokat épít be. A DNS polimeráz I a folyamat végén (nick translation – bevágás elmozdulás) egy új diszkontinuitást hoz létre a DNS szálon, melyet DNS ligáz kezeléssel hoznak helyre [29]. A jelölés a jelölő molekulától függően lehet direkt, vagy indirekt. Direkt jelölésnél közvetlenül a nukleotidokat jelöljük, míg

indirekt jelölésnél fluorofórral jelölt antitestekkel jelölnek. A mintákat nem jelölt Cot-1 DNS-el kezeljük, ami blokkolja a repetitív szakaszokat, melyek a különösen a centromérákban és telomérákban fordulnak elő nagy gyakorisággal. Ha ezek a szakaszok nincsenek blokkolva, képesek hamis eredményt adni a vizsgálat kiértékelésekor. Hibridizáció során a két jelölt DNS-t (minta és referencia) hibridizáltatjuk a normál metafázisos kromoszóma preparátumhoz, majd az elkészült preparátumot fluoreszcens mikroszkóp alatt értékeljük [30].

2.3. Array Comparative Genome Hybridization (aCGH)

Az adatbázisok létrejöttének köszönhetően kialakultak olyan újgenerációs módszerek, melyek lehetővé tették a humán genom gyorsabb, olcsóbb és könnyebb vizsgálatát. A 2000-es évek elején indultak útnak a microarray technológiára épülő módszerek, mint az aCGH, mely a hagyományos CGH és a microarray technológia elegyéből született.

A HGP -nek köszönhetően, minden egyes szekvenciának tudták a pontos elhelyezkedését a genomban, minek köszönhetően nem volt már szükség a kromoszóma preparátumra ahhoz, hogy a hibridizáltatni kívánt jelölt DNS fragmentumok bekötődésének pontos helyét meghatározzák. A hagyományos CGH felbontási képessége nagyjából 5-10 Mb volt, azonban a humán genom adatokat tartalmazó adatbázisoknak köszönhetően és a mikrotechnika robbanásszerű fejlődésének segítségével létrehozható volt egy sokkal nagyobb felbontóképességű genom hibridizációs technika, az array CGH.

A teljes genomot reprezentáló próbákat szintetizálás során hozzák létre, melyeket egy tárgylemez méretű üvegfelületre kötnek ki. A lemez felületére kikötött próbák pozíciója és szekvenciája ismert. Egy próba mérete akár a 60 bp-os hosszúságot is elérheti. A próbák által lefedett genomiális szakaszok közti távolság (felbontás mértéke), függ a lemez felületén vizsgálni kívánt minták számától, a vizsgálatához szükséges felbontás mértékétől, illetve a gén tartalmú régióktól és az intragenikus régióktól. Egy nagy felbontású array lemez esetében a felbontás (milyen közel helyezkednek el a próbák által lefedett genomiális szakaszok egymáshoz viszonyítva) akár a 2 kb méretet is elérheti. A próbákból 2, 4 vagy akár 8 kópia is kiköthető, aminek

köszönhetően több minta elemezhető, azonban az egy lemezen vizsgált minták számának növelésével egyidejűleg az egy mintára eső próbák száma csökken.

A módszer során, akárcsak a hagyományos CGH esetében, a vizsgálni kívánt mintánk mellé szükséges egy nemben megegyező referencia DNS is. Izolálás során perifériás vérből nyert genomi DNS-t restrikciós enzimek segítségével fragmentálják. A minta és referencia DNS fragmenteket különböző fluoreszcens festékekkel jelölték. A minta DNS jelölésére használt fluoreszcens festék Cyanine (Cy5), míg a referencia DNS-ek jelölésére a Cyanine (Cy3) szolgál. Bizonyos gyártók esetében a fordított jelölés is elterjedt. A minta és referencia DNS-eket egyidejűleg viszik fel a lemez felületére és hibridizáltatják a lemezen kikötött próbákhoz. A lemezt egy lézer scanner segítségével olvassák be. A scanner által generált lézer megvilágítja a lemez felületére kikötött próbákhoz hibridizált fluoreszcens festékekkel jelölt fragmenteket. A scanner detektora a lézer hatására felvillanó festékek intenzitását detektálja. A scanner ezt a műveletet a lemez teljes felületén elvégzi, és minden próbapozícióban detektálja a fluoreszcens jeleket. Abban az esetben, ha a két festék intenzitása megegyezik, az adott próbához hibridizált genomi fragmentek dózisa megegyezik. Amint ez az irány eltolódik valamelyik festék jelintenzitásának irányába, úgy delécióról vagy duplikációról beszélhetünk.

Fontos megemlíteni, hogy a technika nem alkalmas minden genomi eltérés detektálására. Technikájából adódóan az array CGH módszer a genomban előforduló kópiaszám eltéréseket, dóziseltéréseket képes detektálni. A módszerrel transzlokációk töréspontjai is meghatározhatóak, míg azok kiegyensúlyozatlanok (kiegyensúlyozott transzlokáció esetében nincs dóziskülönbség a genomban).

2.4. Genomiális betegségek

A 1990-es évek elején, mikor a Humán Genom Projekt kezdetét vette, a kutatók még úgy vélték, hogy a humán genom szekvenciájának variánsai (SNP) állhatnak a legtöbb megbetegedés hátterében. A HGP lezárásával és a hibridizációs technikák rohamos fejlődésével egyetemben ez a nézet is változni látszott. A szekvenálási technikák fejlődésével a humán genom teljes szekvenálása már alig egy hét alatt kivitelezhető, azonban az ezekből az eredményekből nyert adatok sem adnak választ a

betegségek kialakulásának nagy részére. Napjainkban a szemlélet változóban van: a genetikával foglalkozó kutatók figyelme egyre inkább a genomika irányába fókuszál.

A genomi szerkezetben történő változások különböző mechanizmusokon keresztül játszódnak le, melyek alapján különböző típusokba sorolhatóak. Három olyan fő típust különböztetünk meg, melyek DNS átrendeződéssel járnak, köszönhetően a homológ rekombinációnak és a LCR (low copy repeat) szakaszoknak [31-35].

2.4.1. Tandem ismétlődő gének

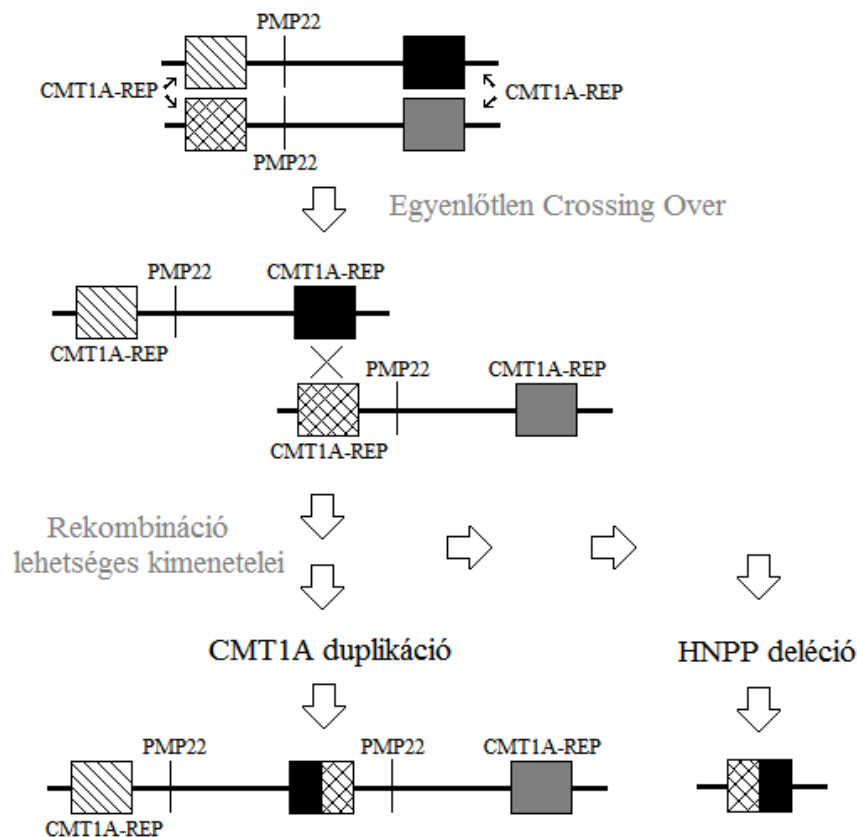
A tandem ismétlődő gének esetében a gének elhelyezkedése egymást követő, azaz tandem formát követ, mely így szubsztrátként viselkedik a homológ rekombináció során. Másik esetben a génnel szomszédos szekvenciák ismétlődnek, és ezek az ismétlődő repetitív szakaszok vesznek részt szubsztrátként a rekombinációban. Az ismétlődő szekvenciák rekombinációja során létre jöhet haploinsufficiencia, amikor az egyik génkópia elveszik, illetve olyan rekombináns hibrid gének is, melyek megváltozott tulajdonsággal bírnak. Az egyik első felismert, ezen a mechanizmuson keresztül kialakuló betegség az α -thalassemia, ami az α -globin gén deléciójának eredménye.

Az α -globin gén klaszterben elhelyezkedő X, Y és Z homológ szakaszokat nem homológ szakaszok választják el egymástól. Ezek a homológ szakaszok az evolúció során duplikálódott szakaszok. A meiózis során bekövetkező kromoszóma eltolódás eredményeként a homológ szakaszok között kialakuló reciprok rekombináció az α -globin gén kópiaszám változásával jár. Akik egy α -globin kópiát tartalmazó 16-os kromoszómát örökölnek, azoknál manifesztálódik a betegség [34].

2.4.2. Géntől független repetitív szakaszok

Ebben az esetben a fenotípusért felelős géntől távolabb, fizikálisan különálló repetitív szakaszok játszanak szerepet, mint a rekombináció szubsztrátjai. A repetitív szakaszok közrefogják a fenotípusért felelős dózis szenzitív gént vagy géneket. A repetitív szakaszok rekombinációja vezet a dózis szenzitív gén egy kópiájának kieséséhez, vagy annak megduplázódásához. Ezen a dózis szenzitivitáson keresztül

alakul ki a Charcot-Marie-Tooth 1A típusa is és a HNPP (Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsy) (4. ábra).

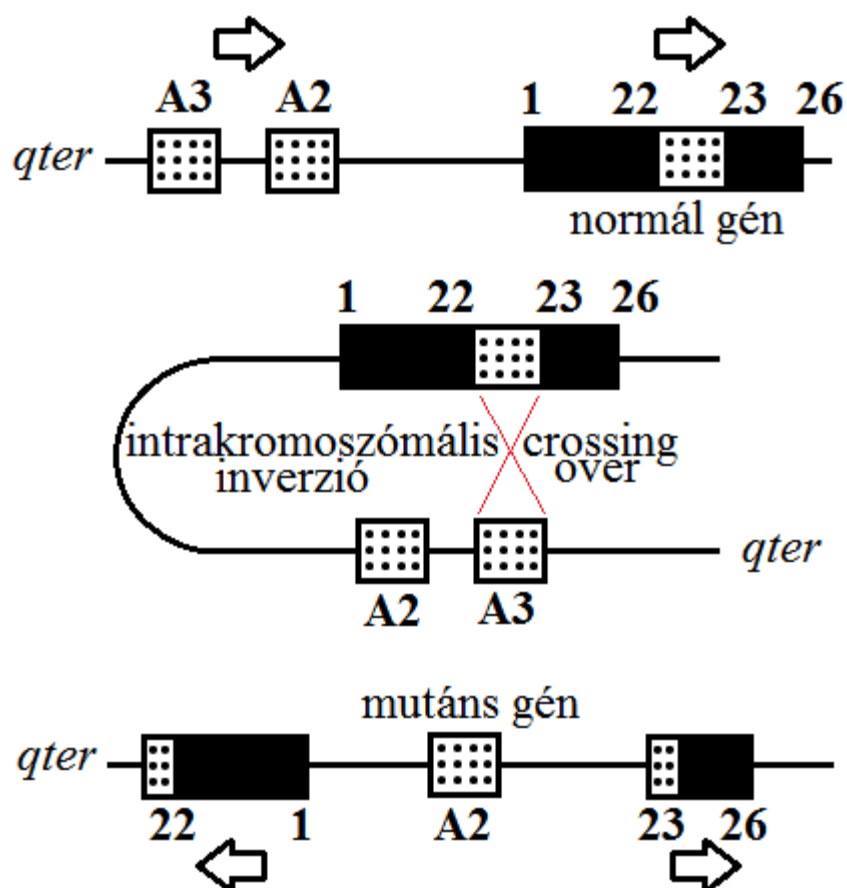


4. ábra: CMT és a HNPP kialakulása [33, 36]

A repetitív szekvenciák, melyek jelen esetben a CMT1A-REP szekvenciák, a PMP22-es gént fogják közre. Amikor az egyenlőtlen crossing over lejátsszódik, végbemehet a PMP22 gén duplikációja és deléciónja is. Duplikáció során a Charcot-Marie-Tooth 1A típusa, deléción esetén a HNPP alakul ki [34].

2.4.3. Inverz ismétlődések

Az inverz ismétlődések olyan ismétlődések, melyek egymás irányultságára fordítottak. A fordított ismétlődések közti rekombináció során, amikor az egyik ismétlődő szakasz a génben található, inverzió jön létre, mely megváltoztatja a gén integritását és funkcionálisan inaktívvá teszi. Az egyik leggyakoribb betegség, mely ezen a mechanizmuson keresztül alakul ki, a Hemophilia A (5. ábra).



5. ábra: VIII-as faktor inverziója [37, 38]

A VIII faktor génjének 22. intronjában található egy intron nélküli gén, a F8A, melynek transzkripció irányultsága az ellenkezője a VIII faktorénak. Az F8A génnek két további kópiája upstream irányban 500 kb távolságra található. Az VIII faktor 22-es intronjában található F8A gén és a 2 további kópiája közti rekombináció során a VIII faktor 1-22 exonja inverzió esik át [34].

2.5. CNV-k (Kópiaszám eltérések)

Az elmúlt évtizedben végzett genomanalízisek során számos olyan régió volt felfedezhető, melyek többszörös kópiaszámban fordulnak elő a genomban. Ezek a régiók a kilobázisos mérettől a megabázisos méretekig terjedhetnek. Ezeknek a szakaszoknak a kópiaszámában bekövetkező változásait egységesen kópiaszám variációknak (copy number variations – CNVs) nevezzük. A CNV-k nagyszámú

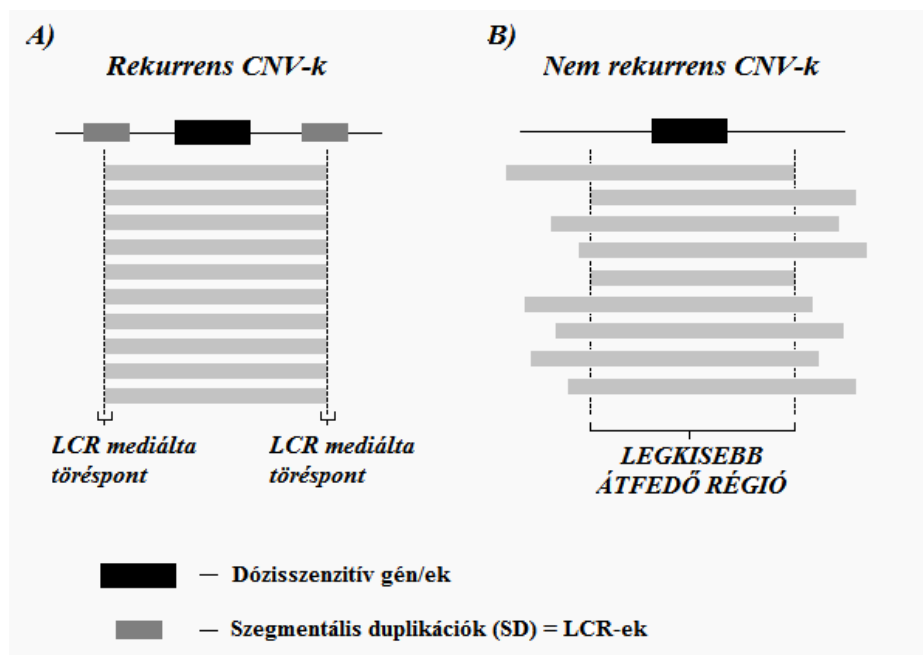
előfordulása a genomban, a populációs genom diverzitás egy fontos mozgatórugója, azonban ezek az eltérések állhatnak sok esetben a genomiális betegségek hátterében is.

2.5.1. CNV-k típusai

Számos humán megbetegedéssel foglalkozó kutatás eredményeinek kapcsán két fajta CNV csoport volt megfigyelhető. Az első csoportba tartoznak azok a CNV-k, melyek frekvenciája a populációkban meghaladja az 1%-ot. Ezek a diploid genomban 0-30 kópiaszámban fordulnak elő. A CNV-k ezen csoportját egységesen CNP-knek vagy kópiaszám polimorfizmusoknak (copy number polymorphisms – CNPs) nevezik. A másik csoport a ritka CNV-k csoportja, ahol a CNV-k mérete nagyobb (több mint 100 kb), azonban előfordulásukat tekintve ritkának mondhatóak a populációban (kevesebb, mint 1%). A diploid genomban 1-3 kópiaszámban fordulnak elő [35, 39].

2.5.1.1. Ritka CNV-k

A ritka CNV-k további két típusra oszthatóak, a rekurrens és nem rekurrens CNV-kre.



6. ábra: Rekurrens és nem rekurrens CNV-k [39]

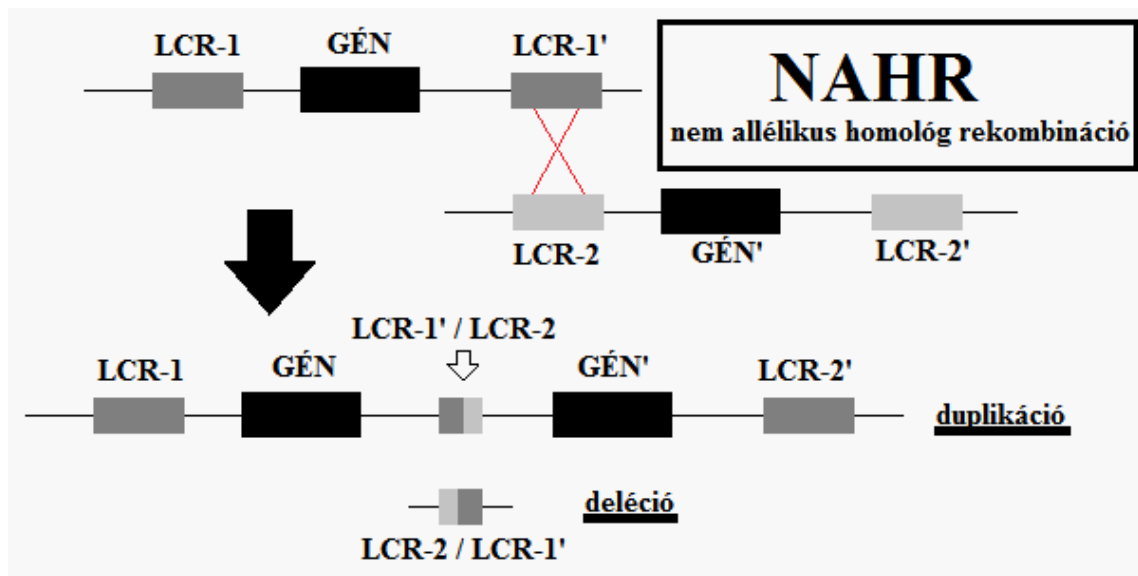
A rekurrens CNV-k közel azonos méretűek, és töréspontjaik is megegyeznek. Utóbbiak bizonyos LCR régiókhoz kötöttek. Ezzel ellentétben a nem rekurrens CNV-k töréspontjai ritkán esnek ugyanabba a pozícióba, és méretük is nagymértékben eltér.

A nem rekurrens CNV-k esetében az eltérő méretű CNV-k átfedőek, ezáltal egy közös genomiális régiót tartalmaznak. Ebben a közös régióban található dózis szenzitív gének kifejeződésének mértéke állhat a megfigyelt fenotípus hátterében (6. ábra) [39].

2.5.2. CNV-k kialakulásának mechanizmusai

2.5.2.1. Rekurrens CNV-k kialakulása (NAHR mechanizmus)

A rekurrens CNV-k kialakulásában a NAHR (non allelic homologous recombination/nem allélikus homológ rekombináció) játszik óriási szerepet. A NAHR mechanizmus működése a szegmentális duplikációk, más néven LCR régiókhoz kötött (7. ábra). Az LCR régiók a teljes humán genom 5%-át teszi ki. Az LCR blokkok több mint egy kilobázis hosszúságúak, és egymáshoz viszonyított szekvenciájuk homológiája több mint 90%. Ha az LCR blokkok szekvencia homológiája eléri a 97%-ot, és a blokkok egyazon kromoszómán kevesebb, mint 10 Mb távolságra helyezkednek el egymástól, akkor a hibás meiózis vagy mitózis folyamán egyenlőtlen crossing over mehet végbe, melynek eredménye lehet duplikáció és delécia is. Ha az LCR blokkok irányultsága egymással ellentétes, akkor a NAHR során inverzió jön létre, ha pedig a homológ LCR szakaszok egyike egy másik kromoszómán helyezkedik el, transzlokáció játszódik le. Eredményként létre jön egy rekurrens CNV, melyet két oldalról LCR blokkok határolnak. A szegmentális duplikációkban gazdag területek a genomban a genomi átrendeződés forrópontjai (hotspotjai). A NAHR nem egyenletesen oszlik meg az LCR régiók között, hanem klasztereződik az LCR-ekben gazdag forrópontok (hotspotok) közelében. A NAHR események nyomán gyakran alakul ki a DNS kettős száljának törése (double strand break – DSB). NAHR mechanizmus lejátszódhat a csíravonalban, ahol az átrendeződés a genomiális betegség kialakulásáért tehető felelőssé, illetve a szomatikus sejtekben, ahol az átrendeződés a különféle malignus elváltozások kialakulásában játszik szerepet [39, 40].



7. ábra: A nem allélikus homológ rekombináció [41]

2.5.2.2. Nem rekurrens CNV-k kialakulása (NHEJ, FoSTeS)

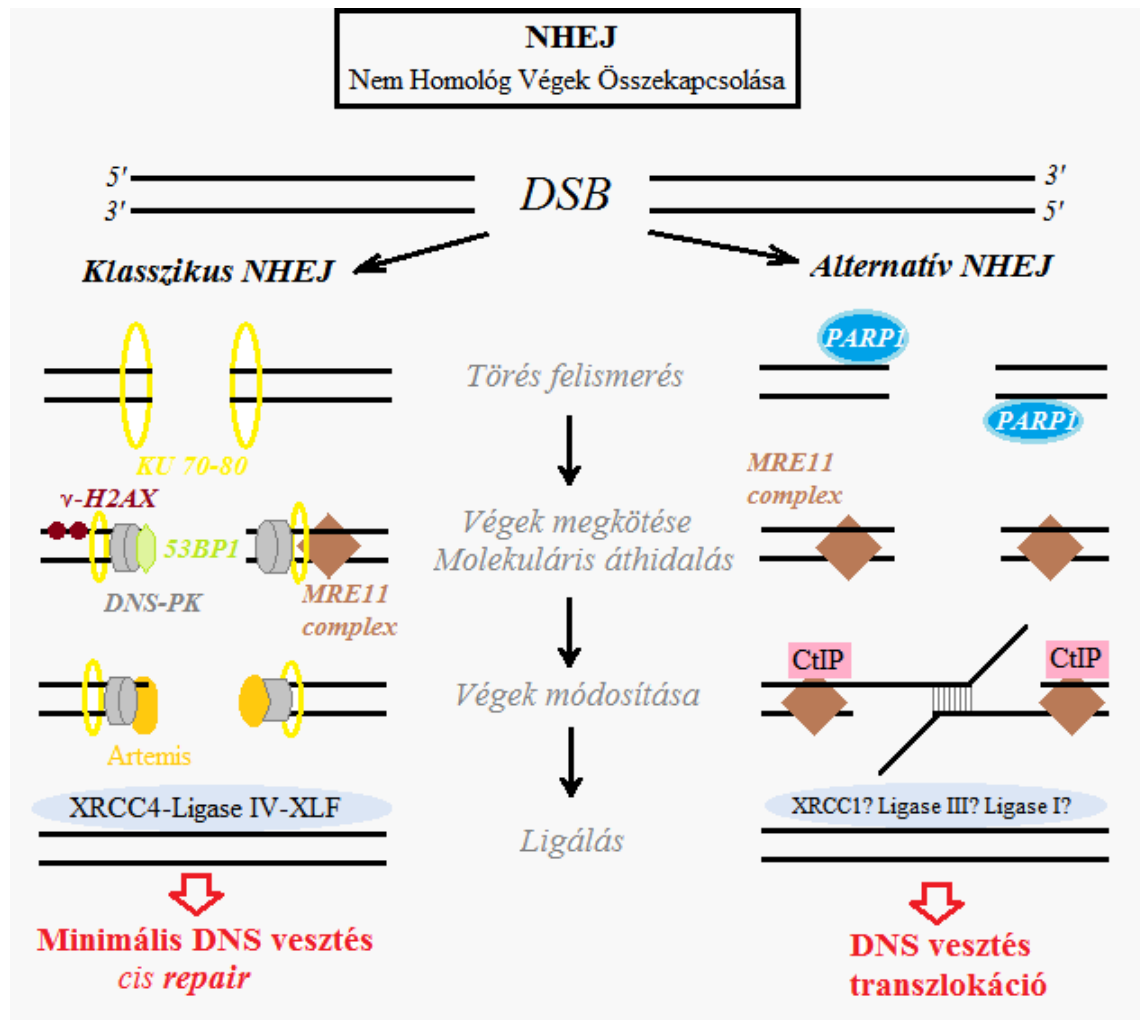
Bizonyos nagyfokú hasonlóságot mutató ismétlődő szekvenciák esetében, mint az Alu (*Arthrobacter luteus*-ban detektált ismétlődő DNS kópiák) és LINE (hosszú szétszórt ismétlődések) szekvenciák, a NAHR bizonyos esetekben képes nem rekurrens CNV-k kialakulását mediálni. A többi nem rekurrens CNV kialakulása magyarázható a nem homológ end-joining (non-homologous end-joining - NHEJ) és a fork stalling and template switching (FoSTeS) mechanizmusokkal [40].

2.5.2.2.1. NHEJ (Nem Homológ End-Joining)

A nem homológ end-joinig mechanizmus két eltérő útvonalra osztható. A klasszikus NHEJ-ra és az alternatív NHEJ-ra (8. ábra). A klasszikus nem homológ end-joining (cNHEJ) mechanizmus során a kettős szálú DNS-en törés keletkezik (double strand break – DSB). A törés során mindkét DNS szál elhasad, ezek javítását a cNHEJ mechanizmus végzi. A kettős szál javítását a rendszer 4 lépésben valósítja meg: 1. a kettős száltörésének detektálása, 2. molekuláris áthidalás a törött DNS szál mindkét végén, 3. a két vég módosítása olymódon, hogy kompatibilisek legyenek a ligáláskor, 4. a végső ligálás. A ligáláshoz szükséges a DNS szálak végeinek módosítása, mely

ilyenkor plusz nukleotidokat kaphat, vagy épp veszíthet el. A cNHEJ végeredményében az eredeti szekvencia megváltozásával járhat, azonban ez csak néhány nukleotidot érint. Mivel a cNHEJ-hoz nem szükséges LCR régió vagy egyéb homológ szakasznak a megléte, ezért ez a folyamat nem köthető egy bizonyos pozícióhoz [39, 42].

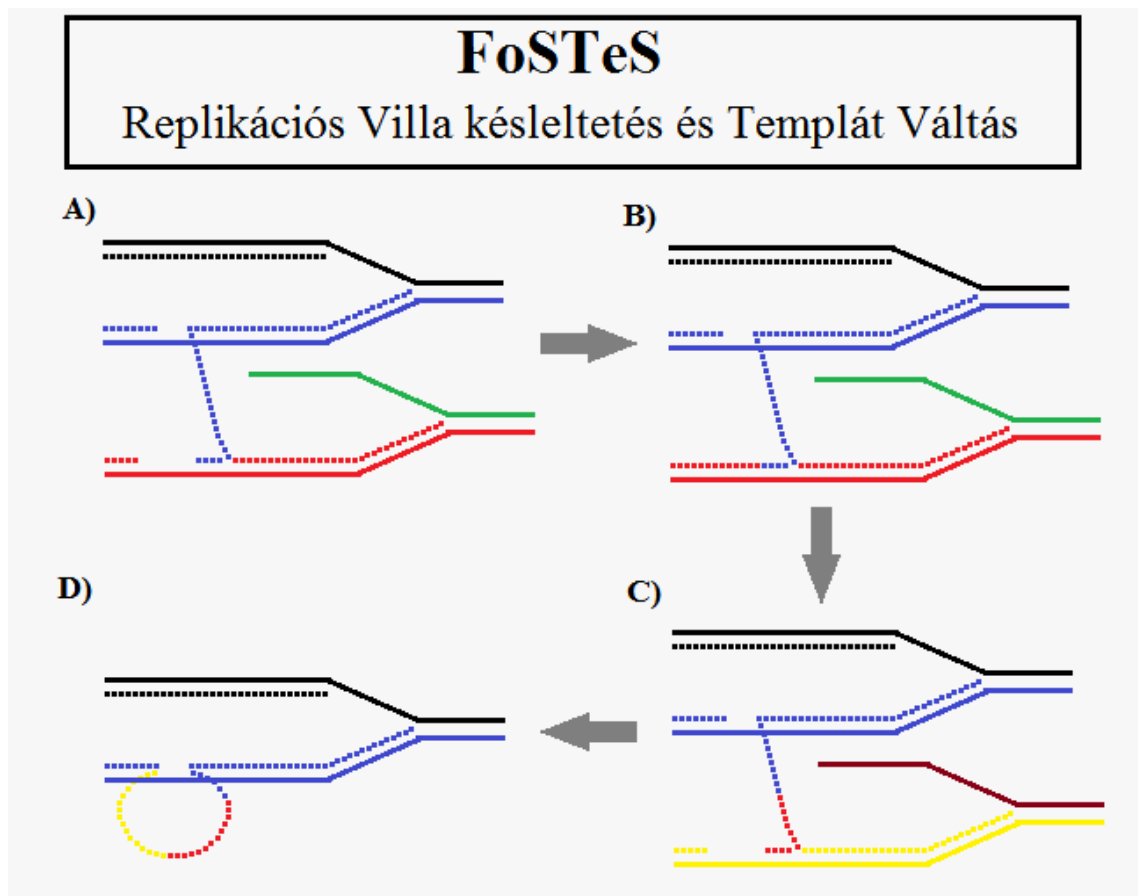
A nem homológ end-joining másik útvonala az alternatív NHEJ (altNHEJ). Ennél az útvonalnál a kettős törés felismerése után egy nukleáz a töréstől 5'-3' irányban hasítja a DNS kettős szálát. A törésnél így mindkét szálnál egy hosszabb szabad vég alakul ki. Ha ezek között a végek között mikrohomológia (2-4 bp) áll fenn, akkor a két szál összekapcsolódik, és megkezdődik a szálak ligálása. Az altNHEJ révén olyan nagyobb méretű CNV-k alakulhatnak ki, melyek a nem rekurrens CNV-k egy kisebb hányadát alkotják [43].



8. ábra: Klasszikus NHEJ és alternatív NHEJ [44]

2.5.2.2.2. FoSTeS (Fork Stalling and Template Switching)

A nem rekurrens CNV-k egy hányada a FoSTeS mechanizmus révén jönnek létre. Ez a rendszer felelős a komplex genomi átrendeződések nagy részéért a genomban (9. ábra). A replikációs villa keletkezése után a replikáció egy bizonyos szakaszon megáll. Az addig újonnan szintetizálódott lemaradó DNS szál kiszabadul a replikációs villából, és bekötődik a fizikailag közel elhelyezkedő második replikációs villába (9. ábra/A). A kötődés a lemaradó szál szekvenciája és a második replikációs villa szekvenciájának mikrohomológiája révén történik. A PolI és a ligáz révén az eredeti lemaradó szál a második replikációs villa lemaradó száljához kötődik. A lemaradó szál még számos esetben képes új replikációs villákat megtámadni (9. ábra/B,C), mielőtt visszatérne az eredeti templátszállhoz, és befejezné a replikációt (9. ábra/D) [45].



9. ábra: FoSTeS mechanizmus [40]

2.6. Az array CGH vizsgálat elvégzésének feltételei, a célcsoport kiválasztása

Vizsgálataimhoz azokat a betegeket választottam ki, akiknél pszichomotoros elmaradás és izomhipotónia mellett agyi malformáció és/vagy szívfejlődési rendellenesség, valamint növekedési elmaradás is észlelhető. A beszéd késése, hiánya, az epilepszia, valamint a sztereotíp kézmozgás szintén fontos szempontot képviselt. A kiválasztott betegeknél a tünetek alapján kezdeményezett rutin diagnosztikai eljárások során a fenotípus háttérében álló kóroki eltérés nem volt kimutatható.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataim elvégzéséhez 140 mintát gyűjtöttünk össze a PTE Orvosi Genetikai Intézet Genetikai tanácsadásán többszörös fejlődési rendellenesség miatt vizsgált betegektől, amely mintákat array CGH módszerrel vizsgáltunk.

A vizsgálat során célom volt:

- az olyan kóros fenotípust mutató komplex fejlődési rendellenességben szenvedő betegek várható genomi eltéréseinek detektálása, akiknél a hagyományos kromoszóma vizsgálat normál kariotípust mutatott;
- a kimutatott eltérések által érintett gének, genomi régiók funkciójának elemzése a szakirodalom és a publikus adatbázisok adatainak segítségével;
- az érintett génekre vonatkozó irodalmi adatok elemzése a megváltozott géndózis hatásának értékelése szempontjából;
- a talált eltérések genotípus fenotípus korrelációjának feltárása, összehasonlítva a szakirodalomban közölt, hasonló fenotípussal és eltéréssel rendelkező esetekkel;
- a fenti összehasonlítás alapján további adatok gyűjtése annak megállapítására, hogy a hasonló esetekben mely szűkebb régió, illetve melyik érintett gén lehet felelős a fenotípusos eltérésekért;
- a talált eltérések (CNV-k) típusának meghatározása, és azok összehasonlítása a szakirodalomban közölt esetekkel, illetve az eltérések típusaira jellemző vonások összehasonlítása;
- a ritka CNV-k típusainak összehasonlítása szakirodalmi adatokkal a klinikai tüneteken keresztül.
- A feltárt genomi eltérések és a megfigyelt fenotípus alapján az array CGH vizsgálat indikációjának pontosabb meghatározása a többszörös fejlődési rendellenesség által érintett betegek csoportján belül;

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Vizsgálati anyag

A kiválasztott betegek és családtagjaik részletes fizikális vizsgálata, valamint a mintavétel genetikai tanácsadás keretében, tájékoztatás és a vizsgálatba való beleegyezésük után történt. A laboratóriumi vizsgálatok céljára 8-12 ml EDTA-val alvadásgátolt vénás vért vettek, amelyek feldolgozás után biobanki tárolásra kerültek.

4.2. DNS izolálás

A DNS izolálást Omega E.Z.N.A. Blood Maxiprep kittel végeztük, mely alkalmas nagy mennyiségű (akár 20ml) vérből való DNS izolálására. A DNS kötő filteres oszlopok kapacitása 1,5 mg DNS.

HiBind DNA Maxi Columns	DNS kötő oszlopok	50 db
50 ml Collection Tubes	50 ml-es gyűjtőcsövek	50 db
Buffer TL	TL puffer	160 ml
Buffer BL	BL puffer	600 ml
Buffer HB	HB puffer	300 ml
Equilibration Buffer	Ekvilibráló puffer	2 x 85 ml
DNA Wash Buffer	DNS mosópuffer	3 x 100 ml
RNase A	RNáz A	2,2 ml
OB Protease	OB proteáz	300 mg
Proteinase Storage Buffer	Proteináz tároló puffer	20 ml
DNA Elution Buffer	DNS elúciós (leoldó) puffer	120 ml

A DNS izolálás megkezdése előtt:

1. Használat előtt az OB Proteinázt Proteináz Tároló Pufferben feloldottuk (10 mM; pH 8,0)
2. DNS mosópufferhez 400 ml abszolút alkoholt adtunk

Reagensek, amelyeket a kit nem tartalmaz:

- Abszolút alkohol
- Izopropanol
- 50 ml-es centrifuga csövek

DNS izolálás:

DNS megkötése: A 10 ml vért 50 ml-es centrifugacsőbe öntöttük, majd 250 µl OB proteázt adtunk a vérhez. Ha a vér mennyiség kevesebb volt, mint 10 ml, akkor 10mM Tris-HCl-val, PBS-sel vagy Elúciós pufferrel egészítettük ki a térfogatát. A mintákhoz vortexelés után 10,2 ml BL puffert adtunk, majd ismételten vortexeltük (5 perc. 20 µl RNáz A hozzáadása után 70 °C-on 10 percig inkubáltuk a mintákat. A lizátumhoz 10,3 ml etanolt vagy izopropanolt adtunk, majd alapos vortexelés után a cső tartalmát egy HiBind DNA Maxi Column oszlopra vittük fel, amit egy 50 ml-es gyűjtőcsőbe helyeztünk. Az oszlopokat 4000 g-n centrifugáltuk 5 percig, hogy a filter adszorbeálja a lizátumban lévő DNS-t. Az oszlopon átfolyt oldatot, illetve az ennek a gyűjtésére használt gyűjtőcsövet a centrifugálás végeztével eldobtuk.

Mosás: Az oszlopot új gyűjtőcsőbe helyeztük, majd 50 ml HB puffert vittünk fel az oszlop felületére. Az oszlopokat 3000 g-n 5 percig centrifugáltuk, majd az átfolyó folyadékot eltávolítottuk a gyűjtőcsőből. Az oszlopot visszahelyeztük a gyűjtőcsőbe, majd 15 ml DNS mosó puffert pipettáztunk az oszlopra. Ismételt centrifugálási (3000 g-n 5 perc) lépés után az átfolyó folyadéktól megszabadultunk. Következő lépésként az oszlopra 10 ml DNS mosó puffert pipettáztunk és 3000g-n 5 percig centrifugáltuk. Az átfolyó folyadékot eltávolítottuk. A mosás utolsó lépéseként meg kell szabadulnunk a teljes mosó puffer mennyiségtől, így az oszlopot most mosó puffer nélkül centrifugáltuk (szárazon) 4500 g-n 10 percig.

DNS visszanyerése az oszlopról: Az oszlopot áthelyeztük egy 50 ml-es nukleázmentes centrifugacsőbe, majd 1 ml 70 °C-os elúciós puffert (1 mM Tris-HCl, pH 8,5) vittünk fel az oszlopra. 3-5 perc szobahőn való inkubálás után az oszlopokat lecentrifugáljuk 4500 g-n 5 percig. A filteren keresztül folyó elúciós puffer eltávolítja a filter felületére kikötött DNS-t.

A hatékony DNS visszanyerés érdekében az elúciós lépést meg ismételtük. Mindegyik elúciós lépés során, az oszlopon megkötött DNS 60-70%-a nyerhető vissza. Az ismételt elúciós lépést követően ez az érték 80% feletti.

DNS tisztítása:

Az izolálás során a DNS tisztaságát és koncentrációját NanoDrop műszerrel ellenőriztük. Amennyiben a DNS tisztasága nem érte el az általunk kívánt értéket, a DNS-t tovább tisztítottuk. Erre Macherey-Nagel NucleoSpin gDNA Clean-up Purification Kit-et alkalmaztuk.

Macherey-Nagel DNA gDNA Clean-up Purification Kit:

- 50 db filter
- 50 db gyűjtőcső (2 mL)
- 1 db DB buffer (kötő puffer – 25 mL)
- 1 db DW buffer (mosó puffer – 25 mL+használat előtt hozzáadni 60 mL etanolt)
- 1 db DE buffer (elúciós puffer – 15 mL
 - DE buffer: 5 mM Tris/HCl, pH 8,5)

A protokollt követve 150 µl tisztításra váró DNS-hez 450 µl DB puffert adtunk. Kisebb kiindulási térfogat esetén a DNS-t vízzel egészítettük ki 150 µl-re. Második lépésként az elegyet a NucleoSpin gDNA Clean-up oszlopra (filter+gyűjtőcső) pipettáztuk, majd 11.000 g-n 30 másodpercig centrifugáltuk. Ebben a lépésben a filterre kikötődik a DNS.

A mosó lépések során 700 µl DW puffert pipetázunk az oszlopra és megismételjük a centrifugálást az előző lépésben alkalmazottaknak megfelelően. A centrifugálás során a gyűjtőcsőbe átfolyó mosó puffert a centrifugálás végeztével kiöntöttük, majd a filtert visszahelyeztük. A mosó lépést megismételtük. E folyamat a filter felületére kikötött DNS megtisztítására szolgál. Ilyenkor a mosó pufferek a DNS-en kívül minden szennyeződést kimosnak a filterből és a DNS-ből.

A mosás után a tisztító oszlopot 11.000 g-n 1 percig centrifugáltuk, a maradékfolyadék eltávolítása céljából. Utolsó lépésként a DNS-t 50 µl DE pufferrel 1 perc szobahőn való inkubálás után 11.000 g-n 30 másodpercig centrifugálással eltávolítottuk egy Eppendorf csőbe. A DNS tisztaságát NanoDrop segítségével ellenőriztük. Szükség esetén a tisztítási folyamatot megismételtük.

4.3. G-sávok kromoszómafestés

A komplett táptalajt felolvasztottuk, szétadagoltuk 4 ml-ként tenyésztőcsövekbe, majd -20 °C-on tároltuk.

A tenyésztés menete és a feldolgozás: A kromoszóma vizsgálatához sterilen vett, Na-Heparinnal alvadésgátolt perifériás vért használtunk. Két tenyésztőcsőben 4-4 ml táptalajt olvasztottunk fel, és 5-5 csepp vért cseppentettünk bele steril körülmények között.

Tápfolyadékok és egyéb reagensok:

- Lymphogrow medium
- Lymphochrome medium
- Antibioticum-Antimycoticum
- [Trypsin-EDTA (1x)]
- 10 µg/ml Colcemid solution
- [L-Glutamin 200 mM]
- Phytohemagglutinin M
- Heparin

Oldatok:

- Hypotonizáló: 0,075 M KCl
- Fixáló: metanol és 100 %-os ecetsav (for HPLC) 3 : 1 arányú keveréke
- Weise puffer a Giemsa festékhez 1000ml: 1,14 g dinátrium- hidrogénfoszfát
0,49 g kálium-dihidrogénfoszfát
- 2 x SSC 1000ml: 17,5 g NaCl
8,82 g Na-citrát
- Leismann's festék: 0,3 g festék és 200 ml metanol. 3 napig vízfürdőben történő melegítéssel (65°C) segítjük az oldódást.

A csöveket 37 °C-os termosztátba helyeztük, 72 óráig inkubáltuk. Két órával a feldolgozás kezdete előtt 2 csepp Colcemidet adtunk a sejt kultúrához, ezzel metafázisban blokkoltuk a sejtosztódást, majd újabb két órára a 37 °C-os termosztátba helyeztük. Előkészítettük a hypotonizáláshoz (37 °C) és a fixáláshoz (4 °C) az oldatokat. A blokkolási idő lejártával, a mintát lecentrifugáltuk (10 perc 2000 rpm, szobahőn) és a

felülúszót eltávolítottuk. Az üledékhez hypotonizáló oldatot adtunk, majd 30 percig 37 °C-on inkubáltuk. Fél óra elteltével a mintát lecentrifugáltuk, a felülúszó nagy részét vízsugár szivattyúval eltávolítottuk, az üledékre enyhe rázogató mellett fixálót pipettáztunk, majd ismét 2000 rpm-en lecentrifugáltuk. A folyamatot addig ismételtük (kb. 3x), amíg tiszta szuszpenziót nem kaptunk. Ezután a mintát -20 °C-ra tettük 20 percre. Újabb centrifugálás után a felülúszó egy részét ismét leszívtuk. Az üledéket felszuszpendáltuk, majd a szuszpenzióból 1 cseppet 4 tisztított tárgylemezre helyeztünk.

Értékelés: A tárgylemezre kicseppentett preparátumot Giemzával megfestettük (festőküvetébe 80 ml Giemsa festéket töltöttünk, a kicseppentett lemezeket beleállítottuk 15 percre, majd desztillált vízzel leöblítettük), száradás után mikroszkóp alatt értékeltük: 15 metafázisban lévő kromoszómát megszámláltunk, majd csoportokba soroltuk őket.

A Giemsa festés és értékelés után *G-sávozást* végeztünk: a preparátumból újabb tárgylemezre cseppentettünk, majd 24 órán keresztül állni hagytuk. Ezután 2,5 órára 65°-os 2 x SSC oldatot tartalmazó festőküvetébe állítottuk. A sávozott készítményt Leishmann's festékkel kezeltük. A mikroszkópos elemzés során minden mintából 5 kariotípust készítettünk.

4.4. Metafázis FISH

A vizsgálatra humán perifériás vért használtunk. A 2x4 ml phytohemagglutinint tartalmazó táptalajhoz (Chromosome Medium 1A) egyenként 5 csepp vért adtunk, majd összerázás után a 37 °C-os termosztátban 72 órán keresztül inkubáltuk. A kultúrához a vizsgálatot megelőzően 2 órával colcemidet (0,1 µg/ml) adtunk. A sejtek hipotonizálását 37°C-on 30 percig 0,075 M KCl-os oldattal végeztük, majd fixálóval többszöri átmosással fixáltuk (3:1 arányú metanol és jégcet elegy). A preparátumot -20°C-ra helyeztük min. 30 percig, majd tárgylemezre cseppentettük ki a sejteket. A preparátumokat a vizsgálat elvégzéséig -20°C-on tároltuk.

A vizsgálati folyamat első lépéseként a -20°C-on tárolt preparátumokat szobahőmérsékleten felmelegítettük.

Szükséges oldatok:

- 20 x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na-citrát (pH 7,0)
- 10 x PBS: 137 mM NaCl, 27 mM KCl, 80 mM Na₂HPO₄, 15 mM KH₂PO₄ (pH 7,0)
- 10 % Tween 20
- 1 M MgCl₂
- 10 % pepszin
- 1 N HCl
- 70 % - 90 % - 100 % etanol
- DAPI magfestés: 125 ng/ml antifade mounting mediumban oldva

Munkaoldatok:

- 2 x SSC (500 ml): 450 ml desztillált víz + 50 ml 20 x SSC (pH 7,0)
- 1 x PBS (1000 ml): 900 ml desztillált víz + 100 ml 10 x PBS (pH 7,0)
- MgCl₂/PBS (500 ml): 480 ml 1 x PBS + 20 ml MgCl₂
- MgCl₂/PBS/formaldehid (100 ml): 100 ml MgCl₂/PBS + 1 ml formaldehid

Előkezelés: A mintákat fehérjementesítés céljából pepszines emésztésnek vetettük alá, majd azt követően fixáltuk. A munkafázisokat festőküvetében végeztük.

1. Mosás 2 x SSC oldatban: 3 x 3 perc
2. Mosás 1 x PBS oldatban: 1 x 3 perc
3. Emésztés: 100 ml desztillált víz és 1 ml 1 N HCl elegyét 37°C-ra előmelegítettük, majd az emésztés megkezdése előtt 25 µl 10 %-os pepszin oldatot kevertünk bele: 10 percig inkubáltuk 37°C-on.
4. Mosás 1 x PBS oldatban: 3 x 3 perc
5. Mosás MgCl₂/PBS oldatban: 2 x 3 perc
6. Fixálás MgCl₂/PBS/formaldehid oldatban: 1 x 10 perc
7. Mosás 1 x PBS oldatban: 1 x 3 perc
8. Dehidráció jéghideg felszálló alkoholsorban (70 - 90 - 100 %): 1 - 1 perc
9. Lemezek szárítása szobahőmérsékleten

Az előkezelt lemezek hibridizációra alkalmas területeit fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgáltuk, majd a kiválasztott területet a tárgylemez karcolásával jelöltük.

Denaturálás és hibridizáció: az általunk használt codenaturációs módszer szerint a fluorochrome vagy haptén jelölésű próbához hibridizációs puffert adtunk, majd szükség szerint desztillált vízzel 10 µl végtérfogatra egészítettük ki az elegyet. Az oldatot az előre kiválasztott, hibridizációra alkalmasnak ítélt területre cseppentettük. A fedőlemezzel lefedtük a területet, majd hot plate-en 80 °C-on 3 percig denaturáltuk a próbát és a kromoszómális DNS-t. Utána a fedőlemezt leragasztottuk, majd lefordítva egy fekvő küvettában 37 °C-on pára kamrában egy éjszakán át hibridizáltuk.

Poszthibridizációs mosás: Az oldatokat frissen készítettük, és a festőküvetákkal együtt fűthető vízfürdőben 37 °C-ra előmelegítettük. A munkaidő pH értékét 7,0-ra állítottuk be.

Munkaidő:

50 % formaldehid/ 2 x SSC (400 ml): 160 ml desztillált víz + 40 ml 20 x SSC + 200 ml formaldehid (pH 7,0)

2 x SSC (500 ml): 450 ml desztillált víz + 50 ml 20 x SSC (pH 7,0)

4T (500 ml): 400 ml desztillált víz + 100 ml 20 x SSC + 2,5 ml 10 % Tween 20 (pH 7,0)

1. A fedőlemezeket eltávolítottuk
2. Mosás 50% formaldehid/ 2 x SSC oldatban 37 °C-on: 3 x 5 perc
3. Mosás 2 x SSC oldatban 37 °C-on: 3 x 5 perc
4. Mosás 4T oldatban 37 °C-on vagy szobahőmérsékleten: 3 x 3 perc

A fluorochrome jelölésű próbánál a lemezeket desztillált vízzel öblítettük, majd szobahőmérsékleten szárítottuk. A hibridizált területet DAPI magfestéssel lefedtük. A denaturálási fázistól a preparátumokat fénytől védve helyeztük.

A haptén jelölésű próbák alkalmazásakor a mintákat az első 4T mosási lépést követően 100 µl előhívó oldattal (a próba jelölésének megfelelő antitestblokkoló reagenssel hígítottuk) buborékmentesen lefedtük, majd 30 percre 37 °C-os pára kamrába helyeztük. Az inkubáció után a 4T mosási lépésektől folytattuk a protokollt, szem előtt tartva a preparátum fénytől való védelmét. A lemezek desztillált vizes öblítése után a

lemezeket szobahőmérsékleten megszárítottuk, majd a hibridizált területet DAPI magfestéssel lefedtük.

A lemezeket a fluoreszcens festékeknek megfelelő filtereket alkalmazva, fluoreszcens mikroszkóp segítségével értékeltük.

4.5. Array CGH

A vizsgálathoz Agilent Human Genome G3 SurePrint 8x60K-s array-t használtunk.

Array CGH-hez használt reagensok, oldatok, kitek és tartalmuk:

Merck Millipore Amicon Ultra-0.5 mL Centrifuga Filterek DNS és Fehérje Tisztításra és Koncentrálásra

Minta DNS (minimum koncentráció: 100 ng/μl)

- SureTag Complete DNA Labeling Kit
 - férfi és női referencia DNS
 - Nukláz mentes víz
 - 10x Enzim reakció puffer
 - BSA (bovine serum albumin)
 - Alu I restrikciós enzim
 - Rsa I restrikciós enzim
 - random primer
 - 5x reakció puffer
 - 10x dNTPs
 - Cyanine 3-dUTP
 - Cyanine 5-dUTP
 - Exo (-) Klenow
- Oligo aCGH/ChIP-on-chip Hybridization Kit
 - Cot-1 DNS (1,0 mg/mL)
 - 10x aCGH Blokkoló ágens
 - 2x HI-RPM hibridizációs puffer
- mosó puffer 1.
- mosó puffer 2.

Az Agilent 8pack array CGH technika lépései:

- Minták és referenciák előkészítése a vizsgálatra
- Minták és referenciák fragmentálása restrikciós enzimek segítségével
- Minta és referencia fragmentek sokszorozása és jelölése
- Minták és referenciák tisztítása
- Minta-referencia párok hibridizáltatása a lemez felületére
- Lemezek mosása
- Lemezek scannelése
- Adatok értékelése

Minták és referenciák előkészítése a vizsgálatra:

A vizsgálathoz perifériás vérből izolált DNS-t használtunk. A DNS izolálás eredményeként kapott DNS koncentrációját és tisztaságát NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, NanoDrop Products, 3411 Silverside Road, Bancroft Building, Wilmington, DE 19810 USA) segítségével ellenőriztük. Az izolálás során használt elúciós puffert használtuk negatív kontrollként a méréshez. Mintánként 1,5 µl DNS-t pipettáztunk a NanoDrop 2000 detektor felületére, majd a fedél zárásával elindítottuk a mérést. A program a negatív kontroll és a minták közti abszorbancia különbséget detektálja, melynek köszönhetően megkaptuk a DNS koncentrációt illetve a minták tisztaságát.

A minták DNS koncentrációjának el kell érnie a 100 ng/µl-t, hogy a protokoll első lépéseként megadott volumenben (10,1 µl) a minták DNS koncentrációja elérje az 1 µg koncentrációs értéket. A DNS tisztaságának értékeit a 260/280 és 260/230 arányszámok jelzik. A 260/280 arányszám a DNS és RNS abszorbanciájának egymáshoz viszonyított aránya. Normál körülmények között a kétszálú DNS 260 nm hosszúságú UV fényt nyel el. Ezzel ellentétben az egyszálú RNS, 280 nm hosszúságú UV fényt abszorbeál. A két érték egymáshoz viszonyított aránya a minta DNS-ben található RNS „szennyezettség” adja meg. A minta RNS-el való „szennyezettsége” 1,8 feletti érték esetén már elfogadható. A másik arányszám a 260/230 pedig a minta DNS tartalmának szerves oldószerrel való „szennyezését” jelzi. Ez többségében magasabb értékét mutat, mint a 260/280 arányszám. Itt 1,9 – 2,0 felett elfogadható a szerves oldószerrel való „szennyezettség”.

Miután mintáinkat a protokollnak megfelelően az array CGH vizsgálatra előkészítettük, a minták térfogatát (10,1 µl) és koncentrációját (1µg/10,1µl) egységesítettük. A nem megfelelő koncentrációjú és tisztaságú DNS mintákat Macherey-Nagel gDNA Clean-up Purification Kit segítségével tisztítottuk meg.

Minták és referenciák fragmentálása restrikciós enzimek segítségével:

A vizsgálathoz mind a referencia DNS-ből mind a vizsgálni kívánt DNS mintából 1 µg mennyiséget fragmentáltunk. A kiindulási minta és referencia DNS-ek térfogatát 10,1 µl-ben maximalizáltuk.

Komponensek	µl/minta	18 mintára
Nukleáz mentes víz	1	18
10x Enzim reakció puffer /Puffer C	1,3	23,4
Acetylated BSA (10 mg/µl)	0,1	1,8
Alu I (10 U/µl)	0,25	4,5
Rsa I (10 U/µl)	0,25	4,5
Össztérfogat	2,9	

A minták és az emésztő master mix együttes végtérfogata 13µl. A reakcióelegyet PCR készülékben a következő programon inkubáltuk:

37 fok – 2 óra

65 fok – 10 perc

4 fok (vagy jégre)

A restrikciós enzimeknek köszönhetően a genomi DNS fragmentálódott. A fragmentek méretének meghatározásához Agilent BioAnalyzer 2100 műszert alkalmaztunk. A mintákból és referenciákból az emésztést követően 1 µl-t megfuttattunk. Az elhasznált volument desztillált vízzel pótoltuk.

Minta és referencia fragmentek sokszorozása és jelölése:

Minden mintához illetve referenciához 2,5 µl random primert adtunk, majd vortexeltük. A mintákat PCR készülékben a következő programon inkubáltuk:

95 fok – 5 perc

4 fok – 3 perc

A mintákat 1 perig 6000g-n centrifugáltuk, majd a hozzáadtuk a jelölő master mixet (9,5 µl). Jelölésnél fontos, hogy a mintáinkat és referenciáinkat különböző fluoreszcens festékekkel jelöljük (minták: Cy5/Cyanin5, referenciák: Cy3/Cyanin3).

Komponensek	µl/minta	Cy3 mix 9 mintára	Cy5 mix 9 mintára
5 x Reakció puffer	5	45	45
10 x dNTP	2,5	22,5	22,5
Cy3/Cy5 dUTP	1,5	13,5	13,5
Exo-Klenow	0,5	4,5	4,5
Össztérfogat	9,5		

Az elegyet pipettával összekevertük, majd minden csőbe 9,5 µl jelölő mixet pipettáztunk, ügyelve hogy a mintákat tartalmazó csövekbe Cy5-öt tartalmazó mix kerüljön, míg a referenciákba Cy3-at tartalmazó mixet pipetázzunk.

A csöveket PCR készülékben a következő programon inkubáltuk:

37 fok – 2 óra

65 fok – 10 perc

4 fok

Minták és referenciák tisztítása:

A mintákat 1 percig 6000 g-n lecentrifugáltuk. A tisztításhoz Amicon AU-30-as filteres csöveket alkalmaztunk. A filteres csövekbe 430 µl TE puffert pipettáztunk, majd ehhez adtuk a mintáinkat ügyelve a komponensek keveredésére. A csöveket 10 percig 14000 g-n centrifugáltuk. A centrifugálás után az átfolyót kiöntöttük, majd a filterbe 480 µl TE puffert pipettáztunk. A centrifugálási lépést megismételtük, és az átfolyót ismételten kiöntöttük a gyűjtőcsőből. Ilyenkor a jelölt DNS-ünk a filterhez kötődött, és a mosási folyamat alatt megszabadultunk a nem jelölődött DNS-ek nagy részétől.

Utolsó lépésként a filtert megfordítva helyezzük egy új gyűjtőcsőbe és 1 percig 1000 g-n centrifugáltuk.

A filterektől megszabadulva a jelölt DNS volumenünk 20-32 µl között volt mérhető. A megfelelő térfogat eléréséhez (9,5 µl), a mintáinkat Thermo blokk segítségével bekonzentráltuk. Ha a minták végtérfogata a 9,5 µl-t nem érte el, akkor TE pufferrel egészítettük ki.

A festék beépülését NanoDrop készülék segítségével mértük meg. A méréshez 1,5 µl mintát használtunk. A mérés során a koncentráció-, illetve a festékek abszorbancia értékekből kiszámoltuk a festék beépülését. A beépülés optimális, ha értéke minták esetében 20-35, referenciák esetében 25-40.

A megfelelő minta-kontroll párokat egybemértük (16 µl).

Minta-referencia párok hibridizáltatása a lemez felületére:

A jelölt DNS-ekhez hozzáadtuk az előre elkészített hibridizációs mixet (29 µl/minta), majd 95 fokon 3 percig, majd 37 fokon 30 percig PCR készülékben inkubáltuk.

Komponensek	µl/minta	9 mintára
Human Cot-1 DNS (1 mg/ml)	2	18
10 x aCGH Blokkoló Ágens	4,5	40,5
2 x Hibridizációs puffer HI-RPM	22,5	202,5
Össztérfogat	29	

A mintákból 40 µl-t a gasket slide megfelelő pozíciójába pipettáztunk („drag and dispense”). A minták felpipettázása után az array lemezt aktív felszínével a gasket slide-ra helyeztük. A hibridizációs kamrát lezártuk, majd 65 fokon 20 rpm-en 24 órán keresztül inkubáltuk.

Lemez/ek mosása:

A hibridizáció után a kamrát szétszedtük. A gasket slide – array slide -okat egyben kiemeltük a kamrából, majd az erre a célra használt 1-es mosó pufferrel töltött mosókádban a két lemezt elválasztottuk egymástól, ügyelve hogy a lemezek a folyadék felszín alatt maradjanak. A lemezt mosóállványba tettük, majd folyamatos mágneses

keverés mellett az 1-es mosó pufferbe helyeztük 5 percre. A 2-es mosó puffert „overnight” 37 fokra előmelegítettük és mágneses keverővel kevertettük. Az 1-es mosó pufferben töltött 5 perc után a lemezt áthelyeztük a 2-es mosó pufferbe 1 percre, majd a lemezt sötétkamrában szárítottuk.

Lemezek scannelése:

A megszáradt lemezt egy tartóba helyeztük, mely kompatibilis az array szkennert foglalatával. A szkennert elindítása után az array lemezt behelyeztük a szkennert. Az Agilent ScanControl elindítása után a lemezeket beszkenneltük. A szkennelés termékeként létrejövő kép (.TIFF) fájlt az Agilent Feature Extraction program segítségével hoztuk feldolgozható formába. A program a képfájltra ráhelyezi az úgynevezett grid fájlt, mely meghatározza a lemez különböző pontjain előforduló próbákat. Az output fájlokat az Agilent Cytogenomics program segítségével jelenítettük meg.

Adatok értékelése:

Az adatok kiértékelése az Agilent Cytogenomics program segítségével történt. A program a Feature Extraction program által generált fájlokat analizálja és teszi vizuálisan is értékelhetővé. A program segítségével megállapítható az érintett gének neve és a genomiális eltérések pontos helye és töréspontjai is. Mindemellett a program számos adatbázissal is kapcsolatot létesít, így a kiértékelőnek lehetősége nyílik az adott eltérés patogenitásának megállapítására.

5. BETEGEK

5.1. Első eset

Az első beteg egy kislány, aki a 39. héten császármetszéssel született egészséges szülőktől. A családi anamnézis negatív, a szülők közt rokon kapcsolt nem áll fenn. Születési súlya 2160g, Apgar értéke 8/9. Szívzöreje miatt kardiológiai vizsgálatokat végeztek, ahol subaortikus ventrikuláris szeptum defektust észleltek, emellett perzisztáló foramen ovale és perzisztáló ductus arteriosus volt megfigyelhető. Hasi ultrahang vizsgálat során normális szerkezetű, de kisebb méretű veséket találtak. Koponya ultrahang a corpus callosum diszgenezisét mutatta.

Két hónapos korában kórházba került étkezési zavarok és hipoglikémia (vércukor szintje 1.2 mmol/L) miatt. A betegen megfigyelhető volt a súlyos disztrófia, az izom hipotónia, dizmorfiás arcvonások, mint az arc aszimmetriája (hemihipertrófia az arc baloldalán), rövid jobboldali szemrés, hosszú szempillák, aszimmetrikus fülek ahol a jobb fül diszplasztikus, kisebb és alacsonyabban volt található, mint a bal fül, rövid philtrum és magas szájpadrólás. A kórházi tartózkodás alatt tudatzavart és atóniás periódusokat figyeltek meg, ami miatt konvulzióra gyanakodtak, de ezt az elvégzett EEG nem támasztotta alá.

Három hónapos korában a veleszületett szív defektusok (nyitott kamrai szeptum, foramen ovale és ductus arteriosus) miatt műtétre szorult, a posztoperatív időszak eseménytelenül telt, a pulmonális nyomás normalizálódott. Egy előre haladott atrioventrikuláris (AV) elzáródás miatt ideiglenesen pacemarkerre volt szüksége. Miután kiengedték a kórházból, rendszeresen vizsgálták a kardiológiai klinika járóbeteg rendelésén.

Négy hónappal a műtét után ismét kórházba került pulmonális hipertenzió miatt. Mellkasi röntgen vizsgálat során észlelték, hogy a bal tüdőben az artériák elágazásának száma alacsonyabb. Felmerült, hogy ez veleszületett rendellenesség, azonban a perzisztens nem recanalizálható trombózis lehetősége sem volt kizárható. Ezt követően kardiomegáliát (jobb szívfél megnagyobbodás) és megnövekedett tágult pulmonális törzset észleltek, ami a megnövekedett pulmonális artériás nyomás következtében alakult ki. Axiális és rekonstruált CT felvételeken baloldali (balra helyezett) vena cava

superior és egy atípusosan (baloldalon) elhelyezkedő, nem azonosítható véna volt megfigyelhető. Az emelkedett nagyvérköri nyomás miatt a vena cava inferior és a máj vénák kitágultak. Majd a jobb mellkasfélben hydrothorax alakult ki, és tüdő parenchyma károsodott. A súlyos visszatérő gyulladások immunhiányos állapotra utaltak, amit a fehér vérszámok flow citometria vizsgálatát alátámasztott, mivel szignifikánsan csökkent limfocitákat detektáltak.

Bár a neonatális időszakban csökkent kalcium szintet és magas parathormon szintet találtak, a klinikai kép alapján felmerült a DiGeorge szindróma lehetősége, azonban az elvégzett vizsgálattal a mikrodéliót kizárták. A gyermek betegsége folyamatos progressziót mutatott, generalizált ödéma jelentkezett, jobb szívfél elégtelenség lépett fel, és visszatérő fertőzések miatt a betegnek folyamatos gépi lélegeztetésre volt szüksége. A kezelés ellenére a gyermek 9 hónapos korában meghalt. Anyagcsere betegségek gyanúja miatt vizelet szerves sav, szérumsav és ammónia vizsgálatot, valamint szérumsav transferrin izoelektromos fókuszálást végeztek a congenitális glikozilációs zavarok kizárása céljából, ezek a vizsgálatok azonban mind negatív eredményt adtak. Kariotipizálás során kromoszómális eltérést nem találtak, és a DiGeorge régió (22q11.2) FISH analízise sem mutatott deléciót.

5.2. Második eset

A második beteg egy 5 éves kislány, aki császármetszéssel született a 39. héten egészséges, magyar származású szülők második gyerekeként. A szülők közt rokoni kapcsolat nem áll fenn. A családi anamnézisben komolyabb betegség nem fordult elő. Születési súlya 2750 g (25-50 pc), hossza 49 cm (5-10 pc) a fej körfogata 36 cm (+1SD). Az 5 és 10 perces Apgar értéke 9/10.

A perinatális időszakban enyhe sárgaságot, csípőízületi lazaságot, axiális hipotóniát és etetési nehezítettséget figyeltek meg. Egy hetes korában súlyos axiális hipotóniát és spasztikus alsó végtagok miatt neurohabilitációt indítottak, azonban csak minimális javulás volt észlelhető. Három hónap múlva a szomatikus és pszichomotorikus fejlődése lelassult, ami azóta is nagyon lassú. Hat hónapos korában obstruktív bronchitis miatt hospitalizálták, az első életévben számos felső légúti fertőzés zajlott, krónikus hasmenés lépett fel, ezért CFTR gén vizsgálata megtörtént, azonban eltérést nem észleltek. 14 hónapos korában agyi MR vizsgálat történt,

ventrikulomegáliát, csökkent periventrikuláris fehérállományt és a corpus callosum hipopláziát detektáltak.

A beteg 8 hónapos korában került Intézetünk genetikai tanácsadójába a súlyos hiptónia és minor anomáliái miatt. Ekkor a beteg súlya 9.5 kg (5-10 pc), magasság 68 cm (< 3 pc), és a fejkörfogat 48.5 cm (+ 1 SD) volt. Dizmorfiás státuszában a széles homlok, frontális kiboltosulás, lefelé ívelő szemrész, távol álló szemek, alacsonyan ülő fülek, antevertált orr, rövid philtrum, kicsi száj, magasan ível szájpadlás és rövid kicsi lábak és kezek, elvékonyodó ujjak, és ízületi lazaság volt megfigyelhető. Neurológiai státuszában változtalanul súlyos izom hipotónia és a beszédfejlődés jelentős elmaradása volt detektálható, motoros fejlődése mindvégig jelentős késést mutatott, 2,5 éves korában még nem ült, nem mászott és nem állt, járni 5 éves korában tanult meg. Ekkor már megértette a beszédet és gesztusokat, és kézjelekkel kommunikált. Beszédfejlődése még nem indult meg. Viselkedésében sztereotíp mozgások (tapsolás, csapkodás), hiperaktivitás, hetero-és autoagresszió volt.

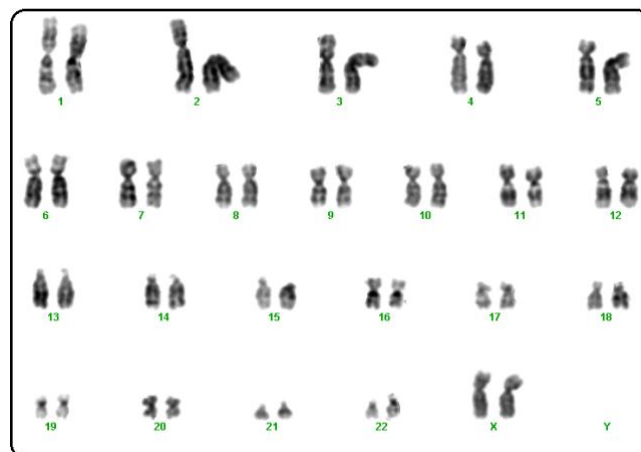
Széles körű metabolikus (karnitin vizsgálat, aminosav, vizelet szerves sav, izoelektromos fókuszálás CDG-re) és genetikai vizsgálatok (kariotipizálás, CFTR, szekvenálás, mitochondriális mutáció vizsgálat) negatívak voltak, mint ahogy az EEG vizsgálat is.

6. EREDMÉNYEK

Az általunk aCGH-el vizsgált 140 komplex fejlődési rendellenességben szenvedő beteg közül a disszertációmban bemutatott két esetben találtunk olyan eltérést, amelyek azonos – mégpedig a 4-es – kromoszómát érintenek. Az egyik egy recurrens, a másik egy non-recurrens kópiaszám-eltérés, amelyek méretük, illetve géntartalmunk révén a kóros fenotípus kialakításáért felelősek.

6.1. Első eset

A látott klinikai kép alapján a beteg kislánynál genomi rendellenesség volt feltételezhető, ezért elsőként kromoszóma vizsgálatra került sor, amely normál kariotípust mutatott (10. ábra). Mivel a hagyományos sávozás nem észlelt eltérést, következő lépésként végeztük el az array CGH vizsgálatot. Array CGH vizsgálat során egy 14,56 Mb kiterjedésű deléciót detektáltunk a 4-es kromoszóma hosszú karjának 4q28.3-31.23-as szakaszán. A deletált szakasz töréspontjainak ismeretében (GRCh37, chr4:136.127.048 – 150.690.325) azonosítottuk a kiesett szakaszban elhelyezkedő géneket.

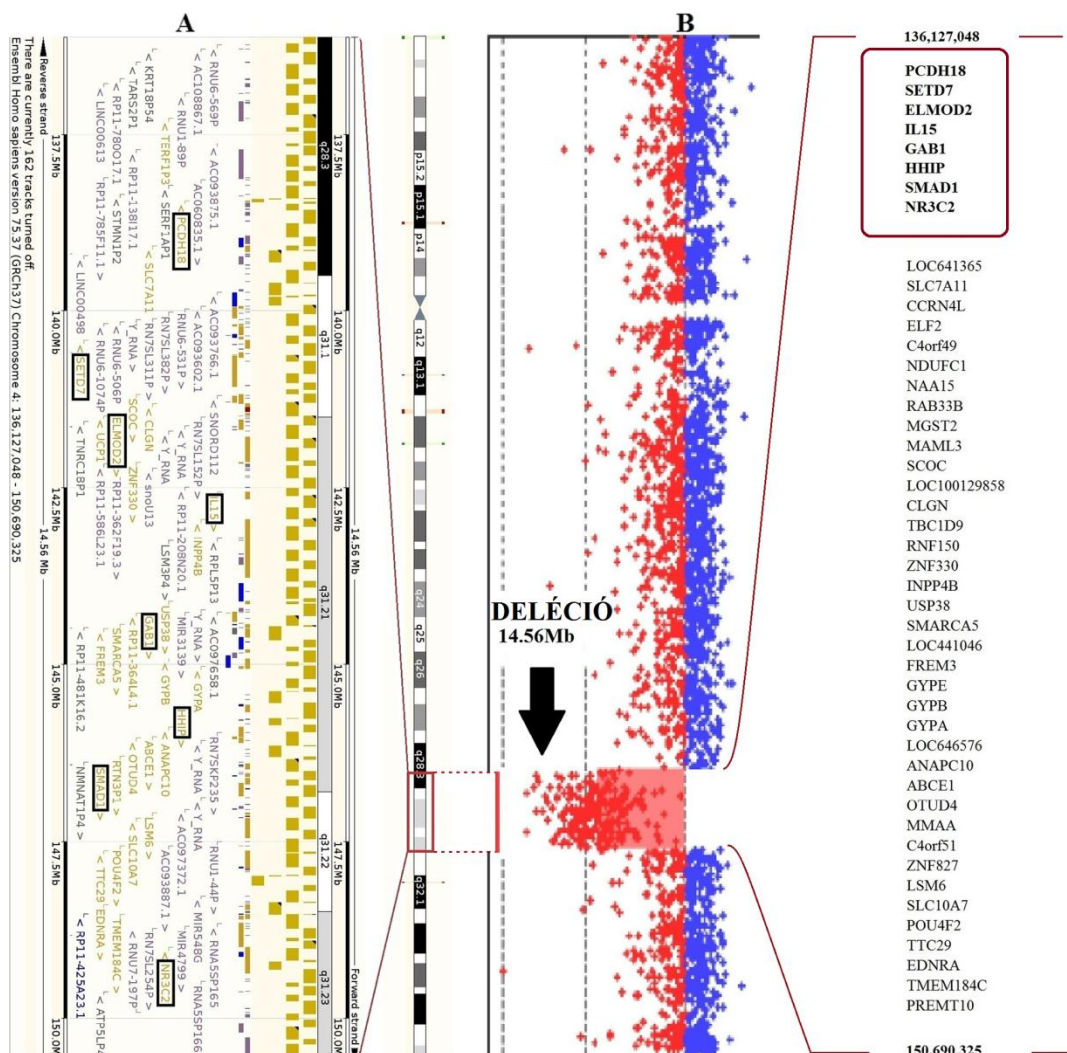


10. ábra: Első beteg normál kariogramja

A deletált szakasz 47 gént tartalmaz: *PCDH18*, *LOC641365*, *SLC7A11*, *CCRN4L*, *ELF2*, *C4orf49*, *NDUFC1*, *NAA15*, *RAB33B*, *SETD7*, *MGST2*, *MAML3*, *SCOC*, *LOC100129858*, *CLGN*, *ELMOD2*, *TBC1D9*, *RNF150*, *ZNF330*, *IL15*, *INPP4B*, *USP38*, *GAB1*, *SMARCA5*, *LOC441046*, *FREM3*, *GYPE*, *GYPB*, *GYPA*, *LOC646576*,

HHIP, ANAPC10, ABCE1, OTUD4, SMAD1, MMAA, C4orf51, ZNF827, LSM6, SLC10A7, POU4F2, TTC29, EDNRA, TMEM184C, PREMT10, ARHGAP10, NR3C2. Ebből a 47 génből 8 gén esetében véltünk felfedezni kapcsolatot a beteg fenotípusával. Ez a 8 gén a PCDH18, SETD7, ELMOD2, IL15, GAB1, HHIP, SMAD1, NR3C2 (11. ábra).

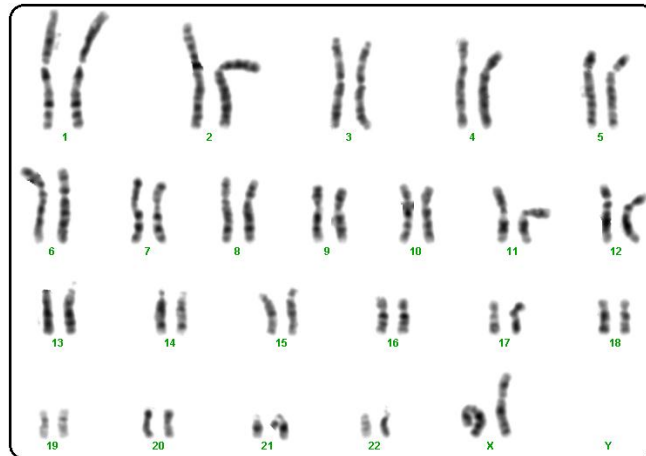
A beteg szüleinek aCGH vizsgálatát is elvégeztük annak megállapítása érdekében, hogy öröklött vagy *de novo* kópiaszám eltérésről van-e szó. A szülők egyike sem hordozta a gyermekben talált deléció. Az aCGH eredményeket a családtagokban metafázis FISH segítségével konfirmáltuk.



11. ábra: Az 1. beteg deletált régiójának (4q28.3-31.23) (B) aCGH képe és (A) a régióba eső gének Ensembl képe.

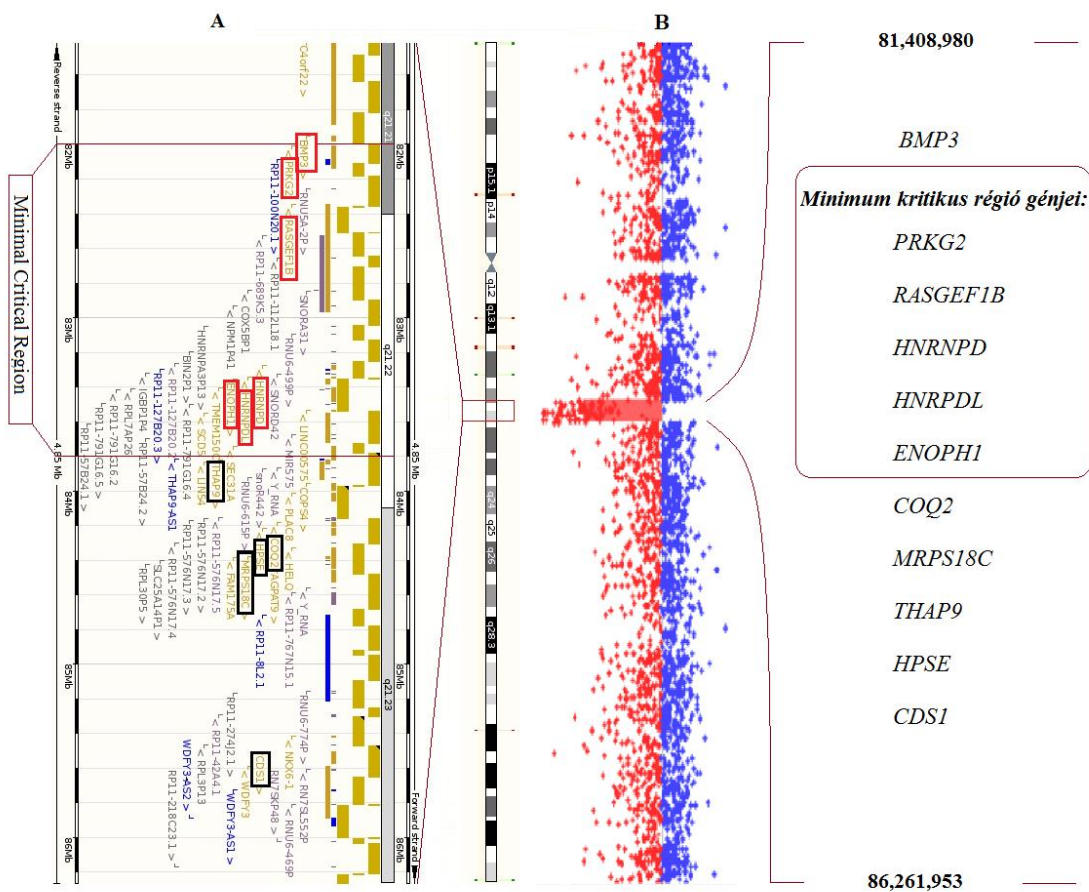
6.2. Második eset

A beteg negatív kromoszóma vizsgálata után került aCGH vizsgálatra (12. ábra), mely során egy 4,85 Mb méretű intersticiális deléciót mutattunk ki a 4-es kromoszóma hosszú karjának 4q21.21-21.23 szakaszán (13. ábra).



12. ábra: Második beteg normál kariogramja

A töréspontok ismeretében (GRCh37, ch4: 81.408.980 – 86.261.953) megállapítottam, hogy a deletált szakasz a következő géneket tartalmazta: *BMP3*, *PRKG2*, *RASGEF1B*, *HNRNPD*, *HNRPDL*, *ENOPH1*, *COQ2*, *MRPS18C*, *THAP9*, *HPSE*, *CDS1*. A beteg szüleinek vizsgálata során nem detektáltunk a beteghez hasonló eltérést a 4-es kromoszóma hosszú karján, mely így *de novo* eredetűnek bizonyult. Az eredményeket metafázis FISH segítségével konfirmáltuk.



13. ábra: A 2. beteg deletált régiójának (4q21.21-21.23) (B) aCGH képe és (A) a régióba eső gének Ensembl képe.

7. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

7.1. Első eset

7.1.1. A detektált eltérés által érintett gének feltételezhető szerepe az első beteg fenotípusának kialakulásában

Az array CGH vizsgálat során detektált 14,56 Mb méretű deléció számos olyan gént érint, melynek haploinsufficienciája állhat a beteg fenotípus jegyeinek hátterében. Az egyik ilyen a *PCDH18* (*608287) gén, mely a deletált szakasz (ch4:138.440.071-138.453.628) proximális végén helyezkedik el, és már számos esetben hozták összefüggésbe szellemi elmaradással. A *PCDH18* gén által kódolt fehérje a protocadherine családjába tartozó protocadherin 18-at kódolja, mely szerepet játszhat a sejt-sejt kapcsolatok kialakításában legfőképp az agyban. A vizsgált gyermek esetében a fejlődésbeli elmaradás egyértelműen megállapítható volt. A szakirodalomban eddig ismertetett 4q intersticiális deléciós esetek érintett szakaszai, ahol a klinikai tünetek között szerepelt a szellemi elmaradás, részben átfedést mutatnak a mi betegünkével. Kasnauskiene J. és munkatársai egy olyan esetet közöltek, melyben a beteg súlyos fejlődési rendellenességben szenvedett, és az array CGH segítségével detektált 1,53 Mb deléció egyetlen egy gént érintett, a *PCDH18*-at [46]. Mindezek ismeretében feltételezhetjük, hogy a *PCDH18* gén kópiaszámbeli eltérése okozhatta betegünk fejlődési elmaradását.

A *SETD7* gén (*606594) (ch4:140.417.095-140.527.853) által kódolt fehérje a hiszton metiltranszferáz H3H4, mely szerepet játszhat a neurális gének expressziójának epigenetikai szabályozásában a lizin metiltranszferáz funkción keresztül. Wang és munkatársai különböző epigenetikai változásokért felelős gének expresszióját vizsgálták neuronális szöveteken, mint a hESC (humán embrió összejt) és az agykéreg [47]. A *SETD7* expressziója emelkedett értéket mutatott minden esetben, azonban az agykéregben mért érték ötszöröse volt a hESC-ben mértnek, mely felveti a *SETD7* szerepét a neuronális gének szabályozásában. Feltételezhetjük, hogy betegünkben a *SETD7* kópia vesztes befolyásolhatja a neuronális gének szabályozását, ezáltal szerepet játszva a kognitív fejlődésének elmaradásában.

Betegünk laboreredményei csökkent limfocita számot mutattak, mely felelőssé tehető az immunhiányos állapot kialakulásáért. A ch4:142.557.752-142.655.140 pozícióban detektált *IL15* gén (*600554) egy citokint kódol, mely a T-limfociták aktivációját és proliferációját befolyásolja. A memória sejtek, különösképp a CD8+ T-limfociták osztódása lassan megy végbe az emlősökben. Ku és munkatársai felfedezték, hogy a CD8+ T-sejtek osztódásához elengedhetetlen az interleukin 15. Mindemellett, amikor az *IL2* gén gátlás alatt van, a T-sejtek osztódása rohamosan megnő. Valószínűsíthetően az *IL15* és az *IL2* együttesen tartja ellenőrzés alatt a CD8+ T-sejtek osztódását [48]. Az *IL15* dózis változása magyarázatot adhat a betegben észlelt alacsony limfocita számra.

A *GAB1* gén (ch4:144.257.915-144.395.721) (*604439) által kódolt adaptor fehérje direkt szubsztátja az epidermális növekedési faktor receptornak (EGFR), és fontos szerepet játszik a tubulogenezisben. A betegben megfigyelt vaszkuláris tüdőmalformáció, mely hatással volt mind a tüdőartériákra, mint a vénákra, és az ebből kialakuló pulmonális hipertenzióra, összefüggésbe hozható a tubulogenezisben lejátszódó valamilyen defektussal [49, 50], ami a *GAB1* gén kópia elvesztéséből fakadó dózis eltéréssel hozható kapcsolatba.

Kapcsolatba hozható a pulmonális hipertenzióval egy másik, a betegünkben deletált gén is, a *HHIP* (*606178) (ch4:145.567.173-145.666.423). A gén által kódolt fehérje, mely egy szabályozó fehérje a Hh (hedgehog) jelátviteli útvonalban, a morfogenezis szabályozásában vesz részt. Zhou és munkatársai csökkent *HHIP* mRNS és fehérje jelenlétét detektálták COPD-ben szenvedő betegekben [51, 52]. Li és munkatársai erős kapcsolatot véltek felfedezni a *HHIP* és az asztmás betegek abnormális tüdőfunkciója között [53, 54]. Ez alapján nem zárható ki a lehetséges összefüggés a rendellenesen fejlődő tüdő és a *HHIP* gén között a betegünkben.

A *SMAD1* gén (*601595) (ch4:146.402.346-146.479.231) deléciója szintén összefüggésbe hozható a pulmonális hipertenzióval. Han és munkatársai knock-out egereken végzett kísérletei bizonyították, hogy összefüggés mutatható ki a *SMAD1* hiánya és a pulmonális hipertenzió között [55]. Pannu és munkatársai a *SMAD1* szerepének fontosságát észlelték a fibrózis kialakulásában [56]. Nasim és munkatársai pedig hasonló következtetésre jutottak, amikor egy 47 éves francia nőt vizsgáltak pulmonális hipertenzióval [57].

Szakirodalmi adatok alapján az *ELMOD2* (*610196) (ch4:141.445.312-141.474.924) szerepet játszhat a familiáris idiopátiás pulmonális fibrózisban [58], azonban a beteg tüdejének parenchimális állapotáról nem áll rendelkezésünkre adat.

A deletált régió disztális szakaszában helyezkedik el az *NR3C2* (nuclear receptor subfamily 3, group C) (*600983) gén (ch4:148.999.913-149.365.850), ami egy sejtmagi minerálkortikoid receptort kódol. A receptor fontos szerepet tölt be a szervezet nátrium koncentrációjának szabályozásában, ami befolyásolja a test folyadék háztartását és a vérnyomást. A receptor fehérje 984 aminosavból épül fel, mely 3 részre tagolható, egy N-terminális szakaszra, egy DNS kötő szakaszra és egy ligand kötő szakaszra [59]. A ligand kötő szakasz képes megkötni a mineralkortikoidokat, minek következtében a receptor a sejtmagba transzportálódik, és a DNS-kötő szakasz már képes kapcsolódni a megfelelő génszakaszhoz, hogy aktiválja annak transzkripcióját, melyet az N-terminális szakasz képes szabályozni. Abban az esetben, ha a receptort kódoló génben mutáció történik vagy deletálódik a gén egy kópiája, a képződő fehérje nem tudja megfelelően ellátni a feladatát. Számos publikáció hozta már összefüggésbe az *NR3C2* gén mutációit olyan betegségek kialakulásával, mint a hyponatraemia és a pszeudohypoaldoszteronizmus1-es típusa (PHA1). Ennek ismeretében feltételezhetjük, hogy a gén kópiaszámának eltérése eredményezhette a betegben detektált alacsony nátrium szintet [60].

7.1.2. Az első beteg összehasonlítása a szakirodalomban közölt esetekkel

Az első betegben észlelt, a 4q28 régiót érintő delécióinak megfelelő eltérések meglehetősen ritkán fordulnak elő a szakirodalomban, különösen az olyan publikációk, amelyek értékelhető fenotípusos leírást is tartalmaznak a betegekről. Az 1. táblázat-ban összesítettem a saját betegünk (első beteg) illetve a szakirodalomban megtalálható betegek (11 eset) fenotípusos jellemzőit.

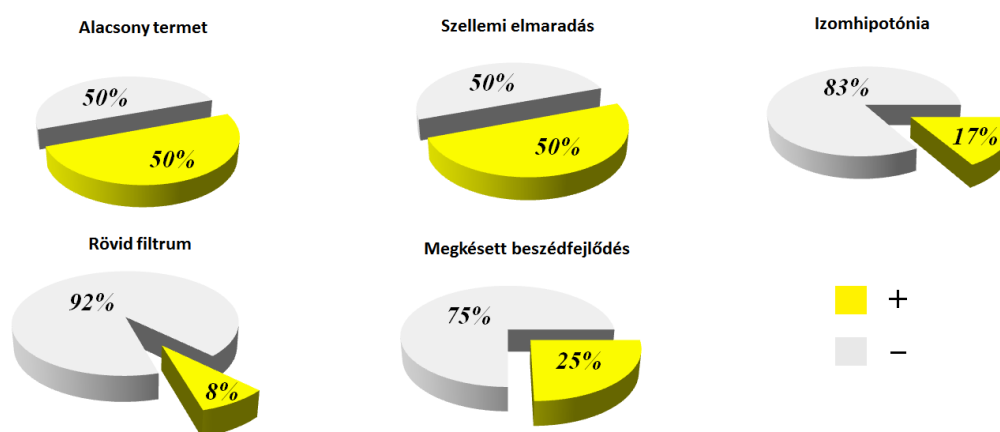
1. táblázat: 4q28 deléciós esetek fenotípusos összehasonlítása

	Első beteg	4q28.3 deléciós esetek a DECIPHER adatbázisból										
		310.	248279.	249210.	249370.	251834.	253743.	261263.	268127.	275153.	287709.	301503.
Pozíció	4q28.3-q31.23	4q28.3-4q31.1	4q28.3-31.23	4q28.1-31.21	4q28.3-31.21	4q28.1-31.21	4q31.21-31.23	4q26-31.1	4q27-31.1	4q28.3-31.21	4q28.3-31.21	4q28.3-31.21
Méret	14,56 Mb	3,76 Mb	10,11 Mb	17,63 Mb	3,27 Mb	21,19 Mb	4,88 Mb	24,30 Mb	20,11 Mb	9,69 Mb	3,90 Mb	8,36 Mb
Kor	3/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Intrauterin növekedés elmaradás	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Alacsony termet	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+
Növekedési elmaradás	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Nehéz táplálhatóság	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Frontális kiboltosulás	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alacsonyan ülő fülek	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
Hipertelorizmus	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Felfelé álló szemrész	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Lefelé álló szemrész	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Rövid szemrész	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hosszú szempillák	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Előre tekintő ornyílások	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Vaskos orr	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Rövid filtrum	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mély filtrum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Magas szájpád	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Szájpád hasadék	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Mikrognátia	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Bőr hipopigmentáció	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
I. lábujj eltérés	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V. ujj klinodaktília	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Izomhipotónia	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Absence rohamok	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ASD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Corpus callosum diszgenézis	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Szellemi elmaradás	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
Megkésett beszédfejlődés	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Teljes fejlődésbeli elmaradás	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Atrioventricularis sövény defektus	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Kamrai szeptum defektus	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pitvari szeptum defektus	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Pulmonális hipertenzió	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Az összehasonlító táblázat jól szemlélteti, hogy bár a betegekben detektált CNV-k töréspontjai viszonylag közel esnek egymáshoz, az észlelt fenotípusos jellemzők rendkívül heterogén képet mutatnak. Ennek oka, hogy az adatbázisokba felvitt beteg fenotípus adatok hiányosak, nem azonos részletességgel és szempontok alapján íródtak. Ez a jelenség jól tetten érhető olyan nagyméretű deléciók esetében, melyek részben vagy egészben átfednek az általam detektált eltéréssel azonban a betegek fenotípusos eltérései a deléció méretéhez képest szegényesek, pedig ezt a géndenitász és dózisszenzitivitás nem indokolná. Az adatok értékelését nehezíti a DECIPHER adatbázisban rögzített eltérések esetében a betegek korának hiányos feltüntetése így nem tudhatjuk, hogy a töréspontok alapján feltételezhetően megjelenő tünetek hiánya abból fakad, hogy túl fiatal volt a beteg és vizsgálatakor még nem jelentek meg a tünetek, vagy pedig a későbbiekben sem mutatta a tüneteket.

Összeségében azonban elmondható, hogy minden 4q28.3 régiót érintő deléciós eltérésben megfigyelhető volt fejlődésbeli defektus, mely a legtöbb esetben mentális zavarokkal társult, azonban a első betegben megfigyelt pulmonális hipertenzió egyik adatbázisban leközölt esetben sem volt megfigyelhető.

Amint azt a 14. ábra mutatja, a fenotípusos jellemzők közül előfordulási arányai alapján öt tünet emelhető ki.



14. ábra: 4q28 deléciós esetek gyakori fenotípusos jellemzői

A tünetek közül kiemelhető az alacsony termet és a szellemi elmaradás, melyek az esetek 50 %-ában megfigyelhetőek voltak. Érdekes még kiemelni a megkésett

beszédfejlődést is, mely az esetek 25 %-ánál volt jellemző. Továbbá az izomhipotónia és a rövid filtrum is jelentősen nagyobb arányban fordult elő a betegeknél. Megfigyelhető azonban, hogy egyik tünet előfordulási gyakorisága sem haladja meg az 50 %-ot.

7.2. Második eset

7.2.1. A detektált eltérés által érintett gének feltételezhető szerepe a második beteg fenotípusának kialakulásában

Számos tanulmány született a 4q21 mikrodeléciós szindrómáról és annak gyakori tüneteiről, mint a növekedési elmaradás, hipotónia, súlyos fejlődési elmaradás megkésett beszédfejlődéssel vagy annak teljes hiányával, kis kezek és lábak, jellegzetes arcvonások, mint a széles homlok, hipertelorizmus és a kiemelkedő alsó és felső metszőfogak [51, 61-68]. A minimális kritikus régiót, melynek érintettsége szükséges a 4q21 mikrodeléciós szindróma tüneteinek kialakulásához, már régóta ismert. Az 1,37 Mb méretű régió 5 ismert gént tartalmaz (*PRKG2*, *RASGEF1B*, *HNRNPD*, *HNRPDL*, *ENOPH1*) [65]. Betegünk összehasonlítása más, korábban a szakirodalomban leírt esetekkel számos hasonló tünetet mutatott, azonban néhány eltérőt is.

A betegünkben detektált 4,85 Mb deléció tartalmazza a 4q21 mikrodeléciós szindróma minimális kritikus régióját, a korábbi publikációkban leírt meghatározó génekkel egyetemben, mint a *PRKG2* és a *RASGEF1B*. Az ezidáig leírt legkisebb deléció ebben a régióban 2 Mb kiterjedésű volt. Ebben az esetben a deléció 3 gént tartalmazott: *HNRNPD*, *HNRPDL* és az *ENOPH1*, ami nem csak a betegünkben detektált eltérés pozíciójával, de a beteg fenotípusával is hasonlóságot mutatott. Mindkét betegnél makrocefália, kis kezek és lábak, fejlődési elmaradás, jellegzetes arcvonások, mint a széles homlok, hipertelorizmus és a kiemelkedő alsó szemfogak voltak megfigyelhetőek. A hasonlóságok a két beteg fenotípusos jegyei között, illetve az átfedő régiók és gének megerősítik, hogy a *HNRNPD*, a *HNRPDL* és az *ENOPH1* gének dózis eltérése szerepet játszhat a betegünk klinikai tüneteinek kialakításában [67].

Az irodalomban leírt esetekben a dizmorfiás jellemzőkkel egyetemben jellegzetes brachidactilia volt megfigyelhető, ezzel ellentétben betegünkben ez kevésbé kifejezett volt, továbbá nem volt megfigyelhető a klasszikus fenotípusos képen megjelenő rövid

második lábujj sem. Laza és hipermobilis ízületek szintén megfigyelhetők voltak betegünk esetében, ahogy egy nemrég leírt 24,89 Mb-t érintő proximális 4q intersticiális deléció esetében is [69]. A közös neurokognitív jellemzők mellett, melyek a legtöbb 4q21 mikrodéléció esetében megfigyelhetők voltak, jellemző volt betegünkben többek között a sztereotíp mozgás és a viselkedésbeli zavar, esetenként előforduló önbántalmazó magatartás és agresszió. A beszéd hiánya ellenére betegünk fogékonyságot mutatott a jel kommunikációra, mely nagyfokú hasonlóságot mutat a proximális 4q deléció eset kapcsán leírt tünetekkel.

Az általunk detektált 4,85 Mb deléció olyan géneket érint, melyeket korábban már kapcsolatba hoztak a 4q21 mikrodéléció szindrómával, azonban a gének szerepének meghatározása a fenotípusra még nem teljesen tisztázott. A klasszikus 4q21 fenotípus kialakításához elengedhetetlen a minimális kritikus régió haploinsufficienciája. A régióban elhelyezkedő *PRKG2* és *RASGEF1B* géneket már korábban azonosították, mint a jellegzetes tünetekért felelős faktorokat. A *RASGEF1B* gén kódolja a Ras fehérjecsaládhoz funkcionálisan kapcsolt, erősen konzervált guanin nukleotid kicserélő faktort (RAS – Guanine nucleotide Exchange Factor). A fehérje szupercsalád tagjai olyan alapvető sejtfunkciókban vesznek részt, mint a szignáltranszdukció, citoszkeleton dinamika és az intracelluláris transzport. Magas expressziót mutatnak a központi idegrendszerben, és feltételezhetően szerepet játszanak az aktin és microtubulus dinamika szabályozásában, mind a dendrit, mind a gerincevelő strukturális plaszticitásában [70]. Mivel számos Rho-GTPáz jelátviteli gént hoztak már kapcsolatba az értelmi elmaradással, a *RASGEF1B* valószínűsíthetően szerepet játszik a 4q21 fenotípus kognitív jellemzőinek kialakításában.

Erős bizonyíték van arra, hogy a másik alapvető fenotípusos jellemző, a súlyos növekedés elmaradás, a *PRKG2* gén által kódolt cGMP-függő protein kináz II-es típusának tulajdonítható. *PRKG2* null mutációs egerekben posztnatális törpeség alakult ki, ami a növekedési zóna súlyos endochondrális csontosodási defektusának, és a károsodott chondrocyta növekedésnek az eredménye. A legkisebb deletált szakaszt tartalmazó esetben a deléció nem tartalmazta a *PRKG2* gént, bár felfedezhetőek voltak az olyan tünetek, mint a kis kezek és lábak, rövid ujjak, azonban később növekedés elmaradás nem volt tapasztalható. Betegünknel, és azokban a 4q21 mikrodéléció esetekben, amik tartalmazták a minimális kritikus régiót, ezzel ellentétben súlyos növekedés elmaradás volt jellemző. Ezek a megfigyelések is megerősítik, hogy a *PRKG2* gén haploinsufficienciája magyarázatot adhat a növekedési elmaradásra [71].

Emellett a betegünkben detektált deléción számos olyan gént (*BMP3*, *COQ2*, *MRPS18C*, *THAP9*, *HPSE*, *CDS1*) is érint, amelyek nincsenek közvetlen kapcsolatban a megfigyelt fenotípusos jellemzőkkel. Patkány embriókon végzett kísérletek során felvetődött a *BMP3* lehetséges szerepe a végtagok korai csontfejlődésében [72]. *BMP3* -/- embriókban illetve újszülöttekben nem volt tapasztalható a csontvázrendszer defektusa, viszont a csontdenzitás emelkedése volt megfigyelhető a csontok trabekuláris metafizisében [73]. Kutyaon végzett kísérletek során detektált mutáció a *BMP3* génben kapcsolatba hozható a kranioszkeletális elváltozásokkal [74]. Azonban Strehle és munkatársai észrevételei alapján lehetséges kapcsolat állhat fenn a *BMP3* gén haploinsufficienciája és a 4q21 mikrodélációs szindrómás esetekben leírt alacsony termet és a csontvázrendszeri rendellenességek között [75]. Így nem zárható ki, hogy a *BMP3* gén haploinsufficienciája hozzájárulhat az olyan koponya jellemzőkhöz, mint a széles homlok és a frontális kiboltosulás, melyek megfigyelhetőek voltak betegünk esetében is.

A *HPSE* gén az endoglükozidáz családba tartozó heparanáz kódoja, ami a heparán szulfát proteoglikánok (HSPGs – Heparan Sulfate Proteoglycans) heparán szulfát oldalláncait vágja le. Hozzájárulnak a sejtek mozgásához az extracelluláris mátrix újramodellezésével vagy bioaktív molekulákat bocsájtanak az extracelluláris mátrixba [76]. Vlodavsky és munkatársai korrelációt mutattak ki a *HPSE* expresszió és a heparanáz aktiváció között [77]. Jelenleg nem mutatható ki közvetlen kapcsolat a *HPSE* funkciója és a fejlődési rendellenesség között, azonban feltételezhető, hogy az extracelluláris mátrix újramodellező funkciónak esszenciális szerepe lehet az idegrendszeri fejlődésben.

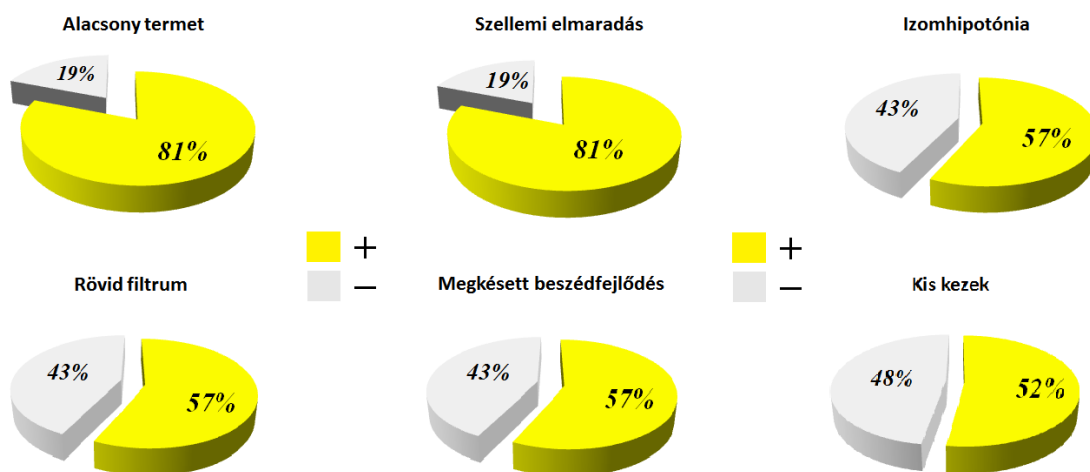
7.2.2. A második beteg összehasonlítása a szakirodalomban közölt esetekkel

Ellentétben az első betegben detektált eltéréssel, a második betegben talált eltérés egy 2010 óta ismert mikrodélációs szindróma. Azonban ezzel együtt is csak kevés olyan esetet közöltek eddig a szakirodalomban, mely a 4q21-es régiót érinti. A 2. táblázat összehasonlítja a 4q21 mikrodélációs esetekben előforduló főbb tüneteket.

2. táblázat:4q21 deléciók esetek összehasonlítása a főbb tünetek tükrében

		Pozíció	Méret	Kor	Alacsony termet	Szellemi elmaradás	Izomhipotónia	Kis kezek	Megkésett beszédfejlődés	Rövid filtrum
Második beteg		4q21.21- q21.23	4,85 Mb	5	+	+	+	+	+	+
4q21 deléciók esetek a DECIPHER atabázisból	944.	4q21.21- 22.1	11,7 Mb	-	+	+	-	-	-	+
	4539.	4q21.21- 21.23	3,12 Mb	-	-	+	+	-	+	+
	4665.	4q21.21- 21.23	4,48 Mb	-	+	+	-	-	+	-
	251258.	4q21.1- 21.22	5,95 Mb	-	+	+	-	-	-	+
	252386.	4q21.21- 21.22	2,19 Mb	-	+	+	-	-	-	-
	271211.	4q21.22- 21.23	1,82 Mb	-	-	-	+		+	+
4q21 deléciók esetek az ECARUCA adatbázisból	4846'.	4q21.21- 21.23	5,19 Mb	46	+	+	-	+	-	-
	4804'.	4q21.22- 21.23	1,98 Mb	14	+	+	+	+	-	-
	4932'.	4q21.22- 21.23	2,10 Mb	48	+	+	-	+	-	-
Bonnet et al. 2010.	1.	4q21.1- 21.22	6,6 Mb	3/4	+	+	+	+	-	-
	2.	4q21.1- 21.23	9,6 Mb	1	+	+	-	+	-	-
	3.	4q13.3- 21.21	13,5 Mb	2	+	+	+	+	+	+
	4.	4q21.21- 22.3	15,1 Mb	8	-	-	+	-	+	+
	5.	4q21.21- 21.22	3,2 Mb	12	+	+	+	+	+	+
	6.	4q13.3- 21.23	9,7 Mb	13	+	+	+	+	+	+
	7.	4q21.21- 21.23	6,3 Mb	13	-	+	+	-	+	-
	8.	4q21.21- 21.23	4,5 Mb	23	+	-	-	+	+	+
	9.	4q21.21	5,5 Mb	23	+	+	-	-	+	+
Friedman et al.	3476.	4q21.21- 22.1	11,1 Mb	18	+	+	+	+	-	+
Harada et al.	-	4q21.1- 22.2	14,8 Mb	7	+	-	+	-	+	-

Ahogy a 2. táblázat mutatja, a 4q21 mikrodeléciós betegek fenotípusos vonásai sokkal inkább homogén képet mutatnak. A főbb tünetek többsége minden egyes betegben megfigyelhető volt.

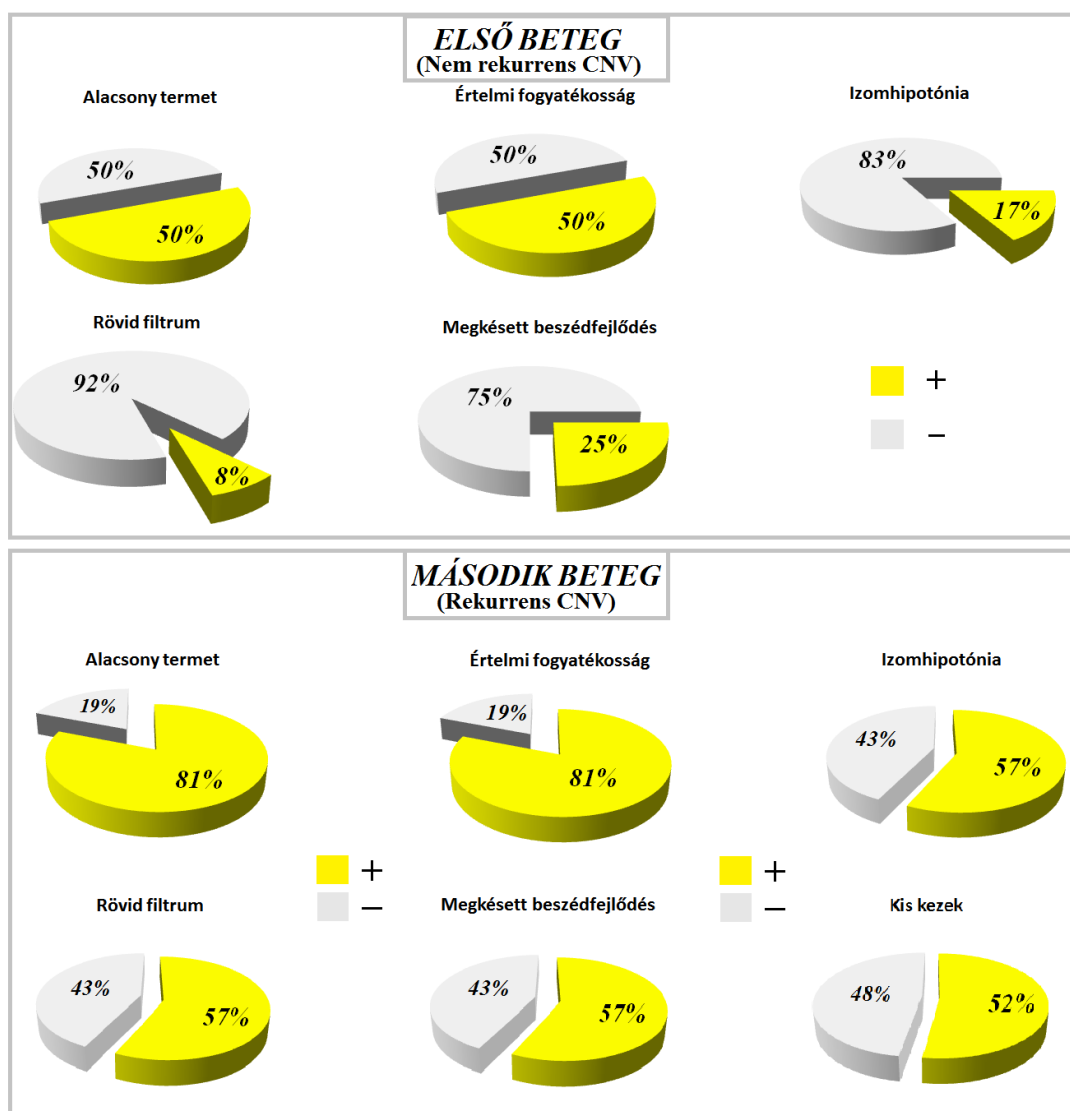


15. ábra: A 4q21 mikrodeléciós esetek főbb tüneteinek százalékos eloszlása

A 15. ábra szemlélteti a főbb tünetek eloszlását. Megfigyelhető, hogy az esetek 81 %-ában az alacsony termet és a szellemi elmaradás volt felfedezhető. Továbbá észlelhető volt az esetek több mint 50 %-ában az izomhipotónia, a megkésett beszédfejlődés, a rövid filtrum és a kis kezek, mint tünetek.

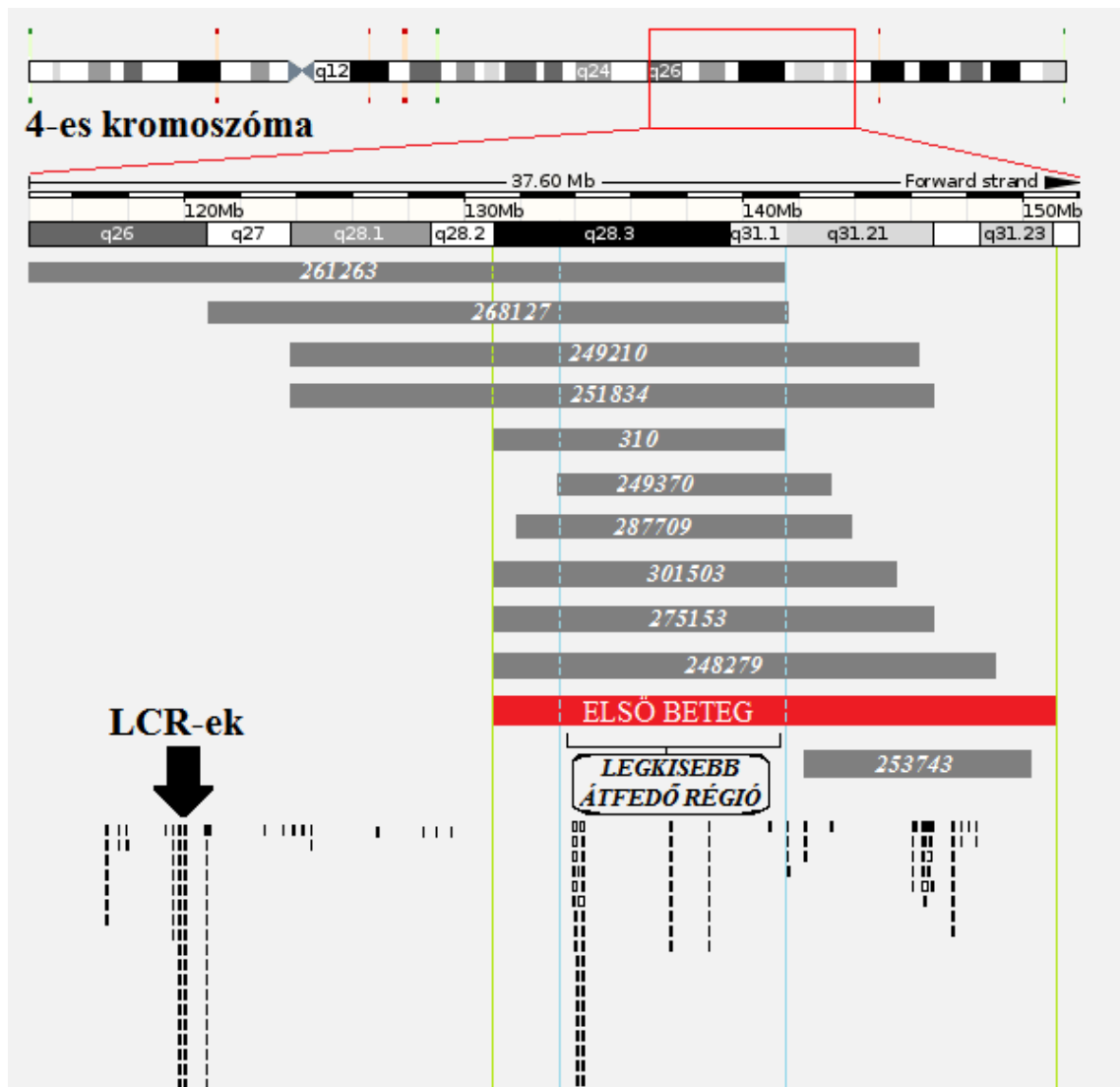
7.3. Nem rekurrens és rekurrens CNV-k összehasonlítása

Az első betegben detektált 14,56 Mb méretű deléció által érintett genomi régiót és a beteg fenotípusát a szakirodalmi esetekkel összevetve elmondható, hogy az esetek sem töréspontban, sem pedig klinikai tünetekben nem mutatnak nagyfokú hasonlóságot. Ellentétben ezzel a második betegben detektált 4,85 Mb méretű deléció által okozott fenotípusos tüneteket összevetve az irodalomban ismeretes hasonló töréspontú betegek tüneteivel megállapítható, hogy a tünetek előfordulása a betegekben sokkal egységesebb.



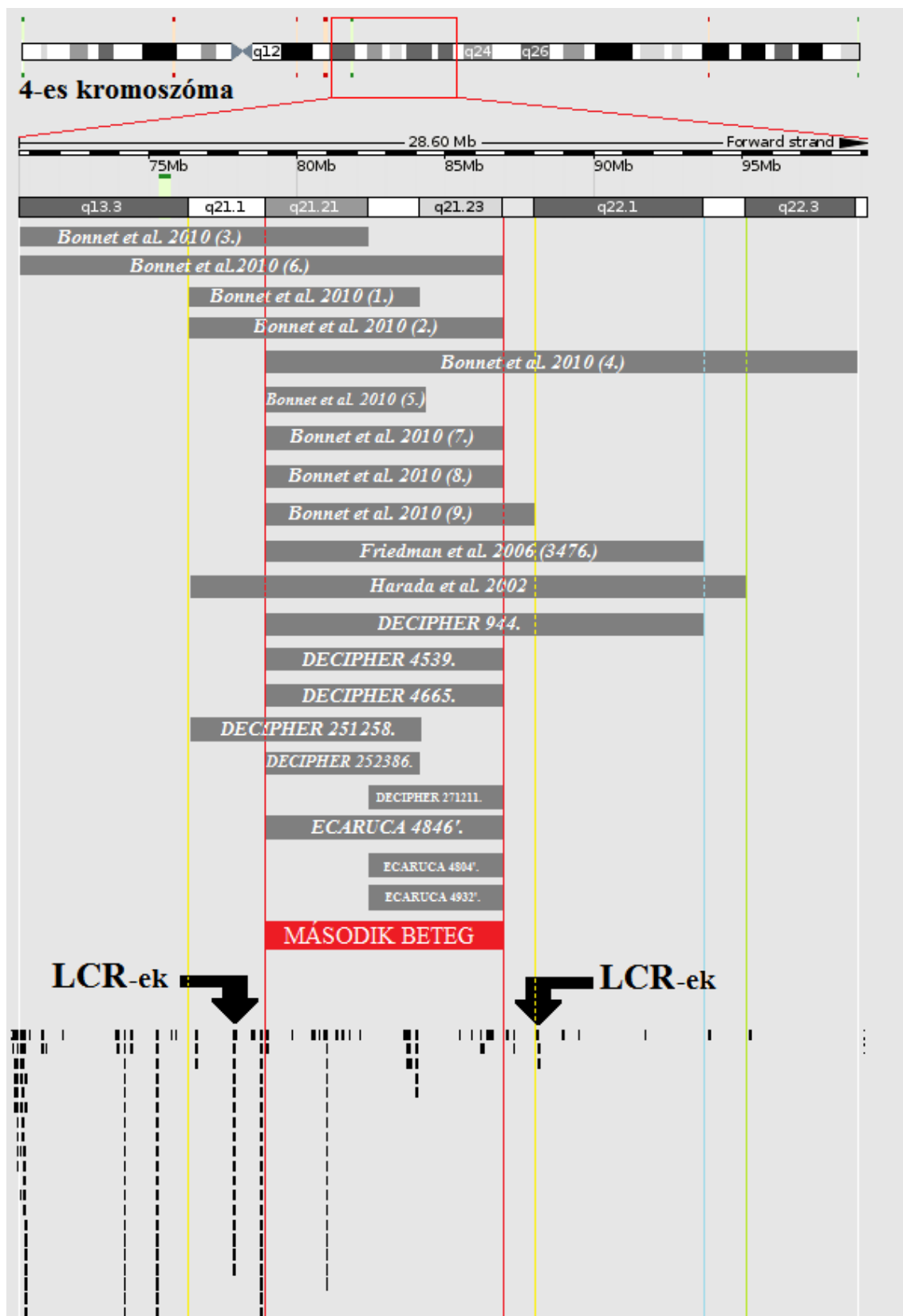
16. ábra: Nem rekurrens és rekurrens CNV-k által kialakított tünetek százalékos megoszlása

Ahogy azt a 16. ábra is mutatja az első betegben és a második betegben a leggyakrabban előforduló tünetek többsége megegyezik egymással, azonban azok előfordulási aránya nagymértékben különbözik egymástól. Míg a második beteg és csoportja esetében az alacsony termet, mint tünet a betegek több mint 80 %-ában fordult elő, addig ez az arány az első beteg és csoportjában nem haladja meg az 50 %-ot. A leggyakoribb tünetek a második csoport esetében kivétel nélkül 50 %-ot meghaladó előfordulási arányt mutatnak. Ennek oka vélhetően a kialakulásuk különböző mechanizmusa lehet.



17. ábra: A 4q28.3-as esetek töréspontjainak összehasonlítása és az általuk kirajzolt legkisebb átfedő régió

Az 4q28.3-as esetek töréspontjait összehasonlítva felfedezhető egy közös szakasz a deletált régiókban, melyet minden deléció tartalmaz (17. ábra). Ezt a szakaszt hívják legkisebb átfedő régiónak. Az is felfedezhető az ábrán, hogy a deléciós töréspontok nem LCR régió közelében helyezkednek el. A töréspontokból jól látszik, hogy nincs egy meghatározott hotspot, ahol a CNV-k kialakulása megjósolható lenne. Ennek okán kimondható, hogy a 4q28.3-as régióban általunk detektált deléció nem rekurrens CNV, tehát a betegünkben talált deléció vagy NHEJ vagy pedig FoSTeS mechanizmus segítségével alakulhatott ki.



18. ábra: A 4q21 mikrodeléciók esetek töréspontjainak összehasonlítása és az LCR régiók ezekre való vetülése

A 4q21 mikrodeléziós esetek töréspontjainak egymásra vetítése során kirajzolódnak a forrópontok mentén kialakuló töréspontok (18. ábra). Minden eset töréspontját levetítve egy pozíció alapú segmentális duplikációkat tartalmazó térképre felfedezhető, hogy a 4q21 mikrodeléziók mindig meghatározott töréspontok mentén alakulnak ki. Mivel ezek a töréspontok az LCR régiók mentén jönnek létre, melyek a NAHR fontos mediátorai a CNV-k kialakításában, elmondható, hogy a 4q21 mikrodeléziós esetek rekurrens CNV-k.

A CNV-k különböző típusait az általunk bemutatott két eseten keresztül ismertette elmondható, hogy a nem rekurrens CNV-k által okozott fenotípusos jellemzők nem mutatnak egységes klinikai képet. Ennek oka a nem rekurrens CNV-k-re jellemző nem determinált töréspont, s ezáltal annak mérete és géntartalma sem megjósolható, melynek következtében a kialakult klinikai kép fenotípusosan variábilis lesz. Ezzel ellentétben a 4q21 mikrodeléziós szindrómára jellemző rekurrens CNV-k LCR mediálta töréspontjaik révén determináltak. Ennek következtében klinikai képük sokkal homogénebb, fenotípus alapján való detektálásuk sokkal valószínűbb.

7.4. Array CGH vizsgálatának prediktálása

Eredményeink és szakirodalmi adatok révén megállapítható, hogy a 4-es kromoszóma genomiális eltérései rendkívül heterogének mind méretük mind kialakulásuk szempontjából. Azonban eredményeink azt mutatják, hogy a rekurrens CNV-k nagy biztonsággal megállapíthatóak a klinikai kép alapján. Véleményünk szerint a normál kromoszómavizsgálat hasonló esetekben szükségét veszíti. Javasoljuk a feltételezhetően rekurrens CNV-k detektálására a hagyományos kromoszóma vizsgálat helyett az array CGH módszert alkalmazni.

8. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Tanulmányomban a következő megfigyeléseket tettem:

1.

Az általunk alkalmazott array CGH módszer segítségével megállapítottuk, hogy a 9 hónapos leánygyermek tüneteiert (első eset), aki növekedési zavarral, fejlődésbeli késéssel, szív-fejlődési és tüdő rendellenességekkel, valamint craniofaciális dysmorfizmussal rendelkezett, egy a négyes kromoszóma hosszú karján (4q28.3-31.23) elhelyezkedő *de novo* 14,56 Mb méretű deléción a felelős, mely 8 gént: *PCDH18*, *SETD7*, *ELMOD2*, *IL15*, *GAB1*, *HHIP*, *SMAD1* és az *NR3C2* érintett.

2.

A deletált gének által kiesett funkciók magyarázatul szolgálhatnak az első beteg esetében a disszertációban részletesen ismertetett klinikai tünetekre (kognitív képességek: *PCDH18*, *SETD7*; immunodeficiencia: *IL15*; alacsony Na ion szint: *NR3C2*), különösen a tüdőbeli vaszkuláris rendellenességek egyedülálló mivoltára (*ELMOD2*, *GAB1*, *HHIP*), valamint a pulmonáris hipertenzióra (*SMAD1*).

Mindezen eredmények nagyban hozzájárulhatnak a 4q CNV-k genetikai spektrumának részletesebb feltárásához és jobb megértéséhez.

3.

A második áltatunk vizsgált 5 éves leánygyermek a Magyarországon első ízben azonosított, jellegzetes 4q21 mikrodeléciós szindrómás fenotípust mutató eset (Második eset). A beteg klinikai tünetei (súlyos fejlődési zavar, beszéd hiánya, magatartásbeli zavar) részben átfedtek a szakirodalomban korábban már ismertetett 4q21 mikrodeléciós szindrómás esetekkel. Betegünknel egy *de novo* 4,85 Mb nagyságú deléciót mutattunk ki array CGH segítségével a négyes kromoszóma hosszú karján (4q21.21-4q21.23). A deletált régió 10 gént *BMP3*, *PRKG2*, *RASGEF1B*, *HNRNPD*, *HNRPDL*, *ENOPH1*, *COQ2*, *MRPS18C*, *THAP9*, *HPSE*, és *CDS1* érintett.

4.

A fent említett régió 10 érintett génjéből, 5 gén a szindrómára jellemző 1.37 Mb méretű, ún. minimális kritikus régió génjei: *PRKG2*, *RASGEF1B*, *HNRNPD*, *HNRPDL*, *ENOPH1*. Ezek közül a *PRKG2* (súlyos növekedésbeli késés) és a *RASGEF1B* (kognitív funkciók) a 4q21 fenotípus fő meghatározó génjei. A *BMP3* gén haploinsufficienciája szerepet játszhat a csont deformitások kialakulásában, mint a frontális kiboltosulás és a széles homlok. A másik 5 érintett gén a *BMP3*, *COQ2*, *MRPS18C*, *THAP9*, *HPSE*, és *CDS1* esetében nem találtunk összefüggést a gének által kódolt fehérjék funkciói, valamint a beteg klinikai tünetei között.

Vizsgálatunk eredményei nagyban hozzájárulhatnak a 4q21 mikrodeléciós szindrómában szenvedő betegek szakszerűbb jövőbeli egészségügyi ellátásához, továbbá kiemeli az array CGH módszer fontosságát az intellektuális zavarok mögött álló lehetséges genetikai háttér feltárásában.

5.

Betegeinket array CGH eredményei alapján talált eltéréseket összevetve megállapítottuk, hogy míg az első beteg esetében a megfigyelt deléció töréspontjai nem esnek egybe szegmentális duplikációkkal, addig a második beteg esetében detektált eltérés töréspontjai LCR hotspotokhoz orientálódnak.

6.

Az első betegben detektált eltérés töréspontjait összehasonlítva a szakirodalomban publikált hasonló esetekkel megállapíthatjuk, hogy a 4q28.3-31.23 és szomszédos régiókba eső eltérések töréspontjai nem mutatnak egységes képet, töréspontjaik nem mutatnak kapcsolatot szegmentális duplikációkkal. A detektált régiókban azonban minden esetben előfordul egy közös szakasz, a legkisebb átfedő régió. Megállapítottuk, hogy az első beteg esetében detektált kópiaszám variáció egy nem rekurrens CNV.

7.

A második beteg esetében a töréspontokat összevetve a publikált esetekkel felfedezhető, hogy a töréspontok jól meghatározható LCR gazdag területen mentek végbe. Ezeket a töréspontokat a szegmentális duplikációk mediációján keresztül

lejátszódó NAHR hozza létre. Ennek alapján megállapíthatjuk, hogy a második beteg esetében detektált eltérés egy rekurrens CNV.

8.

A két esetünetet összehasonlítva a szakirodalomban publikált esetek klinikai tüneteivel megállapítható, hogy míg a nem rekurrens CNV-k variábilis genetikai régiójuknak köszönhetően nem mutatnak egységes klinikai képet (a leggyakrabban előforduló tünetek előfordulási aránya max 50 %). A rekurrens CNV-k determinált töréspontjaik révén ezzel ellentétben egységesebb klinikai képet mutatnak, klinikai képe a determinált töréspontnak köszönhetően sokkal egységesebb (a leggyakrabban előforduló tünetek előfordulási aránya 80% feletti).

9.

Pontosabb indikációt sikerült meghatároznom elsőként Magyarországon a komplex fejlődési rendellenességben szenvedő betegek array CGH vizsgálatára.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Morgan, T.H., *The Origin of Five Mutations in Eye Color in Drosophila and Their Modes of Inheritance*. Science, 1911. **33**(849): p. 534-7.
2. Morgan, T.H., A.H. Sturtevant, and C.B. Bridge, *The Evidence for the Linear Order of the Genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1920. **6**(4): p. 162-4.
3. Beadle, G.W. and E.L. Tatum, *Genetic Control of Biochemical Reactions in Neurospora*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1941. **27**(11): p. 499-506.
4. Avery, O.T., C.M. Macleod, and M. McCarty, *Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii*. J Exp Med, 1944. **79**(2): p. 137-58.
5. Chargaff, E., *Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation*. 1950. Experientia, 1994. **50**(4): p. 368-76.
6. Watson, J.D. and F.H. Crick, *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid*. Nature, 1953. **171**(4356): p. 737-8.
7. Tjio, J.H., *The chromosome number of man*. Am J Obstet Gynecol, 1978. **130**(6): p. 723-4.
8. Meselson, M. and F.W. Stahl, *The Replication of DNA in Escherichia Coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1958. **44**(7): p. 671-82.
9. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
10. Sanger, F., et al., *Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA*. Nature, 1977. **265**(5596): p. 687-95.
11. Mullis, K.B., *Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction*. Ann Biol Clin (Paris), 1990. **48**(8): p. 579-82.
12. Marx, J.L., *The cystic fibrosis gene is found*. Science, 1989. **245**(4921): p. 923-5.
13. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-51.
14. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
15. McPherson, J.D., et al., *A physical map of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 934-41.
16. **Sequencing**. Map based and shotgun whole genome sequencing. Available from: <http://www.discoveryandinnovation.com/BIOL202/notes/lecture24.html>.
17. Venter, J.C., et al., *Shotgun sequencing of the human genome*. Science, 1998. **280**(5369): p. 1540-2.
18. **NCBI**. National Center for Biotechnology Information. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
19. International HapMap, C., *The International HapMap Project*. Nature, 2003. **426**(6968): p. 789-96.
20. International HapMap, C., *A haplotype map of the human genome*. Nature, 2005. **437**(7063): p. 1299-320.
21. **ECARUCA**. European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations. Available from: <http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp>.
22. **DECIPHER**. Available from: <http://decipher.sanger.ac.uk>.
23. **DGV**. Databse of Genomic Variants. Available from: <http://projects.tcag.ca/variation>.

24. **1000 Genomes.** Available from: <http://www.1000genomes.org/>.
25. Giemsa, G., *Eine Vereinfachung und Vervollkommung meiner Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nocht'schen Chromatinfärbung.* Zentralblatt für Bakteriologie I, 1904. **32**: p. 307–313.
26. Langer-Safer, P.R., M. Levine, and D.C. Ward, *Immunological method for mapping genes on Drosophila polytene chromosomes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(14): p. 4381-5.
27. Kallioniemi, A., et al., *Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors.* Science, 1992. **258**(5083): p. 818-21.
28. du Manoir, S., et al., *Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization.* Hum Genet, 1993. **90**(6): p. 590-610.
29. Rigby, P.W., et al., *Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I.* J Mol Biol, 1977. **113**(1): p. 237-51.
30. Weiss, M.M., et al., *Comparative genomic hybridisation.* Mol Pathol, 1999. **52**(5): p. 243-51.
31. Dittwald, P., et al., *NAHR-mediated copy-number variants in a clinical population: mechanistic insights into both genomic disorders and Mendelizing traits.* Genome Res, 2013. **23**(9): p. 1395-409.
32. Lupski, J.R., 2002 Curt Stern Award Address. *Genomic disorders recombination-based disease resulting from genomic architecture.* Am J Hum Genet, 2003. **72**(2): p. 246-52.
33. Lupski, J.R., *Genomic disorders ten years on.* Genome Med, 2009. **1**(4): p. 42.
34. Lupski, J.R., *Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits.* Trends Genet, 1998. **14**(10): p. 417-22.
35. Lupski, J.R. and P. Stankiewicz, *Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes.* PLoS Genet, 2005. **1**(6): p. e49.
36. Purandare, S.M. and P.I. Patel, *Recombination hot spots and human disease.* Genome Res, 1997. **7**(8): p. 773-86.
37. Kazemi, B., *Using Factor VII in Hemophilia Gene Therapy.*
38. Schwartz, R.K., E; McKenna, R.; *FVIII.* 2011; Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/201319-overview>
39. Mikhail, F.M., *Copy number variations and human genetic disease.* Curr Opin Pediatr, 2014. **26**(6): p. 646-52.
40. Gu, W., F. Zhang, and J.R. Lupski, *Mechanisms for human genomic rearrangements.* Pathogenetics, 2008. **1**(1): p. 4.
41. Atlas. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.* Available from: <http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/ChromFragSitesID20098.html>.
42. Waters, C.A., et al., *Nonhomologous end joining: a good solution for bad ends.* DNA Repair (Amst), 2014. **17**: p. 39-51.
43. Pannunzio, N.R., et al., *Non-homologous end joining often uses microhomology: implications for alternative end joining.* DNA Repair (Amst), 2014. **17**: p. 74-80.
44. Deriano, L. and D.B. Roth, *Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage.* Annu Rev Genet, 2013. **47**: p. 433-55.

45. Zhang, F., et al., *The DNA replication FoSTeS/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans*. Nat Genet, 2009. **41**(7): p. 849-53.
46. Kasnauskienė, J., et al., *A single gene deletion on 4q28.3: PCDH18--a new candidate gene for intellectual disability?* Eur J Med Genet, 2012. **55**(4): p. 274-7.
47. Wang, H., et al., *Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase*. Mol Cell, 2001. **8**(6): p. 1207-17.
48. Ku, C.C., et al., *Control of homeostasis of CD8⁺ memory T cells by opposing cytokines*. Science, 2000. **288**(5466): p. 675-8.
49. Holgado-Madruga, M. and A.J. Wong, *Role of the Grb2-associated binder 1/SHP-2 interaction in cell growth and transformation*. Cancer Res, 2004. **64**(6): p. 2007-15.
50. Holgado-Madruga, M. and A.J. Wong, *Gab1 is an integrator of cell death versus cell survival signals in oxidative stress*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(13): p. 4471-84.
51. Zhou, J., et al., *[Array comparative genomic hybridization detection of a de novo 4q21.21-q22.1 deletion in a child with severe growth retardation]*. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi, 2014. **31**(1): p. 52-5.
52. Zhou, X., et al., *Identification of a chronic obstructive pulmonary disease genetic determinant that regulates HHIP*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(6): p. 1325-35.
53. Li, X., et al., *Genome-wide association study identifies TH1 pathway genes associated with lung function in asthmatic patients*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **132**(2): p. 313-20 e15.
54. Li, X., et al., *Importance of hedgehog interacting protein and other lung function genes in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(6): p. 1457-65.
55. Han, C., et al., *SMAD1 deficiency in either endothelial or smooth muscle cells can predispose mice to pulmonary hypertension*. Hypertension, 2013. **61**(5): p. 1044-52.
56. Pannu, J., et al., *Smad1 pathway is activated in systemic sclerosis fibroblasts and is targeted by imatinib mesylate*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(8): p. 2528-37.
57. Nasim, M.T., et al., *Molecular genetic characterization of SMAD signaling molecules in pulmonary arterial hypertension*. Hum Mutat, 2011. **32**(12): p. 1385-9.
58. Hodgson, U., et al., *ELMOD2 is a candidate gene for familial idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Hum Genet, 2006. **79**(1): p. 149-54.
59. Martinierie, L., et al., *The mineralocorticoid signaling pathway throughout development: expression, regulation and pathophysiological implications*. Biochimie, 2013. **95**(2): p. 148-57.
60. Balsamo, A., et al., *Functional characterization of naturally occurring NR3C2 gene mutations in Italian patients suffering from pseudohypoaldosteronism type 1*. Eur J Endocrinol, 2007. **156**(2): p. 249-56.
61. Bartnik, M., et al., *Application of array comparative genomic hybridization in 256 patients with developmental delay or intellectual disability*. J Appl Genet, 2014. **55**(1): p. 125-44.
62. Nowaczyk, M.J., et al., *Deletion 4q21/4q22 syndrome: two patients with de novo 4q21.3q23 and 4q13.2q23 deletions*. Am J Med Genet, 1997. **69**(4): p. 400-5.
63. Harada, N., et al., *A 4q21-q22 deletion in a girl with severe growth retardation*. Clin Genet, 2002. **61**(3): p. 226-8.

64. Friedman, J.M., et al., *Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation*. Am J Hum Genet, 2006. **79**(3): p. 500-13.
65. Bonnet, C., et al., *Microdeletion at chromosome 4q21 defines a new emerging syndrome with marked growth restriction, mental retardation and absent or severely delayed speech*. J Med Genet, 2010. **47**(6): p. 377-84.
66. Dukes-Rimsky, L., et al., *Microdeletion at 4q21.3 is associated with intellectual disability, dysmorphic facies, hypotonia, and short stature*. Am J Med Genet A, 2011. **155A**(9): p. 2146-53.
67. Bhoj, E., et al., *Expanding the spectrum of microdeletion 4q21 syndrome: a partial phenotype with incomplete deletion of the minimal critical region and a new association with cleft palate and Pierre Robin sequence*. Am J Med Genet A, 2013. **161A**(9): p. 2327-33.
68. Tsang, E., et al., *Life-history chronicle for a patient with the recently described chromosome 4q21 microdeletion syndrome*. Am J Med Genet A, 2012. **158A**(10): p. 2606-9.
69. Hemati, P., C. du Souich, and C.F. Boerkoel, *4q12-4q21.21 deletion genotype-phenotype correlation and the absence of piebaldism in presence of KIT haploinsufficiency*. Am J Med Genet A, 2015. **167**(1): p. 231-7.
70. Newey, S.E., et al., *Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation*. J Neurobiol, 2005. **64**(1): p. 58-74.
71. Uhler, M.D., *Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain*. J Biol Chem, 1993. **268**(18): p. 13586-91.
72. Rosen, V., et al., *Purification and molecular cloning of a novel group of BMPs and localization of BMP mRNA in developing bone*. Connect Tissue Res, 1989. **20**(1-4): p. 313-9.
73. Daluiski, A., et al., *Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 84-8.
74. Schoenebeck, J.J., et al., *Variation of BMP3 contributes to dog breed skull diversity*. PLoS Genet, 2012. **8**(8): p. e1002849.
75. Strehle, E.M., et al., *The spectrum of 4q- syndrome illustrated by a case series*. Gene, 2012. **506**(2): p. 387-91.
76. McKenzie, E., et al., *Cloning and expression profiling of Hpa2, a novel mammalian heparanase family member*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **276**(3): p. 1170-7.
77. Vlodavsky, I., et al., *Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis*. Nat Med, 1999. **5**(7): p. 793-802.

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

10.1. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

1. Phenotypic variability in a Hungarian patient with the 4q21 microdeletion syndrome.

Komlósi K, **Duga B**, Hadzsiev K, Czako M, Kosztolányi G, Fogarasi A, Melegh B.

Mol Cytogenet. 2015 Mar 3;8:16. doi: 10.1186/s13039-015-0118-7. eCollection 2015.

Impakt Faktor: 2,140

2. Deletion of 4q28.3-31.23 in the background of multiple malformations with pulmonary hypertension.

Duga B, Czako M, Komlosi K, Hadzsiev K, Torok K, Sumegi K, Kisfali P, Kosztolanyi G, Melegh B.

Mol Cytogenet. 2014 Jun 5;7:36. doi: 10.1186/1755-8166-7-36. eCollection 2014.

Impakt Faktor: 2,140

10.2. További közlemények:

10.2.1. Folyóirat cikkek:

1. Common functional variants of APOA5 and GCKR accumulate gradually in association with triglyceride increase in metabolic syndrome patients.

Hadarits F, Kisfali P, Mohás M, Maász A, **Duga B**, Janicsek I, Wittmann I, Melegh B.

Mol Biol Rep. 2012 Feb;39(2):1949-55. doi: 10.1007/s11033-011-0942-8. Epub 2011 Jun 4.

Impakt Faktor: 2,506

2. Mutations of the apolipoprotein A5 gene with inherited hypertriglyceridaemia: review of the current literature.

Melegh BI, **Duga B**, Sümegi K, Kisfali P, Maász A, Komlósi K, Hadzsiev K, Komoly S, Kosztolányi G, Melegh B.

Curr Med Chem. 2012;19(36):6163-70.

Impakt Faktor: 4,070

3. Hodgkin disease therapy induced second malignancy susceptibility 6q21 functional variants in roma and hungarian population samples.

Varszegi D, **Duga B**, Melegh BI, Sumegi K, Kisfali P, Maasz A, Melegh B.

Pathol Oncol Res. 2014 Jul;20(3):529-33. doi: 10.1007/s12253-013-9724-z. Epub 2013 Dec 5.

Impakt Faktor: 1,855

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

Magyari L, Varszegi D, Sarlos P, Jaromi L, Melegh BI, **Duga B**, Kisfali P, Kovesdi E, Matyas P, Szabo A, Szalai R, Melegh B.

Cytokine. 2014 Feb;65(2):148-52. doi: 10.1016/j.cyto.2013.11.011. Epub 2013 Dec 11.

Impakt Faktor: 2,664

5. **[Identifying rare genomic disorders with array comparative genomic hybridization in Hungary].**

Duga B, Czakó M, Hadzsiev K, Komlósi K, Sümegi K, Kisfali P, Kosztolányi G, Melegh B.

Orv Hetil. 2014 Mar 2;155(9):358-61. doi: 10.1556/OH.2014.29825. Hungarian.

Impakt Faktor: 0

6. **Admixture of beneficial and unfavourable variants of GLCCI1 and FCER2 in Roma samples can implicate different clinical response to corticosteroids.**

Szalai R, Matyas P, Varszegi D, Melegh M, Magyari L, Jaromi L, Sumegi K, **Duga B**, Kovesdi E, Hadzsiev K, Melegh B.

Mol Biol Rep. 2014 Nov;41(11):7665-9. doi: 10.1007/s11033-014-3659-7. Epub 2014 Aug 5.

Impakt Faktor: 2,024

7. **[Attention deficit hyperactivity disorder analyzed with array comparative genome hybridization method. Case report].**

Duga B, Czakó M, Komlósi K, Hadzsiev K, Sümegi K, Kisfali P, Melegh M, Melegh B.

Orv Hetil. 2014 Oct 5;155(40):1598-601. doi: 10.1556/OH.2014.30006. Hungarian.

Impakt Faktor: 0

8. **Significant interethnic differences in functional variants of PON1 and P2RY12 genes in Roma and Hungarian population samples.**

Janicsek I, Sipeky C, Bene J, **Duga B**, Melegh B, Sümegi K, Jaromi L, Magyari L, Melegh B.

Mol Biol Rep. 2015 Jan;42(1):227-32. doi: 10.1007/s11033-014-3762-9. Epub 2014 Oct 9.

Impakt Faktor: 2,024

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

Szalai R, Magyari L, Matyas P, **Duga B**, Banfai Z, Szabo A, Kovesdi E, Melegh B.

Environ Toxicol Pharmacol. 2014 Nov;38(3):814-20. doi: 10.1016/j.etap.2014.09.012. Epub 2014 Sep 28.

Impakt Faktor: 2,084

10. Functional Variants of Lipid Level Modifier MLXIPL, GCKR, GALNT2, CILP2, ANGPTL3 and TRIB1 Genes in Healthy Roma and Hungarian Populations.

Sumegi K, Jaromi L, Magyari L, Kovesdi E, **Duga B**, Szalai R, Maasz A, Matyas P, Janicsek I, Melegh B.

Pathol Oncol Res. 2015 Jan 9.

Impakt Faktor: 1,855

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

Szabo A, Czako M, Hadzsiev K, **Duga B**, Komlosi K, Melegh B.

Mol Cytogenet. 2015 Jun 25;8:41. doi: 10.1186/s13039-015-0137-4

Impakt Faktor: 2,14

12. Increased prevalence of functional minor allele variants of drug metabolizing CYP2B6 and CYP2D6 genes in Roma population samples.

Weber A, Szalai R, Sipeky C, Magyari L, Melegh M, Jaromi L, Matyas P, **Duga B**, Kovesdi E, Hadzsiev K, Melegh B.

Pharmacological Reports 67:(3) pp. 460-464. (2015 June)

doi: 10.1016/j.pharep.2014.11.006.

Impakt Faktor: 1,928

10.2.2. Könyv fejezetek:

1. Role of Functional Variants and Mutations of the Apolipoprotein A5 Gene in Human Pathology

Balázs Duga, Béla I.Meleg, Katalin Sümegi, Anita Maász, Péter Kisfali, Katalin Komlósi, Béla Meleg B.

Apolipoproteins: Regulatory Functions, Health Effects and Role in Disease

New York: **Nova Science Publishers Inc.**, 2012. pp. 75-92

(ISBN:978-1-62257-484-1)

2. Ischemic Stroke Susceptibility Gene Research: Lessons We Learned

Bela I. Meleg, Anita Maasz, Peter Kisfali, Katalin Sumegi, **Balazs Duga**, Gyorgy Kosztolanyi, Samuel Komoly, Bela Meleg

Ischemic Stroke: Symptoms, Prevention and Recovery

New York: **Nova Science Publishers Inc.**, 2013. pp. 117-144.

(ISBN:978-1-62257-799-6)

3. Role of Triglyceride Modifier Genetic Variants in Development of Metabolic Syndrome

Anita Maasz, Peter Kisfali, Bela I. Meleg, **Balazs Duga**, Katalin Sümegi, Bela Meleg

Handbook on Metabolic Syndrome: Classification, Risk Factors and Health Impact

New York: **Nova Science Publishers Inc.**, 2012. pp.95-119.

(ISBN: 978-1-62257-025-6)

Összesített Impakt Faktor: 27,43

10.3.Idézhető absztraktok:

1. The lipid-associated GALNT2 gene variant rs4846914 confers a highly elevated risk for type 2 diabetes

N. Polgar, P. Kisfali, A. Maasz, E. Baricza, **B. Duga**, M. Mohas, I. Wittmann, B. Melegh

Eur J Hum Genet, 2011;19(S2):251

2. TRIB1 genes polymorphism in type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome patients

P. Kisfali, G. Szabó, E. Baricza, **B. Duga**, K. Hettyésy, B. Melegh

Eur J Hum Genet, 2011;19(S2):262

3. Huntington Disease in Hungary

E. Sáfrány, L. Balikó, J. Nemes, E. Baricza, **B. Duga**, C. Sáfrány, B. Melegh

Eur J Hum Genet, 2011;19(S2):335

4. Functional SHMT1, MTR and MTRR gene variants of folate metabolism in Roma and average Hungarian population samples

B. I. Melegh, L. Magyar, L. Járomi, **B. Duga**, I. Janicsek, P. Kisfali, C. Sipeky, B. Melegh

Eur J Hum Genet, 2012;20(S2):253

5. Genotype distribution of GLCCI1 rs37972 in Roma and Hungarian Caucasian samples

B. Duga, L. Magyar, L. Jaromi, I. Janicsek, P. Kisfali, B. I. Melegh, C. Sipeky, B. Melegh

Eur J Hum Genet, 2012;20(S2):254

6. Distribution of PON1 and P2RY12 polymorphisms in Roma and Hungarian population samples

Janicsek, C. Sipeky, **B. Duga**, L. Jaromi, L. Magyar, B. I. Melegh, B. Melegh

Eur J Hum Genet, 2012:20(S2):257

7. Pharmacogenetic variations of the SLCO1B1 gene in Roma and Hungarian population samples

C. Sipeky, B. I. Melegh, I. Janicsek, **B. Duga**, G. Tarlos, I. Szabo, L. Jaromi, L. Magyari, K. Komlosi, K. Hadzsiev, B. Melegh

Eur J Hum Genet, 2012:20(S2):259

8. Differences in IL28B promoter region rs12979860 variants in healthy Hungarian Caucasian and healthy Hungarian Roma patients versus with Hepatitis C Virus infected ones.

P. Kisfali, **B. Duga**, G. Par, B. I. Melegh, A. Pár, B. Melegh

Eur J Hum Genet, 2012:20(S2):393

9. Marked differences of haplotype tagging SNP distribution, linkage, and haplotype profile of APOA5 gene in Roma population samples

B. Duga, B.I. Melegh, L. Jaromi, K. Sümegi, Z. Bánfai, K. Komlósi, K. Hadzsiev, A. Szabo, R. Szalai, E. Kövesdi, J. Bene, P. Kisfali, B. Melegh

Eur J Hum Genet, 2013:21(S2):556

10. Polimorphisms of CYP2B6 and CYP2D6 genes associated with drug metabolism in Roma population samples

R. Szalai, C. Sipeky, L. Jaromi, L. Magyari, P. Matyas, J. Bene, **B. Duga**, E. Kovesdi, A. Szabo, B. Melegh;

Eur J Hum Genet, 2013:21(S2):383

11. Distribution of eight SNPs of lipid level modifier genes in healthy Roma and Hungarian population samples

J. Bene, K. Sumegi, L. Jaromi, L. Magyari, E. Kovesdi, **B. Duga**, R. Szalai, P. Matyas, A. Szabo, Z. Banfai, B. Melegh

Eur J Hum Genet, 2013:21(S2):404

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

L. Magyari, D. Varszegi, P. Sarlos, L. Jaromi, J. Bene, **B. Duga**, K. Hadzsiev, P. Kisfali, K. Komlosi, E. Kovesdi, P. Matyas, A. Szabo, R. Szalai, B. Meleg
Eur J Hum Genet, 2013;21(S2):565

13. Phenotypic variability in a Hungarian family with a novel TSC1 mutation

E. Kovesdi, K. Hadzsiev, K. Komlosi, I. Janicsek, J. Bene, L. Magyari, L. Jaromi, **B. Duga**, K. Sumegi, A. Szabo, Z. Banfai, B. Meleg
Eur J Hum Genet, 2013;21(S2):566

14. Deletion of 9q22.3-33.1 in a child with corpus callosum hypoplasia and thymus asymmetry

M. Czakó, **B. Duga**, K. Hadzsiev, K. M. Komlósi, P. Kisfali, G. Kosztolányi, B.
Eur J Hum Genet, 2014;22(S2):209

15. CYP1A2 gene non-coding region polymorphisms in Roma and Hungarian population samples

R. Szalai, P. Matyas, L. Magyari, J. Bene, **B. Duga**, Z. Banfai, A. Szabo, B. Meleg
Eur J Hum Genet, 2014;22(S2):298

16. CYP1A1 variant in Roma population samples

L. Magyari, R. Szalai, E. Kovesdi, Z. Banfai, **B. Duga**, P. Matyas, A. Szabo, B. Meleg
Eur J Hum Genet, 2014;22(S2):303

17. Genetic relationship of European Roma people and eight ethnic groups from the Caucasus area which suggest Romas probably admixed with during their migration

Szabó, Z. Bánfai, **B. Duga**, R. Szalai, L. Magyari, P. Mátyás, E. Kövesdi, K. Sümegi, B. Meleg
Eur J Hum Genet, 2014;22(S2):320

18. Phenotypic variability in a Hungarian patient with the 4q21 microdeletion syndrome

K. Komlósi, K. Hadzsiev, M. Czakó, **B. Duga**, A. Fogarasi, J. Bene, G. Kosztolányi, B. Melegh
Eur J Hum Genet, 2014;22(S2):423

19. Deletion of 4q28.3-31.23 in the background of multiple malformations

B. Duga, M. Czako, K. Komlosi, K. Hadzsiev, K. Torok, K. Sumegi, P. Kisfali, G. Kosztolanyi, B. Melegh
Eur J Hum Genet, 2014;22(S2):444

20. Asthma related FCER2 variant in Roma and Hungarian populations

P. Matyas, R. Szalai, L. Magyar, **B. Duga**, E. Kovesdi, Z. Banfai, A. Szabo, B. Melegh
Eur J Hum Genet, 2014;22(S2):501

21. Admixture of Turks, Hungarians and Romas in the Carpathian Basin

Z. Bánfai, A. Szabó, K. Sümegi, **B. Duga**, L. Magyar, E. Kövesdi, P. Mátyás, R. Szalai, B. Melegh
Eur J Hum Genet, 2014;22(S2):509

10. MELLÉKLETEK

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

CASE REPORT

Open Access

Deletion of 4q28.3-31.23 in the background of multiple malformations with pulmonary hypertension

Balazs Duga^{1,2}, Marta Czako^{1,2}, Katalin Komlosi^{1,2}, Kinga Hadzsiev^{1,2}, Katalin Torok³, Katalin Sumegi^{1,2}, Peter Kisfali^{1,2}, Gyorgy Kosztolanyi^{1,2} and Bela Melegh^{1,2*}

Abstract

The 4q deletion syndrome shows a broad spectrum of clinical manifestations consisting of key features comprising growth failure, developmental delay, craniofacial dysmorphism, digital anomalies, and cardiac and skeletal defects. We have identified a de novo interstitial distal deletion in a 9 month-old girl with growth failure, developmental delay, ventricular septum defect in the subaortic region, patent foramen ovale and patent ductus arteriosus, vascular malformation of the lung, dysgenesis of the corpus callosum and craniofacial dysmorphism using array-comparative genomic hybridization. This de novo deletion is located at 4q28.3-31.23 (136,127,048 - 150,690,325), its size is 14.56 Mb, and contains 8 relevant genes (*PCDH18*, *SETD7*, *ELMOD2*, *IL15*, *GAB1*, *HHIP*, *SMAD1*, *NR3C2*) with possible contributions to the phenotype. Among other functions, a role in lung morphogenesis and tubulogenesis can be attributed to the deleted genes in our patient, which may explain the unique feature of vascular malformation of the lung leading to pulmonary hypertension. With the detailed molecular characterization of our case with 4q- syndrome we hope to contribute to the elucidation of the genetic spectrum of this disorder.

Keywords: 4q28.3-31.23, Array CGH, Deletion, Complex malformation syndrome, Developmental delay, Pulmonary hypertension, Face dysmorphism, Vascular malformation of the lung

Background

It has now been accepted in the literature that the 4q-syndrome comprises interstitial and terminal deletions of the long arm of chromosome 4 [1,2]. Essential features of this syndrome include mild craniofacial and digital dysmorphism, developmental delay, growth retardation, skeletal and cardiac anomalies, and autism spectrum disorder [2]. A broad spectrum of clinical manifestations has been observed partly due to the variability in the extent of the deletions and the possible additional contribution of other genetic rearrangements, such as unbalanced translocations [3]. Many reports of 4q- cases associated with large deletions could be detected by conventional chromosome analysis; however, in recent

years the reports of submicroscopic chromosomal aberrations associated with 4q- phenotype increased as a result of the widespread diagnostic use of array comparative genomic hybridization (a-CGH) [3].

A classification of the 4q- deletions has been proposed by Strehle et al. based on the observation that deletions appear to occur in clusters along 4q [2]. As demonstrated in previous case reports, it is not uncommon that array CGH testing refines or corrects standard karyotyping. We present the case of a 9-month-old girl with a 14.56 Mb distal interstitial deletion of chromosome 4, more specifically in the region of 4q28.3-31.23. Reports of distal 4q interstitial deletions are quite rare. In addition to the key features seen in 4q- cases epilepsy, small kidneys, hyponatraemia, immunodeficiency and vascular anomaly of the lung vessels was also seen in our patient. There had been limited clinical phenotype and molecular correlation for congenital heart defects (CHDs) for this region until the routine use of aCGH, however, in a recent report of a child with a 4q32.3-q34.3 (chr4:167236114–178816031;

* Correspondence: melegh.bela@pte.hu

¹Department of Medical Genetics, Clinical Centre, University of Pecs, Szegedi 12, Pecs H-7624, Hungary

²Szentágothai Research Centre, University of Pecs, Ifjusag 20, Pecs H-7624, Hungary

Full list of author information is available at the end of the article

hg18) deletion involving the TLL1 (Tolloid-like-1), HPGD (15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase), and HAND2 (Heart and neural crest derivatives-expressed protein 2) genes, that are known to be involved in cardiac morphogenesis, the critical region responsible for CHDs seen in 4q deletion syndrome was narrowed down [4]. CHDs are reported to occur in about 60% of patients with 4q deletion syndrome in the presence or absence of HAND2 deletion, implying additional genes in 4q that could influence cardiac development. We discuss the possible role of eight deleted genes in the expression of the unique phenotype including the anomaly of the lung vessels seen in our patient. The precise molecular characterization of new cases with 4q- syndrome will aid to elucidate the genetic spectrum of this disorder.

Case presentation

Patient

The index patient was born as the first child to non-consanguineous healthy parents at 39th week of gestation, with a birth weight of 2160 g by caesarean section, Apgar scores were 8/9. Because of heart murmur cardiologic examination was performed which revealed ventricular septum defect in the subaortic region, Patent Foramen Ovale and patent ductus arteriosus. Abdominal ultrasound showed smaller kidneys with normal structure and cranial ultrasound showed dysgenesis of the corpus callosum.

At the age of two month she was hospitalized due to feeding problems and hypoglycaemia (blood glucose value: 1,2 mmol/L). Severe dystrophy, muscle hypotonia and dysmorphic facial features including remarkable asymmetry of the face (hemihypertrophy of the left side), short right palpebral fissure, long eyelashes, asymmetry of the ears with a dysplastic, smaller and low-set right ear, short philtrum and high palate were detected. During hospitalization impairment of consciousness and short atonic periods were present, which were presumed to be convulsion equivalent, but the performed EEG did not indicate paroxysmal signs.

At the age of 3 months her congenital heart defect required surgical correction (closure of the ventricular septum defect, foramen ovale and ductus arteriosus). The results of laboratory tests showed no abnormality besides hyponatremia. After the heart operation there were no residual defects, the pulmonary pressure was normal. During the 4th week of the postoperative period, a severe septic state developed. Because of an advanced AV-block a temporary pacemaker was needed. She was dismissed from the hospital and was regularly checked on by an outpatient cardiology clinic.

Four months following heart surgery she was admitted to the clinic again because of pulmonary hypertension. Radiological examinations (Computed Tomography (CT)

and CT-angiography) were performed in order to exclude a possible pulmonary cause which revealed a lower arborisation of the pulmonary arteries supplying the left lower lobe. No branches were detected to the left upper lobe and a congenital anomaly was suggested, not excluding the possibility of a persistent non-recanalized thrombosis. Cardiomegaly was reported (primarily to the right part of the heart) with an enlarged pulmonary trunk as a result of elevated pulmonary arterial pressure. A left sided vena cava superior and also an atypically localized (left side) undefined venous vessel was present on the axial and the reconstructed CT slices. The vena cava inferior and also the hepatic veins were enlarged due to elevated venous pressure in the major blood circle. In the thorax cavity hydrothorax was found on the right side with consolidation on both sides and no normal lung parenchyma.

The severe recurrent infections raised the possibility of an immunodeficiency, which was confirmed by flow cytometry of the white blood cells in which significantly decreased lymphocytes were detected. Although hypocalcaemic episodes and high parathyroid hormone levels were reported in the neonatal period, microdeletion of the DiGeorge region of chromosome 22 was excluded. Generalized oedema, deterioration of right ventricular function and recurrent infections progressed, the patient needed continuous mechanical ventilation and despite therapy died at the age of nine month.

In search of metabolic diseases urine organic acids, serum amino acids, ammonia and serum transferrin isoelectric focusing were performed to exclude congenital disorders of glycosylation, but all yielded normal results. Routine karyotyping revealed no visible chromosomal aberration and Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) analysis of the DiGeorge syndrome critical region (22q11.2) gave also a normal result (Figure 1).

Methods

Array CGH was performed using the Agilent Human Genome G3 Sureprint 8x60K Microarray (Agilent Technologies, Stewens Creek Bld., Santa Clara, CA, 95051 USA), a high resolution 60-mer oligonucleotide based microarray containing 55,077 60-mer probes, spanning coding and non-coding genomic sequences with median spacing of 33 kb and 41 kb, respectively.

Array image was acquired using an Agilent laser scanner G2565CA (Agilent Technologies, California, USA) and analyzed with the Agilent Feature Extraction software (v10.10.1.1.). Results were presented by Agilent Cytogenomics software (v2.5.8.11). DNA sequence information refers to the public UCSC database (Human Genome Browser, Feb 2009 Assembly; GRCh37:hg19).

The deletion detected was aligned to known aberrations listed in publicly available databases, such as the Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans



Figure 1 Patient's G-banded karyogram. The banding resolution in this case remained about 400 bphs (bands per haploid set) which is below the minimum G-banding quality required for analysis of postnatal samples of patients with intellectual disability and/or dysmorphic features (550 bphs).

using Ensembl Resources (DECIPHER [5]), the Database of Genomic Variants (DGV [6]), Ensembl [7] and European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations (ECARUCA [8]).

Parental samples were analyzed using the same array.

Results and discussion

Array CGH analysis of our patient with complex malformations revealed a 14.56 Mb deletion on the long arm of chromosome 4 (4q28.3q31.23; 136,127,048 - 150,690,325) (see Figure 2). Analysis of the parents confirmed the de novo occurrence of the deletion. In a detailed analysis of the genes affected by the deletion we highlighted 8 genes (*PCDH18*, *SETD7*, *ELMOD2*, *IL15*, *GAB1*, *HHIP*, *SMAD1*, *NR3C2*) with possible contributions to the phenotype. The genes thought to be relevant are summarized in Table 1 in order of their position on the chromosome.

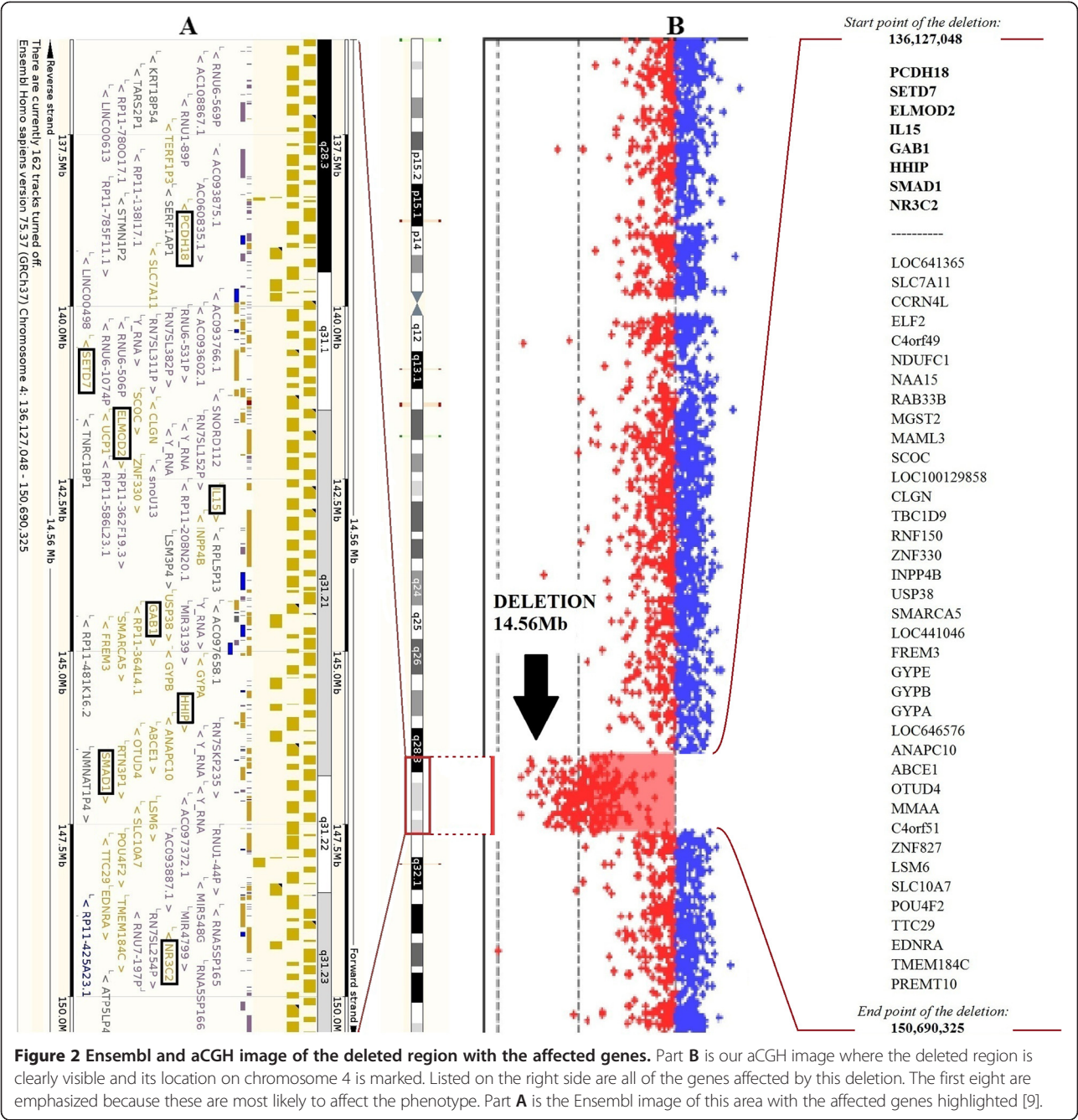
The first of these genes is *PCDH18* (MIM *608287). Kasnauskiene J. et al. reported a boy with severe developmental delay, seizures, microcephaly and hypoplastic corpus callosum with a 1.53 Mb single gene deletion on chromosome 4 (4q28.3; 137,417,338 - 138,947,282) with array CGH. Deletion of the *PCDH18* gene was also detected which together with our case suggests that the *PCDH18* gene might be involved in intellectual disability [10]. Unfortunately our patient died at the age of nine months, she was hospitalized many times and showed severe developmental delay, however we have no data about her exact intellectual ability, but it is a repeatedly described symptom in previous reports on 4q interstitial

deletions where the region partially overlaps with ours. *SETD7* (*606594) gene could be a second candidate in connection with cognitive development. Wang et al. examined the expression of genes responsible for epigenetic changes in different neuronal tissues, especially during differentiation. It was determined that *SETD7* expression was upregulated both in human embryonic stem cells and human cortex, which implies that *SETD7* might play a particular role in the regulation of the neural genes [11].

The laboratory results of our patient showed decreased lymphocyte numbers which may be responsible for the patient's immunodeficiency. Another gene of the deleted region is the *IL15* (*600554) (see Table 1). Ku et al. suggested earlier that the balance between *IL15* and *IL2* can control the number of the CD8+ memory T-cells. Dosage alteration of this gene may explain our patient's low lymphocyte number [13].

The clinical picture of our patient was complicated by vascular lung malformation affecting both the pulmonary arteries and veins and consequent pulmonary hypertension. The *GAB1* (*604439) gene, which encodes an adaptor protein and is involved in branching tubulogenesis [14,15] may also be associated with the vascular malformation of the lung observed in our patient.

The *HHIP* (*606178) gene encodes a protein which participates in the regulation of morphogenesis. Zhou et al. found decreased levels of *HHIP* mRNA and protein in the lung tissue samples of COPD patients. Based on these, a possible correlation between the abnormal development of



lung vessels in our patient and the gene can be hardly excluded [16,17].

The unique feature of vascular malformation in the lung, gradually lead to pulmonary hypertension in our patient. Additionally the role of genes in the deleted region associated with the development of pulmonary hypertension cannot be ruled out. Han et al., examined the *SMAD1* (*601595) gene (in knock-out mice), and found that the deficiency of it is associated with pulmonary hypertension [18]. Pannu et al. noticed the importance of *SMAD1* in the development of fibrosis [19]. In a publication by Nasim et al. the same results were discovered when they examined a 47-year-old French woman with primary pulmonary hypertension [20]. Furthermore, mutations in *ELMOD2* (*610196) gene (deleted in our patient) may lead to familial idiopathic pulmonary fibrosis [12], however in our patient we have no data about parenchymal changes of the lung.

Another gene affected by this deletion with possible effect on the phenotype, called *NR3C2*, plays a role in

Table 1 Deleted genes on the long arm of the chromosome 4, with a possible effect on the phenotype

GENES WITH POSSIBLE EFFECT ON THE PHENOTYPE			
Gene	Role	Position on chr 4	Effect on the phenotype
<i>PCDH18</i>	Protocadherin 18: impact on cell-cell connection, highly expressed in the brain and lung.	138,440,071 - 138,453,628	Might be involved in intellectual disability [10].
<i>SETD7</i>	Histone methyltransferase H3K4.	140,427,191 - 140,477,576	Regulation of the neural genes; differentiation of neuroectoderm progenitor cells [11].
<i>ELMOD2</i>	GTPase activating protein: role in antiviral responses and pulmonary fibrosis.	141,445,311 - 141,474,923	Mutations in this gene may lead to familial idiopathic pulmonary fibrosis [12].
<i>IL15</i>	Cytokine: affects T-cell activation and proliferation, controls the number of CD8+ memory T cells.	142,557,748 - 142,655,139	Dosage alteration of IL15 gene may explain patient's low lymphocyte number [13].
<i>GAB1</i>	Direct substrate of the epidermal growth factor receptor (EGFR).	144,257,679 - 144,359,717	Has an important role in branching tubulogenesis, and probably in the lung vessel malformation observed in our patient [14,15].
<i>HHIP</i>	Hedgehog-Interacting Protein: effect on regulation of morphogenesis.	145,567,417 - 145,662,541	Possible correlation between the lung malformation of our patient and the gene [16,17].
<i>SMAD1</i>	Involved in the downstream signaling pathway of bone morphogenic protein (BMP) subfamily members.	146,402,950 - 146,480,327	SMAD1 deficiency may play a role in the development of pulmonary hypertension [18-20].
<i>NR3C2</i>	Mineralocorticoid receptor: impact on the regulation of sodium concentration in the body. <i>NR3C2</i> mutations were published to influence the development of hyponatraemia.	148,999,914 - 149,365,849	Copy number changes of <i>NR3C2</i> gene may be associated with low sodium levels [21].

regulating the sodium concentration in the body thereby influencing fluidic balance and blood pressure. We cannot rule out the possibility that changes in copy number of this gene may be associated with low sodium levels consequently seen in our patient [21].

Conclusion

Several genes are affected in the deletion of the region between 4q28.3 and 4q31.23, which could give a possible explanation for the clinical symptoms. Among other functions a role in lung morphogenesis and tubulogenesis can be attributed to the deleted genes in our patient which may explain the unique feature of vascular malformation of the lung vessels leading to pulmonary hypertension. The interpretation of the role of the haploinsufficient genes is complicated by the fact that in current literature we only found a few cases where the deletion overlapped our region. In the future it would be necessary to examine this region not only with array CGH but also with transcriptomic and proteomic methods.

Consent

Because the patient died, written consent for publication and any accompanying images in this Case report was obtained from the patient's next of kin. A copy of the written consent is available for review by the Editor-in-Chief of this journal.

Abbreviations

Array CGH: Array comparative genome hybridization; COPD: Chronic obstructive pulmonary disease; CT: Computed tomography; DECIPHER: Database of chromosomal imbalance and phenotype in humans using ensembl resources; DGV: Database of genomic variants; ECARUCA: European cytogeneticists association register of unbalanced chromosome aberrations; EEG: Electroencephalography; FISH: Fluorescence in situ hybridization; UCSC: University of California Santa Cruz.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests related to this manuscript.

Authors' contributions

KK and KH were responsible for the patient's clinical genetic examination and KT was liable for the clinical and cardiologic examination. KK, KT and KH contributed to the clinical description. BM, MCz and BD conceived and designed the molecular experiments. MCz and BD performed the array CGH and analyzed the data. BD, MCz, KK, KH, GyK and BM co-wrote the manuscript.

KS and PK revised the manuscript critically for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This research was supported by the European Union and the State of Hungary, co-financed by the European Social Fund in the framework of TÁMOP-4.2.4.A/ 2-11/1-2012-0001 'National Excellence Program' and by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences to KK. The acquisition of equipment was supported by the OTKA 103983.

Author details

¹Department of Medical Genetics, Clinical Centre, University of Pecs, Szegedi 12, Pecs H-7624, Hungary. ²Szentágotthai Research Centre, University of Pecs, Ifjusag 20, Pecs H-7624, Hungary. ³Department of Pediatrics, Clinical Centre, University of Pecs, Jozsef Attila 7, Pecs H-7623, Hungary.

Received: 24 January 2014 Accepted: 23 May 2014

Published: 5 June 2014

References

1. Strehle EM: **Dysmorphological and pharmacological studies in 4q- syndrome.** *Genet Couns* 2011, **22**:173-185.
2. Strehle EM, Gruszfeld D, Schenk D, Mehta SG, Simoncic I, Huang T: **The spectrum of 4q- syndrome illustrated by a case series.** *Gene* 2012, **506**:387-391.
3. Manolakas E, Kefalas K, Vetro A, Oikonomidou E, Daskalakis G, Psara N, Siomou E, Papageorgiou E, Sevastopoulou E, Konstantinidou A, Vrachnis N, Thomaidis L, Zuffardi O, Papoulidis I: **Prenatal diagnosis of two de novo 4q35-qter deletions characterized by array-CGH.** *Mol Cytogenet* 2013, **6**:47.
4. Xu W, Ahmad A, Dagenais S, Iyer RK, Innis JW: **Chromosome 4q deletion syndrome: narrowing the cardiovascular critical region to 4q32.2-q34.3.** *Am J Med Genet A* 2012, **158A**:635-640.
5. DECIPHER. [http://decipher.sanger.ac.uk].
6. the Database of Genomic Variants (DGV). [http://projects.tcag.ca/variation].
7. Ensembl. [http://www.ensembl.org].
8. ECARUCA. [http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp].
9. Ensemble MapViewer. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Overview?r=4%3A136127048-150690325.
10. Kasnauskienė J, Ciuladaitė Z, Preiksaitienė E, Matuleviciene A, Alexandrou A, Koumbaris G, Sismani C, Pepalyte I, Patsalis PC, Kucinskas V: **A single gene deletion on 4q28.3: PCDH18—a new candidate gene for intellectual disability?** *Eur J Med Genet* 2012, **55**:274-277.
11. Wang H, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Borchers C, Tempst P, Zhang Y: **Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase.** *Mol Cell* 2001, **8**:1207-1217.
12. Hodgson U, Pulkkinen V, Dixon M, Peyrard-Janvid M, Rehn M, Lahermo P, Ollikainen V, Salmenkivi K, Kinnula V, Kere J, Tukiainen P, Laitinen T: **ELMOD2 is a candidate gene for familial idiopathic pulmonary fibrosis.** *Am J Hum Genet* 2006, **79**:149-154.
13. Ku CC, Murakami M, Sakamoto A, Kappler J, Marrack P: **Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines.** *Science* 2000, **288**:675-678.
14. Holgado-Madruga M, Wong AJ: **Gab1 is an integrator of cell death versus cell survival signals in oxidative stress.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**:4471-4484.
15. Holgado-Madruga M, Wong AJ: **Role of the Grb2-associated binder 1/SHP-2 interaction in cell growth and transformation.** *Cancer Res* 2004, **64**:2007-2015.
16. Li X, Howard TD, Moore WC, Ampleford EJ, Li H, Busse WW, Calhoun WJ, Castro M, Chung KF, Erzurum SC, Fitzpatrick AM, Gaston B, Israel E, Jarjour NN, Teague WG, Wenzel SE, Peters SP, Hawkins GA, Bleeker ER, Meyers DA: **Importance of hedgehog interacting protein and other lung function genes in asthma.** *J Allergy Clin Immunol* 2011, **127**:1457-1465.
17. Li X, Hawkins GA, Ampleford EJ, Moore WC, Li H, Hastie AT, Howard TD, Boushey HA, Busse WW, Calhoun WJ, Castro M, Erzurum SC, Israel E, Lemanske RF Jr, Szefer SJ, Wasserman SI, Wenzel SE, Peters SP, Meyers DA, Bleeker ER: **Genome-wide association study identifies TH1 pathway genes associated with lung function in asthmatic patients.** *J Allergy Clin Immunol* 2013, **132**:313-320. e315.
18. Han C, Hong KH, Kim YH, Kim MJ, Song C, Kim MJ, Kim SJ, Raizada MK, Oh SP: **SMAD1 deficiency in either endothelial or smooth muscle cells can predispose mice to pulmonary hypertension.** *Hypertension* 2013, **61**:1044-1052.
19. Pannu J, Asano Y, Nakerakanti S, Smith E, Jablonska S, Blaszczyk M, ten Dijke P, Trojanowska M: **Smad1 pathway is activated in systemic sclerosis fibroblasts and is targeted by imatinib mesylate.** *Arthritis Rheum* 2008, **58**:2528-2537.
20. Nasim MT, Ogo T, Ahmed M, Randall R, Chowdhury HM, Snape KM, Bradshaw TY, Southgate L, Lee GJ, Jackson I, Lord GM, Gibbs JS, Wilkins MR, Ohta-Ogo K, Nakamura K, Girerd B, Coulet F, Soubrier F, Humbert M, Morrell NW, Trembath RC, Machado RD: **Molecular genetic characterization of SMAD signaling molecules in pulmonary arterial hypertension.** *Hum Mutat* 2011, **32**:1385-1389.
21. Balsamo A, Cicognani A, Gennari M, Sippell WG, Menabo S, Baronio F, Riepe FG: **Functional characterization of naturally occurring NR3C2 gene mutations in Italian patients suffering from pseudohypoaldosteronism type 1.** *Eur J Endocrinol* 2007, **156**:249-256.

doi:10.1186/1755-8166-7-36

Cite this article as: Duga et al.: Deletion of 4q28.3-31.23 in the background of multiple malformations with pulmonary hypertension. *Molecular Cytogenetics* 2014 **7**:36.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



CASE REPORT

Open Access

Phenotypic variability in a Hungarian patient with the 4q21 microdeletion syndrome

Katalin Komlósi^{1,3†}, Balázs Duga^{1,3†}, Kinga Hadzsiev^{1,3}, Márta Czako^{1,3}, György Kosztolányi^{1,3}, András Fogarasi² and Béla Melegh^{1,3*}

Abstract

Background: Interstitial deletions of 4q21 (MIM 613509) have already been reported in more than a dozen patients with deletions ranging from 2 to 15.1 Mb delineating a common phenotype including marked growth restriction, hypotonia, severe developmental delay with absent or delayed speech and distinctive facial features. A minimal critical region of 1.37 Mb accounting for the common features with 5 known genes (*PRKG2*, *RASGEF1B*, *HNRNPDL*, *HNRNPDL*, and *ENOPH1*) has been described so far.

Results: Here we report on a 5 year-old Hungarian girl presenting with severe developmental delay, good receptive language but absent spoken speech, short stature, dystrophy, hypotonia, distinctive facies including broad forehead, frontal bossing, downward slanting palpebral fissures, hypertelorism, hypoplastic ear-lobes, anteverted nostrils, short philtrum, small mouth, higharched palate, short, small hands and feet, distally narrowing fingers and clinodactyly. Cerebral MRI showed ventricular dilation and an increase in periventricular signal intensity. After extensive metabolic tests and exclusion of subtelomeric deletions array CGH analysis was performed using the Agilent Human Genome G3 SurePrint 8x60K Microarray (Agilent Technologies, USA), which detected a 4.85 Mb de novo interstitial deletion of 4q21.21-4q21.23. The clinical symptoms only partly overlap with reported 4q21 microdeletion cases. Among multiple annotated genes our patient is also haploinsufficient for the following genes: *RASGEF1B* being a strong candidate for the neurodevelopmental features and *PRKG2* for severe growth delay.

Conclusion: The first Hungarian case of 4q21 deletion adds to the phenotypic spectrum of this novel microdeletion syndrome and underlines the importance of array CGH to uncover the heterogeneous causes of intellectual disability.

Keywords: Submicroscopic deletion, Array CGH, 4q21, Short stature, Intellectual disability

Background

The recent wide-spread use of microarray-based comparative genomic hybridization (array CGH) has extensively aided the elucidation of the underlying cause in patients with severe developmental delay and intellectual disability with dysmorphic features [1]. Interstitial deletions of 4q21 have been reported in about a dozen patients [1-8] with deletions ranging from 2 to 15.1 Mb delineating a common phenotype including marked growth restriction, hypotonia, severe developmental delay with absent or

delayed speech, small hands and feet and distinctive facial features as broad forehead, hypertelorism, and prominent central incisors. A minimal critical region of 1.37 Mb accounting for the common features with 5 known genes (*PRKG2*, *RASGEF1B*, *HNRNPDL*, *HNRNPDL*, *ENOPH1*) has been described so far [5].

Here, we report the first Hungarian case of 4q21 deletion adding to the phenotypic spectrum of this novel microdeletion syndrome.

Case presentation

Results

After extensive metabolic tests and exclusion of subtelomeric deletions array CGH analysis was performed using the Agilent Human Genome G3 SurePrint 8x60K Microarray, which detected a 4.85 Mb de novo interstitial deletion of 4q21.21-4q21.23 (ch4:81 408 980–86 261 953)

* Correspondence: melegh.bela@pte.hu

†Equal contributors

¹Department of Medical Genetics, Clinical Centre, University of Pecs, Szigeti Street 12, Pecs H-7624, Hungary

³Szentágotthai Research Centre, University of Pecs, Ifjúság Street 20, Pecs H-7624, Hungary

Full list of author information is available at the end of the article

(Figure 1). The deletion in our patient involved the following genes: *PRKG2* (MIM 601591), *RASGEF1B* (MIM 614532), *HNRNPD* (MIM 607137), *HNRPDL*, *ENOPH1*, *COQ2*, *MRPS18C*, *THAP9*, *HPSE*, and *CDS1*. Except for known CNVs, no copy number alterations were observed in other chromosomes (data not shown). Based on the normal CGH array profile of the parents this deletion proved to be *de novo*. The deletion was not reported as polymorphic or structural variant in the publicly available databases.

Discussion

The widespread use of array CGH has led to the delineation of many novel entities associated with developmental delay [1]. Beyond revealing the underlying cause it provides information for prognosis, the medical management of the symptoms and access to resources for the

affected families, and also gives the basis for estimating recurrence risks.

Several reports and studies have delineated a 4q21 microdeletion syndrome with a common phenotype including marked growth restriction, hypotonia, severe developmental delay with absent or delayed speech, small hands and feet and distinctive facial features as broad forehead, hypertelorism, and prominent lower and upper incisors [5]. A minimal critical region of 1.37 Mb with 5 known genes (*PRKG2*, *RASGEF1B*, *HNRNPD*, *HNRPDL*, *ENOPH1*) has been described so far [5]. Comparison of our case with previously published cases (Table 1) revealed several common features but also some variation in the phenotype. The 4.85 Mb deletion in our patient includes the minimal critical region of the 4q21 microdeletion syndrome, encompassing the candidate genes, *PRKG2* and *RASGEF1B*, previously described as major

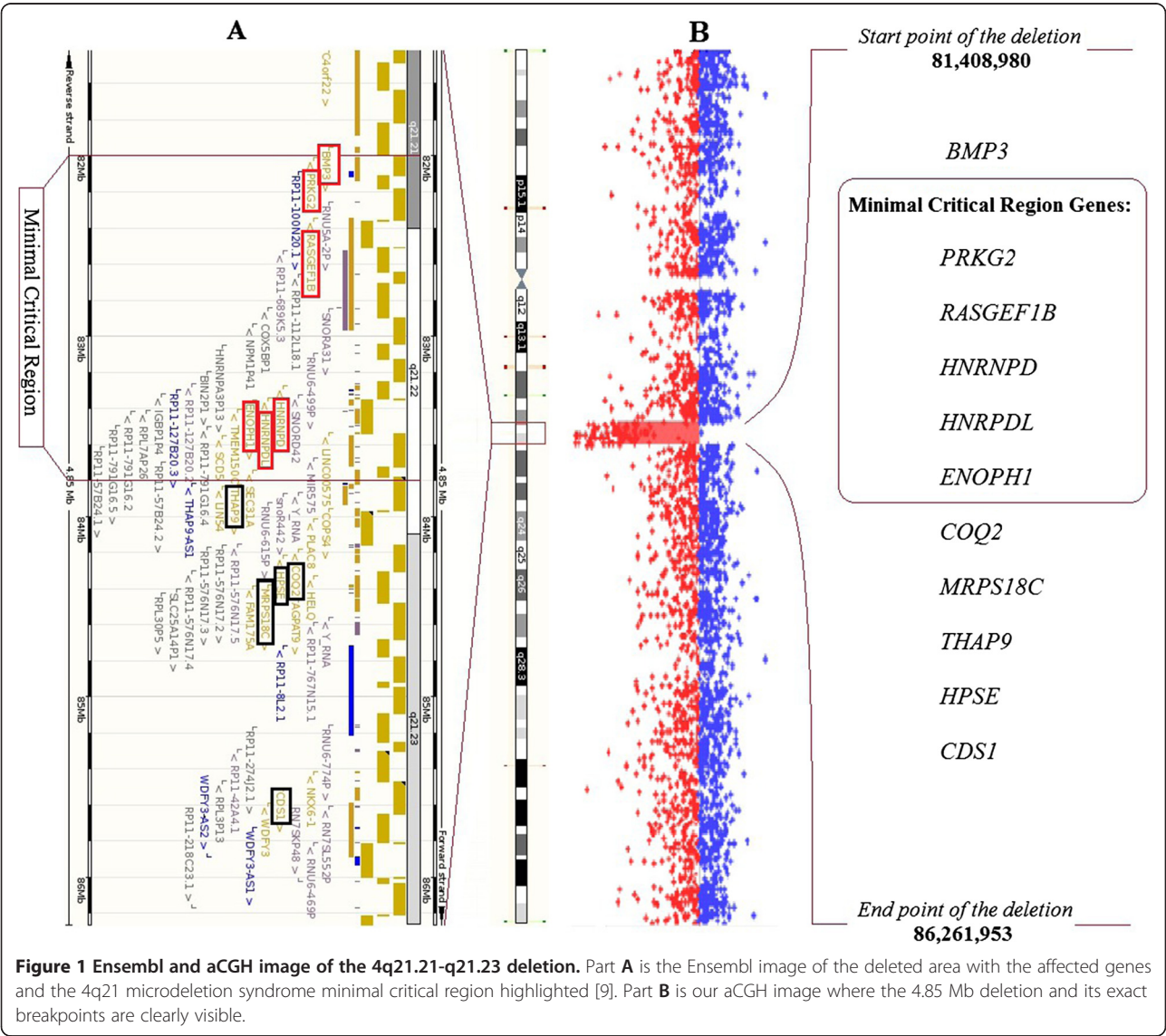


Figure 1 Ensembl and aCGH image of the 4q21.21-q21.23 deletion. Part A is the Ensembl image of the deleted area with the affected genes and the 4q21 microdeletion syndrome minimal critical region highlighted [9]. Part B is our aCGH image where the 4.85 Mb deletion and its exact breakpoints are clearly visible.

Table 1 Phenotypic differences between patients with 4q21 microdeletions and common features of the minimal critical region

Clinical/common features	Minimal critical region [5]	Smallest described deletion [7]	Largest described deletion [5]	Current case report
Deletion	4q21.21-21.22	4q21.22-q21.23	4q21.21-q22.3	4q21.21-4q21.23
Size (Mb)	1.37	2.0	15.1	4.85
Age at diagnosis (years)	NA	7	8	5
<i>Craniofacial features</i>				
Frontal bossing, broad forehead	Yes	Yes	Yes	Yes
Downslanting palpebral fissures	ND	Yes	ND	Yes
Hypertelorism	Yes	Yes	No	Yes
Anteverted nostrils	ND	ND	Yes	Yes
Short philtrum	ND	ND	Yes	Yes
Hypoplastic ear-lobes	ND	No	Yes	Yes
Small mouth	ND	Yes	ND	Yes
Higharched palate	ND	Yes	ND	Yes
<i>Developmental delay</i>				
Neonatal hypotonia	Yes	No	Yes	Yes
Gross motor delay	Yes	moderate	Yes	Yes
Delayed speech	Yes	Yes	Yes	Yes
Stereotypic movements	ND	ND	ND	Yes
Behavioral disturbance	ND	Yes	ND	Yes
<i>Anthropometric and skeletal abnormalities</i>				
IUGR	ND	No	Yes	Yes
Birth weight (centile)	ND	50th	25th	25-50th
Postnatal growth delay	Yes	No	-5SD	-2SD
Conserved head circumference	Yes	+1SD	-0.5SD	+1 SD
Small hands and small feet	Yes	Yes	No	Yes
Brachydactyly	Yes	Yes	No	Yes
<i>Cerebral imaging abnormality</i>				
Ventricular dilation	ND	No	Yes	Yes
Corpus callosum hypoplasia	ND	No	ND	Yes
Cerebellar vermis hypoplasia	ND	No	ND	No
Frontal cerebral hypoplasia	ND	No	Yes	No

Yes: feature present; no: feature absent; ND: data not accessible, NA: not applicable.

determinants of the 4q21 phenotype. Our patient shares haploinsufficiency with the patient portrayed as having the smallest reported deletion in this region, a novel 2.0 Mb deletion encompassing three of the genes in the proposed minimal critical region: *HNRNPD*, *HNRPDL*, and *ENOPH1* [7]. The shared features between this patient and our patient, including macrocephaly, small hands and feet, developmental delay, and the distinctive facial features of broad forehead, hypertelorism and prominent lower incisors, stress the role of these genes as likely candidates for the shared phenotype through yet unrevealed mechanisms [7].

Among the dysmorphic features the characteristic brachydactyly observed in other patients was less pronounced in our index patient, and no shorter 2nd toe was observed as described in the classic phenotype. Joint laxity and hypermobile joints, also observed in our patient, have been described recently in a patient with a proximal 4q interstitial deletion of 24.89 Mb encompassing 4q12–4q21.21 [10] and is only known in 3 additional patients with proximal 4q deletions. In addition to the common neurocognitive characteristics seen in most 4q21 cases our patient also exhibited stereotypic movements and a behavioral disturbance including occasional

self-injurious behavior and aggression towards others as described in the patient with the 2 Mb deletion [7]. It is also noteworthy that good receptive language and communication by sign was observed in our patient besides absent speech also resembling the described case with a large proximal 4q deletion [10], however, more studies with the precise description of the deletion boundaries will be needed to point out genes responsible for the overlapping features.

The 4.85 Mb region involved in the deletion contains a number of genes, some of which have already been discussed as being major determinants of the phenotype [1,5], while the role of other genes and their impact on the phenotype still need to be elucidated. We have learned from previous works that haploinsufficiency of the minimal critical region is essential for the expression of the classic 4q21 phenotype, within this region, the genes *PRKG2* and *RASGEF1B*, have been identified as major determinants in the development of the characteristic features [5]. *RASGEF1B* encodes a highly conserved guanine nucleotide exchange factor for Ras family proteins. This protein superfamily is involved in various basic cellular functions such as signal transduction, cytoskeleton dynamics and intracellular trafficking. It is highly expressed in the central nervous system, and may play a role in actin and microtubule dynamics regulating both dendrite and spine structural plasticity [11]. Since several genes related to intellectual disability have been identified in the Rho-GTPase signaling pathway, *RASGEF1B* seems to play a role in the cognitive features of the 4q21 phenotype [5].

There is strong evidence that the second basic feature of the microdeletion syndrome, severe growth delay, can be attributed to the *PRKG2* gene which encodes a cGMP-dependent protein kinase type II protein. Mice with a null mutation of this gene developed postnatal dwarfism as a result of severe endochondral ossification defect at the growth plates and impaired chondrocyte growth. While small hands, short fingers and feet were described, no postnatal growth delay was observed in the patient with the smallest described deletion [7] not containing the *PRKG2* gene, while in patients deleted for the minimal critical region and in our current case growth delay was severe (Table 1). Those observations also underline that the haploinsufficiency of the *PRKG2* gene could explain growth failure [7] in most of the 4q21 patients. On the other hand, haploinsufficiency of *PRKG2* has previously also been linked to severe cognitive developmental delay [12].

Additionally the deletion in our patient also involved several genes (*BMP3*, *COQ2*, *MRPS18C*, *THAP9*, *HPSE*, and *CDS1*) for which no direct function can be linked to the features observed in our patient. In rat embryos, *Bmp3* was suggested to be involved in pattern formation

during early skeletal development [13]. In *Bmp3* $-/-$ embryos or newborns no skeletal defects were found, only increased trabecular metaphyseal bone density and total trabecular bone volume [14]. On the other hand, a missense mutation in the *BMP3* gene (F452L) was associated with cranioskeletal differences in canines [15]. Strehle et al. argued that haploinsufficiency of *BMP3* might be associated with short stature and other skeletal anomalies in 4q21 interstitial deletions [16]. Thus, it cannot be ruled out that haploinsufficiency of *BMP3* may also contribute to the cranial features observed in our patient, such as broad forehead and frontal bossing.

The *HPSE* gene encodes a heparanase belonging to the family of endoglycosidases which cleave the heparan sulfate side chain of heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) and contribute to the remodeling of the extracellular matrix for cell movement or the release of bioactive molecules from the extracellular matrix or cell surface [17]. Vlodavsky et al. demonstrated a correlation of *HPSE* expression and heparanase activity with increased metastatic potential in breast cancer tissues and cell lines [18]. Currently no direct function of the *HPSE* gene can be linked to developmental disorders, however, it can be assumed that the basic function of extracellular matrix remodeling might also be essential for neurodevelopment. Further detailed case reports or experimental data are needed to learn more about the clinical relevance of those genes.

Conclusions

We describe the first Hungarian patient with a de novo previously unreported interstitial 4q deletion, syndromic severe developmental delay, absence of spoken language and behavioral disturbance. The clinical symptoms in our patient partially overlap with reported 4q21 microdeletion cases. Among the multiple annotated genes our patient is also haploinsufficient for *RASGEF1B*, a strong candidate for the neurodevelopmental features and *PRKG2* for severe growth delay. In the future elucidation of the clinical relevance of several other deleted genes in 4q21 patients may help establish guidelines for adequate healthcare management of those patients. Our case of 4q21 deletion adds to the phenotypic spectrum of this novel microdeletion syndrome and underlines the importance of array CGH to uncover the heterogeneous causes of intellectual disability.

Methods

Patient report

The patient was a 5 year old girl born by caesarean section at 39th week of gestation as the second child of non-consanguineous healthy Hungarian parents, the family history was unremarkable. Her birth weight was 2750 g (25–50 pc), her length 49 cm (5–10 pc), the head

circumference 36 cm (+1SD). Her 5 and 10 minute Apgar scores were 9/10. In the perinatal period mild icterus, joint laxity in the hips, axial hypotonia and poor feeding was noted. At 1 week of age severe axial hypotonia and spasticity in the lower limbs was recognized and there was only slight improvement following extensive neurohabilitation. After 3 months her somatic and psychomotor development slowed down and has been very slow ever since. At 6 months of age the patient was hospitalized with severe obstructive bronchitis and during her first year she suffered several upper airway infections with dense mucous and chronic diarrhea, but *CFTR*-related diseases were excluded. At 14 months of age brain MRI revealed significantly widened and abnormally structured ventricles, diminished periventricular white matter and hypoplasia of the corpus callosum. At the age of 18 month the patient was referred to our genetic counseling unit because of severe hypotonia and developmental delay. Postnatal growth delay: weight was 9.5 kg (5–10 pc), height 68 cm (<3 pc) and head circumference 48.5 cm (+1 SD) and a distinctive facies including broad forehead, frontal bossing, downward slanting palpebral fissures, hypertelorism, hypoplastic ear-lobes, anteverted nostrils, short philtrum, small mouth, high-arched palate as well as short, small hands and feet, distally narrowing fingers, clinodactyly and joint laxity were noted. Neurological examination revealed severe generalized hypotonia and absent speech development. Gross motor milestones were severely delayed despite of extensive neurohabilitation: at the age of 2.5 years she was unable to sit alone, she did not crawl and was unable to stand alone. At the age of 5 years she was able to walk, sit alone, but had no speech. She had good receptive language and used signs and gestures to communicate but had no speech. Stereotypical movements such as hand clapping and flapping and a behavioral disturbance, including occasional self-injurious behavior and aggression toward others were observed. Epilepsy has not been noted so far and repeated EEGs gave negative results. Extensive metabolic (carnitine-ester profiling, amino acids, urine organic acids, isoelectric focusing for CDGs) and genetic testing (routine karyotyping, *CFTR* sequencing, mitochondrial mutation screening) yielded negative results.

Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH) analysis

Array CGH was performed using the Agilent Human Genome G3 SurePrint 8x60K Microarray (Agilent Technologies, USA), a high resolution 60-mer oligonucleotide based microarray containing 55,077 60-mer probes, spanning coding and non-coding genomic sequences with median spacing of 33 kb and 41 kb, respectively.

Purification of the DNA from blood was performed using the DNA Purification Kit NucleoSpin®Dx Blood (Macherey-Nagel, Germany) according to the manufacturer's protocol. Concentration and purity of the extracted DNA were measured with the NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc.). Pooled genomic DNA from peripheral blood leukocytes of phenotypically normal males or females from Promega was used as a reference (Promega Male/Female Reference DNA, Promega Corporation, USA).

Labeling and hybridization were carried out based on the Agilent protocol (Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis – Enzymatic Labeling Protocol v7.2; July 2012). Array image was acquired using an Agilent laser scanner G2565CA (Agilent Technologies, California, USA) and analyzed with the Agilent Feature Extraction software (v10.10.1.1). Results were presented by Agilent Cytogenomics software (v2.5.8.11). DNA sequence information refers to the public UCSC database (Human Genome Browser, Feb 2009 Assembly; GRCh37: hg19).

The deletion detected was aligned to known aberrations listed in publicly available databases, such as the DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources) [19], DGV (the Database of Genomic Variants) [20], Ensembl [21] and ECARUCA [22]. Parental samples were analyzed using the same array and method.

Consent

Written informed consent was obtained from the patient for publication of this Case report and any accompanying images. A copy of the written consent is available for review by the Editor-in-Chief of this journal.

Abbreviations

MRI: Magnetic Resonance Image; a(array) CGH: Array Comparative Genomic Hybridization; EEG: Electroencephalography; CDG: Congenital Disorder of Glycosylation; *CFTR*: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; GRCh37:hg19: Genome Reference Consortium human 37/human genome 19; UCSC database: University of California, Santa Cruz Genome Browser database; DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources; DGV: The Database of Genomic Variants; ECARUCA: European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations; CNV: Copy Number Variation.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

KK, KH and AF were responsible for the patient's clinical genetic examination. KK and KH contributed to the clinical description. BM, MCz and BD conceived and designed the molecular experiments. MCz and BD performed the array CGH and analyzed the data. KK, KH, MCz, BD, GyK and BM co-wrote the manuscript. BM revised the manuscript critically for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

Katalin Komlósi and Balázs Duga both should be considered 1st authors.

Acknowledgements

This work was supported by the OTKA 103983 grant to BM, the European Union and the State of Hungary, co-financed by the European Social Fund in the framework of TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 'National Excellence Program' to BD and supported by the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences to KK. We are grateful to the family for their cooperation.

Author details

¹Department of Medical Genetics, Clinical Centre, University of Pecs, Szegedi Street 12, Pecs H-7624, Hungary. ²Department of Neurology, Bethesda Children's Hospital, Bethesda Street 3, Budapest H-1146, Hungary. ³Szentágotthai Research Centre, University of Pecs, Ifjúság Street 20, Pecs H-7624, Hungary.

Received: 17 November 2014 Accepted: 13 February 2015

Published online: 03 March 2015

References

- Bartnik M, Nowakowska B, Derwinska K, Wisniewiecka-Kowalik B, Kedzior M, Bernaciak J, et al. Application of array comparative genomic hybridization in 256 patients with developmental delay or intellectual disability. *J Appl Genet*. 2014;55(1):125–44. doi:10.1007/s13353-013-0181-x.
- Nowaczyk MJ, Teshima IE, Siegel-Bartelt J, Clarke JT. Deletion 4q21/4q22 syndrome: two patients with de novo 4q21.3q23 and 4q13.2q23 deletions. *Am J Med Genet*. 1997;69(4):400–5.
- Harada N, Nagai T, Shimokawa O, Niikawa N, Matsumoto N. A 4q21–q22 deletion in a girl with severe growth retardation. *Clin Genet*. 2002;61(3):226–8.
- Friedman JM, Baross A, Delaney AD, Ally A, Arbour L, Armstrong L, et al. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *Am J Hum Genet*. 2006;79(3):500–13. doi:10.1086/507471.
- Bonnet C, Andrieux J, Beri-Dexheimer M, Leheup B, Boute O, Manouvrier S, et al. Microdeletion at chromosome 4q21 defines a new emerging syndrome with marked growth restriction, mental retardation and absent or severely delayed speech. *J Med Genet*. 2010;47(6):377–84. doi:10.1136/jmg.2009.071902.
- Dukes-Rimsky L, Guzauskas GF, Holden KR, Griggs R, Ladd S, Montoya Mdel C, et al. Microdeletion at 4q21.3 is associated with intellectual disability, dysmorphic facies, hypotonia, and short stature. *Am J Med Genet*. 2011;155A(9):2146–53. doi:10.1002/ajmg.a.34137.
- Bhoj E, Halbach S, McDonald-McGinn D, Tan C, Lande R, Waggoner D, et al. Expanding the spectrum of microdeletion 4q21 syndrome: a partial phenotype with incomplete deletion of the minimal critical region and a new association with cleft palate and Pierre Robin sequence. *Am J Med Genet A*. 2013;161A(9):2327–33. doi:10.1002/ajmg.a.36061.
- Zhou J, Hu P, Liu A, Li L, Ji X, Hui W, et al. [Array comparative genomic hybridization detection of a de novo 4q21.21–q22.1 deletion in a child with severe growth retardation]. *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi = Zhonghua yixue yichuanxue zazhi. Chinese J Med Gen*. 2014;31(1):52–5. doi:10.3760/cmaj.issn. 1003-9406.2014.01.012.
- Ensembl MapViewer. http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Overview?db=core&r=4%3A81408980-86261953.
- Hemati P, du Souich C, Boerkoel CF. 4q12–4q21.21 deletion genotype-phenotype correlation and the absence of piebaldism in presence of KIT haploinsufficiency. *Am J Med Genet*. 2015;167(1):231–7. doi:10.1002/ajmg.a.36821.
- Newey SE, Velamoor V, Govek EE, Van Aelst L. Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation. *J Neurobiol*. 2005;64(1):58–74. doi:10.1002/neu.20153.
- Uhlir MD. Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain. *J Biol Chem*. 1993;268(18):13586–91.
- Rosen V, Wozney JM, Wang EA, Cordes P, Celeste A, McQuaid D, et al. Purification and molecular cloning of a novel group of BMPs and localization of BMP mRNA in developing bone. *Connect Tissue Res*. 1989;20(1–4):313–9.
- Daluiski A, Engstrand T, Bahamonde ME, Gamer LW, Agius E, Stevenson SL, et al. Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat Genet*. 2001;27(1):84–8. doi:10.1038/83810.
- Schoenebeck JJ, Hutchinson SA, Byers A, Beale HC, Carrington B, Faden DL, et al. Variation of BMP3 contributes to dog breed skull diversity. *PLoS Genet*. 2012;8(8):e1002849. doi:10.1371/journal.pgen.1002849.
- Strehle EM, Gruszfeld D, Schenk D, Mehta SG, Simonic I, Huang T. The spectrum of 4q- syndrome illustrated by a case series. *Gene*. 2012;506(2):387–91. doi:10.1016/j.gene.2012.06.087.
- McKenzie E, Tyson K, Stamps A, Smith P, Turner P, Barry R, et al. Cloning and expression profiling of Hpa2, a novel mammalian heparanase family member. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;276(3):1170–7. doi:10.1006/bbrc.2000.3586.
- Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, et al. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat Med*. 1999;5(7):793–802. doi:10.1038/10518.
- DECIPHER. [<http://decipher.sanger.ac.uk>]
- the Database of Genomic Variants. [<http://projects.tcag.ca/variation>]
- Ensembl. [<http://www.ensembl.org>]
- ECARUCA. [<http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp>]

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom elsősorban témavezetőmnek *dr. Melegh Béla* professzor Úrnak, aki a különböző genetikai háttérű betegségek diagnosztikája és kutatási lehetőségei iránti érdeklődésemet felkeltette és lehetővé tette, hogy csatlakozhassak 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. Czakó Mártának*, aki bevezetett az array CGH vizsgálatok rejtelmeibe és szépségeibe, és a baráti támogatásáért a laborban töltött éveim alatt. Türelmével és szakmai útmutatásával nagyban elősegítette vizsgálataim sikeres kivitelezését és PhD disszertációm elkészítését.

Köszönettel és hálával tartozom *dr. Hadzsiev Kingának* és *dr. Komlósi Katalinnak*, akik kiváló klinikai szakértelmükkel és tapasztalatukkal segítséget nyújtottak a megfelelő beteganyag kiválasztásában, valamint a klinikai adatok szakszerű interpretálásában.

Külön köszönet jár az Orvosi Genetikai Intézet dolgozóinak és PhD hallgatóinak, így *dr. Berenténé dr. Bene Juditnak*, *Szabó Andrásnak*, *Bánfai Zsoltnak*, *dr. Kövesdi Erzsébetnek*, *Sümegei Katalinnak*, *Mátyás Petrának* és *Szalai Renátának*, akik szakmai tanácsaikkal és baráti támogatásukkal elősegítették vizsgálataim kivitelezését.

Hálával tartozom az Orvosi Genetikai Intézet minden asszisztensének, akik tanulmányaim alatt hozzáértő, lelkiismeretes munkájukkal és szakmai tapasztalatukkal segítettek.

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