

Kópiaszám eltérések vizsgálata minor anomáliás és epilepsziás betegekben

DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

SZABÓ ANDRÁS



Doktori iskola vezetője

Prof. Dr. Sümegi Balázs

Program és Témavezető

Prof. Dr. Melegh Béla

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Klinikai Központ, Orvosi Genetikai Intézet

Pécs, 2016

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
2. BEVEZETŐ	8
2.1 Az epilepszia történelmi háttere	8
2.2 Az epilepszia demográfiai megoszlása	10
2.3 Az epilepsziák csoportosítása	10
2.4 A monogénis epilepsziák genetikai háttere.....	17
2.5 Az epilepsziák kialakulásával kapcsolatba hozható genomiális eltérések.....	28
2.5.1 Rekurrens CNV-k.....	28
2.5.2 Nem rekurrens CNV-k	30
2.6 Az epilepsziák terápiás vonatkozásai.....	30
2.7 Kongenitális anomáliák.....	32
2.8 Kognitív fejlődési elmaradás.....	34
2.9 Genomanalizáló módszerek - aCGH	35
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	40
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	41
4.1 Mintavétel és tárolás.....	41
4.2 DNS izolálás	41
4.2.1 DNS izolálás.....	42
4.2.2 DNS tisztítás	43
4.3 G-sávok kromoszóma festés	44
4.3.1 Lymphocyta tenyésztés.....	45
4.3.2 Értékelés	45
4.4 Uniparentális diszómia	46
4.5 Metafázis FISH	47
4.5.1 A preparátumok előkezelése	49
4.5.2 Denaturálás és hibridizáció.....	49
4.5.3 Poszthibridizációs mosás és festés	49
4.5.4 Értékelés	50
4.6 Array komparatív genomiális hibridizáció.....	50
4.6.1 Minták és referenciák előkészítése.....	51
4.6.2 Minták és referenciák fragmentálása	52
4.6.3 Minta és referencia fragmentek amplifikálása és jelölése	52

4.6.4	Minták és referenciák tisztítása	53
4.6.5	Minta-referencia párok hibridizáltatása a lemez felületére	54
4.6.6	Lemez/ek mosása	54
4.6.7	Lemez/ek szkennelése	55
4.6.8	Adatok értékelése	55
5.	BETEGEK	56
5.1	1. Beteg.....	56
5.2	2. Beteg.....	57
5.3	3. Beteg.....	58
5.4	4. Beteg.....	59
5.5	5. Beteg.....	60
6.	EREDMÉNYEK	62
6.1	1. Beteg.....	62
6.1.1	G-sávok kromoszóma festés	62
6.1.2	Uniparentális diszómia vizsgálata	62
6.1.3	Metafázis FISH	62
6.1.4	Array komparatív genomiális hibridizáció	63
6.2	2. Beteg.....	64
6.2.1	G-sávok kromoszóma festés	64
6.2.2	Uniparentális diszómia vizsgálata	64
6.2.3	Metafázis FISH	64
6.2.4	Array komparatív genomiális hibridizáció	65
6.3	3. Beteg.....	67
6.3.1	G-sávok kromoszóma festés	67
6.3.2	Uniparentális diszómia vizsgálata	67
6.3.3	Metafázis FISH	67
6.3.4	Array komparatív genomiális hibridizáció	68
6.4	4. Beteg.....	69
6.4.1	G-sávok kromoszóma festés	69
6.4.2	Metafázis FISH	70
6.4.3	Array komparatív genomiális hibridizáció	70
6.5	5. Beteg.....	72
6.5.1	G-sávok kromoszóma festés	72
6.5.2	Metafázis FISH	72

6.5.3 Array komparatív genomiális hibridizáció	73
7. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	75
7.1 Az 1. beteg metafázis FISH és aCGH vizsgálata során detektált kópiaszám változások, valamint az érintett gének feltételezhető szerepének vizsgálata	75
7.2 A 2. beteg metafázis FISH és aCGH vizsgálata során detektált kópiaszám változások, valamint az érintett gének feltételezhető szerepének vizsgálata	82
7.3 A 3. beteg metafázis FISH és aCGH vizsgálata során detektált kópiaszám változások, valamint az érintett gének feltételezhető szerepének vizsgálata	83
7.4 A 4. beteg metafázis FISH és aCGH vizsgálata során detektált kópiaszám változások, valamint az érintett gének feltételezhető szerepének vizsgálata	93
7.5 Az 5. beteg metafázis FISH és aCGH vizsgálata során detektált kópiaszám változások, valamint az érintett gének feltételezhető szerepének vizsgálata	96
8. ÖSSZEFOGLALÁS	97
9. IRODALOMJEGYZÉK	99
10. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	108
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	112
12. MELLÉKLETEK	113

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

aCGH: Array komparatív genomiális hibridizáció

ADHD: Figyelemhiányos hiperaktivitászavar

ADNFLE: Autoszomális domináns nocturnal frontális lebeny epilepszia

ADPEAF: Autoszomális domináns parciális epilepszia auditoros tünetekkel

AED: Antiepileptikus szer

APOE: Apolipoprotein E

ARF6: ADP-Ribosylation Factor 6

ARX: Aristaless-related homeobox, X-linked

ASD: Pitvari szeptum defektus

ASPM: Abnormal spindle-like, microcephaly-associated

BFNE: Benignus familiáris neonatális epilepszia

BFPP: Bilaterális frontoparietális polymicrogyria

BP1-5: Töréspont 1-5

CACNA1H: Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha-1H subunit

CAE: Gyermekkori absence epilepszia

CDKL5: Cyclin-dependent kinase-like 5

CGH: Komparatív genomiális hibridizáció

CHD: Veleszületett szívbetegség

CHR: Kromoszóma

CHRNA4: Cholinergic receptor, neuronal nicotinic, alpha polypeptide 4

CHRNA7: Cholinergic receptor, neuronal nicotinic, alpha polypeptide 7

CLCN2: Chloride channel 2

CNV: Kópiaszám variáció

CVD: Kardiovaszkuláris megbetegedés

Cy3: Cyanin3

Cy5: Cyanin5

CYFIP1: Cytoplasmic FMRP-interacting protein 1

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DCX: Doublecortin

DNS: Deoxiribonukleinsav

DSGM: Dévény Speciális manuális technika - Gimnasztika Módszer

EDTA: Etil-diamin-tetraecetsav

EEG: Elektroencefalográfia

EFMR: Epilepszia és mentális retardáció kizárólag lányokban

EHMT1: Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1

EIEE: Burst-suppression mintával járó kora gyermekkori epilepsziás encephalopátia

FIME: Familiáris infantilis myoclonusos epilepszia

FISH: Fluoreszcens in situ hibridizáció

FLNA: Filamin A

FS: Fokális görcs

GABA: Gamma-aminobutyric acid

GABRA1: Gamma-aminobutyric acid receptor, alpha-1

GABRA5: Gamma-aminobutyric acid receptor, alpha-5

GABRB3: Gamma-aminobutyric acid receptor, beta-3

GABRD: Gamma-aminobutyric acid receptor, delta

GABRG2: Gamma-aminobutyric acid receptor, gamma-2

GABRG3: Gamma-aminobutyric acid receptor, gamma-3

GBS: Group B streptococcus

GEFS+: Generalizált epilepszia plusz lázgörcs

GERD: Gastroesophagealis reflux betegség

GLUT1: Glucose transporter 1

GPR56: G-protein coupled receptor 56

GTP: Guanosine-5'-triphosphate

HLA: Humán leukocita antigén

HPLC: Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia

IGE: Idiopátiás generalizált epilepszia

IGF1R: Insulin-like growth factor 1 receptor

ILAE: International League Against Epilepsy

IS: Infantilis spazmus

IUGR: Méhen belüli növekedés-visszamaradás

KCNQ2: Potassium channel, voltage-gated, KQT-like subfamily, member 2

KCNQ3: Potassium channel, voltage-gated, KQT-like subfamily, member 3

KLF13: Kruppel-like transcription factor 13

LGI1: Leucine-rich, glioma inactivated 1

LIS-1: Lissencephaly-1

MAE: Myoclonusos-atónusos epilepszia

MAGEL2: MAGE-like 2

MBD5: Methyl-CpG binding domain protein 5

MCPH: Autoszomális recesszív primér mikrokefália

MCSZ: Mikrokefália, görcsök és fejlődésbeli késés

MECP2: Methyl-CpG-binding protein 2

MHC: Major histocompatibility complex

MKRN3: Makorin 3

MLL3: Myeloid/Lymphoid or mixed-lineage leukemia protein 3

MMR oltás: Morbilli-mumps-rubeola oltás

MRI: Mágnesesrezonancia-képalkotás

NDN: Necdin

NGS: Új-generációs szekvenálás

NIPA1: Nonimprinted gene in Prader-Willi syndrome/Angelman syndrome chromosome region 1

NIPA2: Nonimprinted gene in Prader-Willi syndrome/Angelman syndrome chromosome region 2

NR1I3: Nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3

OTUD7A: OTU domain-containing protein 7A

PAF-AH: Platelet-activating factor acetylhydrolase

PBS: Foszfátpuffer-oldat

PC: Percentilis

PCDH19: Protocadherin 19

PCSK6: Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6

PH: Periventrikuláris heterotópia

PMGYA: Aszimmetrikus polymicrogyria

PML: Progresszív multifokális leukoencephalopátia

PNKP: Polynucleotide kinase 3'-phosphatase

PWACR: Prader-Willi szindróma/Angelman szindróma kritikus régió

PWS/AS: Prader-Willi szindróma/Angelman szindróma

PWSCR: Prader-Willi szindróma kritikus régió

SCN1A: Sodium channel, neuronal type 1 alpha subunit

SCN1B: Sodium channel, neuronal type 1 beta subunit

SCN2A: Sodium channel, voltage-gated, type 2 alpha subunit

SCN3A: Sodium channel, voltage-gated, type 3 alpha subunit

SCN9A: Sodium channel, voltage-gated, type 9 alpha subunit

SD: Standard deviáció

SELS, VIMP: Selenoprotein S

SIN3: SIN3 transcription regulator family member A

SMARCB1: SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily B, member 1

SNP: Egy pontos nukleotid polimorfizmus

SNRPA1: Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A1

SNRPN: Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N

STR: Rövid tandem ismétlődés

STXBP1: Syntaxin-binding protein 1

TBC: Tre-2/Bub2/Cdc16 domain-containing proteins

TBC1D24: TBC1 domain family, member 24

TLE: Temporális lebeny epilepszia

TUBA1A: Tubulin, alpha-1A

TUBB2B: Tubulin, beta-2B

TUBGCP5: Tubulin complex-associated protein 5

UBE3A: Ubiquitin Protein Ligase E3A

UPD: Uniparentális diszómia

VSD: Kamrai szeptum defektus

2. BEVEZETŐ

2.1 Az epilepszia történelmi háttere

Az epilepszia megjelenése már a Kr.e. 1600-1700-as években felkeltette az orvoslással foglalkozó emberek érdeklődését. A legelső, egyiptomi és kínai írásos bizonyítékok a jellegzetes kórkép alapján az epilepsziát még természetfeletti jelenséggént tüntették fel [1, 2]. Az orvostudomány fejlődésével, a tapasztalatok gyűjtésével a Kr.e. 440-es évekre Hippokratész arra a következtetésre jutott, hogy az epilepszia „nem szent betegség (nem Morbus Sacer)”, hanem az agy betegsége. A magyar középkorra számos elnevezése alakult ki a betegségnek, melyek között szerepelt a nyavalya, a frász és az eskór is. A betegség hátter ismeretének hiánya és a specifikus kórkép által az emberiségben kialakult félelem különböző elméletek megszületéséhez vezetett, melyek legtöbbje túlvilági eredetet feltételezett. A vélt eredet következtében a betegség kezdetleges terápiája a túlvilági hatalmakkal való kapcsolatfelvétel révén valósult meg. 1494-ben a Malleus Maleficarum (a boszorkányüldözés kézikönyve) az epilepsziás rohamot a boszorkányok jellemzőjeként írta le, ami az epilepsziás nők üldöztetéséhez, kínzásához és kivégzéséhez vezetett, melynek eredményeként ebben az időszakban több, mint 200.000 beteg nő veszítette életét [3].

Pár száz évvel később az epilepszia hátterének tanulmányozása robbanásszerű fejlődésnek indult. Fiziológiai kísérletek és értelmezések sora került leírásra, melyek közül az egyik legemlékeztetőbb Galvani 1791-es békakísérlete, ami egyben a bioelektromos kommunikáció bizonyítéka is. A XIX. század angol neurológiai iskolája Jackson, Reynold és Gowers hozzájárulásával megteremtette az epilepszia-kutatás modern éráját. Saját és elődei tapasztalatain alapulva leírták, hogy a betegség érintheti a motoriumot, tudatot, szenzóriumot és a viselkedést is. „Az epilepsziás roham oka az idegrendszerből eredő epizodikus elektromos kisülés, mely az izmokra terjed. Az epilepsziás rohamok tünetei függenek az agyi elektromos zavar helyétől.” A számos bizonyíték az agy fokozott ingerlékenységére a terápiás vonatkozás megváltozásához vezetett, ami a gyógyszeres kezelés irányába fordult. Az első antiepileptikum, a bromid alkalmazására 1857-ben került sor [4]. 1912-től a bromidkezelésnél lényegesen kevesebb mellékhatással rendelkező phenorabitál terápia került előtérbe, mely a mai napig is, bizonyos indikációk esetén alkalmazott antiepileptikum. A gyógyszeres terápia hatékonyságának növelése érdekében számos új antiepileptikum alkalmazására sor került, köztük 1939-ben a phenytoinéra, 1953-ban a carbamazepinére, valamint 1963-ban a valproátéra [5]. Az epilepszia terápiája szempontjából a carbamazepine és valproát kezelés

bizonyult a leginkább hatékonyak, azonban a gyógyszerkutatás folyamatos fejlődése, és egyéb terápiás szerek célmolekuláinak felfedezése újabb és újabb antiepileptikus szerek alkalmazásához vezethet.

Az epilepszia és a központi idegrendszer kapcsolatának egyik meghatározó fordulópontja Sommer 1880-as vizsgálata, mely során egy epilepsziás betegben hippocampalis sclerosis-t írt le. Sommer találatát az epilepsziás betegek agyának vizsgálatára helyezte a hangsúlyt, melyhez nagy segítséget nyújtott az 1924-ben egy német fiziológus-pszichiáter, Hans Berger által regisztrált első humán elektroencefalogram (EEG). Közel 10 év elteltével, 1934-ben Fisher és Lowenback által sikerült az első epileptiform EEG kép demonstrálása, melyet Gibbs, Davis és Lennox absence epilepsziás mintázatának leírása követett 1935-ben [6]. Az EEG alkalmazása rohamos gyorsasággal terjedt, és nélkülözhetetlenné vált az epilepszia diagnosztizálásában. 1936-ban megnyílt az első EEG laboratórium a Massachusetts General Hospital-ban. Az 1950-es években William Grey Walter az EEG topográfia feltalálásával lehetővé tette az agy felületének térképezését az elektromos aktivitás szempontjából, azonban alkalmazása napjainkban csak kísérleti körülmények között elfogadott.

Napjaink diagnosztikai eszköztárának egyik meghatározó tagja a mágnesesrezonancia-képalkotás (MRI), melynek 1971-es felfedezése forradalmasította a különböző agyi léziók pozíciójának in vivo leképezését [7, 8]. 1977 után az MRI alkalmazásával lehetőség nyílt az agyi strukturális elváltozások és az epilepszia közti összefüggések alaposabb tanulmányozására. Az MRI klinikai diagnosztikai értékének elismeréseként Paul Lauterbur-t és Sir Peter Mansfield-et 2003-ban fiziológiai és orvostudományi Nobel-díjban részesítették.

Az újuló diagnosztikai eszközök által nyert tapasztalatok révén az epilepszia megfogalmazása kiterjedt az agy funkcionális és/vagy morfológiai rendellenességeire. A különböző agyi területek morfológiai érintettsége előtérbe helyezte a műtéti beavatkozások alkalmazását.

A tudományos szemlélet fejlődése vezetett az International League Against Epilepsy (ILAE) 1909-es budapesti megalapításához, ami az epileptológiát már mint önálló diszciplínát kezelte.

Az ILAE jelenlegi legfrissebb (2014. évi) definiálása alapján epilepsziás betegnek nyilvánítható azon személy, aki az alábbi kondíciók legalább egyikének megfelel:

1. Több, mint 24 óra alatt legalább két nem provokált (vagy reflex) rohamot mutat.

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

Az epilepszia diagnózisa alól feloldandó az a beteg, aki életkorfüggő epilepszia szindrómában szenved, és a szindrómára jellemző életkort elhagyta, illetve az a személy, aki az elmúlt 10 évben rohammentes volt, az utolsó 5 évben antiepileptikus kezelés nélkül.

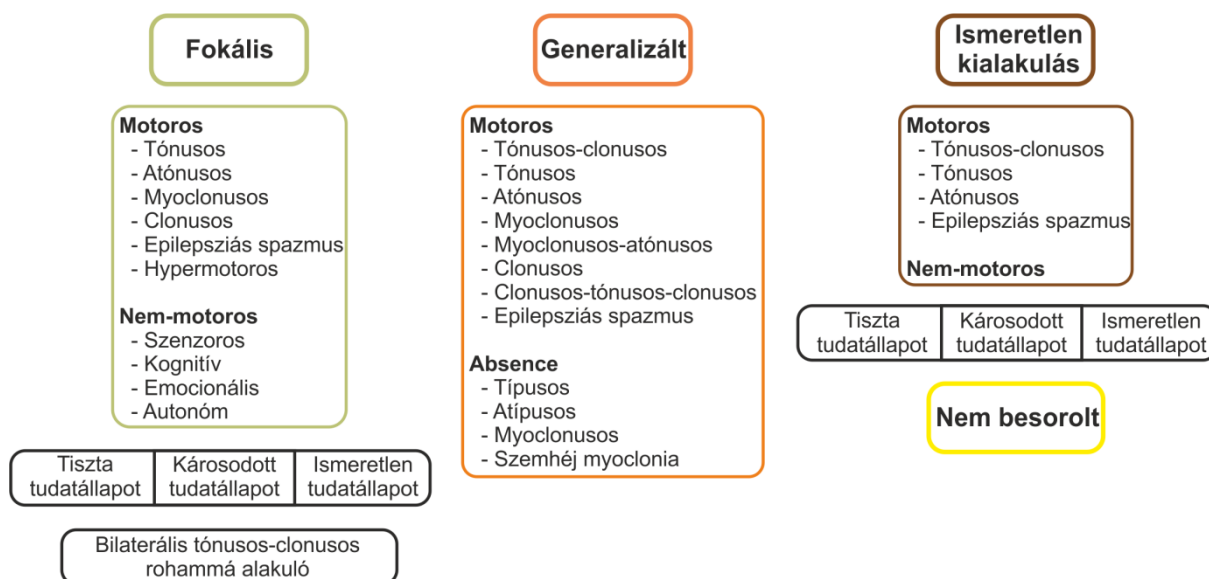
2.2 Az epilepszia demográfiai megoszlása

Világszerte az emberek közel 1%-a szenved epilepsziás megbetegedésben [9]. Az epilepsziás esetek megközelítőleg 80%-át a fejlődő országok népessége teszi ki [10]. A betegség kialakulásának valószínűsége a kor előrehaladtával nő [11, 12]. A fejlett világ országaiban az epilepszia kezdete az újszülött, illetve korai gyermekkorra, míg a fejlődő világ országaiban a késői gyermekkorra, vagy a korai felnőttkorra tehető. A népesség 5-10%-ában 80 éves életkor alatt kialakul egy nem provokált epilepsziás roham, míg egy további roham kialakulásának valószínűsége már eléri a 40-50%-ot [13, 14].

2.3 Az epilepsziák csoportosítása

Az epilepsziás rohamok széles spektruma révén osztályozásuk több szempontból történhet. Az agyi érintettség szempontjából megkülönböztetünk fokális, valamint generalizált rohamokat. A fokális rohamok az agykéreg epilepsziás gócaiból indulnak ki, és ennek megfelelő motoros, érző, kognitív, emocionális és összetett jelenségekkel járnak. Generalizált rohamoknak nevezzük a kétoldali motoros jelenségekkel járó epilepsziás rohamokat, valamint az absence rohamokat. Az epilepsziás betegek megközelítőleg 60%-a motoros rohamokkal társuló epilepsziában szenved. Ezen betegek 1/3-ában a rohamok generalizált formában kezdődnek, érintve az agy mindkét hemiszféráját, míg 2/3-ában a betegség fokális rohamok megjelenésével kezdődik, mely csak az egyik agyi hemiszférát érinti. Az életkor előrehaladtával generalizálódó fokális rohamokat bilaterális tónusos-clonusos rohamoknak nevezzük. Az epilepsziás betegek másik, 40%-ot kitevő csoportját a nem motoros rohamokkal rendelkező betegek teszik ki [15, 16].

A motoros aktivitást mutató fokális és generalizált rohamok leggyakrabban előforduló típusai a tónusos, atónusos, clonusos, tónusos-clonusos, clonusos-tónusos-clonusos, myoclonusos, myoclonusos-atónusos és hypermotoros rohamok, valamint az epilepsziás spazmus [17]. *(1. ábra)*



1. ábra: Az epilepsziás rohamok 2016. évi ILAE csoportosítása

Motoros aktivitást mutató rohamtípusok:

Tónusos:

A tónusos roham során az érintett testrész vagy végtag bizonyos helyzetben rögzül. Rendszerint éjszaka fordul elő és maximum 1 percig tart, mely általában tudatzavar kialakulásával is együtt jár.

Atónusos:

Az atónusos rohamok az izomaktivitás elvesztésével járó rohamok, melyek időtartama általában több mint 1 másodperc. A folyamat eredményeként az érintett izomtónusa megszűnik, a beteg összeesik [18].

Clonusos:

A clonusos roham szabálytalan, tónusos szakasz nélküli aszimmetrikus izomrángások sorozata, mely tudatzavarral nem jár.

Tónusos-clonusos:

A tónusos-clonusos roham (más néven grand mal roham) nem korlátozódik egy-egy testrészre, hanem végigterjed az egész testen. Az összes izom megfeszül (tónusos görcs), az alsó és felső végtagok teljesen nyújtott állapotban rögzülnek. A hirtelen izomösszehúzódás a tüdőkből a levegőt hirtelen kipréseli, ami furcsa hanghatás formájában hallható. Másodpercekkel később az összes izom rángásokba kezd (clonusos görcs). A roham során a beteg elveszíti az eszméletét, összeesik. A fokozott nyáleválasztás miatt

a beteg szája habos, gyakran elharapja a nyelvét, olykor a vizeletét sem tudja tartani. A légzés megszűnése gyakran vezet a beteg elkéküléséhez. A rángógörcsök rövid ideig tartanak, majd a test ellazul. További percek elteltével a beteg lassan visszanyeri eszméletét, de tudata még hosszú ideig ködös, homályos lehet (posztiktális szakasz), vagy a beteg elalszik. A köztudatban a legismertebb epilepsziás roham típus [10, 19].

Clonusos-tónusos-clonusos:

A clonusos-tónusos-clonusos rohamokra jellemző a mindkét oldali végtagokat érintő egy, vagy több rángást követő, fentebb részletezett tónusos-clonusos rángás. A kezdeti rángás legtöbb esetben egy rövid idejű clonusos vagy myoclonusos aktivitás. A juvenilis myoclonusos epilepsziák esetén a leginkább előforduló roham típus.

Myoclonusos:

A myoclonusos rohamok hosszabb periódusokban ismétlődő rohamok, melyek a felső végtagok szimmetrikus, ritmusos rángásával járnak. Ez a rohamforma sokszor terápiarezisztens, a betegek intelligenciaszintje rohamosan romlik. A roham naponta akár több száz alkalommal is bekövetkezhet, azonban a görcsöket nem kíséri tudatzavar [20].

Myoclonusos-atónusos:

A myoclonusos-atónusos rohamok a generalizált rohamok közé tartozó rohamok, melyek esetén a myoclonusos rohamot atónusos roham követi.

Hypermotoros:

A hypermotoros rohamok a két kezet vagy két lábat érintő prominens motoros aktivitások (rúgás, csapkodás, taps, kezek összedörzsölése), esetenként szexuális automatizmusok, valamint egyéb autonóm változások a tudat megtartásával vagy annak elvesztésével.

Epilepsziás spazmus:

Az epilepsziás spazmusokra jellemző a proximális és törzsizomzat hirtelen flexiója, extenziója, illetve ezek együttes előfordulása, mely általában tartósabb, mint egy myoclonusos mozgás, azonban kevésbé tartós, mint egy tónusos görcs. Limitált formái közé tartoznak a grimaszolás, a fej bólogató mozgása vagy a finom szemmozgások. A különböző epilepsziás spazmusok kialakulása különböző életkorokhoz kötött, melyek közül az egyik leggyakrabban előforduló a csecsemőkori spazmus.

A motoros aktivitást nem mutató rohamok alkotják a fokális rohamok nem-motoros csoportját, mely kiterjed a szenzoros, kognitív, emocionális, valamint autonóm jegyekre is.

Az absence epilepszia tudatvesztéssel jár, kialakulása leggyakrabban 4-10 éves korban történik. A rohamok figyelmeztető jelek nélkül ismétlődnek, akár napi 10-50 roham is lehetséges. Jellemző tünetei a gyakori pislogás illetve a fej normál tartásának esetleges változása. A betegekre nem jellemző a posztiktális fázis megléte, azonban néhány esetben megfigyelhető a rohamot követő tudatzavar [21, 22]. A típusos absence rohamok mellett megkülönböztethetünk az absence rohamokra kevésbé jellemző tünettannal rendelkező atípusos, illetve különböző myoclonusos absence rohamokat is.

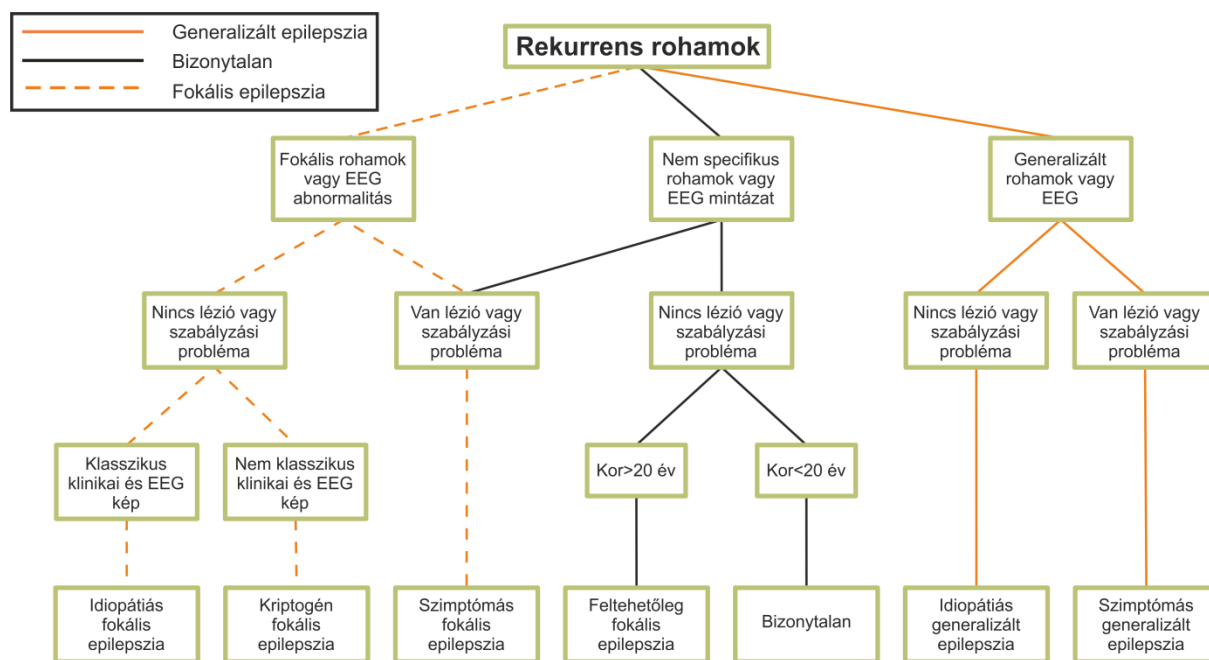
A fokális rohamok sok esetben különböző tünetekkel társíthatók, melyek közül kulcsfontosságú a károsodott tudatállapot, valamint a külső tényezőkre való reagálás, illetve a memória és a tudatos viselkedés zavara. Az epilepsziás rohamok csoportosítása során nagy szerepet kap az érintett tudatállapotának megléte vagy hiánya.

Az epilepsziás rohamok bizonyos hányadánál a roham aktív fázisát egy úgynevezett posztiktális fázis követi, mely megelőzi a normális tudatállapot visszaállását [23]. Betegenként változó, 3-15 perces fázis, azonban néhány esetben órákra is elhúzódhat. A posztiktális fázis egyéb tünetei közé tartozik az általános kimerültségérzet, a fejfájás, nehézségek a beszédben és a viselkedési zavar is [12, 24]. Az epilepsziás betegek 6-10%-a mutat pszichózist a rohamokat követő időszakokban, mely gyakran emlékezetkieséssel párosul [25].

Az epilepsziás betegek 6%-ában az epilepsziás roham kiváltható valamilyen specifikus stimulus alkalmazásával. A reflex rohamok kiváltásában legfőképpen a villogó fény, illetve a hirtelen hanghatások játszanak szerepet. Az epilepsziás rohamok egy része kiváltható sorozatos exhalálással [26, 27].

Az epilepszia kialakulása nagy mértékben befolyásolja az érintett betegek pszichoszociális viselkedését. A betegség következtében kialakulhat stigmatizáció, szociális izoláció és fogyatékoság is, melynek eredménye alacsonyabb iskolai végzettség, valamint az átlagosnál rosszabb elhelyezkedés is lehet [15]. Számos betegség kialakulásának valószínűsége megnő epilepsziás betegek körében. Ezek közé tartozik a depresszió, a szorongásos megbetegedések, a migrén és a figyelemhiányos hiperaktivitás-zavar (ADHD). Az epilepszia gyakori megjelenésű az autista betegekben is [28-31].

Az epilepsziás rohamok osztályozása egy másik szempontból a patomechanizmus alapján történik. A tünetek kialakulásában egyaránt nagy szerepet tulajdonítanak mind a veleszületett agyi malformációknak, mind a szerzett lézióknak, valamint a genetikai eredetnek. [17, 32]. (2. ábra [33])



2. ábra: Az epilepsziás rohamok csoportosítása az érintett agyi régió, illetve a genetikai érintettség szempontjából

Az epilepsziás rohamok sajátosságai, az életkor, az érintett központi idegrendszeri terület, illetve a rohamok kialakításában szerepet játszó tényezők alapján számos epilepszia szindróma megkülönböztetése is lehetővé vált. (1. táblázat)

Enkefalopátiás epilepsziák	Idiopátiás generalizált epilepsziák	Idiopátiás fokális epilepsziák	Szimptómás fokális epilepsziák	Reflex epilepsziák
Korai myoclonusos epilepszia (EME)	Benignus gyermekkori myoclonusos epilepszia (BMEI)	Benignus familiáris neonatalis görcs (BFNS)	Meziális temporális lebeny epilepszia (MTLE)	Idiopátiás fotoszenzitív occipitális lebeny epilepszia (IPOLE)
Ohtahara Szindróma (OS)	Gyermekekori absence epilepszia (CAE)	Benignus familiáris és nem familiáris infantilis görcs (BFNIS)	Laterális temporális lebeny epilepszia (LTLE)	Vizuális minta szenzitív epilepszia (VPSE)
West Szindróma (WS)	Juvenilis absence epilepszia (JAE)	Centrotemporális tüskékkel járó benignus gyermekkori epilepszia (BCECTS)	Frontális lebeny epilepszia (FLE)	Elsődleges olvasási epilepszia (PRE)
Lennox-Gastaut Szindróma (LGS)	Juvenilis myoclonusos epilepszia (JME)	Korai kezdetű benignus, gyermekkori occipitális epilepszia (BCEOS-1)	Parietális lebeny epilepszia (PLE)	Megriadás-indukálta görcsrel járó epilepszia (ESIS)
Alvás alatti folyamatos tüske-hullám mintával járó epilepszia (ECSWS)	Kizárólag generalizált tónusos-clonusos görcsrel járó epilepszia (EGTCS)	Késői kezdetű, gyermekkori occipitális epilepszia (BCEOS-2)	Occipitális lebeny epilepszia (OLE)	
Gyermekekori migráló fokális görcs (MFSI)	Generalizált epilepszia plusz lázgörcs (GEFS+)	Autoszomális domináns nocturnális frontális lebeny epilepszia (ADNFLE)	Hemikonvulzió-Hemiplegia Szindróma (HHS)	
Dravet Szindróma (DS)	Myoclonusos absence epilepszia (EMA)	Familiáris temporális lebeny epilepszia (FTLE)	Rasmussen Szindróma (RS)	
Nem progresszív rendellenesség myoclonusos epilepsziával (MEND)	Myoclonusos-atóniás görcsrel járó epilepszia (EMAS)	Változó fókuszú familiáris fokális epilepszia (FFEVF)		
Progresszív myoclonusos epilepszia (PME)				

1. táblázat: Az ILAE által leírt epilepszia szindrómák

A genetikai és fejlődési rendellenességek következtében kialakuló epilepsziás rohamok az esetek többségében gyermekkorban jelentkeznek, míg a tumorok és a stroke inkább az idősebbek epilepsziás megbetegedéséhez járulnak hozzá [10, 15]. Az agyi daganattal rendelkező betegek közel 30%-ában alakul ki az epilepszia valamely típusa, ami az epilepsziás betegek közel 4%-át teszi ki. Egyéb agyi léziók, mint a különböző cavernosus malformációk és az arteriovenosus malformációk meglepte 40-60%-os rizikófaktorot jelent a hordozók számára, míg a stroke-os betegek 2-4%-ában fejlődik ki epilepszia. A fejtraumák az epilepsziás betegek 6-20%-ában járulnak hozzá a tünetek kialakulásához. Míg az enyhe koponyasérülések az epilepsziára való fogékonyságot a 2-szeresére, addig a súlyosabb agyi sérülések a 7-szeresére emelik [34]. Az agyi traumák mellett a különböző központi idegrendszeri fertőzések, mint a meningitisz, a herpes simplex encephalitis, a neurocysticercosis, a malária, a toxoplazmózis és a toxokariázis is meghatározó szereppel bírnak a különböző típusú epilepsziák kialakításában. Meningitisz esetén az epilepszia rizikófaktor a 10%-ot, míg herpes simplex encephalitis esetén a 25%-ot is elérheti. A

galandféreggel gyakran fertőzött területekről származó epilepsziás betegek közel felében a neurocysticercosis következményeként alakulnak ki az epilepsziás tünetek [34-36]. A központi idegrendszer fertőzései mellett összefüggést találtak az alkoholizmus, az Alzheimer kór, a sclerosis multiplex, a sclerosis tuberosa, az autoimmun encephalitis, valamint az alultápláltság és az epilepszia kialakulása között is [37]. (3. ábra)



3. ábra: Az epilepsziák kialakulásában szerepet játszó tényezők

Egypetjű ikervizsgálatok kimutatták, hogy az egyik testvér epilepsziás érintettsége esetén a másik testvérben a betegség kialakulására 50-60%-os esély van, míg kétpetjű ikrek esetén ez 15%-ra csökken. Amennyiben az ikerpár mindkét tagja érintett volt, az epilepszia típusa a legtöbb esetben (70-90%) azonosnak bizonyult. A közeli rokonok vizsgálata az átlagos populációnál 5-ször nagyobb rizikót eredményezett az epilepszia kialakulása szempontjából. A Down szindrómás betegekben 1-10%-os, míg Angelman szindrómás betegekben 90%-os epilepszia előfordulási valószínűséget mutattak ki [34, 38]. Az elmúlt évtizedekben a klinikai molekuláris diagnosztika fejlődése lehetővé tette az epilepszia genetikai hátterének mélyrehatóbb tanulmányozását. Az epilepsziás megbetegedések egy részének kialakulása (1-2%) egy érintett gén defektusával hozható összefüggésbe, míg a legtöbb epilepszia kialakulásában több gén interakciója, illetve bizonyos környezeti faktorok megléte is nagy szerepet kap. A mindennapi gyakorlatban még napjainkban is használatos az ILAE egy

korábbi definíciója, mely alapján nevezetesen a genetikai háttérrel rendelkező epilepsziák mintegy szinonímájaként használjuk az idiopátiás epilepszia elnevezést. Azok az epilepsziák, amik feltételezhetően nem genetikai okokra vezethetők vissza, azonban a kialakulásukban szerepet játszó pontos szerkezeti károsodás sem ismert, alkotják a kriptogén epilepsziák csoportját. Az utóbbi időben ezt az epilepszia csoportot „feltehetőleg szimptomás” csoportként is emlegetik [39]. (2. ábra) Azokban az esetekben, amikor a betegség kialakulásáért egy gén defektusa tehető felelőssé, legnagyobb százalékban ioncsatorna defektusok, enzim defektusok, GABA defektus és G-protein kapcsolt receptor defektusok állnak a háttérben [20, 32, 40].

2.4 A monogén epilepsziák genetikai háttere

Az eddig leírt, az epilepszia kialakulásában szerepet játszó gének (2. táblázat):

- *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A*, *SCN9A* és *SCN1B*: A feszültségfüggő Na-csatorna alegységek (*SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A*, *SCN9A* és az *SCN1B*) defektusa számos epilepszia típus kialakításában meghatározó szerepet játszik, egészen a benignus familiáris neonatális epilepsziától (BFNE) a lázgörcsrel és generalizált rohamokkal társuló epilepsziákig (GEFS+). A feszültségfüggő Na-csatornában bekövetkező mutációk a generalizált rohamokkal járó epilepsziák körében előforduló leggyakoribb mutációk, melyek közül legnagyobb százalékban a *Sodium channel, neuronal type 1 alpha subunit* (*SCN1A*) gén érintett. A mutációk következtében a feszültségfüggő ioncsatornák Na-ion áteresztő képessége lecsökken, ami a GABA-erg (Gamma-aminobutyric acid) interneuronok elektromos ingerelhetőségének változásához vezet. Az *SCN1A* gén és az epilepszia kapcsolatának vizsgálata során megközelítőleg 700 különböző mutáció felfedezésére került sor, mely alapján az *SCN1A* gén a leggyakrabban mutálódott epilepszia gén. A lókuszt patogénikus variánsainak allélikus heterogenitása rendkívül magas, mely nagyban hozzájárul a fenotípusos sokszínűség kialakulásához. A misszensz mutációk legtöbbje a fehérje funkcióvesztéséhez (Dravet szindróma), és génexpresszió változások kialakulásához vezethet. A *Sodium channel, voltage-gated, type 2 alpha subunit* (*SCN2A*) Na-csatorna alegységben bekövetkező misszensz mutációk a feszültségfüggő Na-csatornák plazmamembrán denzitásának csökkenéséért felelősek, melyek egy jóindulatú csecsemőkori epilepszia (BFNE) kialakulásában játszanak szerepet. A patogénikus *SCN2A* mutációk jóval kisebb arányban fordulnak elő a monogén epilepsziások körében, mint az *SCN1A* mutációk. A *Sodium channel, voltage-gated, type 3 alpha subunit* (*SCN3A*) alegység esetén

mindössze egyetlen ismert mutáció patogenitása bizonyított, ami kriptogén fokális rohamokkal járó epilepszia kialakulásához vezet. A feszültségfüggő Na-csatornák egy másik alegységében, a főként a perifériás idegrendszerben expresszáldó *Sodium channel, voltage-gated, type 9 alpha subunit*-ban (*SCN9A*) bekövetkező mutációk a lázgörcsszel társuló familiáris epilepszia kialakulásában játszanak szerepet, azonban felmerült kapcsolat a Dravet szindróma kialakulása és az *SCN9A* mutációi között is.

Az α -alegységek kiegészítő alegységeinek vizsgálatai során egyéb, az epilepszia kialakulásában szerepet játszó mutációk azonosítása történt meg. A *Sodium channel, neuronal type 1 beta subunit* (*SCN1B*) génben talált mutációk legfőként a GEFS+ kialakulásához vezetnek, azonban bizonyos esetekben a temporális lebenyt érintő epilepszia kialakulása is megfigyelt. Az *SCN1B* funkcióvesztésének eredménye a pórust formáló α -alegységeken átáramló Na-ionok kontrolljában bekövetkező változás, ami az idegsejt Na-áramlásának és elektrokémiai potenciáljának megváltozásához vezet. Klinikai vizsgálatok igazolták, hogy egy homozigóta funkcionális nullmutáns *SCN1B*-s páciens esetén a mutáció autoszomális recesszív módon okozhatta a Dravet szindróma kialakulását [41-48].

- *CACNA1H*: A feszültségfüggő T-típusú kalcium csatornák mediálják a sejt kalcium bevitelét, ami által szabályozzák a kalcium-érzékeny sejtfolymatokat és a sejtek ingerelhetőségét. A *Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha-1H subunit* (*CACNA1H*) génben detektált eltérések és a gyermekkori absence epilepsziák (CAE) kialakulása közti kapcsolat számos bizonyítékkal alátámasztott. Egy további lázgörcsszel járó epilepsziás (FS), valamint egy myoclonusos-atónusos epilepsziás (MAE) betegben talált két különböző, szintén a csatornafunkciót érintő eltérés, a korábbi vizsgálatokat is figyelembe véve kiterjesztette a *CACNA1H* gén általános szerepét az epilepszia kialakulásában. A legtöbb vizsgált variáns funkcionyeréses mutáció következménye, mely egy megnövekedett kalcium áramlás kialakulásához, így a normál agyi működés megváltozásához vezet. A *CACNA1H* gén mutációi nagy szerepet kapnak a genetikailag komplex generalizált epilepsziák egy széles spektrumának kialakításában, azonban egymagukban nem okoznak epileptikus tüneteket [41, 49, 50].

- *CLCN2*: A feszültségfüggő klorid csatornák csoportjába tartozó fehérjét kódoló *Chloride channel 2 (CLCN2)* gén mutációi számos idiopátiás generalizált epilepsziás (IGE) betegség, köztük az autoszomális domináns juvenilis myoclonusos epilepszia (JME) kialakulásával kapcsolatba hozhatók. A mutációk legtöbbszörének következménye a fehérje funkcióvesztése, amely intracelluláris kloridion akkumuláció kialakulásához vezet. A neuronok megnövekedett kloridion koncentrációja a normál agyi működés megváltozását okozza. A vélt funkcionális hibák bizonyítása ellenére azonban a *CLCN2* gén diszfunkciója egyedül nem elég az epilepszia kialakulásának indukálásához [42, 49].
- *KCNQ2* és *KCNQ3*: A neuronális kálium csatornákat kódoló gének mutációi felelőssé tehetőek egy benignus, csecsemőkori epilepszia, a BFNE kialakulásáért. A tünetek kezdete általában a születést követő 3. napra tehető, míg azok megszűnése a 3. hónapban a leggyakoribb. A rohamok átmeneti jellegének oka lehet a *KCNQ* kálium csatorna gének expressziós mintázatának a fejlődés előrehaladtával való progressziója, a neurális hálózat redundáns komponenseinek aktivációja, illetve különböző kompenzációs mechanizmusok aktiválódása. A neuronális kálium csatornák a kálium ionok sejtből való kiáramoltatása révén létrehozzák az idegsejtek belső negatív membrán-potenciálját. Az epilepszia kialakításában eddig két kálium csatorna gén, a *Potassium channel, voltage-gated, KQT-like subfamily, member 2 (KCNQ2)* és *Potassium channel, voltage-gated, KQT-like subfamily, member 3 (KCNQ3)* mutációját találták meghatározónak. A *KCNQ2* génben talált patogén mutációk száma meghaladja a százat, így az *SCN1A* gén után a monogénes epilepsziák kialakításában ez a második leggyakrabban érintett gén. Az eltérések nagy variabilitást mutatnak, melyek között megtalálhatók misszensz, nonszensz, frameshift mutációk és kópiaszám eltérések is, érintve mind az exonikus, mind az intronikus régiókat. A nonszensz mutációk eloszlása egyenletes a gén egészen, azonban a patogén mutációk egyharmadát kitevő misszensz mutációk vizsgálata során csoportosulások figyelhetők meg, mely alapján klinikai szignifikanciával rendelkező régiók határozhatók meg a fehérje szerkezetében. A misszensz mutációk leginkább az S4 feszültség szenzort, a pórus kialakításában szerepet játszó hurkot, illetve a kalmodulin kötő C-terminális domént érintik, csökkentve ezzel a kálium áramlását, míg a nonszensz mutációk a fehérjék funkcióvesztését okozzák. Végeredményként a *KCNQ2*-ben létrejött mutációk a rohamok gátlásának feloldását okozzák. A *KCNQ2* mutációt hordozó

BFNE-s betegek 15%-ánál jelentkeznek a későbbiekben egyéb neurológiai tünetek, beleértve az epilepsziás rohamokat is. A *KCNQ3* gén mutációja következtében kialakuló BFNE előfordulási gyakorisága jóval kisebb, mint a *KCNQ2* mutáció következtében kialakult. A két gén vizsgálata kimutatta a transzmembrán régiók nagyfokú szekvencia homológiáját, ami felvetette a kérdést, hogy miért mutat a *KCNQ2* ezen régiója nagyobb mutációs rátát, mint a hozzá hasonló szekvenciájú *KCNQ3*. Elektrofiziológiai vizsgálatok elvégzésére még nem került sor, azonban a *KCNQ3* gén 4 ismert mutációja a transzmembrán régiót, illetve a pórus kialakításában szerepet játszó hurkot érinti, melyek alapján patomechanizmusa a *KCNQ2* esetén leírtakkal azonos lehet [41, 42, 46].

- *CHRNA4*: A *Cholinergic receptor, neuronal nicotinic, alpha polypeptide 4 (CHRNA4)* a ligand-gátolt ioncsatornák egy szupercsaládjának tagja. Az általa kódolt fehérje mediálja a szinapszisokban a szignál transzmissziót. Steinlein és mtsai epilepsziás betegek vizsgálata során összefüggést találtak az autoszomális domináns, frontális lebenyt érintő és főként éjszakai rohamokkal járó ADNFLE (Autoszomális domináns nocturnalis frontális lebeny epilepszia) és a *CHRNA4* mutációja között. A 33 vizsgált, fokális rohamokat mutató epilepsziás gyermek mindegyike hordozta a *CHRNA4* valamely mutációját, szemben a 333 egészséges kontroll minta *CHRNA4* negatív genotípusával [42, 46, 51].
- *LGII*: Az epilepsziák genetikai vonatkozása legtöbb esetben a generalizált rohamokkal járó epilepsziák csoportjára szűkül, míg a fokális rohamokkal társuló epilepsziák legtöbbje nem mutat genetikai relevanciát. A *Leucine-rich, glioma inactivated 1 (LGII)* gén valamint a fokális rohamokkal járó, laterális-temporális lebenyt érintő epilepsziák egy bizonyos típusának kialakulása között azonban számos tudományos közlemény mutatott ki kapcsolatot. A feszültségfüggő kálium csatornák aktivitásának szabályozásáért felelős fehérje részt vesz a neuronális növekedésszabályozásban és a sejtek proliferációjának szabályozásában. A gén egy kópiájában bekövetkező mutáció hozzájárul az ADPEAF (Autoszomális domináns parciális epilepszia auditoros tünetekkel) kialakulásához, míg mindkét kópia mutációja elősegíti az agyban a gliasejtek tumoros növekedését. Vizsgálata során 25 mutációt írtak le, melyek legtöbbje misszensz vagy nonszensz mutáció. A könnyen felismerhető szindróma kialakulásának hátterében a fehérje funkcióvesztése és szekréciójának zavara állhat [41, 42, 52, 53].

- *GABRG2*, *GABRD* és *GABRA1*: A GABA_A receptorok a neuronális jelátvitel legfontosabb gátlói, melyekben bekövetkező mutációk a központi idegrendszer működésének megváltozásához vezetnek. A fehérjekomplex Gamma-aminobutiric acid receptor, gamma-2 (*GABRG2*) és Gamma-aminobutiric acid receptor, alpha-1 (*GABRA1*) alegységeinek változásai hozzájárulnak a familiáris epilepsziák különböző típusainak kialakításához. A fehérjekomplex egy harmadik alegységének, a Gamma-aminobutiric acid receptor, delta-nak (*GABRD*) a mutációja nem mutat olyan mértékű ok-okozati kapcsolatot az epilepszia kialakulása szempontjából, mint az előzőleg említett két alegység, így a *GABRD* gént az irodalom csak hajlamosító epilepszia génként tünteti fel. A fehérjekomplex alegységeiben bekövetkezett mutációk kihatással vannak annak működésére, aminek következtében a sejt normál kloridion exportja a GABA_A csatornákon keresztül felborul, ezzel hatást gyakorolva a neuron hyperexcitabilitást gátló képességére. A kóros folyamat eredményeként alakulhat ki például CAE, JME, valamint GEFS+. Az ismert alegységek pentamer kombinációjának sokszínűsége, és a különböző alegységek mutációi még nagy potenciált nyújtanak az epilepsziakutatást tekintve [41, 42, 54-57].
- *GLUT1*: Az 1-es típusú glükóz transzporter (*GLUT1*) deficienciát okozó káros, domináns mutációk egy epilepsziát, szellemi elmaradottságot és rohamokkal társuló mozgászavart mutató betegség, valamint a korai kifejeződésű absence epilepszia kialakulásában is szerepet játszanak. A *GLUT1* diszfunkció révén kialakult betegségek terápiájában fontos szerepet játszik a ketogén diéta, melynek szigorú tartásával akár tartós rohammentes állapot elérhető [41].
- *PCDH19*: A mentális retardációval járó epilepsziák egy típusa, az EFMR (Epilepszia és mentális retardáció kizárólag lányokban), mely nőket érint, egy X-hez kapcsolt betegség. Az X-kromoszómához kötött megbetegedéseknél általánosságban megfigyeltekkel ellentétben, ebben az esetben a nőnemű heterozigóta egyedek érintettek, azonban a hemizigóta fiúk csak hordozók, melyek minden nőnemű utódja szintén érintett lesz. A betegség kialakulásáért az X kromoszóma *Protocadherin 19* (*PCDH19*) génjének mutációi tehetők felelőssé, melyek a fehérje funkcióvesztése révén a sejt-sejt kapcsolatok megváltozását eredményezik. A fejlődő agyban kifejeződő fehérjét kódoló gén mutációi révén a betegség széles klinikai spektrumot mutat, mely kiterjedhet a lázgörcssel társuló rohamokra, a lázgörcssel nem járó, fokális és generalizált rohamokkal társuló epilepsziára, szellemi elmaradottságra,

valamint autisztikus és agresszív viselkedésre. Néhány esetben a tünetek nagy hasonlóságot mutattak a Dravet szindrómás betegek fenotípusával. A *PCDH19*-hez kapcsolt betegségek fenotípusos megjelenése ezek mellett hasonlóságot mutat az *Aristaless-related homeobox, X-linked (ARX112 és ARX113)* és *SCN1A* mutációk által okozott betegségek tünettanához. Azon encephalopathiás női betegekben, melyekben az *SCN1A* vizsgálat negatív eredményt ad, a *PCDH19* vizsgálata szükséges [41, 46, 58, 59]

- *CDKL5*: Az X kromoszómához kötött infantilis spazmus (IS) genetikai hátterét három különböző gén (*ARX*, *CDKL5*, *SCN1A*) mutációjának eredményeként írja le az irodalom. A *Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5)* gén mutációját elsőként szellemileg visszamaradott, infantilis spazmust mutató lány gyermekekben azonosították, majd Rett szindrómás tüneteket mutató betegek vizsgálata során is sikerült a gén mutációját kimutatni. Későbbi tanulmányok rámutattak a szellemi elmaradottság, a korán kialakuló rohamok valamint a *CDKL5* gén kapcsolatára. Fontos megjegyezni, hogy a vizsgálatok csak a női csoportban találtak összefüggést a gén mutációja és a kialakult fenotípus között [60, 61].
- *STXBP1*: Saitsu és mtsai egy EIEE-s (Burst-suppression mintával járó kora gyermekkori epilepsziás encephalopátia) beteg array komparatív genomialis hibridizáció (aCGH) vizsgálata során a *Syntaxin-binding protein 1 (STXBP1)* gén delécióját detektálták. A kapott eredmény további páciensek vizsgálatához vezetett, mely során az *STXBP1* gén heterozigóta misszensz mutációit is kimutatták. Az evolúciósan konzervált neuronális fehérje számos fajban nélkülözhetetlen a szinaptikus vezikulák felszabadulásához. Cirkuláris dikroikus olvadásos vizsgálatok kimutatták, hogy a mutáns fehérje jóval termolabilisebb a normál fehérjénél, továbbá a mutáns fehérje syntaxinhoz való kötődése károsodott. A kapott eredmények alapján az *STXBP1* gén mutációi szerepet játszhatnak az EIEE kialakulásában [62].
- *TBC1D24*: A dizartriával és szellemi elmaradottsággal járó, fokális rohamokkal társuló epilepsziák egy autoszomális recesszív formája a familiáris infantilis myoclonosus epilepszia (FIME), melynek kialakulásában nagy szerepet tulajdonítanak a *TBC1 domain family, member 24 (TBC1D24)* gén F251L, D147H és A509V patogén mutációinak. A *TBC1D24* fehérje funkciója jelenleg ismeretlen, azonban koimmunoprecipitációs vizsgálatok kimutatták a *TBC1D24* fehérje, valamint a kis

GTP-ázok (Guanosine-5'-triphosphate) családjába tartozó, a dendrittuskék képződésében és az axonok megnyúlásában szerepet játszó ADP-Ribosylation Factor 6 (ARF6) fehérje kötődését. Ezen ismeretek alapján a *Tre-2/Bub2/Cdc16 domain-containing proteins (TBC)* géncsalád tagjaként a fehérjekomplexum TBC1D24 doménjének kiesése vélhetően negatívan befolyásolja a Rab GTP-áz aktivációt. Egér kísérletek kimutatták a fehérje neuronális expresszióját, valamint az elsődleges axonális aborizációban betöltött szerepét [63, 64].

- **ASPM:** A humán autoszomális recesszív primer mikrokefáliák (MCPH) egy heterogén betegcsoportot képviselnek (MCPH1-6), melyek közül az *Abnormal spindle-like, microcephaly-associated (ASPM)* gén nonszensz mutációi következtében kialakuló MCPH5 fordul elő a leggyakrabban. A mikrokefália, illetve azok közül is az MCPH5 betegséggel diagnosztizált betegek epilepsziára való megnövekedett prevalenciája összefüggésbe hozható az *ASPM* gén funkciókiesésével [65].
- **PNKP:** A DNS integritásának fenntartása minden sejt számára létfontosságú, azonban az idegsejtek a többi sejtnél is érzékenyebbek a DNS repair géneket érintő mutációkra. A neuronok DNS repair fehérjeinek diszfunkciója nagyban hozzájárul a rendellenes fejlődés és a neurodegeneráció kialakulásához. A *Polynucleotide kinase 3'-phosphatase (PNKP)* gént érintő mutációk érzékenyebbé teszik a hordozókat a radioaktív sugárzásokkal és egyéb DNS károsító ágensekkel szemben, aminek eredményeképpen a gén mutációi összefüggésbe hozhatók egy mikrokefáliával, korai kifejeződésű rohamokkal és szellemi elmaradottsággal járó autoszomális domináns betegség, az MCSZ (Mikrokefália, görcsök és fejlődésbeli késés) kialakulásával. Az egyéb DNS repair defektusokkal járó megbetegedések során nem mutathatók ki ilyen mértékű rohamok [66].
- **TUBA1A és TUBB2B:** A neurogenesis, a neuronális migráció, és a differenciáció megfelelő szabályozottsága, valamint a megfelelő idegsejt-idegsejt kapcsolatok megléte elengedhetetlen az agykéreg normális fejlődéséhez. A folyamatban résztvevő gének mutációi a fejlődési rendellenességek sok típusának kialakításában vesznek részt, mint például a kortikális dysgenesis, mely legtöbb esetben szellemi visszamaradottsággal és epilepsziával társul. A Tubulin fehérje szupercsalád heterodimer fehérjekomplexek kialakítása révén vesz részt az eukarióta citoszkeleton felépítésében. A szupercsalád α és β családjába minden eukarióta sejt mikrotubulusainak

fő alkotóeleme. Az α család Tubulin, alpha-1A (TUBA1A) tagjának mutációi fontos kapcsolatba hozhatók a neuronális migrációval járó betegségek kialakításában. Bahi-Buisson és mtsai *Lissencephaly-1 (LIS-1)*, *Doublecortin (DCX)* és *ARX* mutációkra negatív liszenkefáliás betegeket vizsgálva kimutatták azon fenotípusos különbségeket is, melyek megkülönböztethetik az előbbi három gén mutációja által kialakított, illetve a *TUBA1A* gén diszfunkciójából eredő liszenkefáliákat. A Tubulin szuperfehérje család másik tagja a Tubulin, beta-2B (TUBB2B), melynek mutációkból eredő funkcióvesztése összefüggésbe hozható a bilaterális aszimmetrikus polymicrogyriával (PMGYA). A PMGYA patomechanizmusára vonatkozóan kevés információ áll rendelkezésre, de számos altípusa között különbség tehető a kiterjedés, a szellemi elmaradottság mértéke és az epilepsziás rohamok súlyossága alapján [67-69].

Az elsődlegesen epilepsziás tüneteket mutató, agykérgi malformációkkal rendelkező betegekben talált gének:

- *LIS1*, *DCX* és *ARX*: A liszenkefáliák a humán agy abnormális neuron migrációjával, sima agyfelszínnel, szellemi visszamaradottsággal és rohamokkal járó malformációi. A betegség kialakításában részt vevő gének azonosítása nagy fontosságú a normál agyfejlődés molekuláris szabályozásának megismerésében. Az 1-es típusú liszenkefáliák kialakulása a *LIS-1* gén pontmutációihoz/deléciónak köthető. A *LIS-1* gén és a heterotrimer G-proteinek β alegységének szekvenciája közötti nagyfokú homológia alapján, a *LIS-1* gén egy, a normál agyi fejlődés biztosításában szerepet játszó jelátviteli út tagja lehet. Molekuláris vizsgálatok emellett azonosították a *LIS-1* fehérjét, mint a Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) szabályozó alegységét, azonban a neuron migrációban betöltött szerepe még az alapos vizsgálatok ellenére is ismeretlen. A liszenkefáliák egy másik formáját, az X-hez kötött liszenkefáliák (XLIS) teszik ki, melyek kialakulásában bizonyítottan nagy szerepet játszanak a *DCX* gén eltérései. Az XLIS-ben szenvedő férfiak klinikai képe alapvetően megkülönböztethetetlen a 17-es kromoszómán elhelyezkedő *LIS-1* gén mutációja következtében kialakult 1-es típusú liszenkefália fenotípusos megjelenésétől. A heterozigóta női betegek enyhébb fenotípust mutatnak, feltételezhetően a mutáns vagy a normál X kromoszóma random inaktivációjának köszönhetően. Az érintett női betegek neuronjainak egy csoportja normál viselkedést mutat, míg a neuronok másik csoportja a kortexbe való migrációja során csak félútig jut, kialakítva ezzel a szubkortikális fehérállományban a szubkortikális heterotópia sávot, másnéven „double

cortex"-et. Az XLIS, valamint az epilepsziával járó mentális retardációk kialakítása a *DCX* gén mellett az *ARX* gén számos mutációjával is kapcsolatba hozható. Az előagy GABA-erg és kolinerg neuronjainak fejlődésében szerepet játszó transzkripció faktor mutációinak neurobiológiai funkciója a mélyreható egér kísérletek ellenére napjainkig ismeretlen, azonban az eddig leírt, megközelítőleg 60 *ARX* mutáció némelyike egymagában is elegendő a liszenkefália vagy az epilepsziával járó szellemi elmaradottság kialakításához [70-74].

- *FLNA*: Bizonyos agyi neuronok agykéregbe való migrációjában bekövetkező eltérések kihatással vannak a normál agyi működés kialakulására. Az aktin keresztkötések és az aktin-membrán glikoprotein kötések kialakításáért felelős *Filamin A (FLNA)* gén által kódolt fehérje a neuronok migrációjakor emelkedett mértéket mutat az agyban, míg a felnőtt kor elérésével a szintje lecsökken. Egy, az *FLNA* génben detektált intragenikus mutáció jelenléte egy X-hez kötött domináns neuronmigrációs kórkép, a periventrikuláris heterotópia (PH) kialakulásával jár. A neuronmigráció teljes hiánya férfiak esetén embriókori letalitást okoz, női egyedekben epilepsziás rohamok és pleiomorf központi idegrendszeri tünetek kialakulásához vezet normál intelligenciaszint mellett. A kutatási eredmények alapján az *FLNA* gén ezen kívül nagy szerepet játszik a normális, nonneurális fejlődés kialakításában, mint például a melanociták migrációjában, és a normális embrionális fejlődésben, valamint esszenciális szerepe van a vérerek kialakulásában is [75].
- *GPR56*: Az emlős agykéreg funkcionálisan és anatómiailag is megkülönböztethető, fajonként eltérő specifikus területekkel rendelkezik, azonban a komplex mintázat kialakításáért felelős molekuláris háttér nagy része jelenleg még ismeretlen. A funkcionális és anatómiai eltérések genetikai okainak vizsgálata számos génnek az agyi fejlődésben betöltött szerepére vonatkozóan hozott eredményt. A G-protein coupled receptor 56 (*GPR56*) G-protein kapcsolt receptorban bekövetkező mutációk a humán agykéreg egy malformációját, a bilaterális frontoparietális polymicrogyria (BFPP) kialakulását eredményezik. A polymicrogyriákra általánosságban jellemző a kevesebb számú és kisebb gyrusok jelenléte, valamint a fiziológiásan megfigyelhető 6 agykérgi réteg redukciója 4 rétegre, esetlegesen a régiók megkülönböztethetőségének a hiánya. Az autoszomális recesszív BFPP során a frontális agykéreg architektúrája nagy mértékben, a parietális és poszterior kérgi területek felépítése kisebb mértékben megváltozik, kialakítva ezzel a betegségre jellemző szellemi visszamaradottságot,

rohamokat, mozgási rendellenességet és a nyelvi funkciók sérülését. A BFPP-n kívüli egyéb polymicrogyriák más-más agyi területeket érintenek, így ezen szindrómák molekuláris vizsgálata számos olyan gén azonosítását teheti lehetővé, melyek a normál agykérgi mintázat kialakulásához járulnak hozzá [76].

- **MECP2:** A nők körében előforduló mentális retardáció kialakulásáért a legtöbb esetben egy progresszív idegfejlődési zavar, a Rett szindróma a felelős. Rett szindrómás betegek egy részének vizsgálata során eltéréseket találtak a *Methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2)* génben, ami a korai fejlődést követő fejlődési leállással, az addig megszerzett képességek regressziójával, a beszédfejlődés leállásával, progresszív mikrokefáliával, rohamokkal, hiperventillációval és sztereotíp kézmozgásokkal járó X-hez kötött domináns betegség kialakulásáért felelős. A génben bekövetkezett misszensz, frameshift és nonszensz mutációknak köszönhetően az MECP2 fehérje hiszton acetilázok és SIN3 transcription regulator family member A (SIN3A) interakcióján keresztül, transzkripciót gátló képessége károsodik, mely bizonyos transzkripciós gátlás alatt lévő fehérjék keletkezéséhez vezet, így alakítva ki a jellegzetes tüneteket [77].
- **APOE:** A leggyakoribb, fokális rohamokkal járó epilepszia szindrómának, a temporális lebeny epilepsziának (TLE) a molekuláris háttere tudományos körökben még vitatott, leginkább poligénes, komplex genetikai háttérrel rendelkező betegségként tartják számon. Kialakításában egyéb genetikai és környezeti faktorok megléte mellett nagy szerepet tulajdonítanak az *Apolipoprotein E (APOE)* gén mutációinak. Az epilepsziás rohamok háttérében minden esetben a neuronok abnormális tüzelése áll, mely kialakulhat fejlődési rendellenességek következtében, a gátló és serkentő mechanizmusok arányának megbomlása következtében, illetve a megváltozott ionegyensúly eredményeként is. Ezen folyamatok agyi szabályozásának egyik legszükségesebb feltétele az apolipoprotein E fehérje megfelelő mennyisége és funkcionalitása. Bizonyos APOE mutációkat hordozó betegek poszttraumatikus rohamokra, a korai megjelenésű TLE-re, és egyes komplex fokális rohamtípusokra való fokozott rizikófaktora alapján a gén az epilepszia kialakításában feltételezhetően szerepet játszó tényező [78-81].
- **HLA:** A *Humán leukocita antigén (HLA)* rendszer által kódolt fő hisztonkompatibilitási komplex-be (MHC) tartozó fehérjék a sejtek felszínén

helyezkednek el, és kiemelt fontosságúak az adaptív immunrendszer finom szabályozását, így a humán adaptív immunrendszer működését tekintve. A *HLA* génkomplex számos, jelentős polimorfizmust mutató gén expressziójáért felelős. Az így kialakult fehérjéket összefoglaló néven antigéneknek nevezzük. Az MHC I. osztályba tartozó fehérjék (A, B és C) többek között részt vesznek a sejten belüli víruspartikulumok prezentálásában, így lehetővé téve az immunrendszer számára a fertőzött sejt elpusztítását. Az MHC II. osztályba tartozó fehérjék (DM, DOA, DOB, DP, DQ és DR) antigéneket prezentálnak az intercelluláris térből a T-lymphocita sejtek számára. A HLA III. osztály fehérjéi alkotják a komplement rendszert. A *HLA* génkomplex területére eső mutációkat összefüggésbe hozták a juvenilis myoclonusos epilepszia (JME) kialakulásával [82, 83].

- A fent említett gének mellett számos egyéb gén és az epilepsziás tünetek kialakulása közti kapcsolat feltételezett [38, 84-98].

NÉV	POZÍCIÓ	KÓDOLT FEHÉRJE
<i>SCN1A</i>	Chr2: 165,989,160-166,128,047	Sodium channel, voltage gated, type I alpha subunit
<i>SCN2A</i>	Chr2: 165,239,402-165,392,310	Sodium channel, voltage gated, type II alpha subunit
<i>SCN3A</i>	Chr2: 165,087,522-165,204,067	Sodium channel, voltage gated, type III alpha subunit
<i>SCN9A</i>	Chr2: 166,195,185-166,375,993	Sodium channel, voltage gated, type IX alpha subunit
<i>SCN1B</i>	Chr19: 35,030,684-35,040,448	Sodium channel, voltage gated, type I beta subunit
<i>CACNA1H</i>	Chr16: 1,153,241-1,221,771	Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H subunit
<i>CLCN2</i>	Chr3: 184,346,185-184,361,651	Chloride channel, voltage-sensitive 2
<i>KCNQ2</i>	Chr20: 63,400,210-63,472,677	Potassium channel, voltage gated KQT-like subfamily Q, member 2
<i>KCNQ3</i>	Chr8: 132,120,859-132,480,953	Potassium channel, voltage gated KQT-like subfamily Q, member 3
<i>CHRNA4</i>	Chr20: 63,343,223-63,378,401	Neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha-4 subunit
<i>LGII</i>	Chr10: 93,757,809-93,798,174	Leucine-rich glioma-inactivated protein 1
<i>GABRG2</i>	Chr5: 162,067,540-162,155,536	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, gamma 2
<i>GABRD</i>	Chr1: 2,019,324-2,030,751	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, delta
<i>GABRA1</i>	Chr5: 161,847,191-161,899,969	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1
<i>GLUT1</i>	Chr1: 42,925,375-42,959,173	Solute carrier family 2 (Facilitated glucose transporter), member 1
<i>PCDH19</i>	ChrX: 100,291,644-100,410,273	Protocadherin 19
<i>CDKL5</i>	ChrX: 18,425,583-18,653,629	Cyclin-dependent kinase-like 5
<i>STXBPI</i>	Chr9: 127,611,760-127,692,936	Syntaxin binding protein 1
<i>TBC1D24</i>	Chr16: 2,475,118-2,505,734	TBC1 domain family, member 24
<i>ASPM</i>	Chr1: 197,084,128-197,146,694	Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein
<i>PNKP</i>	Chr19: 49,861,204-49,878,351	Polynucleotide kinase 3'-phosphatase
<i>TUBA1A</i>	Chr12: 49,184,796-49,189,324	Tubulin, alpha 1a
<i>TUBB2B</i>	Chr6: 3,224,261-3,231,730	Tubulin, beta 2B class IIb
<i>LIS1</i>	Chr17: 2,593,210-2,685,615	Platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib, alpha subunit
<i>DCX</i>	ChrX: 111,293,780-111,412,375	Doublecortin
<i>ARX</i>	ChrX: 25,003,694-25,015,948	Aristaless related homeobox, X-linked
<i>FLNA</i>	ChrX: 154,348,524-154,374,638	Filamin A, alpha
<i>GPR56</i>	Chr16: 57,610,652-57,665,580	Adhesion G protein-coupled receptor G1
<i>MECP2</i>	ChrX: 154,021,573-154,137,103	Methyl CpG binding protein 2
<i>APOE</i>	Chr19: 44,905,754-44,909,393	Apolipoprotein E
<i>HLA</i>	CHR:6	Human leukocyte antigen

2. táblázat: A monogénis epilepsziák kialakításában szerepet játszó gének

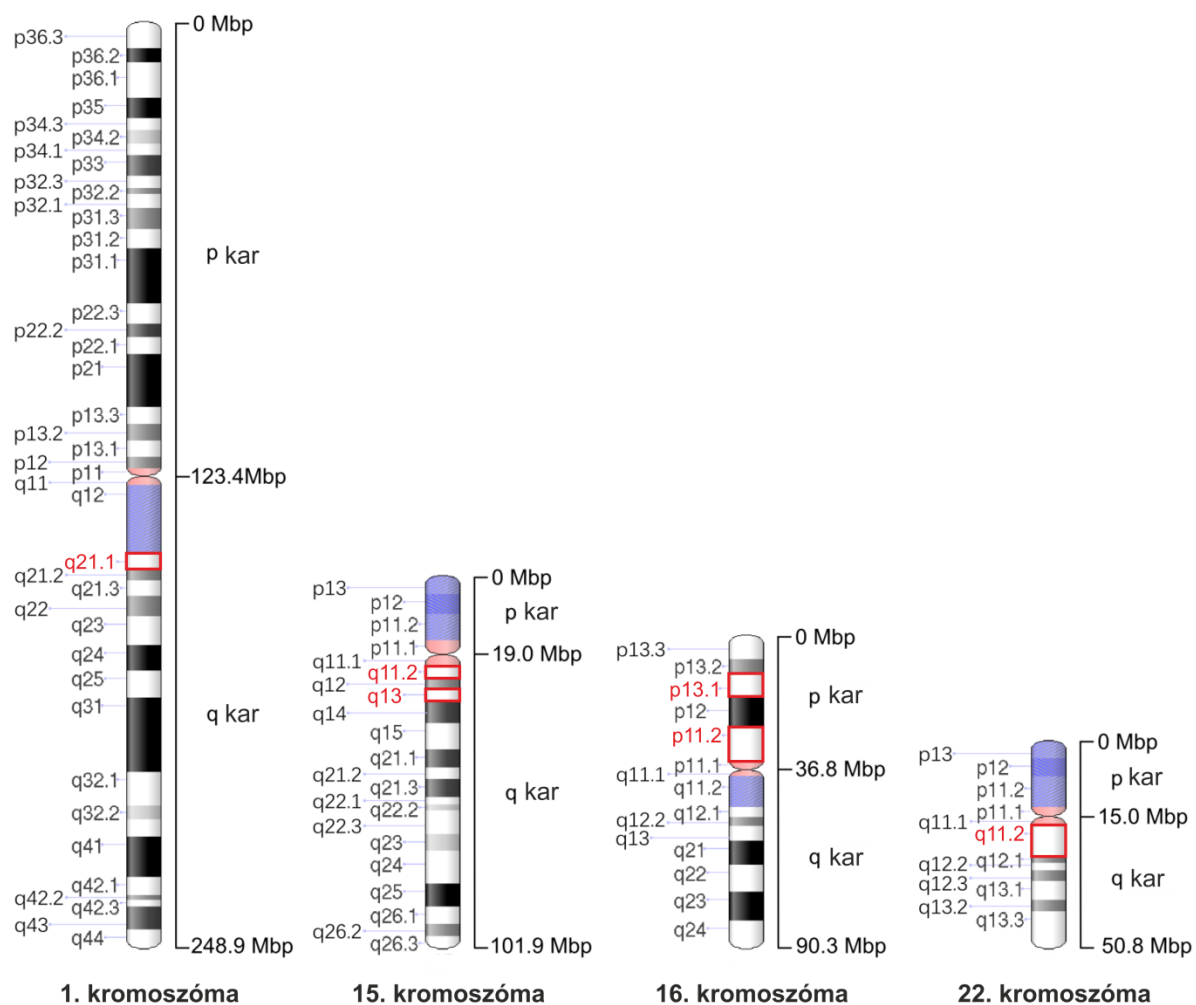
2.5 Az epilepsziák kialakulásával kapcsolatba hozható genomiális eltérések

A genomot érintő azon deléciókat, duplikációkat vagy inszerciókat, melyek egy vagy több gént érintve az 1 Kb-os mérettől a több megabázisos méretig is terjedhetnek, kópiaszám variációknak (CNV) nevezzük. A különböző típusú epilepsziák aCGH vizsgálata során detektált CNV-k esetén megkülönböztethetünk ismételten előforduló, úgynevezett rekurrens, valamint egyedi esetekben előforduló nem rekurrens genomiális eltéréseket. Az érintett genomiális régiókban található gének funkciója, deléció vagy duplikáció következtében kialakuló kópiaszám változása együttesen határozzák meg a gyakran összetett klinikai kép kialakulását. A rekurrens CNV-k esetenkénti ismétlődő előfordulása a tünetek jellegzetességének függvényében megkönnyítheti a nagyobb betegcsoportokat érintő vizsgálatok kivitelezését.

2.5.1 Rekurrens CNV-k

Epilepsziás betegek fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) és aCGH vizsgálata jól kimutatható kromoszómális strukturális eltérések detektálását tette lehetővé, melyek közt találunk transzlokációkat, gyűrűkromoszómákat, addicionális marker kromoszómákat, kisebb és nagyobb genomiális régiókat érintő deléciókat, duplikációkat, inszerciókat. Az irodalomban leközölt leggyakoribb, rekurrens mikrodeléciók, melyek az idiopátiás epilepsziák különböző típusaival összefüggésbe hozhatók, az 1q21.1, 15q11.2, 15q13.3, 16p11.2, 16p13.11, 22q11.2 genomi régiókat érintették [99-101]. Az idiopátiás generalizált epilepsziás (IGE) szindrómák leggyakoribb rekurrens mikrodeléciója a 15q13.3 mikrodeléció, mely az IGE-s betegek 1%-ában fordul elő, és megközelítőleg 68-szoros rizikófaktor az IGE kialakulása szempontjából [102, 103]. A 15q13.3 mikrodelécióval elsőként diagnosztizált betegek esetén az epilepsziás görcsöket mentális retardáció, skizofrénia, pszichotikus zavar, autizmus, valamint fejlődési visszamaradottság kísérte [104-110]. A 15q13.3 mikrodeléciók széles fenotípusos spektruma egy összetett mechanizmus meglétét feltételezte. Későbbi vizsgálatok kimutatták további 5 nagyobb deléció, az 1q21.1, 15q11.2, 16p11.2, 16p13.11 és 22q11.2 rendszeres előfordulását skizofréniát, pszichotikus tüneteket, autizmust vagy mentális retardációt mutató betegekben, akik egy része epilepsziás görcsöket is mutatott [105-107, 111-124]. Nagy populációkat érintő vizsgálatok alapján igazolható az 1q21.1, 15q11.2, 15q13.3, 16p11.2, 16p13.11, 22q11.2 genomi régiókat érintő mikrodeléciók epileptogenezisben játszott szerepe, valamint ezen rekurrens mikrodeléciók hajlamosító szerepe különböző neuropszichiátriai betegségek kialakulásában. A rekurrens mikrodeléciók előfordulási valószínűsége, epilepsziás betegekben való rendszeres detektálásuk ellenére sem

haladja meg egyenként a 0,5-1%-ot, összességében pedig a 2,5%-ot. Kontroll minták esetén a rekurrens mikrodeléciók előfordulási gyakorisága együttesen 0,3 %-ot mutat [99]. A rekurrens CNV-k epilepszia kialakításában játszott szerepének bizonyított mivolta ellenére is láthatjuk, hogy a betegek nagy részének fenotípusos megjelenését egyéb, összetett mechanizmusok is befolyásolják [125]. (4. ábra)



4. ábra: Az epilepsziás megbetegedések kialakításában leggyakrabban előforduló rekurrens kromoszómális eltérések

A vizsgált betegszám növekedésével nyilvánvalóvá vált, hogy ezen genomi régiók érintettsége esetén nem csak azok kópiaszám vesztese állhat a kialakult fenotípusos kép hátterében. A genomi régiókba eső, dózisérzékeny gének kópiaszámának növekedése, a kópiaszám csökkenésükhöz hasonlóan kóros tünettan kialakulásához járulhat hozzá. A nagy felbontóképességű genomanalizáló módszerek elterjedése a mikrodeléciós szindrómák mellett a különböző mikroduplicációs szindrómák fontosságát is előtérbe helyezte.

Az említett 1q21.1, 15q11.2, 15q13.3, 16p11.2, 16p13.11, 22q11.2 genomi régiókat érintő változások mellett természetesen egyéb, dóziszérzékeny géneket tartalmazó régiók (pl.: 9q34) rekurrens kópiaszám változásai is hozzájárulhatnak meghatározott tünetek, akár szindrómák (pl.: Kleefstra szindróma) kialakulásához.

2.5.2 *Nem rekurrens CNV-k*

A teljes genom vizsgálatát lehetővé tevő új-generációs módszerek előnye nem csak a rekurrens CNV-k felfedezésében nyilvánult meg. Az epilepsziás betegekben detektált nem rekurrens CNV-k meghatározó szerepe a betegség kialakításában egyre nyilvánvalóbbá vált. Generalizált rohamokat mutató epilepsziás betegek aCGH és egy pontos nukleotid-polimorfizmus (SNP) microarray vizsgálatai alapján összességében megközelíti az 5%-ot azon nem rekurrens CNV-k előfordulási gyakorisága, melyek a kontroll mintákban nem detektálhatók és legalább egy gént tartalmaznak. Amellett, hogy a nem rekurrens CNV-k ritkasága, esetenként egyedisége megnehezíti klinikai szignifikanciájuk interpretálását, a jelenleg rendelkezésre álló diagnosztikai eredmények alapján is nyilvánvalóvá vált az epilepszia genetikai hátterének kialakításában játszott meghatározó szerepük. Az átfedő, nem rekurrens CNV-kkel rendelkező esetek vizsgálati számának növekedésével lehetőségünk nyílt az adott klinikai kép kialakításáért felelős kritikus régió, gén meghatározására. Új rekurrens CNV-k detektálása és azok vizsgálata nagymértékben hozzájárulhat új epilepszia gének meghatározásához [100, 101, 126-128].

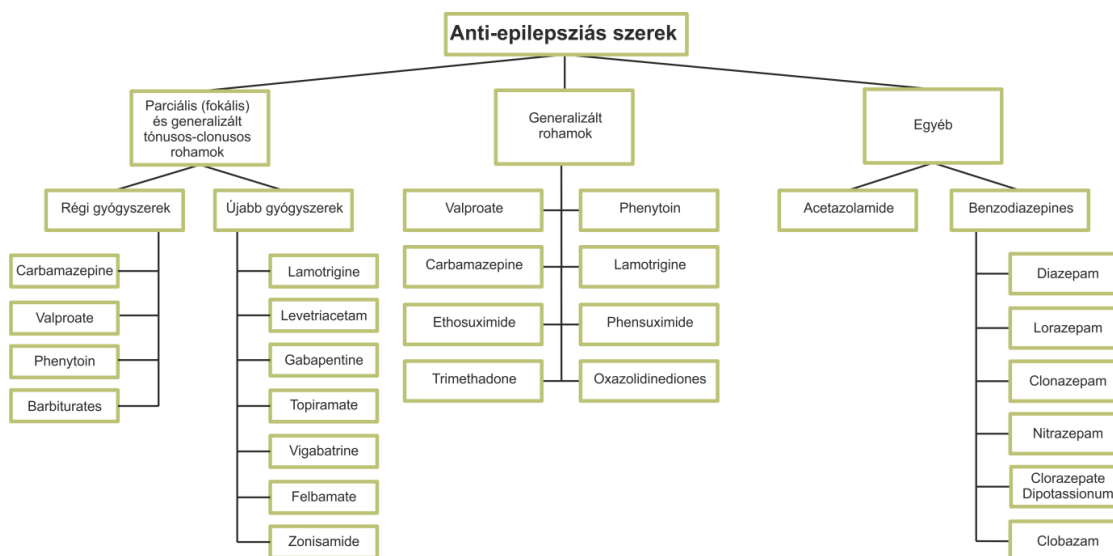
Az epilepszia genetikai hátterének összetettsége és a jelenleg rendelkezésünkre álló korlátozott ismeretek alapján a klinikai kép hátterének pontos meghatározása érdekében további vizsgálatok elvégzése szükséges. A teljes genomot lefedő vizsgálatok bővülő tárháza, valamint az általuk kapott eredmények értékelése lehetőséget nyújt a jövőben új genomiális eltérések és az epilepszia kapcsolatának meghatározására.

2.6 **Az epilepsziák terápiás vonatkozásai**

Az epilepsziás betegek terápiája egy második roham előfordulása esetén legtöbb esetben napi, rendszeres gyógyszeres kezeléssel történik, azonban a betegség kialakulására való magas rizikó esetén a gyógyszeres kezelés az első rohamot követően is elkezdhető. A tünetek súlyosságától függően a gyógyszeres terápia mellett speciális diéta (ketogén diéta), mélyagyi stimuláló beültetése, illetve idegsebészeti eljárás is alkalmazható. Az epilepsziás betegek körében leggyakrabban alkalmazott kezelés az antikonvulzáns kezelés. Az alkalmazandó antikonvulzáns szer meghatározását nagymértékben befolyásolja a roham típusa, az

epilepsziás szindróma milyensége, egészségügyi problémák megléte, egyéb gyógyszeres kezelések, valamint az illető kora és életformája. Az esetek többségében a kezelés egy fajta gyógyszer szedésével kezdődik. Azokban az esetekben, ahol a kezdeti gyógyszer hatására a beteg nem mutat pozitív változást, egy másik gyógyszer egyedüli szedése javasolt. Amennyiben ez sem megfelelő, több gyógyszer együttes alkalmazása ajánlott. Az esetek közel felében a kezdeti gyógyszer hatására pozitív változást mutat a beteg, míg második gyógyszer egyedüli szedése az esetek 13%-ában segít. 2 vagy 3 gyógyszer együttes szedése az epilepsziás betegek további körülbelül 4%-ának nyújt segítséget. A fejlett epilepsziás terápia ellenére az esetek közel 30%-ában a különböző antikonvulzánsok alkalmazása ellenére sem szűnnek meg a tünetek [15, 129-133].

Az antiepileptikus szerek közül a phenytoin, a carbamazepine és a valproát egyaránt hatásosnak tekinthetők mind fokális, mind generalizált rohamokban szenvedők esetén. A mellékhatásokra és költségekre való tekintettel, fokális rohamokkal rendelkező betegeknél az első választandó szer általában a carbamazepine és a lamotrigine, míg második gyógyszerként a levetiracetam és a valproát alkalmazott. Ugyanezen szempontokat figyelembe véve generalizált rohamokat mutató epilepsziával rendelkező betegek első vonalbeli kezelése esetén a valproát, másod vonalbeli kezelése alkalmával pedig a lamotrigine szedése ajánlott. Absence rohamokat mutató betegek kezelése általában ethosuximide vagy valproát alkalmazásával történik. A valproáttal való kezelés hatékonynak bizonyult bizonyos myoclonus, atónusos és tónusos betegek kezelésekor is. A fent említett, leggyakrabban alkalmazott szerek mellett az epilepsziás tünetek kezelésére számos egyéb gyógyszer is a klinikusok rendelkezésére áll [129, 134-137]. (5. ábra)



5. ábra: Az epilepsziás rohamok kezelésére használt antiepileptikumok

2.7 Kongenitális anomáliák

A veleszületett rendellenességek (kongenitális anomáliák) magukba foglalnak minden, a normálistól eltérő, születéskor már meglévő állapotot, függetlenül attól, hogy a születéskor felismerésre kerül, vagy sem. A kongenitális anomáliák közé soroljuk a genetikai hibákból kifolyólag kialakult anomáliákat, a veleszületett fejlődési rendellenességeket (kongenitális abnormitások), a veleszületett daganatokat, a méhen belüli növekedés visszamaradást (IUGR), a magzati betegségeket (pl. fertőzőes betegségek), az immunológiai rendellenességeket, a szellemi visszamaradottságot és a viselkedési, valamint társadalmi beilleszkedési zavarokat is. (3. táblázat)

Születési defektus	Születésre eső esetek száma	Becsült éves esetszám
Központi idegrendszeri defektusok		
Anenkefália	1/4,859	859
Spina bifida anenkefália nélkül	1/2,858	1,460
Enkefalocele	1/12,235	341
Szem defektusok		
Anophthalmia/microphtalmia	1/5,349	780
Kardiovaszkuláris defektusok		
Truncus arteriosus	1/13,876	301
A nagy artériák felcserélődése	1/3,333	1,252
Fallot tetralógia	1/2,518	1,657
Atrioventrikuláris szeptum defektus	1/2,122	1,966
Hypoplasias bal szívfél-szindróma	1/4,344	960
Orofaciális defektusok		
Szájpadhasadék	1/1,574	2,651
Ajak és szájpadhasadék	1/940	4,437
Gasztrointesztinális defektusok		
Oesophagus atresia/tracheoesophageal fistula	1/4,608	905
Rektális atresia/stenosis	1/2,138	1,952
Muszkuloszkeletális defektusok		
A felső végtagok redukciós deformitása	1/2,869	1,454
Az alsó végtagok redukciós deformitása	1/5,949	701
Gastrochisis	1/2,229	1,871
Omfalocele	1/5,386	775
Rekeszsérv	1/3,836	1,088
Kromoszómális anomáliák		
13-as trizómia (Patau szindróma)	1/7,906	528
21-es trizómia (Down szindróma)	1/691	6,037
18-as trizómia (Edwards szindróma)	1/3,762	1,109

3. táblázat: A kongenitális anomáliák előfordulási gyakorisága

A kongenitális anomáliák kialakulása genetikai és környezeti tényezőkhez egyaránt köthető, így a multifaktoriális betegségek közé soroljuk őket. A tünetek között előfordulnak belszervi betegségekre utalók (pl. az anyagcsere-rendellenességek esetén), valamint anatómiai rendellenességek is. A tünetek gyakran nem specifikus mivolta megnehezíti a megfelelő diagnózis felállítását [138].

A veleszületett rendellenességek osztályozása több szempontból történhet. A rendellenesség kialakulásának mechanizmusa szerint megkülönböztetünk malformációt, diszrupciót, deformációt és diszpláziát. A szervi fejlődési rendellenességek, malformációk, a fogamzástól az organogenezis befejeztéig kialakuló, öröklött vagy a terhesség során környezeti, teratogén hatásokra kifejlődő morfológiai, a működést is kórosan befolyásoló anomáliák, melyek során valamely szerv(ek) fejlődése eleve kóros irányba indul (pl. ajakhasadék), míg diszrupció esetén a kezdetben normális fejlődés valamilyen külső tényező hatására szakad meg (pl. rubeola, cytomegalovírus, phenytoin, valproát készítmények, anyai alkoholizmus stb.). Deformáció során az egészséges testrész külső mechanikus behatásra torzul (pl. csípőficam, dongaláb, ferdenyak kórosan kevés magzatvíz hatására), diszplázia esetében pedig genetikai okoknál fogva a szövetképződés szenved zavart, így az ennek hatására kialakult alaki torzulás ennek másodlagos következménye (pl. akondroplázias törpenövés).

A rendellenességek száma szerint beszélhetünk izolált kongenitális anomáliákról, amikor a fejlődési zavar csak egy szervet érint, illetve szindrómáról, mely esetén több szerv érintett.

A veleszületett rendellenességek egy harmadik csoportosítási szempontja a tünetek súlyossági fokozata. A letális rendellenességek a gyermek halálához vezetnek még fogamzóképes kor előtt. Major (súlyos) rendellenességekről abban az esetben beszélünk, ha a gyermek kezeletlen esetben nem élheti meg a fogamzóképes kort (pl. súlyos összetett szívfejlődési rendellenességek). Az enyhe rendellenességek az érintett egyén életkilátásait kezeletlen esetben sem érintik, azonban az életminőséget nagy mértékben ronthatják (pl. húgycsőzáródási defektusok, herevízszerv). A minor abnormalitások olyan rendellenességek, amelyeknek önmagukban nincs jelentősége, az érintett életkilátásait, életminőségét nem befolyásolják, azonban felismerésük már újszülöttkorban is fontos, mert halmozott előfordulásuk prenatális eredetű belső szervi (pl. szív, vese, stb.) súlyosabb rendellenességet jelezhet. A minor abnormalitásokon belül megkülönböztetünk minor malformációkat (pl. epicanthus, hasadt uvula, négy ujjas redő, számfeletti mamilla, az V. ujj clinodactyliája, stb.)

és ún. antropometriai variánsokat, melyek méréssel igazolhatóak (pl. hipertelorizmus, az átlagosnál távolabb elhelyezkedő mamillák, stb.) [139-142].

2.8 Kognitív fejlődési elmaradás

Mentális retardáció alatt idő előtt abbamaradt vagy megkésett mentális fejlődést értünk, melyre jellemző a fejlődés során megjelenő és az intellektus minden szintjét érintő készségek romlása. Az intellektuálisan visszamaradott személy viselkedésére jellemző lehet a felülés és járás késői elsajátítása, a megkésett beszédfejlődés, memóriaproblémák, nehézkes problémamegoldó készség, valamint a szociális szabályok, illetve az önellátó magatartás nehézkes elsajátítása [143, 144].

A mentális retardáció gyűjtőfogalom, mely számos különböző okból kialakult szellemi visszamaradottságot foglal magába. Az esetek kb. kétharmadában az okozati tényező kideríthető, vagy legalábbis sejthető. Minél súlyosabb érintettségről van szó, annál valószínűbb, hogy az okokat is sikerül felderíteni. A szellemi elmaradottság kialakulásában 3 kóroki tényező játszhat szerepet: genetikai, környezeti fizikai és szociokulturális. A genetikai eredetű mentális retardáció esetén elkülöníthetünk familiáris, illetve de novo kialakult állapotot. A familiáris háttérrel nem rendelkező érintettek esetén a betegség kialakulásának hátterében egy de novo kialakult monogénis ártalom, vagy a kromoszómák struktúrájának változását, illetve a kromoszómák számbeli változását okozó eltérés állhat. A kromoszóma rendellenességek esetén a szellemi visszamaradottság általában nem egyedülálló fenotípusos megnyilvánulás. Az esetek többségében egyéb anomáliákkal, antiszociális viselkedéssel társul. A familiárisan érintettek esetén az egyén átlagos intelligenciaszintje általában enyhén elmaradott, és a szülők, testvérek között legalább egy mentálisan retardált egyén található, egyes esetekben a szomatikus tünetek komplex genetikai, valamint antropológiai vizsgálatokkal nem fellelhetők, specifikus kórfolyamatra utaló adatok az anamnézisben nem találhatók. Kialakulása a leggyakrabban multifaktoriális öröklődéssel magyarázható [145-147].

A környezeti fizikai faktorok esetén megkülönböztethetünk prenatális környezeti ártalmakat (pl. anyai betegség, drog-, alkoholfogyasztás, fertőzések, stb.), perinatális környezeti ártalmakat (koraszülöttség, oxigénhiány, születési sérülés, fertőzések, stb.), valamint posztnatális környezeti ártalmakat (pl. virális vagy bakteriális fertőzések, posztimmunizációs encephalopathia; agysérülés; környezeti toxinok, ólom, higany; anoxia;

status epilepticus; extrém alultápláltság; endokrin abnormalitások, pl. hypothyreosis) [148-150].

A szociokulturális kórokok is nagy szerepet játszhatnak az érintettek szellemi visszamaradottságában. Az elhanyagolt gyermekek általában szegényes intellektuális fejlettségűek. Komoly mentális szubnormalitást idézhet elő a hiányos emocionális és intellektuális stimuláció, a pszichoszociális depriváció, valamint a táplálás elégtelensége is.

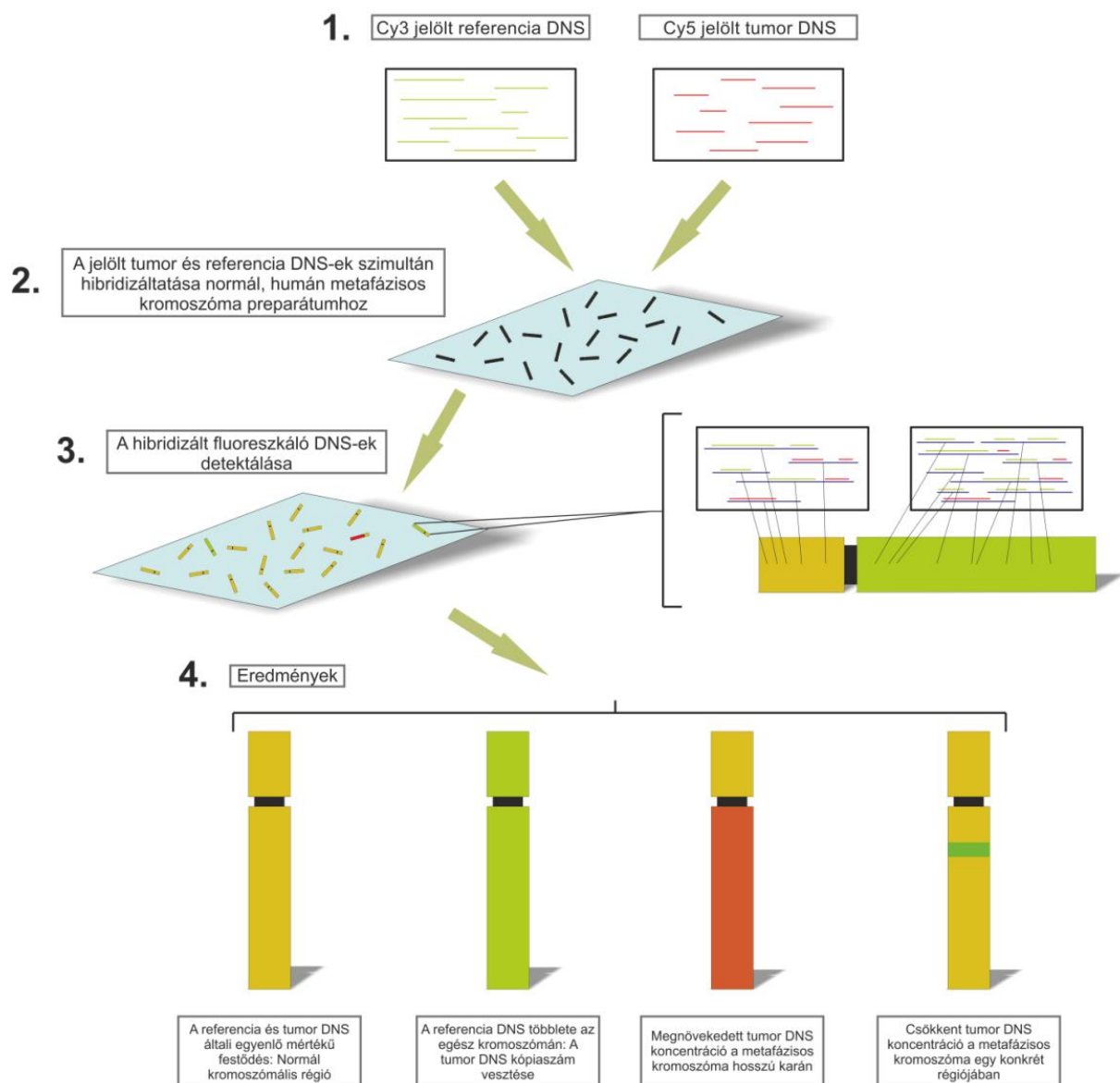
A mentális retardáció a tünetek súlyosságának tekintetében lehet enyhe mentális retardáció (50-69 közötti IQ), mérsékelt mentális retardáció (35-49 közötti IQ), súlyos mentális retardáció (20-34 közötti IQ), valamint nagyon súlyos mentális retardáció (20 alatti IQ). A szellemileg enyhén elmaradott személy késéssel kezd beszélni, de eléri a mindennapi élethez szükséges beszédképességet és a teljes függetlenséget az önellátásban, azonban fejlődése sokkal lassúbb a normálisnál. Az írás és olvasás terén nehézségei akadnak, gyakorlati munkavégzésre alkalmas, azonban szellemi munkavégzésre kevésbé. Amennyiben a betegség érzelmi és szociális éretlenséggel párosul, nyilvánvalóvá válik. A kognitív visszamaradottsághoz autisztikus tünetek, más fejlődési rendellenesség, epilepszia, magatartászavar vagy hátrányos testi állapot gyakran társul. A mérsékeltén érintett személy nyelvi és értelmi fejlődése lassú, önellátási és mozgásképessége visszamaradott. Sokuk egész életre felügyeletre szorul. Írási és olvasási nehézségeik hamar megnyilvánulnak. Felnőttként egyszerű gyakorlati munkavégzésre képesek, ha pontos koordinációt kapnak. Teljesen önálló életvitelre nagyon ritkán képesek. Gyermekkori autizmus vagy más pervazív fejlődési zavar társulhat. Epilepszia, neurológiai és testi hátrányos állapot is gyakori, de a többség képes segítség nélkül járni. A súlyos szellemi elmaradottsággal élő személyek leírása nagy mértékben átfed a mérsékelt tüneteket mutató személyek jellemzésével. A betegek többsége motorosan károsodott, legtöbbjük mozgásképtelen, vagy mozgásban súlyosan korlátozott, ami jelentős központi idegrendszeri károsodásra vagy fejlődési rendellenességre utal. Önálló életvitelre nem képesek, állandó felügyeletet igényelnek. A legegyszerűbb vizuális és térbeli készségeket elsajátíthatják. A súlyos szellemi elmaradás mellett súlyos neurológiai, egyéb testi fogyatékoságok, atípusos autizmus előfordulása gyakori náluk [151-153].

2.9 Genomanalizáló módszerek - aCGH

A molekuláris biológia és a bioinformatika fejlődésének következtében a genotípus-fenotípus összefüggések vizsgálata és a klinikai diagnosztika a genomiális vizsgálatok felé fordult. Az új-generációs módszerek növekvő alkalmazása által nyert információhalmaz

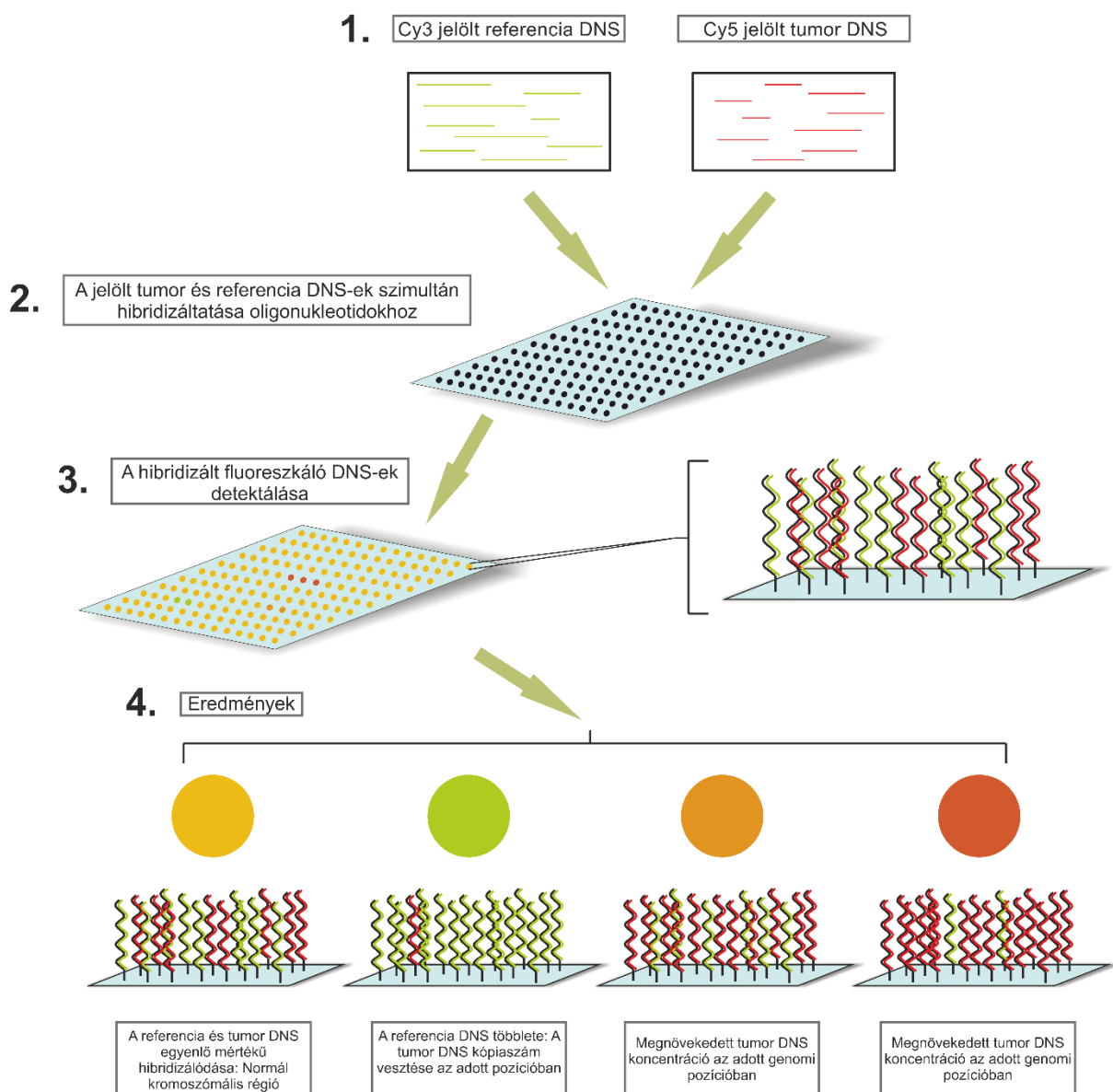
nagymértékben megváltoztatta a biológusok és klinikusok, a betegségek genetikai hátteréről kialakított véleményét. Az új-generációs szekvenálás (NGS) és aCGH módszerek megjelenése az új genomiális eltérések detektálásán túl lehetővé tette a hagyományos technológiák eredményeinek megerősítését, illetve az új-generációs módszerek nagy felbontóképessége révén a már meglévő eredmények pontosítását.

A komparatív genomiális hibridizáció (CGH) egy, a minta DNS-ének kópiaszám változásait (CNV) vizsgáló, hibridizáción alapuló molekuláris citogenetikai módszer. Az eljárás célja két különböző genomiális DNS (vizsgált minta, valamint a referencia DNS) gyors és hatékony összehasonlítása, majd az eltérések vizsgálata. A módszer alkalmazási köre, mely a szolid tumor szövetek és a normál sejtek összehasonlításával kezdődött, a későbbiekben kitágult. A módszer a hagyományos citogenetikai technikáknál (Giemsa-festés, FISH) jóval nagyobb, 5-10 megabázisos felbontóképessége révén egyre tágabb körben került alkalmazásra. A technika alapja, hogy a vizsgálni kívánt minta és a referencia minta izolált DNS-ét különböző színű fluorofórral (általában Cyanin3 (Cy3) és Cyanin5 (Cy5)) való jelölést követően 1:1 arányban metafázisos kromoszómákhoz hibridizáltatjuk. A komplementaritás elve alapján a jelölt DNS-ek a metafázisos kromoszóma megfelelő lókuszához kötődnek. A különböző színű fluoreszcens jelek intenzitását fluoreszcens mikroszkóp és speciális szoftverek segítségével összehasonlítjuk. A vizsgálni kívánt minta színének megnövekedett intenzitásértéke a kromoszóma egy bizonyos régiójában a minta azon genomi régiójára eső DNS kópiaszám többletéről árulkodik. A referencia DNS színének megnövekedett intenzitásértéke a vizsgálni kívánt minta azon genomi régióra eső DNS kópiaszám csökkenését mutatja. Amennyiben a színek intenzitásértéke egy genomi régióban azonos (piros és zöld szín esetén sárga), az adott pozícióban nincs eltérés a vizsgálni kívánt minta és a referencia DNS között. A nagy felbontóképesség ellenére a CGH is rendelkezik korlátokkal, melyek közül az egyik legfontosabb, hogy a módszer csak kiegyensúlyozatlan kromoszómális abnormalitások kimutatására alkalmas, aminek oka, hogy a kiegyensúlyozott transzlokációk (reciprokális transzlokációk, inverziók, esetenként a gyűrűkromoszómák) nem okoznak kópiaszám változást [154-158]. (6. ábra)



6. ábra: A CGH sematikus folyamatábrája

Az aCGH a tradicionális komparatív genomialis hibridizáció egy fajtája, mely esetén a metafázisos kromoszómák meghatározott hosszúságú (25-60 bp), a genomot lefedő oligonukleotidokkal helyettesítettek. Az oligonukleotidok egy speciális tárgylemezen helyezkednek el, és genomi pozíciójuk a gyártó által meghatározott. A módszer 5-10 kilobázisos felbontóképességével egy specifikus, gyors, érzékeny technikává vált, megkönnyítve a kópiaszám változások detektálását mind a klinikai alkalmazásokban, mind a kutatásban [159-162]. (7. ábra)



7. ábra: Az aCGH sematikus folyamatábrája

A különböző módszerek alkalmazását nagymértékben meghatározza azok felhasználási területe. Míg az NGS főleg pontmutációk kimutatására alkalmas technológia, addig az aCGH nagyobb genomális eltérések detektálását teszi lehetővé. A hagyományos (Kariotipizálás, FISH) és új keletű (NGS, aCGH) molekuláris biológiai módszerek együttes alkalmazása, egymást erősítve tette lehetővé az újabb módszerek diagnosztikai alkalmazását. Fontos megjegyezni, hogy a hagyományos és új-generációs módszerek nem felváltották, hanem kiegészítették egymást. A régi és új módszerek korlátainak nagy része egymás melletti alkalmazás esetén kiküszöbölhető (pl.: kiegyensúlyozott transzlokációk detektálása). A

tudomány és a módszerek fejlődése az epilepszia genetikai hátterének vizsgálatát is nagyban befolyásolta. Az aCGH és FISH együttes alkalmazása lehetővé tette epilepsziás betegekben nagyobb genomiális eltérések kimutatását, ezáltal a klinikai kép és a genotípus közti korreláció mélyrehatóbb tanulmányozását. Az egy gén érintettsége révén kialakult epilepsziák vizsgálata mellett így egyre nagyobb teret kapott a nagyobb kromoszómális változások – deléciók, duplikációk – és az epilepszia kapcsolatának vizsgálata.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A vizsgálat során célom volt:

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

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Mintavétel és tárolás

A vizsgálatba bevont betegek és családtagjaik klinikai vizsgálata, valamint a mintavétel genetikai tanácsadás keretein belül történt. A tájékoztatást és a vizsgálatba való beleegyezést követően 5-7 ml Etil-diamin-tetraecetsavval (EDTA) alvadásgátolt vér került levételre minden kiválasztott személytől a laboratóriumi vizsgálatok elvégzéséhez. A minták a feldolgozást követően biobanki tárolásra kerültek.

4.2 DNS izolálás

A DNS izolálására Omega E.Z.N.A. Blood Maxiprep Kit-et alkalmaztunk, mely nagy mennyiségű, akár 20 ml vérből való DNS izolálásra is alkalmas. A tisztításhoz használt filteres DNS kötő oszlopok kapacitása 1,5 mg DNS.

A felhasznált Kit tartalma:

Komponens	Mennyiség/Térfogat
Filteres DNS kötő oszlopok	50 db
50 ml-es gyűjtőcsövek	50 db
TL puffer	160 ml
BL puffer	600 ml
HB puffer	300 ml
Ekvilibráló puffer	2 x 85 ml
DNS mosó puffer	3 x 100 ml
RNáz A	2,2 ml
OB proteáz	300 mg
Proteináz tároló puffer	20 ml
DNS elúciós puffer	120 ml

Reagensek, melyeket a Kit nem tartalmaz:

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

4.2.1 DNS izolálás

A DNS izolálás előtt a Proteináz tároló pufferben feloldottuk a 300 mg OB proteázt (10 mM; pH 8,0), valamint a DNS mosó pufferhez 400 ml abszolút alkoholt kevertünk.

4.2.1.1 A DNS megkötése

10 ml EDTA-val gátolt alvadásgátolt vért 50 ml-es centrifugacsőbe öntöttünk, majd 250 µl OB proteázt pipettáztunk a csőbe. Szükség esetén a vért 10 mM Tris-HCl-val, Phosphate buffered saline-nal (PBS) vagy DNS Elúciós pufferrel egészítettük ki 10 ml térfogatra. Vortexelést követően 10,2 ml BL puffert mértünk rá, majd ismételt vortexeltük 5 percig a mintát. 20 µl RNáz A hozzáadása után 70°C-on inkubáltuk 10 percig a mintákat, majd a lizátumhoz 10,3 ml etanolt vagy izopropanolt mértünk. Alapos vortexelést követően egy HiBind DNA Maxi Column oszlopra vittük fel a cső tartalmát. Az oszlopot 50 ml-es gyűjtőcsőbe helyeztük, majd 5 percig 4000 g-n centrifugáltuk annak érdekében, hogy a filterre kikötődjön a lizátumban levő DNS. A gyűjtőcsőben összegyűlt folyadékot a folyamat végeztével eldobtuk.

4.2.1.2 A DNS mosása

Az oszlopot új gyűjtőcsőbe helyeztük, 50 ml HB puffert vittünk fel az oszlop felületére, majd centrifugáltuk 5 percig 3000 g-n. A csőben összegyűlt folyadékot eltávolítottuk, majd az oszlopot visszahelyeztük a gyűjtőcsőbe. 15 ml DNS mosó puffert vittünk fel az oszlopra, majd ismételt centrifugáltuk a mintát 5 percig 3000 g-n, majd az összegyűlt folyadékot eltávolítottuk. A mosás következő lépéseként 10 ml DNS mosó puffert adtunk a mintához, és az előző lépéshez hasonlóan 5 percig, 3000 g-n centrifugáltuk. A gyűjtőcsőben összegyűlt folyadékot szintén eltávolítottuk. A mosási folyamat utolsó lépéseként annak érdekében, hogy teljes mértékben megszabaduljunk az előzőleg használt mosó pufferből, a mintát 10 percig centrifugáltuk 4500 g-n puffer hozzáadása nélkül (szárazon).

4.2.1.3 A kikötődött DNS visszanyerése az oszlopról

A kikötődött DNS leoldásához az oszlopot áthelyeztük egy nukleáz mentes 50 ml-es centrifuga csőbe, majd 1 ml 70 °C-os DNS elúciós puffert (1 mM Tris-HCl, pH 8,5) vittük fel az oszlopra. Az oszlopot 3-5 perc szobahőmérsékleten való inkubálást követően centrifugáltuk 4500 g-n 5 percig. A folyamat eredményeképpen megkaptuk a filteren keresztülfolyt elúciós puffer által leoldott DNS-t.

A hatékonyabb DNS visszanyerés érdekében az elúciós lépés megismételhető. Minden elúciós lépés során az oszlopon megkötött DNS 60-70 %-a oldódik le, így az ismételt lépések eredményeként ez az érték a 80% feletti tartományt is elérheti.

4.2.2 DNS tisztítás

A DNS izolálás eredményeképpen kinyert DNS tisztasága nem minden esetben megfelelő, így szükség lehet a kinyert DNS tisztítására. A DNS koncentrációja, valamint annak tisztasága NanoDrop műszerrel mérhető. Amennyiben a DNS tisztasága nem éri el a megfelelő értéket, azt tisztítani kell. A DNS tisztítása során Macherey-Nagel NucleoSpin gDNA Clean-up Purification Kit-et alkalmaztunk.

A Kit tartalma:

Komponens	Mennyiség/Térfogat
Filter	50 db
Gyűjtőcső	50 db x 2ml
DB kötő puffer	25 ml
DW mosó puffer	25 ml
DE elúciós puffer	15 ml

A DW mosó puffer használata előtt 60 ml etanol hozzáadás szükséges.

A tisztítási folyamat első lépéseként 150 µl tisztítani kívánt DNS-hez hozzáadtunk 450 µl DB kötő puffert. Amennyiben kevesebb DNS tisztításra volt szükségünk, a DNS-t vízzel egészítettük ki 150 µl végtérfogatra. A protokoll második lépéseként a reakcióelegyet a NucleoSpin gDNA Clean-up oszlopra (filter+gyűjtőcső) pipettáztuk, majd 30 másodpercig centrifugáltuk 11000 g-n. A folyamat eredményeként a DNS kikötődött a filterre.

A DNS mosási lépései során 700 µl DW mosó puffert vittünk fel az oszlop felületére és az előző lépéshez hasonló paraméterekkel centrifugáltuk a mintát. A centrifugálás végeztével a gyűjtőcsőben összegyűlt mosó puffert eltávolítottuk, majd a filtert visszahelyeztük és az előző lépést megismételtük. A mosási lépések során a mosó pufferek a DNS-en kívül minden szennyeződést eltávolítanak a filterből, így végezetül a tiszta DNS-t kapjuk.

A mosást követően a tisztító oszlopot a maradék folyadék eltávolítása érdekében 1 percig, 11000 g-n centrifugáltuk. A folyamat utolsó lépéseként a filtert egy tiszta Eppendorf csőbe

helyeztük. A Filter felületére 50 µl DE elúciós puffert vittünk fel, majd 1 perc szobahőmérsékletű inkubálást követően 30 másodpercig, 11000 g-n centrifugáltuk. A puffer hatására a DNS leoldódott a filterről az Eppendorf csőbe, így annak tisztasága NanoDrop segítségével mérhető. Amennyiben szükséges, a tisztítási folyamat megismételhető.

4.3 G-sávok kromoszóma festés

A tenyésztéshez szükséges komplett táptalajt felolvasztottuk, 4 ml-enként tenyésztőcsövekbe adagoltuk, majd 20 °C-on tároltuk.

A vizsgálathoz szükséges tápfolyadékok és egyéb reagensek:

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

A vizsgálathoz szükséges oldatok:

- *Hypotonizáló oldat: 0,075 M KCl*
- *Fixáló oldat: 100 %-os ecetsav és Metanol (High-pressure liquid chromatography (HPLC) tisztaságú) 1 : 3 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*

- *Leishmann's festék: 0,3 g festék és 200 ml metanol. 3 napig 65 °C -os vízfürdőben történő melegítéssel segítjük az oldódást.*

4.3.1 *Lymphocyta tenyésztés*

A vizsgálatba bevont személyek kromoszóma vizsgálatához sterilen vett, Na-heparináttal alvadésgátolt perifériás vért használtunk. Két tenyésztőcsőbe, 4-4 ml felolvasztott táptalajba 5-5 csepp vért cseppentettünk sterilen.

A csöveket 37 °C-os termosztátba helyeztük, és 72 óráig inkubáltuk. Két órával a feldolgozás előtt 2 csepp Colcemidet adtunk a sejt kultúrához, blokkolva ezzel metafázisban a sejtosztódást. A csöveket 2 órára újra 37 °C-os termosztátba helyeztük. Az inkubációs idő alatt előkészítettük a hypotonizáláshoz (37°C) és a fixáláshoz (4°C) az oldatokat, majd amikor a blokkolási idő lejárt, a mintát lecentrifugáltuk 10 percig 2000 rpm-en, szobahőmérsékleten. A centrifugálást követően a felülúszót eltávolítottuk, az üledékhez hozzáadtuk a hypotonizáló oldatot, majd 30 percre a 37 °C-os termosztátba helyeztük vissza. Fél óra elteltével a mintát lecentrifugáltuk, a felülúszó nagy részét vízszugár szivattyúval leszívtuk, az üledékre enyhe rázogató mellett fixáló oldatot pipettáztunk, majd ezt követően újra lecentrifugáltuk. A tiszta szuszpenzió eléréséhez ezt a folyamatot háromszor megismételtük. Ezt követően a mintát - 20°C-ra helyeztük 20 percre, majd újabb centrifugálást követően a felülúszó egy részét ismét leszívtuk. Az üledéket felszuszpendáltuk, majd a szuszpenzióból kicseppentettünk 4 tisztított tárgylemezre.

4.3.2 *Értékelés*

A tárgylemezre kicseppentett preparátumot Giemzával festettük meg (festőküvetébe 80 ml Giemsa festéket töltöttünk, a kicseppentett lemezeket beleállítottuk 15 percre a festékbe, majd desztillált vízzel leöblítettük azokat). A száradás után mikroszkópban értékeltük a látottakat: 15 metafázisban lévő kromoszómát megszámoltunk, majd csoportokba soroltuk őket.

A Giemsa festést és értékelést követően végeztük el a G-sávozást, mely során a preparátumból újabb tárgylemezre csöppentettünk, majd 24 órán keresztül szobahőmérsékleten állni hagytuk. Az inkubációs idő leteltével 2,5 órára 65°C –os 2 x SSC oldatot tartalmazó festőküvetébe állítottuk. A sávozott preparátumot Leishmann's festékkel kezeltük, majd a mikroszkópos elemzés során minden mintából 5 kariotípust készítettünk.

4.4 Uniparentális diszómia

Uniparentális diszómia (UPD) esetén az érintett személy kromoszómaszáma normális, ugyanakkor egy adott kromoszómájának mindkét homológja ugyanattól a szülőtől, vagy csak az apától vagy csak az anyától származik. Kialakulásának hátterében két egymást követő, önmagában is numerikus aberrációhoz vezető esemény áll, egy meiotikus non-diszjunkció és egy, a korai barázdálódási osztódások során bekövetkező anafáziskésés (*anaphase lag*). Elsőként egy triszómiás zigóta jön létre, s csak ezt követően vész el a 3. homológ. Attól függően, hogy első, vagy második meiotikus non-diszjunkció zajlott-e le, megkülönböztethetünk uniparentális heterodiszzómiát vagy izodiszzómiát. Az előbbinél egy szülőből két eltérő homológot (egy-egy nagyanyait, illetve nagyapait) örökölt az utód, vagyis a non-diszjunkció az első meiotikus osztódásban következett be. Az utóbbiban az egyik szülő két azonos homológot (vagy csak nagyanyait vagy csak nagyapait) örökölt át, ekkor a második meiotikus osztódásban volt non-diszjunkció. UPD esetén a homológok eredetétől függően, a genomiális imprinting miatt, eltérő tünetek észlelhetők. A Prader–Willi és Angelman szindrómák (PWS/AS) egy részében nem delécia, hanem 15-ös UPD áll az eltérő tünetek hátterében, így vizsgálata elengedhetetlen.

Az eljárás során a szülők és a vizsgált személy esetén a polimorf mikroszatellita (STR) markerek amplifikálásra kerültek PCR segítségével. A markerek amplifikálása a következő hőprogramon történt:

- 94°C 3 perc
- 94°C 45 másodperc (38 ciklus)
- 55-57°C 30 másodperc (38 ciklus)
- 72°C 30 másodperc (38 ciklus)
- 72°C 3 perc
- 4°C

A PCR reakciót követően az amplifikáció 2%-os agaróz gélen került ellenőrzésre, majd 8%-os poliakrilamid gélen választottuk el az egyes alléleket.

Az értékelés során a gyermek (vizsgált személy) alléljeit a két szülő alléljeihez viszonyítottuk, azaz a kapott termékek mintázatát értékeltük. Azokat a markereket, amelyekre nézve a család tagjai homozigóták (két azonos méretű allél) voltak, az értékelésnél nem tudtuk figyelembe venni. Azokat a markereket sem vettük figyelembe, amelyekre nézve a családtagok ugyan heterozigóták voltak, de minden családtag mintájában ugyanaz a két allél

fordult elő, hiszen ilyen mintázat esetén nem állapítható meg a gyermek (vizsgált személy) alléljeinek szülői eredete. A mikroszatellita marker analízis szempontjából csupán azok a markerek informatívak, amelyekre nézve a családtagok heterozigóták, és a két szülő legalább az egyik allélméretben különbözik egymástól.

A 15-ös kromoszómák UPD vizsgálata során a szakirodalomban közölt D15S10, D15S11, D15S97, D15S113, D15S122, D15S128, D15S165, D15S210, D15S659 és GABRB3 polimorf STR markerek kerültek alkalmazásra.

A felhasznált STR markerek primerszekvenciái:

STR Marker	Lokalizáció	Ismétlődés típusa	Primerek
D15S10	15q11-12	(CA) _n	F: GTA ACA CTA TGA ATT GTT AGT G R: GAC AGC TGA ACG TAG TTA AAG
D15S11	15q11-12	(CA) _n	F: GCT CTC TAA GAT CAC TGG ATA GG R: GAC ATG AAC AGA GGT AAA TTG GTG G
D15S97	15q11-13	(CA) _n	F: CTT CTA GCC TCA GGT TCC CC R: ATT CAC TTT TCA AAC CAC CCC
D15S113	15q11-13	(CA) _n	F: CAT GTA CTG TTT TAT CCC TGT GGC R: CTG CTG CTT ATA CTC TTT CTC TAT TC
D15S122	15q11.2-13	(CA) _n	F: GAT AAT CAT GCC CCC CA R: CCC AGT ATC TGG CAC GTA G
D15S128	15q14	(CA) _n	F: GCT GTG TGT AAG TGT GTT TTA TAT C R: GCA AGC CAG TGG AGA G
D15S165	15q11-13	(CA) _n	F: GTT TAC GCC TCA TGG ATT TA R: GGG CAC ACA GTC CCA A
D15S210	15q11-13	(CA) _n	F: TGA ACT AGG CAG CAC ACA CT R: AAC CAA TGC TTG GAC ACA G
D15S659	15q13	(GATA) _n	F: GTG GAT AGA CAC ATG ACA GAT AGG R: TAT TTG GCA AGG ATA GAT ACA GG
GABRB3	15q11.2-12	(CA) _n	F: CTC TTG TTC CTG TTG CTT TCA ATA CAC R: CAC TGT GCT AGT AGA TTC AGC TC

4.5 Metafázis FISH

A kiválasztott személyek fluoreszcens in situ hibridizációs vizsgálatához perifériás vért használtunk. 2 x 4 ml phytohemagglutinin tartalmazó táptalajhoz (Chromosome Medium 1A) 5-5 csepp vért adtunk, összeráztuk, majd 72 órára 37°C -os termosztátba helyeztük. A vizsgálat megkezdése előtt 2 órával a kultúrákhoz Colcemidet (0,1 µg/ml) adtunk. A sejtek hypotonizálása 37°C-os 30 percig, 0,075 M KCl oldatban történt. A fixálást fixáló oldattal (metanol és jégcet 3:1 arányú keveréke) való többszöri átmosással végeztük. A preparátumot -20°C-ra helyeztük minimum 30 percre, majd tárgylemezre cseppentettük ki a sejteket. A preparátumokat a vizsgálat idejéig -20°C -on tároltuk.

A vizsgálat kezdeti lépéseként a -20°C-on tárolt preparátumokat szobahőmérsékleten felmelegítettük.

A vizsgálathoz szükséges reagensek:

- 10 % Tween 20
- 1 M $MgCl_2$
- 10 % pepszin
- 1 N HCl
- 70 % - 90 % - 100 % etanol
- 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) magfestés: 125 ng/ml antifade mounting mediumban oldva

A vizsgálathoz szükséges oldatok:

- 20 x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na-citrát (pH 7,0)
- 2 x SSC (500 ml): 450 ml desztillált víz + 50 ml 20 x SSC (pH 7,0)
- 10 x PBS: 137 mM NaCl, 27 mM KCl, 80 mM Na_2HPO_4 , 15 mM KH_2PO_4 (pH 7,0)
- 1 x PBS (1000 ml): 900 ml desztillált víz + 100 ml 10 x PBS (pH 7,0)
- $MgCl_2$ /PBS (500 ml): 480 ml 1 x PBS + 20 ml $MgCl_2$
- $MgCl_2$ /PBS/formaldehid (100 ml): 100 ml $MgCl_2$ /PBS + 1 ml formaldehid
- 50 % formaldehid/ 2 x SSC (400 ml): 160 ml desztillált víz + 40 ml 20 x SSC + 200 ml formaldehid (pH 7,0)
- 4T (500 ml): 400 ml desztillált víz + 100 ml 20 x SSC + 2,5 ml 10 % Tween 20 (pH 7,0)

4.5.1 *A preparátumok előkezelése*

A preparátumok előkezelését pepszines emésztéssel kezdtük, amit fixálás követett: a tárgylemezt 2 x SSC oldatban mostuk 3 x 3 percig, majd 1 x PBS oldatban 1 x 3 percig. A mosási folyamatot emésztési folyamat követte, mely során 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 adtunk hozzá. A preparátumot 10 percig inkubáltuk a reakcióelegyben 37 °C-on. Ezt követően 1 x PBS oldatban 3 x 3 percig, majd MgCl₂/PBS oldatban 2 x 3 percig mostuk. A fixálás MgCl₂/PBS/formaldehid oldatban történt 1 x 3 percig. Az előkezelés utolsó lépéseként dehidratáltuk a preparátumot jéghideg felszálló alkoholsorban (70 – 90 – 100 %) 1-1 percig, majd szobahőmérsékleten megszárítottuk a lemezt.

Az előkezelt lemez hibridizációra alkalmas területeit fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgáltuk, majd a kiválasztott területet a tárgylemez megkarcolásával jelöltük meg.

4.5.2 *Denaturálás és hibridizáció*

A vizsgálat következő, denaturációs és hibridizációs szakaszában az általunk alkalmazott kodenaturációs módszer szerint a fluorochrome vagy haptén jelölésű próbához hibridizációs puffert adtunk. Szükség szerint kiegészítettük desztillált vízzel 10 µl végtérfogatra az oldatot. Az elegyet az előre kiválasztott, hibridizációra alkalmasnak vélt területre cseppentettük, fedőlemezzel lefedtük, majd hot plate-en 80°C-on denaturáltuk 3 percig a próbát és a kromoszómális DNS-t. A fedőlemezt leragasztottuk, majd lefordítva egy fekvő küvettába helyeztük 37°C-os pára kamrába. A hibridizáció időtartama egy éjszaka volt.

4.5.3 *Poszthibridizációs mosás és festés*

Az inkubáció leteltével a következő lépés a poszthibridizációs mosás volt. A frissen készült oldatokat és a festőküvettákat 37°C-ra fűtött vízfürdőben előmelegítettük. A munkaoldatok pH értékeit 7,0-re állítottuk be. A fedőlemezeket eltávolítottuk, majd 50% formaldehid/ 2 x SSC oldatban 37°C-on 3 x 5 percig mostuk a preparátumot. A mosási folyamat következő lépése 3 x 5 perc 2 x SSC oldatban történő mosás volt 37°C-on, melyet 4T oldatban történő 3 x 3 perces 37°C-on vagy szobahőmérsékleten való mosási lépés követett.

A fluorochrome jelölésű próbáknál a lemezeket desztillált vízzel öblítettük, majd szobahőmérsékleten szárítottuk. A hibridizált területet DAPI magfestéssel lefedtük. A denaturálástól kezdve a preparátumokat fénytől védett helyen tároltuk.

A haptén jelölésű próbák alkalmazásakor az első 4T mosási lépést követően 100 µl előhívó oldattal (a próba jelölésének megfelelő antitestblokkoló reagenssel hígított) buborékmentesen lefedtük, majd 37°C-os pára kamrába helyeztük 30 percre. Az inkubációs idő leteltét követően a protokolt a 4T mosási lépésektől folytattuk tovább. A lemezek desztillált vízzel történt öblítése után a lemezeket szobahőmérsékleten megszárítottuk, majd a hibridizált területet DAPI magfestéssel fedtük. A fluorochrome jelölésű próbáknál alkalmazottakhoz hasonlóan itt is fokozottan figyeltünk a preparátumok fényérzékenységére.

4.5.4 Értékelés

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

4.6 Array komparatív genomiális hibridizáció

A vizsgálatok elvégzéséhez Agilent SurePrint G3 Human Gene Expression V2 8x60K Microarray Kit-et alkalmaztunk.

A vizsgálathoz használt reagensek, oldatok, kit-ek 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
 - Nukleáz-mentes víz
 - 10 x enzim reakció puffer
 - BSA (bovine serum albumin)
 - Alu I restrikciós endonukleáz
 - Rsa I restrikciós endonukleáz
 - random primer
 - 5 x reakció puffer
 - 10 x dNTP
 - Cyanine 3-dUTP

- *Cyanine 5-dUTP*
- *Exo – Klenow enzim*
- *Oligo aCGH/ChIP-on-chip Hybridization Kit:*
 - *Cot-1 DNS (1,0 mg/ml)*
 - *10 x aCGH blokkoló ágens*
 - *2 x HI-RPM hibridizációs puffer*
- *Mosó puffer 1.*
- *Mosó puffer 2.*

4.6.1 *Minták és referenciák előkészítése*

A vizsgálathoz perifériás vérből izolált DNS-t használtunk, melynek koncentrációját és tisztaságát NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, NanoDrop Products, 3411 Silverside Road, Bancroft Building Wilmington, De 19810 USA) segítségével határoztuk meg. A DNS tisztaságának és koncentrációjának méréséhez „vak”-ként az izolálás során alkalmazott elúciós puffert használtuk. Mintánként 1,5 µl DNS-t pipettáztunk a NanoDrop 2000 detektor felületére, majd a fedél lehajtását követően lemértük az izolált DNS tisztaságát és koncentrációját. A program a „vak” és a vizsgált minták abszorbancia értékeinek különbsége alapján adja meg a DNS koncentrációját, illetve tisztaságát.

Annak érdekében, hogy a protokoll első lépéseként megadott volumenben (10,1 µl) a minták DNS koncentrációja elérje az 1 µg értéket, az izolálás során minimum 100 ng/µl-es DNS koncentrációt kellett elérnünk. Normál körülmények között a kétszálú DNS 260, míg az egyszálú RNS 280 nm hullámhosszú UV fényt abszorbeál, így a két érték egymáshoz viszonyított aránya (260/280) megadja a minta DNS-ben kimutatható RNS szennyezettséget. A minta RNS-sel való szennyezettsége 1,8 feletti érték esetén már elfogadható. A minta szerves oldószerrel való szennyezettségének mértékét a 260/230 arányszám jelzi, mely többségében magasabb értéket mutat, mint a 260/280 arányszám. Ez esetben az 1,9-2,0 feletti érték elfogadható oldószerrel való szennyezettségi szint.

A nem megfelelő koncentrációjú és tisztaságú DNS mintákat Macherey-Nagel gDNA Clean-up Purification Kit segítségével tisztítottuk meg.

4.6.2 Minták és referenciák fragmentálása

A folyamat kiinduló, DNS fragmentációs lépéséhez 1 µg DNS-t használtunk fel a 8 vizsgált mintából, illetve a 8 referencia mintából úgy, hogy minden termék végtérfogata 10,1 µl legyen. A megfelelő végtérfogatot a minták bekoncentráálásával vagy nukleáz-mentes vízzel történő hígítással érték el. Az 1-1 µg DNS-eket (10,1 µl) PCR csövekbe pipettáztuk, majd minden csőhöz 2,9 µl emésztő mixet adtunk (13 µl).

Komponens	µl/minta	18 mintára
Nukleáz-mentes víz	1	18
10 x restrikciós endonukleáz puffer/Puffer C	1,3	23,4
Acetilált BSA (10 mg/ul)	0,1	1,8
Alu I (10 U/ul) restrikciós endonukleáz	0,25	4,5
Rsa I (10 U/ul) restrikciós endonukleáz	0,25	4,5
Végtérfogat	2,9	52,2

A reakcióelegyet PCR készülékbe helyeztük a következő programra:

- 37°C 2 óra
- 65°C 10 perc
- 4°C (vagy jégre tenni)

A folyamat eredményeként a genomi DNS-ek fragmentálódtak. A fragmentek méretének meghatározásához Agilent BioAnalyzer 2100 műszert alkalmaztunk.

4.6.3 Minta és referencia fragmentek amplifikálása és jelölése

A DNS jelöléséhez 2,5 µl random primert adtunk minden mintához (15,5 µl), pipettával alaposan összekevertük, majd a PCR készülékbe helyeztük a következő programra:

- 95°C 5 perc
- 4°C 3 perc

A reakció végeztével a mintákat lecentrifugáltuk 1 percig 6000 g-n.

Minden csőhöz 9,5 µl DNS jelölő reakcióelegyet pipettáztunk (25 µl) A jelölésnél a vizsgálandó mintáinkat és a referencia mintákat külön fluoreszcens festékekkel jelöljük: a Cy3 a referencia minták jelölésére, a Cy5 a vizsgált minták jelölésére használandó.

Komponens	µl/minta	Cy3 mix 9 referencia mintára	Cy5 mix 9 vizsgálandó 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 fragment	0,5	4,5	4,5
Végtérfogat	9,5	85,5	85,5

A reakcióelegyeket pipettával alaposan összekevertük, majd lecentrifugáltuk a PCR csövek falára tapadt cseppeket. A mintákat PCR készülékbe helyeztük a következő programra:

- 37°C 2 óra
- 65°C 10 perc
- 4°C

(A minták a reakciót követően -20°C-on tárolhatók.)

4.6.4 Minták és referenciák tisztítása

A tisztítási lépéshez a mintákat lecentrifugáltuk 1 percig 6000 g-n, majd 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe pipettáztuk azokat. Hozzáadtunk minden mintához 480 µl 1 x TE puffert (pH 8,0), majd minden mintát Amicon AU-30 filteres csövekbe pipettáztunk át. A csöveket centrifugába helyeztük, és 10 percig, 14000 g-n centrifugáltuk a mintákat. A mintákhoz 480 µl 1 x TE puffert (pH 8,0) adtunk, majd újra lecentrifugáltuk azokat 10 percig, 14000 g-n. Ezt követően a filtereket fejjel lefelé a tiszta csövekbe helyeztük, majd 1 percig 1000 g-n centrifugáltuk azokat. A folyamat végén a minták térfogata 20 és 32 µl közé esett. Következő lépésként a mintákat asztali blokk termosztátban 50°C-on bekoncentráltuk 9,5 µl végtérfogatra, illetve TE pufferrel kiegészítettük, ha szükséges volt. A festék beépülését NanoDrop segítségével mértük 1,5-1,5 µl minta felhasználásával (8 µl minta maradt). A

mérés során a koncentráció illetve festékek abszorbancia értékekből kiszámoltuk a festék beépülését. A beépülés optimális értéke minták esetén 20-35, referenciák esetén pedig 25-40.

A mérést követően a megfelelő vizsgálandó minta-referencia párokat egy csőbe pipettázzuk (16 µl).

4.6.5 Minta-referencia párok hibridizáltatása a lemez felületére

Az összemért vizsgálandó minta-referencia párok, aCGH slide-hoz való hibridizálásához egy hibridizációs mixet készítünk.

Komponens	µl/minta	9 mintára
Humán 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
Végtérfogat	29	261

A hibridizációs mixből 29 µl-t adtunk minden mintához, alaposan összepipettáztuk majd lecentrifugáltuk a csövek falára tapadt cseppeket. A reakcióelegyet PCR készülékbe helyeztük a következő programra:

- 95°C 3 perc
- 37°C 30 perc

A mintákat lecentrifugáltuk 1 percig 6000 g-n, majd ezt követően 40 µl-t óvatosan a gasket slide felszínének megfelelő pozíciójára pipettáztunk („drag and dispense”). Az aCGH lemezt aktív felszínével a gasket slide-ra helyeztük és hibridizációs kamrával egymáshoz rögzítettük. 24 órán át 65°C-on inkubáltuk, 20 rpm-en.

4.6.6 Lemez/ek mosása

Az aCGH slide mosását az 1. mosó puffer alkalmazásával kezdtük. A két lemezt kiemeltük a hibridizációs kamrából, majd a mosó puffer vízterében eltávolítottuk a gasket slide-ot az aCGH slide-ról. A lemezt mosóállványba helyeztük, majd az 1. mosó pufferben 5 percig inkubáltuk, mágneses keverőt alkalmazva. Az inkubációs idő elteltével az aCGH slide-ot a 37°C-on overnight előmelegített 2. mosó pufferbe helyeztük 1 percre, mágnessel keverve a

puffert. Ezt követően sötétben hagytuk megszáradni, majd egy szkennelésre alkalmas tartóba téve a szkennerbe helyeztük.

4.6.7 Lemez/ek szkennelése

A szkennelést követően az array lemezt behelyeztük a szkennel 1. pozíciójába. Az Agilent ScanControl elindításával a lemezt beszkenneztük, majd a szkennelés eredményeként létrejött .TIFF kiterjesztésű fájlt az Agilent Feature Extraction program segítségével hoztuk feldolgozható formába. A program a képfájltra ráilleszti az úgynevezett grid fájlt, mely meghatározza a lemez különböző pontjaira nyomtatott próbákat. Az output fájlokat az Agilent Cytogenomics program alkalmazásával jelenítettük meg értelmezhető formában.

4.6.8 Adatok értékelése

Az adatok kiértékelése során az Agilent Cytogenomics program a Feature Extraction program által generált fájlokat értékeli és teszi vizuálisan értékelhetővé. A hozzá kapcsolódó adatbázisok alkalmazásával nagymértékben megkönnyíti az eredmények kiértékelésének menetét, főként az adott eltérések patogenitásának megállapítását.

5. BETEGEK

5.1 1. Beteg

Egy 27 hónapos fiú gyermeket vizsgáltunk intézetünk genetikai tanácsadásán epilepszia és pszichomotoros elmaradás miatt. A családi anamnézisből kiemelendő, hogy anyai ágon a távolabbi rokonok körében Down-szindróma, epilepszia, inzulin-dependens diabetes mellitus valamint kardiológiai betegség előfordul; a mater fiú ikerpár testvérei koraszülöttség következtében kialakult légzési elégtelenség miatt 2 napos életkorban elhunytak. A mater előző párkapcsolatából egy egészséges fiú gyermeke született.

Az általunk vizsgált gyermek a mater II./2. graviditásából, 40. gesztációs héten, per vias naturales, 9/10-es Apgar ponttal, 3200 gr súllyal született. Születését követően észlelt ritmuszavar, extrasystolék miatt Neonatális Intenzív Centrumba került további kivizsgálás céljából. Holter-EKG monitorozás történt, mely bigemin, széles QRS-sel járó extrasystolét írt le, ami rövid időn belül spontán rendeződött. Újszülöttkori koponya- és hasi ultrahang vizsgálata kóros eltérést nem igazolt. Strabizmus miatti szemészeti vizsgálat szintén negatív eredményt adott. EEG vizsgálat diffúz működészavart írt le multifokális tüskékkel, ami miatt antiepileptikus terápia került bevezetésre, melyet 3 hónapos koráig kapott. Hosszú időn keresztül az antiepileptikus terápia mellett sem volt rohammentes, az EEG változó rohammintázatot mutatott. Az emiatt elvégzett koponya-MR vizsgálat strukturális eltérést nem mutatott.

Csecsemőkorában etetési nehezítettség miatt csak pohárból tudták etetni. Furcsa sírási hang jellemezte (epiglottis lazaság), izomzata hypoton volt.

A gyermek pszichomotoros fejlődése megkésett: 1 évesen forgott, 1,5 évesen mászott és felállt, 2 évesen kapaszkodva járt. 10 hónapos korától komplex fejlesztésben részesült (DSGM (Dévénny Speciális manuális technika - Gimnasztika Módszer), gyógytorna, gyógyúszás, masszázs). Szemkontaktus kb. 1 éves életkor körül alakult ki. Pszichomotoros nyugtalanság és autoagresszió jellemzi (fejét ütögeti), figyelme nehezen irányítható-leköthető. Nem szobatiszta; pelenkában székletet jelzi. Még nem beszél, csak halandzsázik.

Az első vizsgálat során súlya 10,4 kg (< 5 pc), hossza 90,5 cm (50-75 pc) és fejkörfogata: 46 cm (< -2SD). Dysmorphic státságából lapos occiput, epicanthus, hipertelorizmus, bal fülcimpa hátsó felszínén redő, széles-lapos orrgyök valamint mikrognátia kiemelendő. Neurológiai státságában generalizált hypotonián kívül durva neurológiai kórjel nincsen.

5.2 2. Beteg

Második betegünk egy 17 hónapos kislány, aki minor anomáliák és epilepszia miatt került intézetünkbe kivizsgálás céljából. A családi anamnézisből kiemelendő, hogy apa testvérét epilepszia miatt gondozták: 1 év gyógyszeres kezelést követően rohammentessé vált.

A gyermek az édesanya II./2 zavartalan graviditásából született 41. gesztációs héten, per vias naturales, 10/10-es Apgar ponttal, 3520 gr súllyal. A terhesség alatt ultrahang vizsgálattal észlelt plexus choroideus cysta miatt transabdominalis amniocentesis történt, a magzatvízből normál női karyotípust igazoltak. Zavartalan kardiorespiratorikus adaptációt követően anyai GBS (Group B Streptococcus) pozitivitás miatt antibiotikus kezelésben részesült.

Lassú pszichomotoros fejlődés miatt a gyermek neurohabilitációban részesült 4 hónapos korától. Fél éves életkorban bizonytalan eredetű rosszsullétek, megfeszülések miatt kivizsgálás indult, ennek során EEG vizsgálat történt, mely West-szindrómára jellegzetes mintázatot igazolt. Koponya-MR vizsgálat frontálisan és temporálisan tágabb liquor tereket ábrázolt, egyéb agyi strukturális fejlődési rendellenesség nem volt kimutatható. Vigabatrin kezelés mellett jelentősen csökkent a rohamok előfordulása.

A gyermek pszichomotoros fejlődésére jellemző, hogy 12 hónaposan mászott, 13 hónaposan felállt és kapaszkodva lépegetett. 6-8 hónapos kora között jelentkeztek sztereotíp mozgások: tapsolás, hintáztatás és kézkulcsolás. Beszédfejlődése súlyos késést mutatott. A 15 hónapos életkorban kapott MMR-oltást (Morbilli-mumpsz-rubeola oltás) követően ismét görcse zajlott, ami a szülők elmondása alapján a gyermek fejlődését hetekig visszavetette.

Az első vizsgálat időpontjában súlya 13 kg (90 pc), magassága 85 cm (75-90 pc), fejkörfogata pedig 46 cm (-1SD). Fizikális vizsgálata során enyhe craniofacialis dysmorphia mellett (kiugró homlokesont, lapos occiput, széles arc), széles mellkas és kis lábak voltak megfigyelhetők. Neurológiai státuszában generalizált hypotonia, sztereotíp mozgások és lábbujjhegyezés volt észlelhető.

Második ambuláns vizsgálata alkalmával, 29 hónapos korában még egyedül nem tudott járni, kapaszkodva, széles alapon lépegetett. Sztereotíp mozdulatai változatlanul megfigyelhetők voltak. Az epilepszia rohammintázata változást mutatott: a vigabatrin kezelést valproátra cserélték.

5.3 3. Beteg

Harmadik betegünket 3 éves korában vizsgáltuk első alkalommal minor anomáliák és epilepszia miatt. A kislány a mater I./1. zavartalan graviditásából, terminusra született, harántfekvés miatt császármetszéssel, 2600 gr súllyal és 9/10-es Apgar ponttal. A korai kardiorespiratorikus adaptáció rendben zajlott. 2 napos életkorban jelentkezett első epileptiform görcse, mely barbiturát adása mellett oldódott. A rosszullét 3 hét múlva megismétlődött. A convulsiók hátterében koponya ultrahanggal III. fokú intraventricularis haemorrhagia (IVH) igazolódott. A tónusos-clonusos görcsök oldására fenntartó barbiturát kezelést alkalmaztak, azonban 7 hetes korában rekurrens rohamok miatt intenzív osztályra került. EEG vizsgálat negatív eredményt adott; koponya-MR corpus callosum dysgenesiát vetett fel, ezt azonban későbbi ismételt MR vizsgálat nem igazolta. 1,5-2 éves életkorra rohammentessé vált a gyermek, negatív EEG mellett a barbiturát kezelést fokozatosan leállították, azonban 3 héttel később a rohamok ismét visszatértek. Újabb MR-vizsgálat az IVH következtében kialakult jobb oldalkamra tágulatot írt le. Kombinált antiepileptikus terápia ellenére sem rohammentes.

A gyermek születése óta ismert atrialis és ventrikularis septum defektus miatt rendszeres kardiológiai gondozás alatt állt. Gastroesophagealis reflux betegség (GERD) miatt gastroenterológiai ellenőrzésekre járt.

Megkésett pszichomotoros fejlődés miatt neurohabilitációban részesült.

Az első genetikai vizsgálat alkalmával súlya 10 kg (< 3 pc), magassága 80 cm (< 3 pc) és fejkörfogata 44 cm (< -2SD). Fizikális vizsgálat során a következő minor anomáliákat azonosítottuk: mikrokefália, mikrognátia, besüppedt orrgyök, epicanthus, hipertelorizmus, előre álló philtrum, gótikus szájpad, II-III. lábujjak részleges syndactyliája, testszerte 0,5-2 cm-es café au lait foltok. Bruxizmus, hiperaktivitás és enyhe autisztikus vonások jellemezték a viselkedését.

Kontroll vizsgálatára 6 éves korában került sor. Ekkor lassú szomatikus fejlődést és progresszív mikrokefáliát detektáltunk a gyermeknél. A dystrophia mellett a pszichomotoros fejlődés késése is jelentős volt: 6 évesen nem beszélt. Súlyos figyelemzavarának kezelésére, mely hiperaktivitással és sztereotíp kézmozdulatokkal társult, methylphenidate terápiában részesült. Dysmorfhiás státuszában jelentős változás nem volt látható.

5.4 4. Beteg

Negyedik betegünk egy 8 hónapos kislány, akinek kivizsgálása minor anomáliák, halláskárosodás és megkésett pszichomotoros fejlődés miatt indult. Családi anamnéziséből kiemelendő, hogy az édesanya, lánytestvérei és az anyai nagymama is hypothyreosis miatt hormonszubsztitúcióban részesülnek.

A gyermek a mater I./1. graviditásából, terminusra, 2740 gr súllyal, 4/6/8-as Apgar ponttal született. A 26. gesztációs héten foetalis echocardiographiával hypoplasiás aortaívet észleltek. 1 napos életkorban történt kardiológiai vizsgálat aorta stenosis és coarctatio aortae véleményezett. Újszülöttkori koponya ultrahang vizsgálat során enyhe oldalkamra aszimmetriát írtak le, hasi ultrahang enyhe bal oldali pyelectasián kívül kóros eltérést nem talált.

Pszichomotoros fejlődése megkésett volt: 8 hónapos korában fordult meg először, 20 hónapos korában ült fel. A beszédfejlődés területén is jelentős késés valamint hullámzó tendencia volt megfigyelhető: a beszéd beindulását követően időnként regresszív fázis volt észlelhető.

Első epilepsziás roghama 22 hónapos korában jelentkezett lázas állapot kapcsán, majd a későbbiekben láz nélkül is előfordultak rosszullétek. EEG vizsgálat generalizált, aktív interiktális epilepsziás mechanizmust mutatott. Kombinált antiepileptikus kezelés mellett a rohamok száma jelentős csökkenést mutatott. Koponya-MR vizsgálat tág liquor teret, gracilis hippocampust és a szubkortikális területen ischaemiás károsodásnak megfelelő képet mutatott.

Gyakori felső légúti infekciók miatt kétoldali grommet beültetés történt. Objektív hallásvizsgálat (BERA) bilaterális halláskárosodást mutatott ki, hallásjavító készüléket kapott, azonban a hallási figyelmében jelentős javulást a szülők ezután sem észleltek.

Az első vizsgálatkor testsúlya 7850 g (50 pc), magassága 68 cm (25-50 pc), fejkörfogata pedig 42 cm (-1SD) volt. Fizikai vizsgálata során brachykefália, lapos arc, középarci hypoplasia, ferdén lefelé álló szemrések, konvergens strabizmus, rövid orr, magas szájpap, valamint generalizált hypotonia volt megfigyelhető. (8. ábra)



8. ábra: 4. betegünk jellegzetes arcvonásai

5.5 5. Beteg

Ötödik betegünk egy 30 hónapos kisfiú, akit minor anomáliák miatt vizsgáltunk genetikai tanácsadónkban. A gyermek családi anamnézise negatív. A mater endometriosis miatt több alkalommal műtéten esett át valamint hormonterápiában részesült.

A fiúgyermek a mater II./2. spontán graviditásából, a 38. gesztációs héten, 2600 gr súllyal, császármetszéssel, 7-es Apgar ponttal született. A 34. gesztációs héttől IUGR miatt fokozott obszerváció történt.

5 hónapos korától kezdődően fejlődésneurológiai gondozás alatt állt megkésett mozgásfejlődés miatt: 1 éves korában ült fel, 14-15 hónapos korában kezdett el mászni és járni. Objektív hallásvizsgálattal kétoldali halláskárosodást igazoltak. Az első életévben több alkalommal esett át tüdőgyulladásra, melynek hátterében a pulmonológiai kivizsgálás tracheomalácián kívül egyéb kóroki eltérést nem igazolt.

Első epileptiform rosszulléte 20 hónapos korában zajlott terápiareszisztens fokális rohamokkal társuló epilepszia képében. A rohamok jobb frontalisán indultak, tónusos megfeszüléssel jártak. Az alkalmazott antiepileptikumok metabolizmusában jelentős eltérést tapasztaltak a szokásostól. Minimális dozírozás mellett is toxikus vérszinteket mértek a

gyermeknél. (0,03 mg/kg clonazepam mellett 600 nmol/l gyógyszyszint és 11 mg/kg levetiracetam mellett 330 nmol/l gyógyszyszint)

Intézetünkbe 18 hónapos korában került, amikor súlya 10 kg (<5 pc), magassága 81 cm (<5 pc) és fejkörfogata 45 cm (<-2SD). Informatív morfogenetikai variánsok közül a következők voltak megfigyelhetők: brachymikrokefália, lapos arc, középarc hypoplasia, hipertelorizmus, rövid orr, vastag alsó ajak, hegyes áll, deformált fül. Neurológiai státuszában enyhe hypotónián kívül kóros eltérést nem találtunk. (9. ábra)



9. ábra: 5. betegünk jellegzetes arcvonásai

6. EREDMÉNYEK

6.1 1. Beteg

6.1.1 G-sávok kromoszóma festés

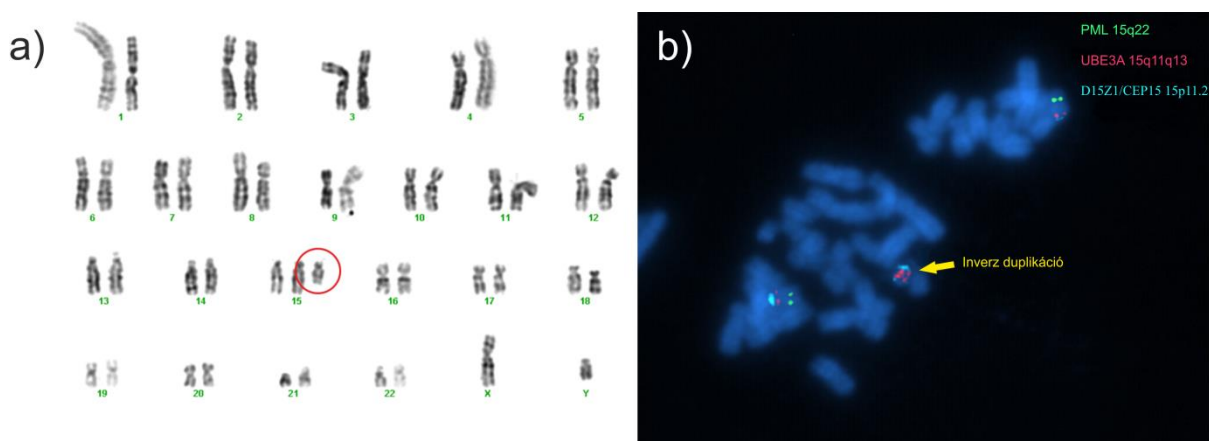
A G-sávok kromoszóma festés segítségével az 1. beteg vizsgálatakor detektálásra került egy E-méretcsoportba tartozó akrocentrikus számfeletti 15-ös marker kromoszóma. (10./a ábra)

6.1.2 Uniparentális diszómia vizsgálata

A vizsgált beteg normál 15-ös kromoszómáinak uniparentális diszómiaja a felhasznált STR markerek alkalmazásával kizárásra került.

6.1.3 Metafázis FISH

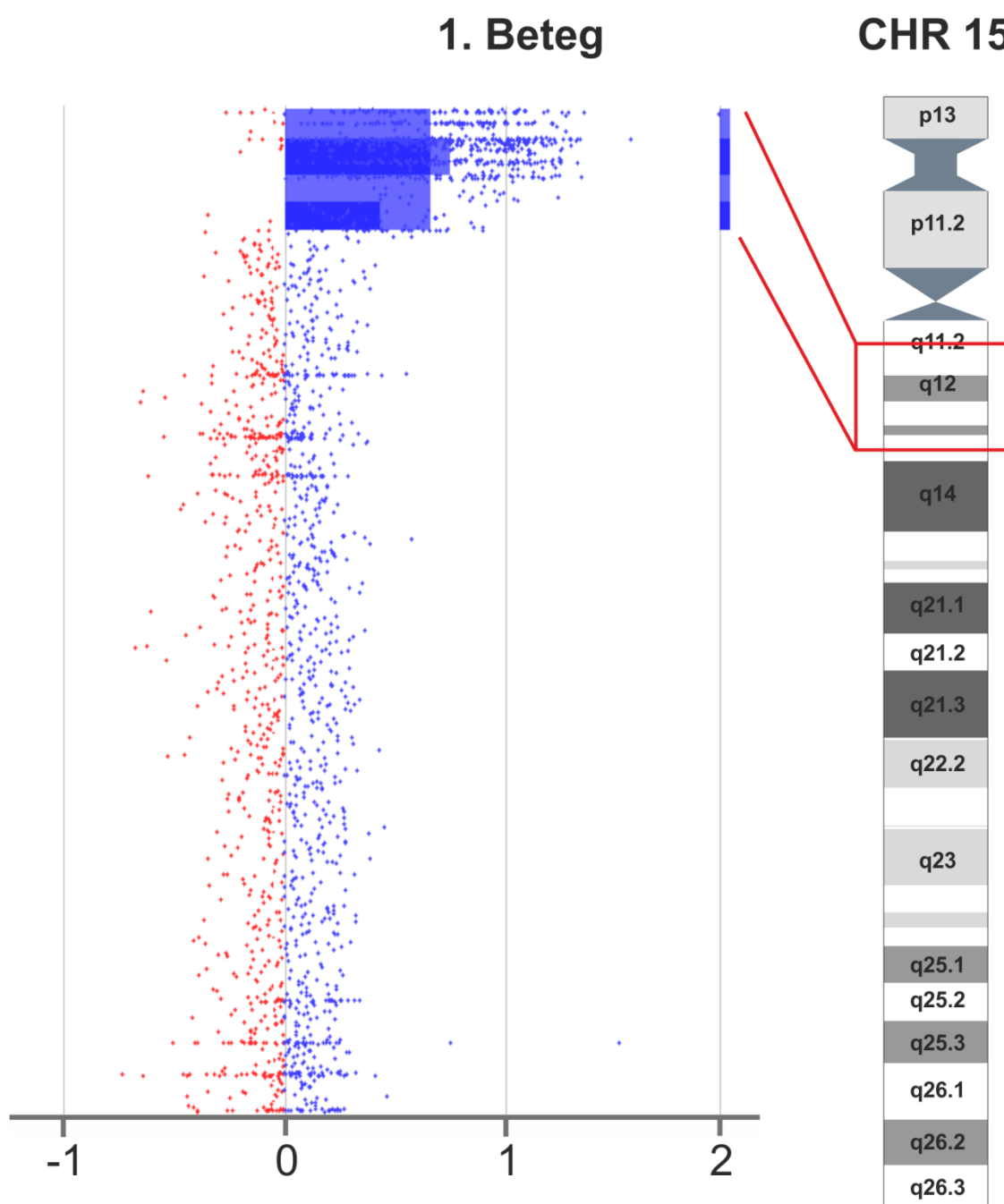
A vizsgált beteg klinikai képe, a 15-ös kromoszóma PWS/AS kritikus régiójába (PWACR) eső UBE3A lókusznak metafázis FISH vizsgálatát indikálta. Az alkalmazott D15Z1 kontroll (CEP15, 15p11.2) és UBE3A (15q11q13) próbák az akrocentrikus 15-ös marker kromoszóma esetén 2 kópiában fordultak elő, ami a normál 15-ös kromoszómák 1-1 kópiájával együtt sejtenkénti 4 kópiát eredményezett. A kontrollként alkalmazott 15q22 (PML lókuszt) hosszú kar próba a számfeletti kromoszómán nem mutatott festődést. (10./b ábra) Ezek alapján az 1. beteg kariotípusa 47,XY,+psu idic (15)(pter→q14::q14→pter)-ként határozható meg.



10. ábra: Az 1. beteg G-sávok kromoszóma festése, valamint metafázis FISH vizsgálata során kapott eredmények. A beteg kromoszómáinak G-sávok festése alapján jól kivehető az addicionális 15-ös marker kromoszóma, így a FISH során alkalmazott 15q11q13 régiót (UBE3A), valamint a 15p11.2 és 15q22 régiót jelölő kontroll próbák és a G-sávok kromoszóma festés alapján a beteg kariotípusa 47,XY,+psu idic (15)(pter→q14::q14→pter)-ként határozható meg.

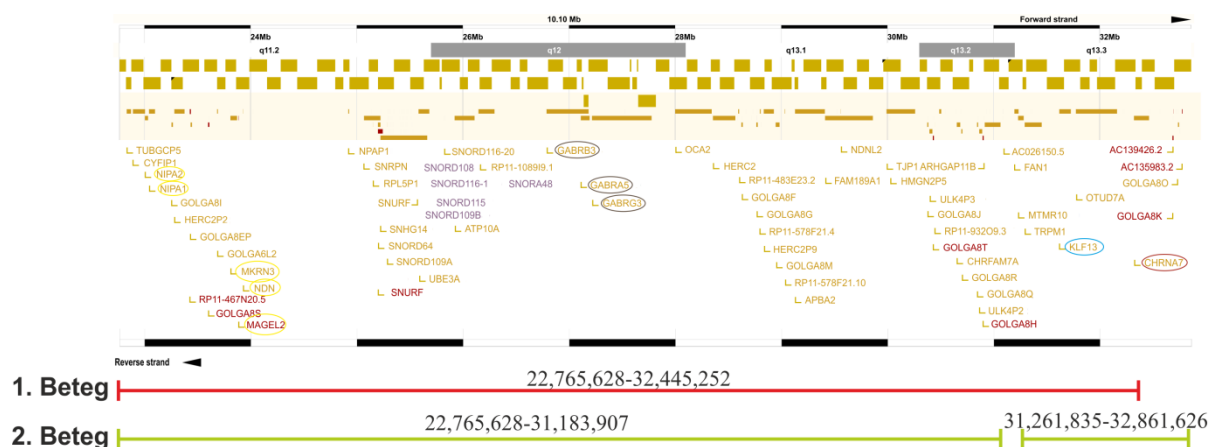
6.1.4 Array komparatív genomiális hibridizáció

Az 1. beteg aCGH vizsgálata kóros férfi array profilt detektált. A vizsgálat segítségével a 15q11.2q13.3 genomi régió 22,765,628-32,445,252 pozíciójába eső, 9,68 Mb-os kópiaszám többletet mutattuk ki. (11. ábra) Az aCGH vizsgálat alapján az 1. beteg a 15q11.2q13.3 (9,68 Mb, chr15:22,765,628-32,445,252) kromoszómális régiót tekintve 4 kópiát hordoz. Ez alapján a psu idic(15) két 9,68Mb-os 15q11.2q13.3 szegmentet tartalmaz.



11. ábra: Az 1. beteg aCGH vizsgálata során kapott eredmény

Az érintett genomialis régió 58 gént tartalmaz: *TUBGCP5*, *CYFIP1*, *NIPA2*, *NIPA1*, *GOLGA8I*, *HERC2P2*, *GOLGA8EP*, *GOLGA6L2*, *MKRN3*, *NDN*, *RP11-467N20.5*, *GOLGA8S*, *MAGEL2*, *NPAP1*, *SNRPN*, *RPL5P1*, *SNHG14*, *SNORD*, *SNORD109A*, *SNURF*, *UBE3A*, *SNORD116-20*, *ATP10A*, *RP11-108919.1*, *GABRB3*, *GABRA5*, *GABRG3*, *OCA2*, *HERC2*, *RP11-483E23.2*, *GOLGA8F*, *GOLGA8G*, *RP11-578F21.4*, *HERC2P9*, *GOLGA8M*, *RP11-578F21.10*, *APBA2*, *FAM189A1*, *NDNL2*, *TJP1*, *HMGN2P5*, *ULK4P3*, *GOLGA8J*, *RP11-932O9.3*, *GOLGA8T*, *CHRFAM7A*, *GOLGA8R*, *GOLGA8Q*, *ULK4P2*, *GOLGA8H*, *ARHGAP11B*, *AC026150.5*, *FAN1*, *MTMR10*, *TRPM1*, *KLF13*, *OTUD7A*, *CHRNA7*. (12. ábra és 4. táblázat)



12. ábra: Az 1. és 2. beteg esetén detektált duplikálódott genomi régiók által érintett gének

6.2 2. Beteg

6.2.1 G-sávok kromoszóma festés

A 2. beteg G-sávok kromoszóma vizsgálata során detektálásra került egy addicionális biszatelit 15-ös kromoszóma. (13./a ábra)

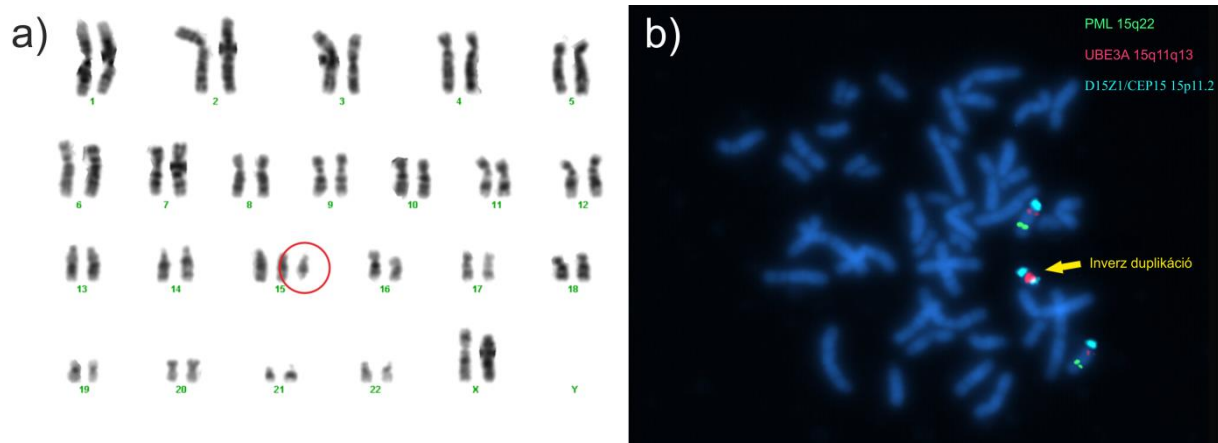
6.2.2 Uniparentális diszómia vizsgálata

A 2. beteg normál 15-ös kromoszómainak uniparentális diszómiája a felhasznált STR markerek alkalmazásával szintén kizárásra került.

6.2.3 Metafázis FISH

A vizsgált beteg klinikai képe az 1. beteghez hasonlóan a 15-ös kromoszóma UBE3A lokuszának (PWACR) metafázisos FISH vizsgálatát indikálta. Az alkalmazott D15Z1 (CEP15, 15p11.2) kontroll és UBE3A (15q11q13) próbák az akrocentrikus 15-ös marker

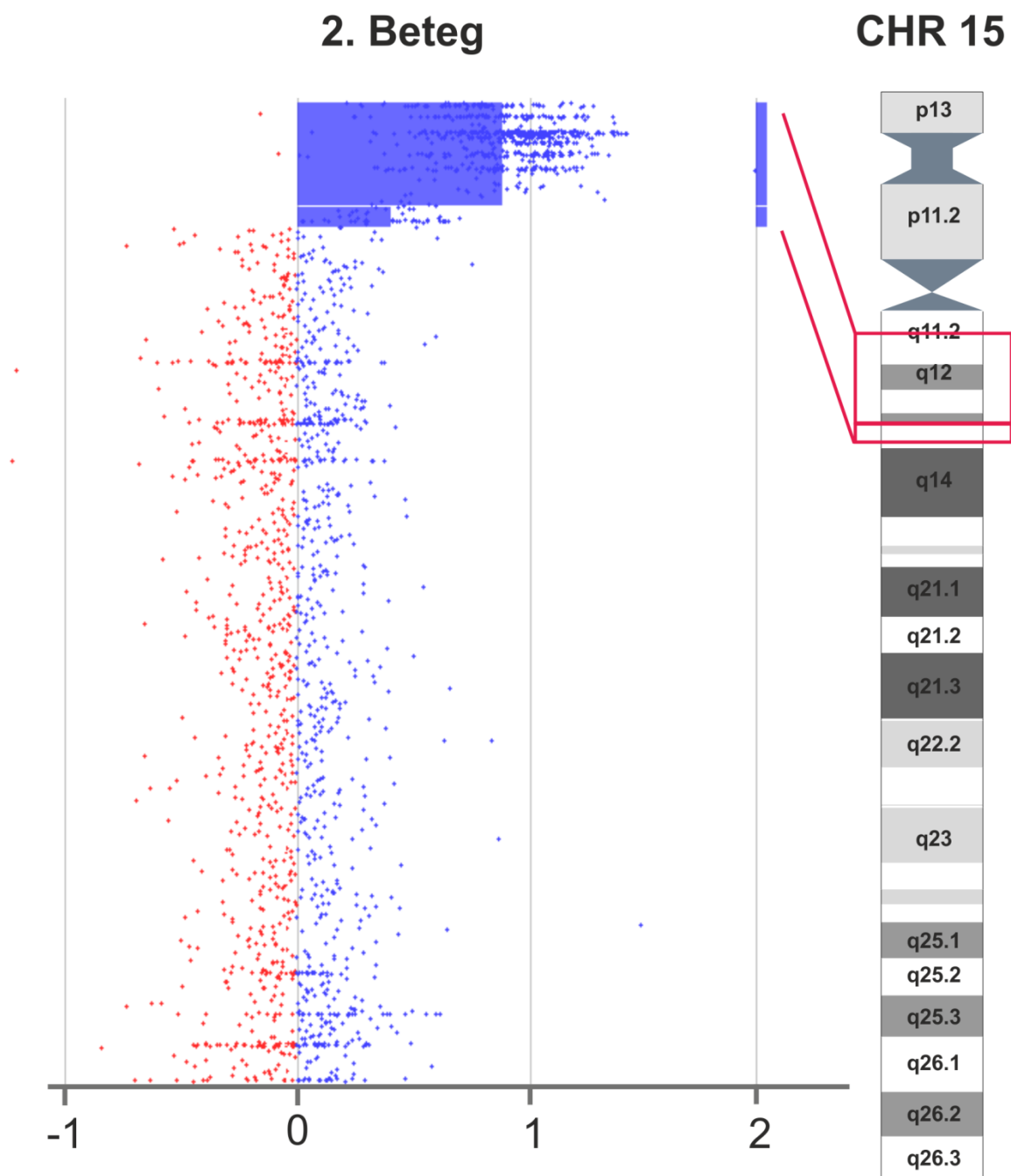
kromoszóma esetén 2 kópiában fordultak elő, ami a normál 15-ös kromoszómák 1-1 kópiájával együtt sejtenkénti 4 kópiát eredményezett. A kontrollként alkalmazott 15q22 (PML lókuszt) hosszú kar próba a számfeletti kromoszómán nem mutatott festődést. (13./b ábra) Ezek alapján a 2. beteg kariotípusa 47,XX,+idic (15)(pter→q14::q14→pter)-ként határozható meg.



13. ábra: A 2. beteg G-sávos kromoszóma festése, valamint metafázis FISH vizsgálata során kapott eredmények
A beteg kromoszómáinak G-sávos festése alapján jól kivehető az addicionális 15-ös marker kromoszóma, így a FISH során alkalmazott 15q11q13 régiót (UBE3A), valamint a 15p11.2 és 15q22 régiót jelölő kontroll próbák és a G-sávos kromoszóma festés alapján a beteg kariotípusa 47,XX,+idic (15)(pter→q14::q14→pter)-ként határozható meg.

6.2.4 Array komparatív genomialis hibridizáció

A 2. beteg aCGH vizsgálata kóros női array profilt detektált. A vizsgálat segítségével a 15q11.2q13.2 genomi régió 22,765,628-31,183,907 pozíciójába eső, 8,42 Mb-os, illetve a 15q13.3 genomi régió 31,261,835-32,861,626 pozíciójába eső 1,6 Mb-os kópiaszám többletet mutattuk ki. (14. ábra) Az aCGH vizsgálat alapján a 2. beteg a 15q11.2q13.2 (8,42 Mb, chr15: 22,765,628-31,183,907) kromoszómális régiót, illetve a 15q13.3 (1,6 Mb, chr15: 31,261,835-32,861,626) kromoszómális régiót tekintve 4 kópiát hordoz. Ez alapján a +idic(15) két 8,42 Mb méretű 15q11.2q13.2 szegmentet, valamint két 1,6 Mb méretű 15q13.3 szegmentet tartalmaz.



14. ábra: A 2. beteg aCGH vizsgálata során kapott eredmény

Az érintett 8,42 Mb-os genomi régió 50 gént tartalmaz: *TUBGCP5*, *CYFIP1*, *NIPA2*, *NIPA1*, *GOLGA8I*, *HERC2P2*, *GOLGA8EP*, *GOLGA6L2*, *MKRN3*, *NDN*, *RP11-467N20.5*, *GOLGA8S*, *MAGEL2*, *NPAP1*, *SNRPN*, *RPL5P1*, *SNHG14*, *SNORD*, *SNORD109A*, *SNURF*, *UBE3A*, *SNORD116-20*, *ATP10A*, *RP11-108919.1*, *GABRB3*, *GABRA5*, *GABRG3*, *OCA2*, *HERC2*, *RP11-483E23.2*, *GOLGA8F*, *GOLGA8G*, *RP11-578F21.4*, *HERC2P9*, *GOLGA8M*, *RP11-578F21.10*, *APBA2*, *FAM189A1*, *NDNL2*, *TJP1*, *HMG2P5*, *ULK4P3*, *GOLGA8J*, *RP11-932O9.3*, *GOLGA8T*, *CHRFAM7A*, *GOLGA8R*, *GOLGA8Q*, *ULK4P2*, *GOLGA8H*. Az

1,6 Mb-os duplikáció 10 gén tartalmaz: *FAN1*, *MTMR10*, *TRPM1*, *KLF13*, *OTUD7A*, *CHRNA7*, *AC139426.2*, *GOLGA8K*, *GOLGA8O*, *AC135983.2*. (12. ábra és 4. táblázat)

6.3 3. Beteg

6.3.1 G-sávok kromoszóma festés

A vizsgált beteg G-sávok kariotípus analízise egy 15-ös gyűrűkromoszómát és egy addicionális 15-ös marker kromoszómát tartalmazó kóros női kariotípust detektált. (15./a ábra)

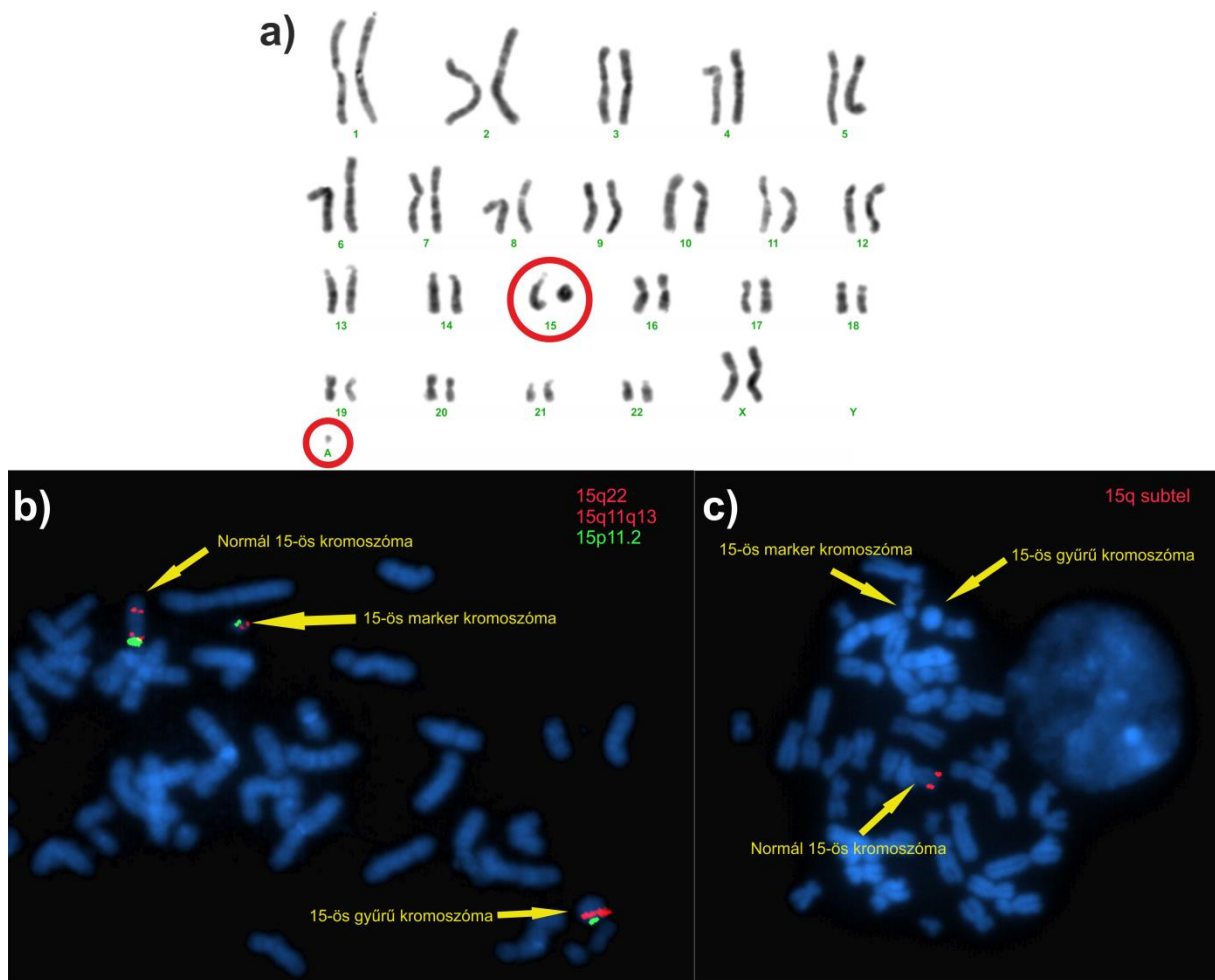
6.3.2 Uniparentális diszómia vizsgálata

A 3. beteg normál 15-ös kromoszómainak uniparentális diszómiája a felhasznált STR markerek alkalmazásával kizárásra került.

6.3.3 Metafázis FISH

Az érintett személy SNRPN lókusának (15q11q13) metafázis FISH vizsgálata a normál 15-ös kromoszómák mellett, mind a 15-ös gyűrű-, mind az addicionális 15-ös marker kromoszómák esetén a PWACR meglétét mutatta. A kontroll próbaként alkalmazott 15p11.2 régióra specifikus rövid kar próba a normál 15-ös, a 15-ös marker és a 15-ös gyűrűkromoszómához is hibridizált. A 15q22 (PML lókus) kontroll próba csak a normál 15-ös kromoszómához és a 15-ös gyűrűkromoszómához hibridizált. (15./b ábra) Az alkalmazott 15q szubtelomerikus próba csak a normál 15-ös kromoszóma esetén volt megfigyelhető. (15./c ábra)

A limfociták részletes analízise a 47,XX,r(15),+m[76]/46,XX,r(15)[18]/47,XX,r(15)x2,+m[4]/48,XX,r(15),r(15),+m[2], míg a fibroblaszt sejtkultúrák részletes analízise a 47,XX,r(15),+m[51]/47,XX,r(15)x2,+m[1] kariotípus felállítását eredményezte. A vizsgálat során a 47,XX,r(15),+m kariotípust mutató sejtek bizonyultak dominánsnak, azonban a másodlagos gyűrű képződés eredményeként detektálhatók voltak a két 15-ös gyűrűkromoszómát és a 15-ös marker kromoszómát tartalmazó, valamint a 15-ös marker kromoszómát nem, azonban a 15-ös gyűrűkromoszómát tartalmazó sejtek is.

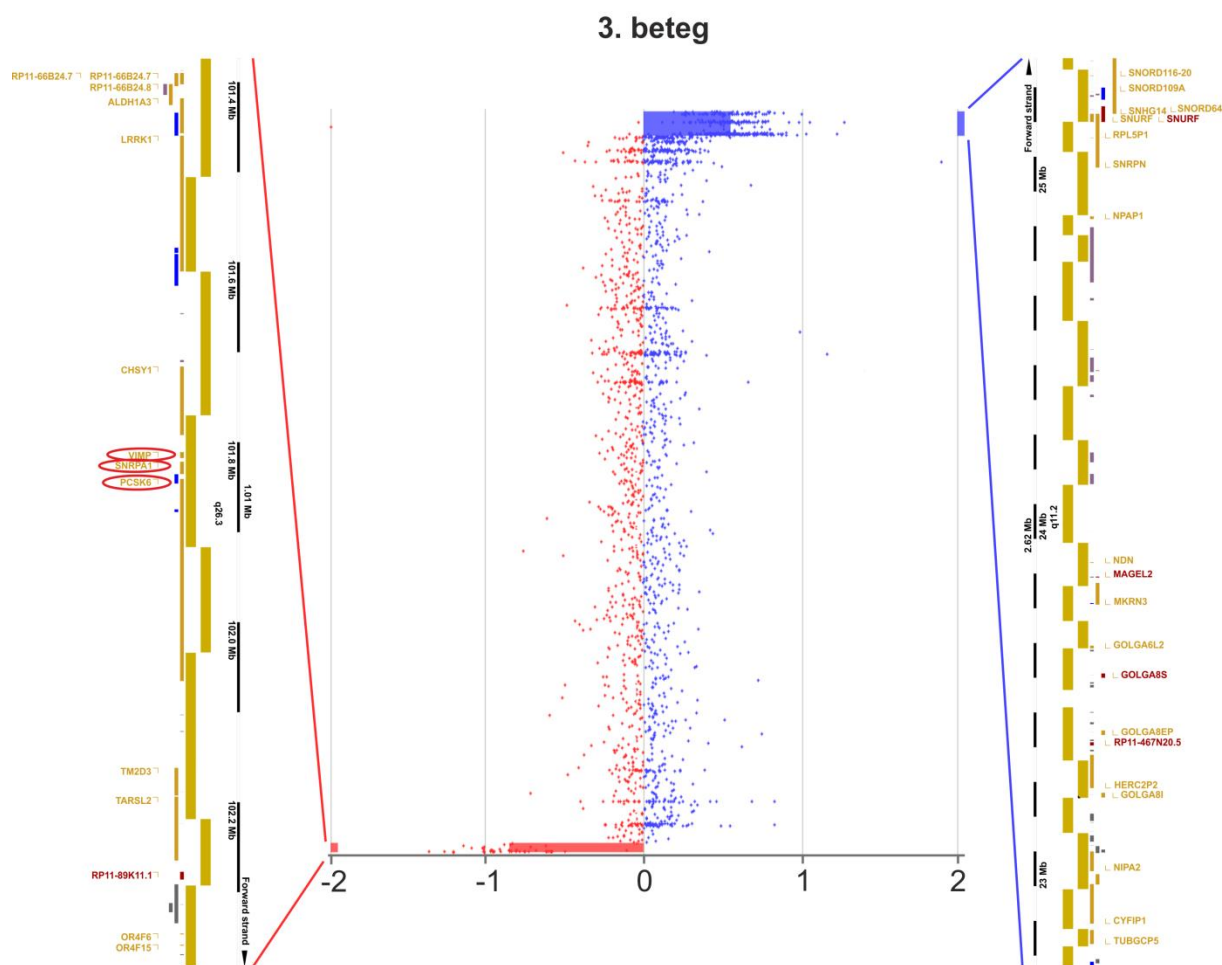


15. ábra: A 3. beteg G-sávos kromoszóma festése, valamint metafázis FISH vizsgálata során kapott eredmények
A beteg kromoszómáinak G-sávos festése alapján jól kivehető az addicionális 15-ös marker kromoszóma és a 15-ös gyűrű kromoszóma, így a FISH során alkalmazott 15q11q13 régiót (SNRPN), valamint 15p11.2 régiót, a 15q22 régiót és 15q szubtelomerikus régiót jelölő kontroll próbák és a G-sávos kromoszóma festés alapján a beteg kariotípusa 47,XX,r(15),+m -ként határozható meg.

6.3.4 Array komparatív genomialis hibridizáció

A beteg aCGH vizsgálata egy 15q11.2 kromoszómális régiót érintő kópiaszám növekedést, illetve egy 15q26.3 kromoszómális régiót érintő kópiaszám csökkenést detektált. A 15q11.2 régiót érintő 2,6 Mb-os duplikáció kezdőpontja a 22,765,628, míg végpontja a 25,383,882 pozíciókra, míg a 15q26.3 régióra eső 1 Mb méretű deléciónak kezdőpontja a 101,373,740, végpontja pedig a 102,383,473 pozíciókra esett. Az eredmények alapján az addicionális marker kromoszóma a normál 15-ös kromoszóma egy 22,765,628-tól 25,383,882-ig terjedő, 2,6 Mb méretű régióját tartalmazza, míg a 15-ös gyűrűkromoszóma a gyűrűképződés következtében kialakuló, a 101,373,740 pozíciótól 102,383,473 pozícióig terjedő, 1 Mb méretű régió delécióját hordozza. (16. ábra)

A 2,6 Mb méretű régió a *TUBGCP5*, *CYFIP1*, *NIPA2*, *GOLGA8I*, *HERC2P2*, *RP11-467N20.5*, *GOLGA8EP*, *GOLGA8S*, *GOLGA6L2*, *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *NPAP1*, *SNRPN*, *RPL5P1*, *SNURF*, *SNHG14*, *SNORD*, *SNORD109A*, *SNORD116-20* géneket, míg az 1 Mb méretű régió az *RP11-66B24.7*, *RP11-66B27.8*, *ALDH1A3*, *LRRK1*, *CHSY1*, *VIMP*, *SNRPA1*, *PSCK6*, *TM2D3*, *TARSL2*, *RP11-89K11.1*, *OR4F6*, valamint az *OR4F15* géneket foglalja magába. (16. ábra)



16. ábra: A 3. beteg aCGH vizsgálata során kapott eredmény

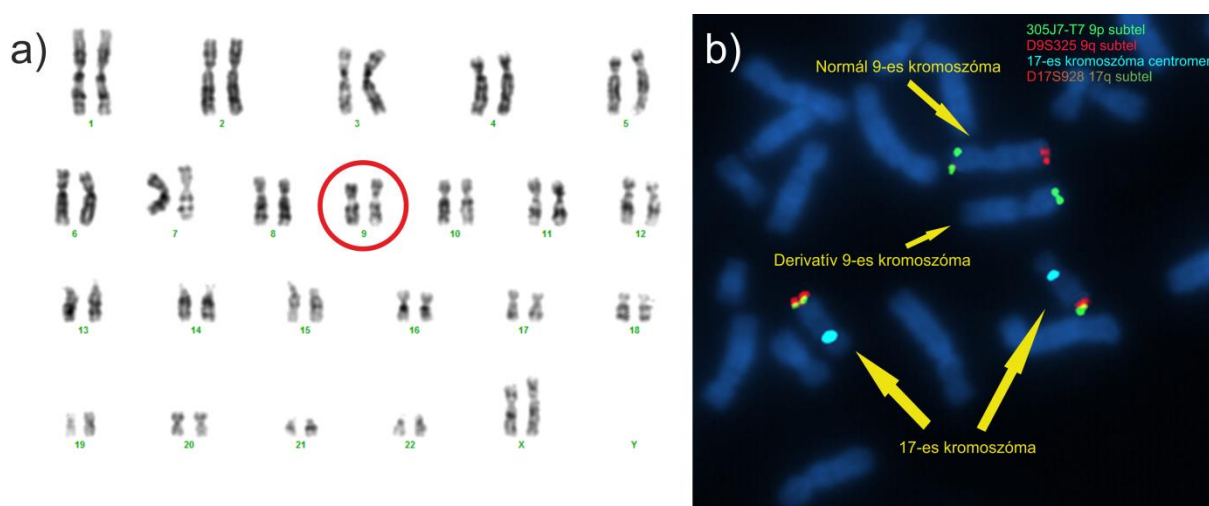
6.4 4. Beteg

6.4.1 G-sávok kromoszóma festés

4. betegünk G-sávok kromoszóma vizsgálata 46,XX női kariotípust detektált. (17./a ábra)

6.4.2 Metafázis FISH

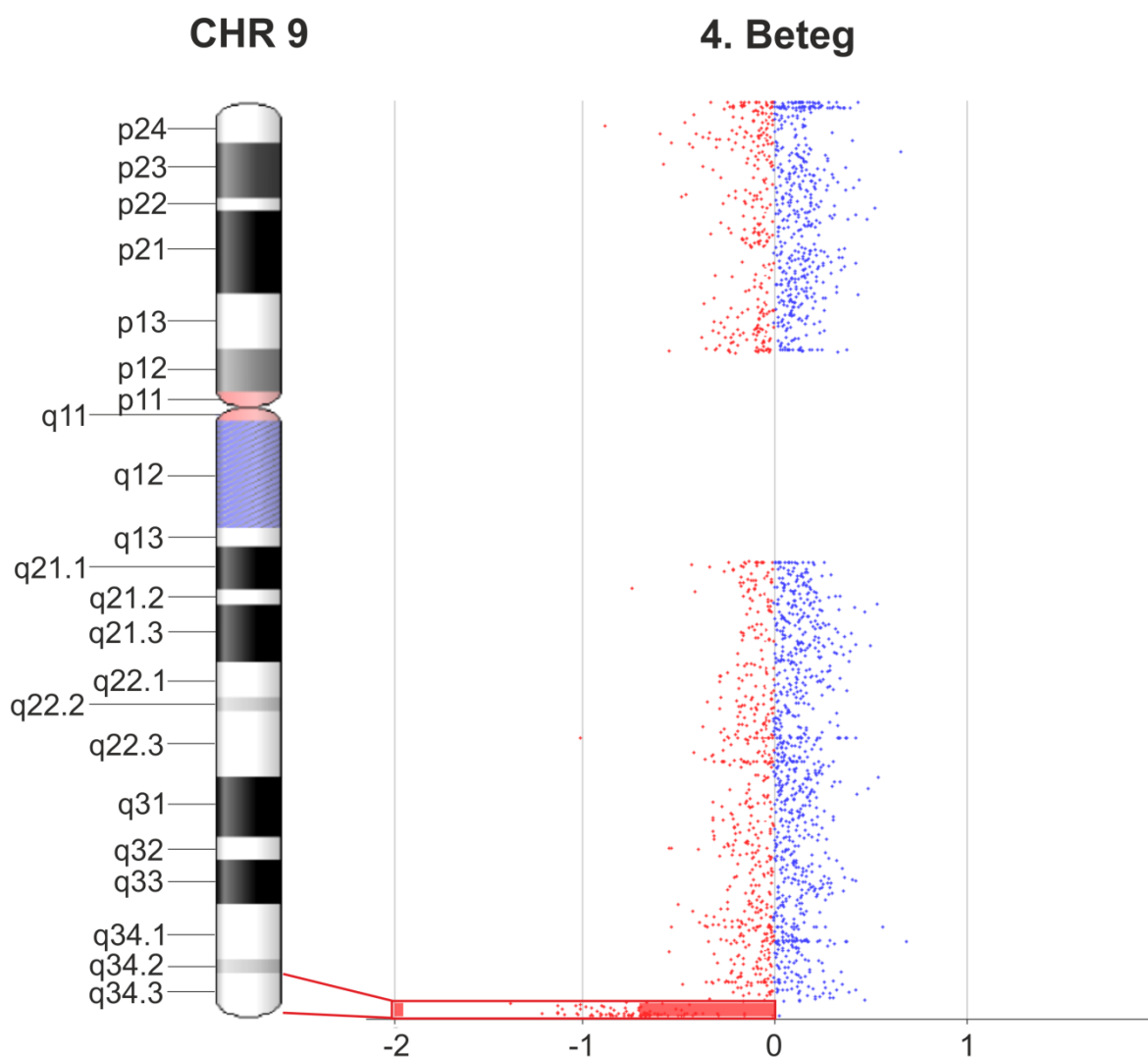
A 4. beteg metafázisos FISH vizsgálata a 9q34.3 terminális régió delécióját mutatta ki. Az érintett személy FISH vizsgálata során a kontroll próbaként alkalmazott 9p szubtelomerikus (305J7-T7), és a 17-es kromoszómára hibridizáló centromerikus és szubtelomerikus (D17S928) próbák normál szignál mintázatot mutattak, míg a 9q szubtelomerikus (D9S325) próba a deletált 9-es kromoszóma hosszú karján nem mutatott jelet. (17./b ábra)



17. ábra: A 4. beteg G-sávós kromoszóma festése, valamint metafázis FISH vizsgálata során kapott eredmények
A FISH során alkalmazott 9q szubtelomerikus régiót (305J7-T7), valamint a 9p szubtelomerikus régiót és a 17-es kromoszóma centromerikus és szubtelomerikus régióit jelölő kontroll próbák és a G-sávós kromoszóma festés alapján a beteg kariotípusa .ish 46,XX,del(9)-ként határozható meg.

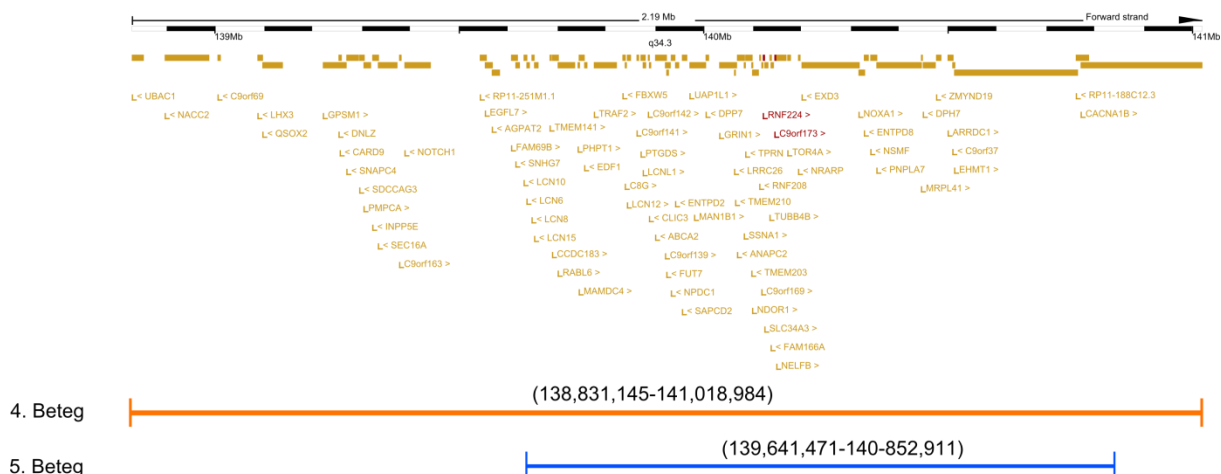
6.4.3 Array komparatív genomialis hibridizáció

A FISH-el kapott eredmények részletesebb vizsgálatára aCGH módszert alkalmaztunk. A 4. beteg aCGH vizsgálata kóros női array profilt mutatott. A vizsgálat segítségével a 9q34.3 terminális régió 138,831,145–141,018,984 pozíciójába eső, 2,188 Mb méretű delécióját detektáltuk. Az aCGH vizsgálat alapján a 4. beteg a 9q34.3 (2,188 Mb, 138,831,145–141,018,984) kromoszómális régiót tekintve 1 kópiát hordoz. (18. ábra)



18. ábra: A 4. beteg aCGH vizsgálata során kapott eredmény

Az érintett 2,188 Mb-os genomi régió 78 gént tartalmaz: *UBAC1*, *NACC2*, *C9orf69*, *LHX3*, *QSOX2*, *GPSM1*, *DNLZ*, *CARD9*, *SNAPC4*, *SDCCAG3*, *PMPCA*, *INPP5E*, *SEC16A*, *C9orf163*, *NOTCH1*, *RP11-251M1.1*, *EGFL7*, *AGPAT2*, *FAM69B*, *SNHG7*, *LCN10*, *LCN6*, *LCN8*, *LCN15*, *TMEM141*, *CCDC183*, *RABL6*, *PHPT1*, *MAMDC4*, *EDF1*, *TRAF2*, *FBXW5*, *C8G*, *LCN12*, *C9orf141*, *PTGDS*, *LCNL1*, *C9orf142*, *CLIC3*, *ABCA2*, *FUT7*, *NPDC1*, *ENTPD2*, *SAPCD2*, *UAP1L1*, *MAN1B1*, *DPP7*, *GRIN1*, *LRRC26*, *TMEM210*, *ANAPC2*, *SSNA1*, *TPRN*, *TMEM203*, *NDOR1*, *RNF208*, *C9orf169*, *RNF224*, *SLC34A3*, *TUBB4B*, *FAM166A*, *C9orf173*, *NELFB*, *TOR4A*, *NRARP*, *EXD3*, *NOXA1*, *ENTPD8*, *NSMF*, *PNPLA7*, *MRPL41*, *DPH7*, *ZMYND19*, *ARRDC1*, *C9orf37*, *EHMT1*, *RP11-188C12.3* és *CACNA1B*. (19. ábra)



19. ábra: A 4. és 5. beteg esetén detektált deletálódott genomi régiók által érintett gének

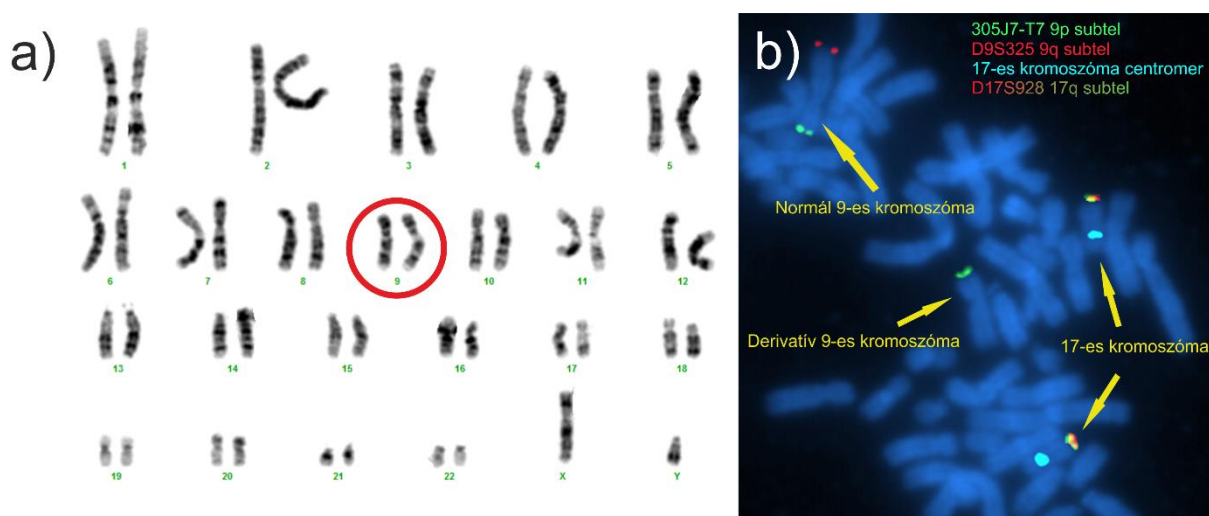
6.5 5. Beteg

6.5.1 G-sávos kromoszóma festés

5. betegünk G-sávos kromoszóma analízise 46,XY férfi kariotípust eredményezett. (20./a ábra)

6.5.2 Metafázis FISH

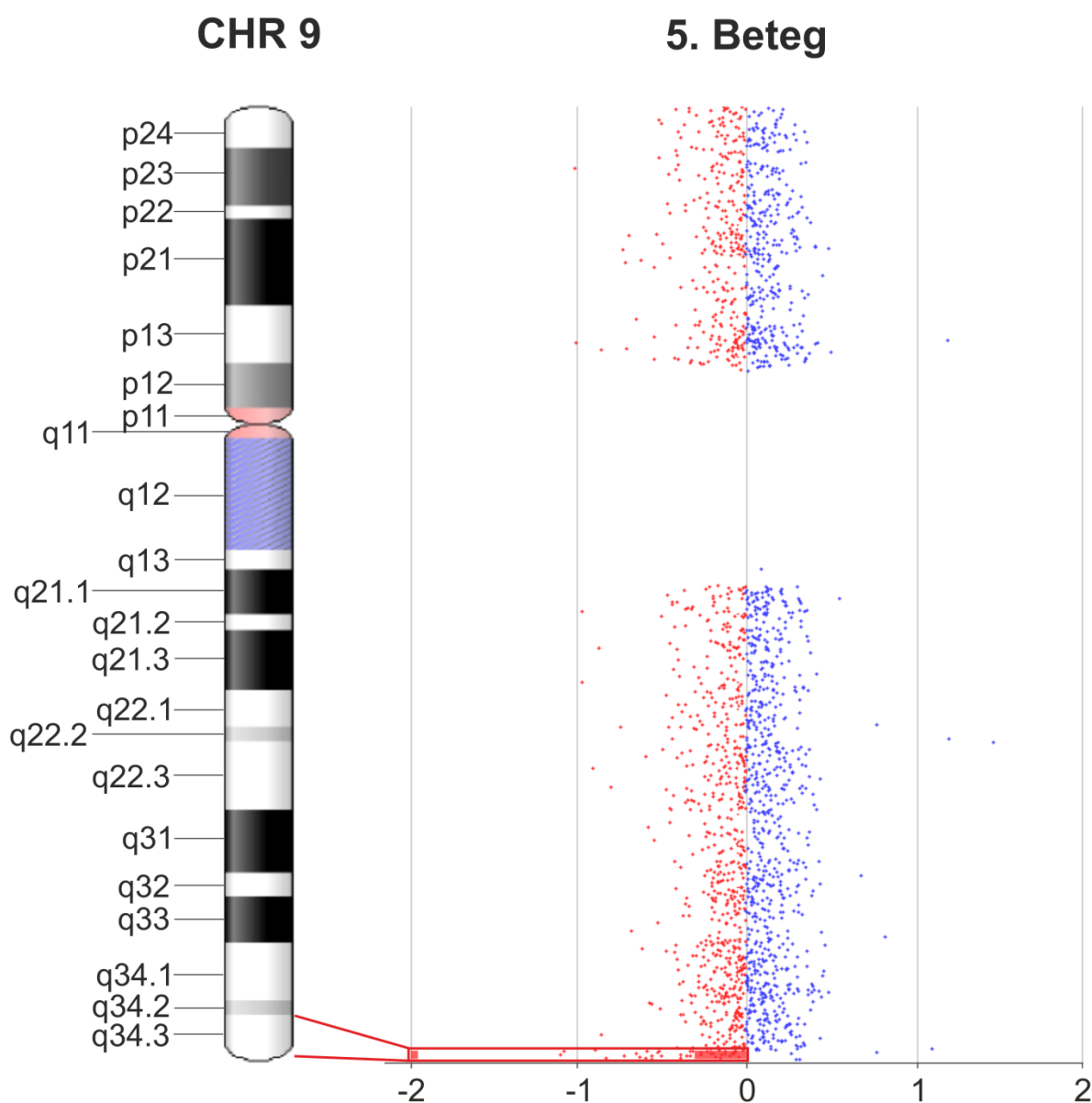
Az 5. beteg metafázisos FISH vizsgálata a 9q34.3 terminális régió delécióját mutatta ki. Az érintett személy FISH vizsgálata során a kontroll próbaként alkalmazott 9p szubtelomerikus (305J7-T7), és a 17-es kromoszómára hibridizáló centromerikus és szubtelomerikus (D17S928) próbák megfelelő jelölést mutattak, míg a 9q szubtelomerikus (D9S325) próba a deletált 9-es kromoszóma hosszú karján nem adott jelet. (20./b ábra)



20. ábra: Az 5. beteg G-sávos kromoszóma festése, valamint metafázis FISH vizsgálata során kapott eredmények
A FISH során alkalmazott 9q szubtelomerikus régiót (305J7-T7), valamint a 9p szubtelomerikus régiót és a 17-es kromoszóma centromerikus és szubtelomerikus régióit jelölő kontrol próbák és a G-sávos kromoszóma festés alapján a beteg kariotípusa .ish 46,XY,del(9)-ként határozható meg.

6.5.3 Array komparatív genomiális hibridizáció

A FISH-el kapott eredmények részletesebb vizsgálatára aCGH módszert alkalmaztunk. Az 5. beteg aCGH vizsgálata kóros férfi array profilt mutatott. A vizsgálat segítségével a 9q34.3 terminális régió 139,641,471–140,852,911 pozíciójába eső, 1,211 Mb méretű delécióját detektáltuk. Az aCGH vizsgálat alapján az 5. beteg a 9q34.3 (1,211 Mb, 139,641,471–140,852,911) kromoszómális régiót tekintve 1 kópiát hordoz. (21. ábra)



21. ábra: Az 5. beteg aCGH vizsgálata során kapott eredmény

Az érintett 1,211 Mb-os genomi régió 57 gént tartalmaz: *LCN6*, *LCN8*, *LCN15*, *TMEM141*, *CCDC183*, *RABL6*, *PHPT1*, *MAMDC4*, *EDF1*, *TRAF2*, *FBXW5*, *C8G*, *LCN12*,

C9orf141, PTGDS, LCNL1, C9orf142, CLIC3, ABCA2, FUT7, NPDC1, ENTPD2, SAPCD2, UAP1L1, MAN1B1, DPP7, GRIN1, LRRC26, TMEM210, ANAPC2, SSNA1, TPRN, TMEM203, NDOR1, RNF208, C9orf169, RNF224, SLC34A3, TUBB4B, FAM166A, C9orf173, NELFB, TOR4A, NRARP, EXD3, NOXA1, ENTPD8, NSMF, PNPLA7, MRPL41, DPH7, ZMYND19, ARRDC1, C9orf37, EHMT1, RP11-188C12.3 és CACNA1B. (19. ábra)

7. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

Vizsgált betegeinkben az összetett klinikai tünetek hátterében a 15-ös és 9-es kromoszóma hosszú karjának proximális, valamint terminális régióira eső kópiaszám változásokat mutattunk ki. Epilepsziás tüneteket, viselkedészavart, szellemi visszamaradottságot és minor malformációkat mutató betegeink aCGH vizsgálata lehetővé tette a 15-ös és 9-es kromoszóma hosszú karjának proximális, valamint terminális régióira eső kópiaszám változások pontosabb feltérképezését, ezzel lehetővé téve az érintett régiók bizonyos génjeinek dóziszérékenysége és a tünetek kialakulása közti összefüggés meghatározását. Eredményeink alapján bizonyos esetekben lehetőségünk nyílt megerősíteni, néhány esetben viszont cáfolni egyes, a szakirodalomban leírt gének szerepét illető hipotézist, ezzel is hozzájárulva a komplex klinikai kép egyes tüneteinek hátterében álló okok meghatározásához.

7.1 Az 1. beteg metafázis FISH és aCGH vizsgálata során detektált kópiaszám változások, valamint az érintett gének feltételezhető szerepének vizsgálata

1. betegünk aCGH vizsgálata során detektálásra került a 15-ös kromoszóma q11.2q13.3 genomi régióját érintő, a 22,765,628-32,445,252 pozícióba eső, 9,68 Mb méretű kópiaszám többlet. (11. ábra) A beteg FISH vizsgálata során kimutatásra került, hogy az érintett régió a normál 15-ös kromoszómák mellett egy addicionális 15-ös marker kromoszómán még 2 kópiában fordul elő, kialakítva ezzel egy 47,XY,+psu idic (15)(pter→q14::q14→pter) kariotípust. (10./b ábra)

A 15q11.2q13.3 (22,765,628-32,861,626) régiót érintő fehérje kódoló gének funkciójuknak köszönhetően számos, leginkább fejlődési rendellenességgel és neurológiai tünetekkel járó kórkép kialakításában játszanak szerepet, azonban közülük számos gén dóziszérékenysége vonatkozóan jelen ismereteink még hiányosak. (4. és 5. táblázat)

Név	Pozíció	Kódolt fehérje	HI(D)	Funkció
TUBGCP5	15:22833394-22873891	Tubulin, gamma complex associated protein 5	-	A gamma-tubulin komplex-el együttműködve szükséges a centroszómában a mikrotubulus nukleáció folyamatához.
CYFIP1	15:22892005-23006016	Cytoplasmic FMR1 interacting protein 1	53,3	A CYFIP1-EIF4E-FMRI komplex részeként az mRNS spakákhoz kötődve mediálja a transzláció represszióját.
NIPA2	15:23004684-23034427	Non imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 2	52,9	Egy lehetséges magnézium transzportert kódol.
NIPA1	15:23043277-23100005	Non imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 1	25,3	A gén egy korai endoszómákon, valamint neuronális és epiteliális sejtek felszínán expresszállódó magnézium transzportert kódol.
GOLGA6L2	15:23684645-23692381	Golgin A6 family-like 2	-	-
MKRN3	15:23810454-23873064	Makorin ring finger protein 3	98,7	A gén által kódolt fehérje egy RING (C3HC4) cink finger motívummal és számos C3H cink finger motívummal rendelkezik.
MAGE2	15:23888691-23891175	MAGE-like 2	-	A fehérje a RING-típusú cink fingert tartalmazó E3 ubiquitin-protein ligázok ubiquitinaktivitását fokozhatja. Szerepet játszhat az E3:szubsztrát komplex Ubl-konjugáló enzimeinek (E2) stabilizációjához.
NDN	15:23930565-23932450	Necdin, melanoma antigen (MAGE) family member	36,2	Növekedési szupresszor ami megkönnyíti a sejtek belépését a sejt ciklus terminációjába.
NPAP1	15:24920541-24928593	Nuclear pore associated protein 1	93,6	A spermatogenezisben játszhat szerepet.
SNRPN	15:25068794-25223870	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N	11,3	A gén által kódolt fehérje egy kis nukleáris ribonukleoprotein komplex tagja, mely az snRNP SMB/SMN családba tartozik. A fehérje szerepet játszik a pre-mRNS éréseben, és feltételezhetően bizonyos szövetekre specifikus alternatív splicing-ban is.
SNURF	15:25200181-25245423	SNRPN upstream reading frame	64,6	A fehérje funkciója jelenleg nem ismert.
UBE3A	15:25582381-25684128	Ubiquitin protein ligase E3A	23,2	A gén által kódolt fehérje tioészter formában az E2 ubiquitin-konjugáló enzimhez kapcsolódva szállítja azt a szubsztrátjához.
ATP10A	15:25922420-26110317	ATPase, class V, type 10A	74	A fehérje a P-típusú kation transzport ATP-ázok családjába tartozik, ezen belül pedig az aminoszfólipid transzportáló ATP-ázok alcsaládjába. Az aminoszfólipid transzlokázok transzportálják a foszfatidilserint és a foszfatidiletanolamint a bilayer egyik oldaláról a másikra.
GABRB3	15:26788693-27184686	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 3	5,2	A kódolt fehérje egy több alegységgel rendelkező klorid-csatorna egy alegysége, mely a gamma-aminobutyric sav receptoraként funkcionál. Ezzel szerepet játszik az emlősök idegrendszerének egyik fő gátló inhibitorának jelátviteléhez.
GABRA5	15:27111510-27194354	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 5	25,5	A kódolt fehérje egy több alegységgel rendelkező klorid-csatorna egy alegysége, mely a gamma-aminobutyric sav receptoraként funkcionál. Ezzel szerepet játszik az emlősök idegrendszerének egyik fő gátló inhibitorának jelátviteléhez.
GABRG3	15:27216429-27778373	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, gamma 3	83,8	A kódolt fehérje egy több alegységgel rendelkező klorid-csatorna egy alegysége, mely a gamma-aminobutyric sav receptoraként funkcionál. Ezzel szerepet játszik az emlősök idegrendszerének egyik fő gátló inhibitorának jelátviteléhez.
OCA2	15:28000021-28344504	Oculocutaneous albinism II	71,5	A kódolt fehérje elképzelések szerint egy a kis molekulák transzportjában szerepet játszó integrált membrán fehérje, speciálisan a melanin prekursorára, a tirozinra.
HERC2	15:28356186-28567298	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2	42,7	A kódolt fehérje kromoszómális károsodás esetén szabályozza a repair fehérjék ubiquitin-függő védelmét.
GOLGA8M	15:28947100-28983530	Golgin A8 family, member M	-	-
APBA2	15:29129629-29410518	Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 2	39	A kódolt fehérje egy neuronális adapter fehérje, amely hatással van az Alzheimer kór amyloid prekursor fehérjéire (APP). Stabilizálja az APP-ket és gátolja a proteolitikus APP fragmentumok keletkezését, beleértve az Alzheimer kóros betegekben megjelenő A béta peptidét is.
FAM189A1	15:29412457-29862927	Family with sequence similarity 189, member A1	-	-
NDNL2	15:29560353-29562033	Necdin-like 2	80,7	A kódolt fehérje része az SMC5-6 kromatin reorganizáló komplexnek, valamint tagja a MAGE supercsoportnak. Az SMC5-6 komplex tagjaként részt vesz a DNS dupla szálú töréseinek homológ rekombinációval történő helyreállításában.
TJP1	15:29991571-30261068	Tight junction protein 1	34,8	A gén a tight junctionokhoz tartozó citoplazmatikus membrán fehérjét kódol. A kódolt fehérje szerepet játszhat a sejt-sejt kapcsolatok fenntartásában részt vevő szignáltranszdukcióban.
GOLGA8J	15:30375158-30385702	Golgin A8 family, member J	-	-
CHRFAM7A	15:30653443-30686052	CHRNA7 (cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7, exons 5-10) and FAM7A (family with sequence similarity 7A, exons A-E) fusion	75,5	A kódolt fehérje feltételezések szerint extracelluláris ligand-vezérelt ion csatorna aktivitással rendelkezik.
GOLGA8R	15:30695943-30706463	Golgin A8 family, member R	-	-
GOLGA8H	15:30896329-30906764	Golgin A8 family, member H	-	-
ARHGAP11B	15:30916697-31065196	Rho GTPase activating protein 11B	74,3	-
FAN1	15:31196055-31235311	FANCD2/FANCI-associated nuclease 1	78,2	A gén a myotubularin-related class 1. cystein-based protein tyrosine phosphatase-ok egy tagját kódolja. A kódolt fehérje katalitikusan inaktív, és részt vesz a DNS dupla szálú töréseinek homológ rekombinációval történő helyreállításában.
MTMR10	15:31231144-31283810	Myotubularin related protein 10	95,9	A kódolt fehérje feltételezhetően pseudofoszfátáz.
TRPM1	15:31293264-31453476	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1	61,9	A gén a tranzient receptor potential melastin alcslád egy tagját kódolja. Kalcium permeabilis kation csatornaként funkcionálnak, melyek megnövekedett expressziós szintet mutatnak melanocitákban és szerepet játszhatnak a melanin szintézisben.
KLF13	15:31619058-31727868	Kruppel-like factor 13	3,5	A kódolt fehérje represszája a transzkripciót a BTE-site-okhoz kötődve, melyek GC-gazdag szekvenciák a DNS-ben és az SP1 aktivátorokkal ellentétes hatással rendelkeznek. A Sin3A és HDAC1 fehérjékkel való kapcsolata révén szintén represszája a transzkripciót. Aktiválja a T-sejtek RANTES expresszióját.
OTUD7A	15:31775329-32162992	OTU deubiquitinase 7A	44,1	A kódolt fehérje egy deubiquitináz enzim. Részt vesz a ubuquitin-fehérje kapcsolatok felbontásában, gátolva a ubiquitin ligázok működését.
CHRNA7	15:32322691-32464722	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7 (neuronal)	20,6	A fehérje egy acetilkolin vezérelt ion csatorna tagja.
GOLGA8K	15:32684983-32695396	Golgin A8 family, member K	-	-
GOLGA8O	15:32737307-32747835	Golgin A8 family, member O	-	-

4. táblázat: Az 1. és 2. beteg esetén detektált duplikálódott genomi régiók által érintett gének

Kialakított betegség vagy érintett élettani folyamatok	Gének
Viselkedészavarok	GABRB3
Szív arteriopátia	GABRA5, GABRB3, GABRG1, GABRG3, KLF13
Kardiovaszkuláris megbetegedés	GABRA5, GABRB3, GABRG1, GABRG3, KLF13,
Sejt ciklus	HERC2, UBE3A
Sejthalál és túlélés	GABRA5, GABRB3
Sejtmorfológia	OCA2, GABRA5, GABRB3, NDN
Sejt-sejt szignalizáció és interakció	NDN, UBE3A
Sejt organizáció	SNURF
Sejtszintű fejlődés	NDN, UBE3A
Sejtnövekedés és proliferáció	NDN, UBE3A
Sejtmozgás	GABRA5, GABRB3, NDN
Fejlődésbeli rendellenesség	GABRB3, GABRG3, MAGEL2, MKRN3, NDN, SNRPN, UBE3A
DNS replikáció, rekombináció és repair	SNRPN
Génexpresszió	NDN, SNRPN, UBE3A
Haj és bőrszín meghatározása	OCA2
Idegrendszeri fejlődés és funkció	GABRA5, GABRB3, NDN, UBE3A
Neurológiai megbetegedés	GABRA5, GABRB3, GABRG3, UBE3A, OTUD7A, TUBGCP5
Gasztrointesztinális megbetegedés	GABRA5, GABRB3, GABRG3
Fehérje degradáció	UBE3A
Fehérjeszintézis	UBE3A
Pszichiátriai megbetegedés	GABRA5, GABRB3, GABRG3, NDN, CHRFAM7A, CHRNA7
Genitáliák fejlődése és megbetegedése	MKRN3, UBE3A
Légzési szervrendszer megbetegedése	GABRA5, GABRB3, GABRG3, MKRN3, SNRPN
Csontrendszert és izmokat érintő betegség	GABRA5, GABRB3, GABRG3
Prader-Willi/Angelman szindróma	GABRG3, MAGEL2, MKRN3, NDN, SNRPN, NIPA1, NIPA2, ATP10A, C15orf2, CYFIP1, TUBGCP5, NDNL2
Absence rohamok	GABRA5, GABRB3, GABRG1, GABRG3, UBE3A
Tónusos-clonusos rohamok	GABRA5, GABRB3, GABRG1, GABRG3, UBE3A
Veleszületett rendellenességek	GABRB3, GABRG3, MAGEL2, MKRN3, NDN, SNRPN, UBE3A
Skizofrénia	GABRA5, GABRB3, GABRG1, GABRG3, NDN, TUBGCP5
Parkinson kór	GABRA5, GABRB3, GABRG1, GABRG3
A vázrendszer veleszületett rendellenességei	GABRA5, GABRB3, GABRG1, GABRG3
Súlycsökkenés	GABRA5, GABRB3, GABRG1, GABRG3
Hepatocelluláris karcinóma	NDNL2
Intersticiális nefritisz	FAN1, MTMR10
Alzheimer kór	APBA2

5. táblázat: Az 1. és 2. beteg esetén detektált duplikálódott genomi régiók által érintett gének és a velük összefüggésbe hozott betegségek

Eredményeink és a szakirodalomban leírt adatok alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az érintett régió több fehérje kódoló génje összefüggésbe hozható a vizsgált személy fenotípusos jellegeivel. A betegre jellemző hypotonia, megkésett motoros és beszédfejlődés, a jellegzetes faciális dysmorphia (lapos ornyereg, epicanthus redő és hipertelorisztikus szemek) és a kimutatott, 15q11.2q13.3 (22,765,628-32,861,626) régiót érintő eltérés a 15q duplikációs szindróma diagnózisának felállításához vezetett [163].

	1. beteg	2. beteg	B.W.M. van Bon et. al. (2009)	B.W.M. van Bon et. al. (2009)	B.W.M. van Bon et. al. (2009)	B.W.M. van Bon et. al. (2009)	Koochek et al. (2006)	Koochek et al. (2006)	Jing Yang et. al. (2013)
A DUPLIKÁCIÓ POZÍCIÓJA	15q11.2q13.3(22,765,628-32,445,252) tetraszómia	15q11.2q13.2(22,765,628-31,183,907) és 15q13.3(31,261,835-32,861,626) tetraszómia	BP4BP5	BP4BP5	BP4BP5	BP3BP5	15q11-15q13	5 kópia: 15q11.2q13.2 (chr15:22,619,671-30,342,457), és 3 kópia: 15q13.2q13.3 (chr15:30,342,458-32,411,629)	4 kópia: 15q11.2q13.1 (chr15:22,054,840-30,058,502) és 3 kópia: 15q13.1q13.2 (chr15:30,058,503-32,418,417)
NEM	fiú	lány	fiú	lány	nő	lány	lány	nő	fiú
KOR A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN	27 hónap	17 hónap	17 év	4 év, 6 hónap	20 év	4 év, 10 hónap	7 év, 4 hónap	38 év	5 év
SZÜLETÉSI SÚLY (g)	3200	3520	P50	>P98	NA	P3-P98	-	-	1800
SZÜLETÉSI HOSSZ (cm)	NA	NA	P30	P50	P3	P25	-	-	47
SZÜLETÉSI FEJKÖRFOGAT (cm)	NA	NA	P60	P45	P60	P50	-	-	32, enyhe mikrokefália
SÚLY A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN (KG)	10 (<5 pc)	13 (90-97 pc)	NA	>P98	NA	>P98	NA	NA	NA
CSALÁDI ANAMNÉZIS	-	-	NA	-	NA	apai eredet	NA	NA	NA
KOPONYA MR/CT	-	normál	normál	normál	NA	normál	normál	normál	normál
EPILEPSZIA/KÓROS EEG	+	+	-	-	-	-	NA	+	-
VISELKEDÉSZAVAR	hiperaktivitás	sztereotíp kézmozdulatok	autisztikus jegyek; bipoláris viselkedészavar	-	beszédkénszer	autista jegyek	-	bipoláris viselkedészavar	+
MENTÁLIS RETARDÁCIÓ	enyhe	enyhe	enyhe	enyhe	enyhe-közepes	súlyos	enyhe	enyhe	enyhe
IZOMHIPOTONIA	+	+	+	-	+	+	NA	+	NA
KARDIÁLIS DEFEKTUS	bigemin extraszisztole	-	-	-	-	-	-	-	-
CRANIOFACIALIS ELTÉRÉSEK	lapos occiput; epicanthus redő; hipertelorizmus	prominens homlok; lapos occiput; széles arc	synophrys	hipertelorizmus	enyhén mélyen ülő szemek	-	nem konjugált szem mozgások; magas homlok; mélyen ülő szemek; lefelé álló szemrés; jobb szem konvergens strabizmus; lapos occiput	normál	hipertelorizmus
ORR	széles orrnyereg	előrenéző orrlyukak	magas orrnyereg	-	-	-	széles és magas orrgyök és orrnyereg	-	-
FÜLEK	fülcimpa redő	-	mélyen ülő fülek; rekurrens otitis media	mélyen ülő fülek; rekurrens otitis media	-	-	-	normál	praeauricularis fistula
VÉGTAGOK	-	kis lábak	syndactylia, brachidactylia; a 2-3 lábujj syndactilyája	4 ujjas redő	-	-	-	-	-
HASI/UROGENITÁLIS RÉGIÓ	-	-	criptorchizmus	invertált mamilla	-	-	-	-	-
EGYÉB JELLEGZETESSÉGEK	-	lábujjhegyen való járás	-	-	etetés-i nehezítettség	-	légzési depresszió	-	magzatvíz aspiráció miatt resuscitatio

6/a. táblázat: Az 1. és 2. beteg összehasonlítása a szakirodalomban talált duplikációs esetekkel

	Jing Yang et. al. (2013)	David J Wu et. al. (2009)	Ee-Shien Tan et. al. (2014)	Ee-Shien Tan et. al. (2014)	J Clayton-Smith et. al. (1993)	Marina Michelson et. al. (2011)	T.K. Mohandas et. al. (1999)	Jon Soo Kim et.al. (2012)
A DUPLIKÁCIÓ POZÍCIÓJA	-	BP18P4	chr15:21,213,950-26,208,646	chr15:18,362,555-26,208,646	NA	részleges triszómia: 15q11-13	NA	a15q11.1 to 15q13.1 régió amplifikációja
NEM	fiú	fiú	fiú	lány	lány	lány	fiú	lány
KOR A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN	8 év	NA	5 év, 8 hónap	NA	4 év	10 év	2 év, 4 hónap	10 hónap
SZÜLETÉSI SÚLY (g)	3700	2500	2950	3234	3630	-	3628	2900
SZÜLETÉSI HOSSZ (cm)	55	54,6	-	45,5	-	-	57	-
SZÜLETÉSI FEJKÖRFOGAT (cm)	35	-	-	32	-	-	36	-
SÚLY A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN (KG)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	< 3 pc
CSALÁDI ANAMNÉZIS	NA	az apa a 9. és 15. kromoszómák között kiegyensúlyozott transzlokációt hordoz	az idősebb fiú testvér autisztikus jellegeket mutat	NA	NA	skizofrén anya	az apa és a lány testvér depressziós, pszichiátriai kivizsgálás alatt áll	-
KOPONYA MR/CT	normál	normál	-	-	normál	normál	-	enyhe agyi atrófia
EPILEPSZIA/KÓROS EEG	-	NA	NA	NA	-	különböző típusú generalizált és fokális rohamok	NA	+
VISELKEDÉSZAVAR	-	bipoláris viselkedészavar	hiperaktivitás és hydrofóbia	-	-	bipoláris viselkedészavar; szelektív mutizmus	-	-
MENTÁLIS RETARDÁCIÓ	enyhe	enyhe	enyhe	közepes	közepes	enyhe	enyhe	NA
IZOMHIPOTONIA	NA	+	NA	NA	NA	NA	NA	+
KARDIÁLIS DEFEKTUS	-	-	-	törzsi hypotonia	-	pulmonalis stenosis	-	-
CRANIOFACIALIS ELTÉRÉSEK	hipertelorizmus	minor anomáliák; bilaterális epicanthus redő	-	hipertelorizmus	-	-	-	hipertelorizmus; lefelé álló szemrés; strabizmus
ORR	-	alacsony orrnyereg	-	-	-	-	-	széles orrgyök
FÜLEK	mélyen ülő fülek	prominens, modulátlan fülkagyló	-	-	-	-	-	-
VÉGTAGOK	-	pes planus és valgus deformitás	-	-	-	-	-	-
HASI/UROGENITÁLIS RÉGIÓ	-	-	-	-	-	-	-	-
EGYÉB JELLEGZETESSÉGEK	-	etetés hiányosság	-	rendellenes pigmentáció	ataxiás járás; elesésre való hajlam	-	-	-

6/b. táblázat: Az 1. és 2. beteg összehasonlítása a szakirodalomban talált duplikációs esetekkel

A szakirodalomban ismertetett, aCGH módszerrel vizsgált és 15q duplikációs szindrómában szenvedő esetek, valamint 1. betegünk összehasonlítása során betegünkben a normális születési súlyt követően egy kifejezett posztnatális növekedési visszamaradottságot észleltünk. (6./a és 6./b táblázat [110, 163-170]) 28 hónapos korában súlya mindössze 10 kg (<5 pc), magassága 90 cm (50-75 pc), fejkörfogata pedig 46 cm volt (> -2SD). A közölt adatokkal ellentétben, ahol a posztnatális növekedési elmaradottságot prenatális növekedési elmaradottság, tehát alacsony születési súly kísérte, esetünkben a posztnatális növekedési elmaradottság normál születési súlyt követően alakult ki. 15q duplikációs szindrómában szenvedő betegek esetén alacsony növekedés számos esetben került leírásra, azonban alacsony testsúllyal járó posztnatális növekedési elmaradottság tudomásunk szerint mindössze egy, 15q13.3 duplikációs esetben (DECIPHER), ahol az érintett régió a *Cholinergic receptor, neuronal nicotinic, alpha polypeptide 7 (CHRNA7)* (*118511) és *OTU domain-containing Protein 7A (OTUD7A)* (*612024) géneket tartalmazta. A CHRNA7 kolinerg nikotin receptor funkcióját tekintve szerepet játszik a kolinerg gyulladásgátló útvonal révén a citokinek szintézisében [171]. A fehérje diszfunkciója összefüggésbe hozható neuropszichiátriai betegségek, valamint különböző epilepsziák kialakulásával is. A gén dóziszérékenysége számos, 15q13.3 delécióval rendelkező beteg esetén leírásra került, köztük West-szindrómás betegekben is [172]. Valbonesi egy csoport ADHD-s beteg vizsgálata során hozta összefüggésbe és bizonyította a gén deléciója, így a csökkent génexpresszió révén annak dóziszérékenységet a betegség kialakulásával [173]. Egy különböző neuropszichiátriai tüneteket mutató 3 generációs család esetén a *CHRNA7* kópiaszám növekedése volt valószínűsíthető a tünetek hátterében [174]. Betegünk aCGH vizsgálata során nyert eredményeink további bizonyítékokkal szolgálnak a kópiaszám növekedésének patogenitása tekintetében.

Az érintett *Necdin (NDN)* (*602117), *MAGE-like 2 (MAGEL2)* (*605283), *Makorin 3 (MKRN3)* (*603856), *Nonimprinted gene in Prader-Willi syndrome/Angelman syndrome chromosome region 1 (NIPA1)* (*608145) és *Nonimprinted gene in Prader-Willi syndrome/Angelman syndrome chromosome region 2 (NIPA2)* (*608146) génekkel kapcsolatban közölt irodalmi adatok bizonyítják e gének szerepét a növekedésszabályozásban, valamint az idegrendszer fejlődésében. A gének deléciója egér és humán szervezetek esetén is az idegrendszer fejlődésének és a növekedés szabályozásának hibájához vezetett [175-177]. Az említett gének dózis növekedése ezek alapján szerepet játszhat a posztnatális fejlődési visszamaradottság illetve az epilepsziás tünetek kialakításában.

A csecsemőkorai morbiditások és mortalitások egyik vezető oka a veleszületett szívbetegségek csoportja, a megközelítőleg 1-5%-os prevalenciájával. Az idic (15) duplikációs szindróma következtében kialakult veleszületett szívbetegségek az esetek megközelítőleg 25%-át teszik ki, míg a 15q13.3 deléció szindrómával rendelkező betegek 7-18%-ra jellemző a szívbetegség [104, 110, 178-180]. A 15q mikrodeléció esetek klinikai vizsgálata rámutatott arra, hogy a mitrális billentyű prolapszus, az enyhén megnagyobbodott bal karma, a Fallot tetralógia, valamint a súlyos trikuszipidális sztenózissal járó jobb szívfél hypoplasia hátterében a BP4-BP5 kromoszómális régióra eső *Kruppel-like transcription factor 13 (KLF13)* (*605328) gén deléciója állhat. A *KLF13* egy konzervált gén, mely a Kruppel-like cink-finger proteinek családjának egy tagját kódolja. A kódolt fehérjét azonosították, mint a szívben expresszálandó gének és a szív morfogenezisének szabályozóját [110, 181]. *Xenopus* embriókban végzett genetikai vizsgálatok szintén demonstrálták a *KLF13* fehérje nélkülözhetetlen szerepét a szív progenitor sejtek proliferációjában, illetve a szív morfogenezisben [182]. *KLF13* funkcionális knockout *Xenopus* embriók vizsgálata során normál kezdeti szív fejlődés volt megfigyelhető, azonban a későbbi vizsgálatok a szív normálistól eltérő, csökkent méretét detektálták, és számos defektust mutattak ki, köztük a kamrai trabekuláció hiányát, atrioszeptális defektust, megkésett atrioventrikuláris párna képződést és a billentyűk öregedését [182]. Derwinska egy 1,6 Mb nagyságú 15q13.3 duplikációt és szív rendellenességeket mutató beteg esetén a *KLF13* megnövekedett dózisát feltételezte a szív anomáliák kialakulásának hátterében [183]. 1. betegünk vizsgálata során a beteg bigemin extraszisztoláját észleltük, ami nem morfológiai rendellenesség. Ez alapján Derwinska feltételezését, miszerint a *KLF13* gén megnövekedett dózisa állhat a szív morfológiai elváltozások kialakulásának hátterében, nem tudjuk megerősíteni.

Az epilepsziás betegek antiepilepsziás terápiája során a gamma aminobutirát sav transzamináz inhibitor vigabatrin és valproát hatásosnak bizonyult. A GABA hatását az agy gátló szinapszisaiban fejt ki specifikus transzmembrán receptorokhoz kötődve. 1. betegünk vizsgálata során a GABA receptorok egy-egy alegységét kódoló *Gamma-aminobutyric acid receptor, beta-3 (GABRB3)* (*137192), *Gamma-aminobutyric acid receptor, alpha-5 (GABRA5)* (*137142) és *Gamma-aminobutyric acid receptor, gamma-3 (GABRG3)* (*600233) gének kópiaszám növekedését mutattuk ki, mely emelkedett GABA receptor szint kialakulásához vezethet. Az epilepszia terápiája során alkalmazott vigabatrin és valproát a gamma aminobutirát transzamináz gátlásán keresztül megnöveli a GABA fehérjék szintjét, így a kópiaszám növekedés következtében megnövekedett GABA receptor szint és az

antiepileptikumok alkalmazása következtében megnövekedett GABA szint együttes jelenléte magyarázhatja a rohamok gyakoriságának csökkenését az alkalmazott antiepileptikumok hatására [184-186].

7.2 A 2. beteg metafázis FISH és aCGH vizsgálata során detektált kópiaszám változások, valamint az érintett gének feltételezhető szerepének vizsgálata

2. betegünk aCGH vizsgálata során kettő - az 1. betegben talált 9,68 Mb méretű, 15q11.2q13.3 régióra eső kópiaszám többlettel nagyrészt átfedő - genomi régió kópiaszám többletét sikerült detektálnunk, melyek a 15q11.2q13.2 genomi régió 22,765,628-31,183,907 pozíciójába eső, 8,42 Mb-os, illetve a 15q13.3 genomi régió 31,261,835-32,861,626 pozíciójába eső 1,6 Mb-os kópiaszám többletek. (14. ábra) A beteg FISH vizsgálata akrocentrikus 15-ös marker kromoszóma jelenlétét mutatta, melynek festődése alapján a 2. beteg kariotípusa 47,XX,+idic (15)(pter→q14::q14→pter)-ként határozható meg. (13./b ábra)

A 22,765,628-31,183,907 és 31,261,835-32,861,626 genomi régiókba eső gének átfedése az 1. betegben detektált duplikáció által érintett génekkel, illetve a két beteg tünetei nagy részének azonossága alapján a 2. beteg esetén megfigyeltek az 1. beteg esetén leírt megfigyelések nagy részével megegyeznek. (12. ábra, valamint 4. és 5. táblázat)

2. betegünk fenotípus vizsgálata során az érintett *CHRNA7*, *OTUD7A*, illetve *NDN2*, *MAGEL2*, *MKRN3*, *NIPA1* és *NIPA2* gének kópiaszám növekedése jelentős mértékben hozzájárulhat a betegben detektált epilepsziás tünetek, valamint a neuropszichológiai tünetek kialakításához [171-177].

A szakirodalomban ismertetett 15q11.2q13.3 régiót érintő duplikációs esetek, valamint 2. betegünk összehasonlítása során az 1. beteghez hasonlóan a 2. betegünkénél sem észleltünk szív malformációt. Ennek alapján szintén megállapíthatjuk, hogy a *KLF13* gén kópiaszám növekedése nem feltétlenül vezet szív malformációk kialakulásához [183]. (6./a és 6./b táblázat)

Az 1. beteg eredményeinek elemzése során leírt feltételezés, mely a kópiaszám többlet következtében megnövekedett GABA receptor szintet, és az antiepileptikumok alkalmazása során megnövekedett GABA szintet hozza összefüggésbe, a 2. beteg esetén is helytálló lehet [184-186].

7.3 A 3. beteg metafázis FISH és aCGH vizsgálata során detektált kópiaszám változások, valamint az érintett gének feltételezhető szerepének vizsgálata

3. betegünk FISH és aCGH vizsgálata egy 2,6 Mb méretű 15q11.2 kromoszómális régiót érintő duplikációt mutatott ki egy addicionális 15-ös marker kromoszómán, 22,765,628-25,383,882 kezdő és végponttal, valamint egy 1 Mb méretű 15q26.3 régiót érintő deléciót egy 15-ös gyűrűkromoszómán, 101,373,740-102,383,473 kezdő és végponttal. (15./b és 15./c, valamint 16. ábra)

A Prader-Willi szindróma kritikus régió (PWSCR) szellemi elmaradottság, viselkedészavar, epilepszia, valamint jellegzetes arcvonások kialakításában játszott szerepéről számos irodalmi adat áll rendelkezésünkre [187, 188]. PWSCR-t tartalmazó addicionális 15-ös marker kromoszómákkal társuló eseteket is említ a szakirodalom, melyek összevetése az általunk talált eredményekkel megkönnyíti a genotípus-fenotípus korreláció felállítását. (7./a és 7./b táblázat [110, 163-170, 189]) A 3. betegünk vizsgálata során detektált 2,6 Mb méretű, 15q11.2 régiót érintő addicionális marker kromoszóma 11 gént tartalmaz, köztük a PWSCR régióba tartozó *NDN* és *Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (SNRPN)* (*182279) géneket. (8. táblázat) Betegünk klinikai adatait és molekuláris diagnosztikai találatait a szakirodalomban ismertetett adatokkal összevetve azt feltételezhetjük, hogy a PWSCR génjeinek kópiaszám növekedése állhat a faciális dysmorphia és a megkésett mentális fejlődés hátterében.

A 15q11.2 régió BP1 és BP2 töréspontjai közé eső *TUBGCP5*, *CYFIP1*, *NIPA2* és *NIPA1* fehérjéket kódoló *TUBGCP5*, *CYFIP1*, *NIPA2* és *NIPA1* gének kópiaszám csökkenése feltételezhetően szerepet játszik a motoros és beszédfejlődés késése mellett epilepsziás tünetek kialakításában is. Az említett gének kópiaszám csökkenésének hatása a normál fenotípusra, a gének dóziszérzékenységről árulkodik. Ennek alapján feltételezhetjük, hogy esetünkben a *TUBGCP5*, *CYFIP1*, *NIPA2* és *NIPA1* gének kópiaszám emelkedése is szerepet játszhat a motoros és beszédképesség fejlődés, valamint az epilepszia kialakulásában. A Tubulin complex-associated protein 5 (*TUBGCP5*) (*608147) jelenléte szükséges a mikrotubulusok centroszómához kötődéséhez. Magas szintű agyi subtalamikus expressziója feltételezi a fehérje szerepét a normál agyműködés kialakításában. A feltételezést megerősíti az agy subtalamikus régiójának károsodása és az ADHD, valamint az obszesszív-kompulzív viselkedés között talált kapcsolat [190, 191]. A *NIPA1* magnézium transzportert kódoló fehérje különböző neuronális és epiteliális sejtek felszínén expresszálódik. Az idegrendszer normális fejlődése mellett a fehérje szerepet játszhat a normál agyi működés fenntartásában is.

A *NIPA1* gént érintő mutációk kapcsolatba hozhatók az autoszomális domináns spasztikus paraplegia kialakulásával is [192, 193]. A *NIPA2* gén által kódolt szelektív magnézium csatorna a vese magnézium metabolizmusáért felelős fehérje [194]. A 15q11.2 BP1-BP2 régió negyedik génje, a *Cytoplasmic FMRP-interacting protein 1 (CYFIP1)* (*606322) gén a CYFIP1-EIF4E-FMR1 fehérjekomplex Cytoplasmic FMR1 Interacting Protein 1 nevű fehérjéjének az expressziójáért felelős. A fehérjekomplex az mRNS sapkákhöz kötődve elősegíti a transzláció represszióját. A komplex részeként működő CYFIP1 fehérje szerepet játszik a lamellipodiumok kialakításában, az aktin filamentumok reorganizációjában, valamint az axonnövekedés szabályozásában [195, 196].

	3. beteg	Szabó et. al. (2015)	Szabó et. al. (2015)	B.W.M. van Bon et. al. (2009)	B.W.M. van Bon et. al. (2009)	B.W.M. van Bon et. al. (2009)	B.W.M. van Bon et. al. (2009)	Koochek et al. (2006)	Koochek et al. (2006)	Jing Yang et. al. (2013)
A DUPLIKÁCIÓ POZÍCIÓJA	22,765,628-25,383,882 (2,618,254 bázis)	15q11.2q13.3(2 2,765,628-32,445,252) tetraszómia	15q11.2q13.2(22,765,628-31,183,907) és 15q13.3(31,261,835-32,861,626) tetraszómia	BP4BP5	BP4BP5	BP4BP5	BP3BP5	15q11-15q13	5 kópia: 15q11.2q13.2 (chr15:22,619,671-30,342,457), és 3 kópia: 15q13.2q13.3 (chr15:30,342,458-32,411,629)	4 kópia: 15q11.2q13.1 (chr15:22,054,840-30,058,502) és 3 kópia: 15q13.1q13.2 (chr15:30,058,503-32,418,417)
NEM	lány	fiú	lány	fiú	lány	nő	lány	lány	nő	fiú
KOR A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN	28 hónap	27 hónap	17 hónap	17 év	4 év, 6 hónap	20 év	4 év, 10 hónap	7 év, 4 hónap	38 év	9 év
SZÜLETÉSI SÚLY (g)	2600 (-1.9 SD)	3200	3520	2900 (P50)	4850 (>P98)	NA	P3-P98	-	-	1800
SZÜLETÉSI HOSSZ (cm)	NA	NA	NA	P30	P50	P3	P25	-	-	47
SZÜLETÉSI FEJKÖRFOGAT (cm)	NA	NA	NA	P60	P45	P60	P50	-	-	32, enyhe mikrokefália
SÚLY A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN (kg)	10 (<3 pc)	10 (<5 pc)	13 (90-97 pc)	NA	26.2 (98th centile)	NA	24 (98th centile)	NA	50-75th centile	NA
MAGASSÁG A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN (cm)	80 (<3 pc)	90 (50-75 pc)	85 (75-90 pc)	179.5 (30th centile)	109 (50th centile)	159 (25th centile)	105 (25th centile)	NA	5th centile	NA
FEJKÖRFOGAT A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN (cm)	44 (<2 SD) (mikrokefália)	46 (<2 SD)	46 (-1 SD)	58.2 (60th centile)	50.2 (45th centile)	56 (60th centile)	50 (50th centile)	NA	25-50th centile	NA
CSALÁDI ANAMNÉZIS	-	-	-	NA	-	NA	apai eredet	NA	NA	NA
KOPONYA MR/CT	corpus callosum diszgenezis; a perinatális IVH következményeként kialakult jobb kamrai dilatació	-	normál	normál	normál	NA	normál	normál	normál	normal
EPILEPSZIA/KÓROS EEG	EEG negatív; rekurrens rohamok	+	+	-	-	-	-	NA	+	-
VISELKEDÉSZAVAR	hiperaktivitás; autisztikus jegyek; sztereotíp kézmozdulatok	hiperaktivitás	sztereotíp kézmozdulatok	autisztikus jegyek	-	beszédkénszer	autisztikus jegyek	NA	bipoláris viselkedészavar; hiperaktivitás	hiperaktivitás; agresszív és destruktív viselkedés
MENTÁLIS RETARDÁCIÓ	súlyos	enyhe	enyhe	enyhe	enyhe	enyhe-közepes	súlyos	enyhe	enyhe	enyhe
BESZÉDFEJLŐDÉSI ZAVAR	súlyos beszédfejlődési zavar	megkészt beszédfejlődés	súlyosan megkészt beszédfejlődés	NA	NA	NA	NA	kissé megkészt beszédfejlődés	NA	megkészt beszédfejlődés
MOTOROS KÉPESSEGEK	NA	megkészt motoros fejlődés	NA	NA	ataxiás járás	NA	megkészt motoros fejlődés	kissé megkészt motoros fejlődés	NA	NA
IZOMHIPOTÓNIA	NA	+	+	+	-	+	+	NA	+	közepes
KARDIÁLIS DEFEKTUS	ASD/VSD	bigemin extrasisztole	-	-	-	-	-	-	-	-
CRANIOFACIALIS JELLEGEK	epicanthus redő; hipertelorizmus	lapos occiput; epicanthus redő; hipertelorizmus	prominens homlok; lapos occipu; széles arc	synophrys	hipertelorizmus; brachikefália; széles homlok	enyhén mélyen ülő szemek	-	nem konjugált szem mozgások; magas homlok; mélyen ülő szemek; lefelé álló szemrés; jobb szem konvergens strabizmus; lapos occiput	strabizmus; lefelé álló szemrés	hipertelorizmus
ORR	lapos orrnyereg	széles orrnyereg	előrenéző orrlyukak	magas orrnyereg	-	-	-	széles és magas orrgyök és orrnyereg	széles orrgyök és orrnyereg	előrenéző orrlyukak
FÜLEK	-	fülcimpa redő	-	mélyen ülő fülek; rekurrens otitis media	mélyen ülő fülek; rekurrens otitis media	-	-	-	-	preauricular fistula; mélyen ülő fülek
VÉGTAGOK	a 2-3 lábujjak szindaktiliája	-	kis lábak	syndactylia, brachidactylia, a 2-3 lábujj syndactyliliája	4 ujjas redő	-	-	-	-	laza ízületek
HASI/UROGENITÁLIS RÉGIÓ	GERD	-	-	Criptorchizmus	-	-	-	-	-	-
EGYÉB JELLEGZETESSÉGEK	többszörös café au lait foltok; bruxizmus; alacsony termet	-	-	bipoláris zavar	invertált mamilla	etetési nehezíttség	-	légzési depresszió	-	magzatvíz aspiráció miatti resuscitatio

7/a. táblázat: A 3. beteg összehasonlítása a szakirodalomban leírt duplikációs esetekkel

	Jing Yang et. al. (2013)	David J Wu et. al. (2009)	Ee-Shien Tan et. al. (2014)	Ee-Shien Tan et. al. (2014)	J Clayton-Smith et. al. (1993)	Marina Michelson et. al. (2011)	T.K. Mohandas et. al. (1999)	Jon Soo Kim et.al. (2012)
A DUPLIKÁCIÓ POZÍCIÓJA	-	BP1BP4	chr15:21,213,950-26,208,646	chr15:18,362,555-26,208,646	NA	részleges triszómia: 15q11-13	NA	a 15q11.1 to 15q13.1 régiók amplifikációja
NEM	fiú	fiú	fiú	lány	lány	lány	fiú	lány
KOR A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN	8 years	NA	5 év, 8 hónap	NA	4 év	10 év	2 év, 4 hónap	10 hónap
SZÜLETÉSI SÚLY (g)	3700	2500	2950	3234	3630	-	3628	2900
SZÜLETÉSI HOSSZ (cm)	55	54,6	-	45,5	-	-	57	-
SZÜLETÉSI FEJKÖRFOGAT (cm)	35	-	-	32	-	-	36	-
SÚLY A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN (kg)	31.5 (95th percentile)	NA	NA	NA	87th centile	NA	NA	< 3 pc
MAGASSÁG A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN (cm)	125 (50th percentile)	NA	NA	NA	87th centile	NA	NA	NA
FEJKÖRFOGAT A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN (cm)	53 (75th percentile)	NA	NA	NA	50th centile	NA	NA	NA
CSALÁDI ANAMNÉZIS	NA	az apa a 9. és 15. kromoszómák között kiegyensúlyozott transzlokációt hordoz	az idősebb fiú testvér autisztikus jegyeket mutat	NA	NA	skizofrén anya	az apa és a lány testvér depressziós, pszichiátriai kivizsgálás alatt áll	-
KOPONYA MR/CT	normál	normál	-	-	normál	normál	-	enyhe agyi atrófia
EPILEPSZIA/KÓROS EEG	-	NA	NA	NA	-	különböző típusú generalizált és fokális rohamok	NA	+
VISELKEDÉSZAVAR	agresszív és destruktív viselkedés	bipoláris viselkedészavar	hiperaktivitás és hydrofóbia	-	-	bipoláris viselkedészavar; szelektív mutizmus	-	-
MENTÁLIS RETARDÁCIÓ	enyhe	enyhe	enyhe	közepes	közepes	enyhe	mild	NA
BESZÉDFEJLŐDÉSI ZAVAR	kissé megkészt beszédfejlődés	megkészt beszédfejlődés	súlyosan megkészt beszédfejlődés	súlyosan megkészt beszédfejlődés	megkészt beszédfejlődés	NA	NA	NA
MOTOROS KÉPESSÉGEK	normál	NA	NA	súlyosan megkészt motoros fejlődés	ataxiás járás; elesésre való hajlam	NA	NA	NA
IZOMHIPOTÓNIA	NA	+	NA	törzsi hypotonia	NA	NA	NA	+
KARDIÁLIS DEFEKTUS	-	-	-	-	-	pulmonalis stenosis	-	-
CRANIOFACIALIS JELLEGEK	hipertelorizmus	minor anomáliák; bilaterális epicanthus redő	-	hipertelorizmus	-	-	-	hipertelorizmus; lefelé álló szemrés; strabizmus
ORR	-	alacsony orrnyereg	-	-	-	-	-	széles orrgyök
FÜLEK	mélyen ülő fülek	prominens, modulálatlan fülkagyló	-	-	-	-	-	-
VÉGTAGOK	laza ízületek	pes planus és valgus deformitás	-	-	-	-	-	-
HASI/UROGENITÁLIS RÉGIÓ	-	-	-	-	-	-	-	-
EGYÉB JELLEGZETESSÉGEK	-	-	-	rendellenes pigmentáció	-	-	-	-

7/b. táblázat: A 3. beteg összehasonlítása a szakirodalomban leírt duplikációs esetekkel

	Név	Pozíció	Kódolt fehérje neve	HI(D)	Funkció
Duplikált régió	TUBGCP5	15:22833394-22873891	Tubulin, gamma complex associated protein 5	-	A gamma-tubulin komplex-el együttműködve szükséges a centroszómában a mikrotubulus nukleáció folyamatához.
	CYFIP1	15:22892005-23006016	Cytoplasmic FMR1 interacting protein 1	53,3	A CYFIP1-EIF4E-FMRI komplex részeként az mRNS spakákhoz kötődve mediálja a transzláció represszióját.
	NIPA2	15:23004684-23034427	Non imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 2	52,9	Egy lehetséges magnézium transzportert kódol.
	NIPA1	15:23043277-23100005	Non imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 1	25,3	A gén egy korai endoszómákon, valamint neuronális és epiteliális sejtek felszínén expresszáldó magnézium transzportert kódol.
	GOLGA6L2	15:23684645-23692381	Golgin A6 family-like 2	-	-
	MKRN3	15:23810454-23873064	Makorin ring finger protein 3	98,7	A gén által kódolt fehérje egy RING (C3HC4) cink finger motívummal és számos C3H cink finger motívummal rendelkezik.
	MAGEL2	15:23888691-23891175	MAGE-like 2	-	A fehérje a RING-típusú cink fingert tartalmazó E3 ubiquitin-protein ligázok ubiquitinaktivitását fokozhatja. Szerepet játszhat az E3:szubsztrát komplex Ubl-konjugáló enzimeinek (E2) stabilizációjához.
	NDN	15:23930565-23932450	Necdin, melanoma antigen (MAGE) family member	36,2	Növekedési szupresszor ami megkönnyíti a sejtek belépését a sejt ciklus terminációjába.
	NPAP1	15:24920541-24928593	Nuclear pore associated protein 1	93,6	A spermatogenezisben játszhat szerepet.
	SNRPN	15:25068794-25223870	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N	11,3	A gén által kódolt fehérje egy kis nukleáris ribonukleoprotein komplex tagja, mely az snRNP SMB/SMN családba tartozik. A fehérje szerepet játszik a pre-mRNs érésben, és feltételezhetően bizonyos szövetekre specifikus alternatív splicing-ban is.
Deletált régió	SNURF	15:25200181-25245423	SNRPN upstream reading frame	64,6	A fehérje funkciója jelenleg nem ismert.
	ALDH1A3	15:101417919-101456831	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	34,78	A kódolt fehérje feltehetőleg kulcs enzim a dorso-ventrális axison kialakuló RA gradiens kialakulásának a korai szem és szaglőrendszer fejlődésének időszakában.
	LRRK1	15:101459420-101610317	Leucine-rich repeat kinase 1	54,22	-
	CHSY1	15:101715928-101792137	Chondroitin sulfate synthase 1	54,01	A kódolt fehérje béta-1,3-glükuron sav és béta-1,4-N-acetilgalaktózin transzferáz aktivitással bír. Részt vesz a glükuronsav (GlcUA) UDP-GlcUA-ból, valamint az acetilgalaktózin (GalNAc) UDP GalNAc-ból való szállításában a kondroitin polimer nem redukáló végéhez. Részt vesz az oszteogenezis negatív kontrolljában a NOTCH szignalizáció modulálásán keresztül.
	VIMP (SELS)	15:101811022-101817705	VCP-interacting membrane protein; Selenoprotein S	46,32	A kódolt fehérje részt vesz az endoplazmatikus retikulum misfolded lumenális fehérjéinek degradációjában. Szerepet játszik a misfolded fehérjék ER-ből citoszolba való transzportjában, ahol a misfolded fehérjék egy ubiquitin-függő úton degradálódnak.
	SNRPA1	15:101821715-101835487	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A1	10,49	Feltehetőleg a sejtosttódásban játszik szerepet.
	PCSK6	15:101840818-102065405	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	40,63	A kódolt fehérje feltehetőleg endoproteáz aktivitást mutat neuroendokrin és nem-neuroendokrin szövetekben.
	TM2D3	15:102161847-102192594	TM2 domain containing 3	62,45	-
	TARSL2	15:102193801-102264807	Threonyl-tRNA synthetase-like 2	55,14	-
	OR4F6	15:102345902-102346876	Olfactory receptor, family 4, subfamily F, member 6	82,3	Szaganyag receptor. Felelőssé tehető a szaganyagok felismeréséért, valamint a G protein-mediált transzdukcijáért.

8. táblázat: A 3. beteg esetén detektált delécio és duplikáció által érintett gének

A gyűrűkromoszómák képződése az adott kromoszómán kialakuló deléciók által kialakult „ragadós” kromoszóma végek összekapcsolódásával magyarázható. 3. betegünk vizsgálata során a 15-ös gyűrűkromoszómán megközelítőleg 1 Mb méretű, a 15q26.3 régiót érintő deléciót detektáltunk. A szakirodalomban leközölt, 15q terminális deléciós betegek, valamint saját esetünk összehasonlítása ebben az esetben is lehetőséget teremt a klinikai adatok és molekuláris genetikai találatok közti összefüggések vizsgálatára. (9./a, 9./b, 9./c és 9./d táblázat [197-212]) A gyűrűképződés következtében létrejött 15q26.3 régiót érintő terminális deléció 10 gént tartalmaz, melyek közül néhány szerepet játszhat a 3. beteg klinikai vizsgálata során tapasztalt veleszületett szívbetegség (CHD) kialakulásában. (8. táblázat) A kardiovaszkuláris megbetegedésekkel (CVD) összefüggésbe hozták a *Selenoprotein S (SELS, VIMP)* (*607918) gént [213, 214]. A korábban leközölt szakirodalmi adatokat kiegészítve Flaquer kísérletet tett olyan kromoszómális régiók meghatározására, melyek a veleszületett szívbetegségek különböző típusainak hátterében állhatnak. Vizsgálatai két kromoszómális régió esetleges szerepét mutatták ki, a 15-ös és a 18-as kromoszómán, valamint a 15-ös kromoszóma *SELS, Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A1 (SNRPA1)* (*603521) és *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6 (PCSK6)* (*167405) génjeit tették felelőssé a CHD különböző típusainak kialakulásáért [215]. 3. betegünk esetén a *SELS, SNRPA1* és *PCSK6* géneket érintette a deléció, így a betegünkénél észlelt CHD és az érintett gének alapján megerősíthetjük az Alenne és Flaquer által leírt eredményeket, miszerint e gének kópiaszám csökkenése összefüggésbe hozható a kamrai vagy pitvari szeptum defektus (ASD/VSD) kialakulásával.

	3. beteg	Ester (2009)	Ester (2009)	Rudaks (2011)	Rujibanjerd (2007)	Dateki (2011)	DECIPHER: 2502
DELÉCIÓ POZÍCIÓJA	101,373,740-102,383,473 (1,009,733 bázis)	99,263,801 - 102,531,392 (3,267,592 bázis)	98,082,278 - 102,531,392 (4,449,115 bázis)	98,461,392 - 102,531,392 (4,070,000 bázis)	98,002,467 - 102,531,392 (4,528,926 bázis)	97,517,453 - 102,531,392 (5,013,940 bázis)	97,507,236 - 102,507,392 (5,024,157 bázis)
EREDET	De novo	De novo	De novo	De novo	De novo	De novo	De novo
NEM	lány	fiú (Patient B)	lány (Patient A)	lány	lány	lány	fiú
KOR A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN	28 hónap	17 év	8 év 4 hónap	4 év 5 hónap	3 év	13 év 9 hónap	9 év
SZÜLETÉSI SÚLY (g)	2600 (-1.9 SD)	2600 (-1.9 SD)	2890 (-1.3 SD)	1900	2500	2170 (-2.1 SD)	NA
SZÜLETÉSI HOSSZ (cm)	NA	47 (-2.2 SD)	47 (-2.2 SD)	NA	NA	47 (-0.7 SD)	NA
SZÜLETÉSI FEJKÖRFOGAT (cm)	NA	NA	NA	NA	NA	32.5 (-0.5 SD)	NA
SÚLY A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN (Kg)	10 (<3 pc)	NA	NA	-1.3 és -2 SD között	< -3 SD	-0.5 SD	alacsony növés
MAGASSÁG A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN (cm)	80 (<3 pc)	-1.9 SD	-1.7 SD	< 2.3 SD	< -3 SD	-3.9 SD	NA
FEJKÖRFOGAT A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN (cm)	44 (<2 SD) (mikrocefália)	NA	NA	-0.7SD	NA	NA	NA
CSALÁDI ANAMNÉZIS	-	-	-	-	-	-	-
KOPONYA MRI/CT	corpus callosum diszgenezis; a perinatális IVH következményeként kialakult jobb kamrai dilatáció	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EPILEPSZIA/KÓROS EEG	EEG negatív; rekurrens rohamok	NA	NA	NA	NA	NA	NA
VESELKEDÉSZAVAR	hiperaktivitás; autisztikus jegyek; sztereotíp kézmozdulatok	ADHD	NA	NA	NA	NA	NA
MENTÁLIS RETARDÁCIÓ	súlyos	NA	verbal IQ 93; performatív IQ 121	-	NA	enyhe (tanulási nehézségek)	megkésett kognitív fejlődés
BESZÉDFEJLŐDÉSI ZAVAR	súlyos beszédfejlődési zavar	NA	NA	kifejezett beszédfejlődés késés	kifejezett beszédfejlődés késés	NA	NA
MOTOROS KÉPESSÉGEK	NA	NA	megkésett motoros fejlődés	normál ütemű motoros fejlődés	megkésett finomotorika fejlődés (Denver Developmental Screening Test II)	NA	NA
IZOMHIPOTÓNIA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
KARDIÁLIS DEFEKTUS	ASD/VSD	-	-	-	-	-	NA
CRANIOFACIALIS JELLEG	epicanthus redő; hipertelorizmus	hipertelorizmus; lefelé álló szemrés	epicanthus redő; hipertelorizmus		-	-	NA
ORR	lapos orrnyereg	-	széles orrnyereg	hypoplasziás orrszárnnyak	-	-	NA
FÜLEK		-	mélyen ülő, poszterior rotált fülek	-	-	-	NA
VÉG TAGOK	a 2-3 lábujjak szindaktiliája	magasan invertált hüvelykujj; széles lábak; laza ízületek	bilaterális clinodactyilia, rövid ujjak, magasan invertált hüvelykujj; széles lábak; laza ízületek; tag rés az 1. és 2. lábujjak között; pes planus	az 5. ujjak clinodactyiliája; enyhe brachydactyilia; rövid kezek és körmök	laza ízületek	-	NA
EGYÉB JELLEGZETESSÉGEK	GERD; többszörös café au lait foltok; bruxizmus; alacsony termet	-	-	-	-	-	törzsre lokalizált elhízás

9/a. táblázat: A 3. beteg összehasonlítása a szakirodalomban leírt deléciós esetekkel

	Walenkamp (2008)	Lin (2011)	Pinson (2005)	Rump (2008)	Rump (2008)	Davidsson (2008)	Poot (2013)
DELÉCIÓ POZÍCIÓJA	97,330,000 - 102,531,392 (5,200,000 bázis)	96,990,988 - 102,531,392 (5,540,405 bázis)	96,820,507 - 102,531,392 (5,710,886 bázis)	96,730,000 - 102,531,392 (5,800,000 bázis)	96,730,000 - 102,531,392 (5,800,000 bázis)	93,860,000 - 102,531,392 (6,480,000 bázis)	95,672,055 - 102,531,392 (6,859,338 bázis)
EREDET	De novo	De novo	De novo	De novo	De novo	De novo	De novo
NEM	lány	NA	lány	lány	fiú	fiú	lány
KOR A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN	15 years old	NA	4 év 6 hónap	35 év	6 hónap	1 év 6 hónap	11 év
SZÜLETÉSI SÚLY (g)	2100 (- 3.0 SD)	< - 3 SD	2400 (- 2 SD)	2850 (- 1.4 SD)	3500 (- 0.3 SD)	2400	1590 (- 2 SD)
SZÜLETÉSI HOSSZ (cm)	47 (- 1.3 SD)	< - 3 SD	42 (- 3.5 SD)	47.5 (- 1.0 SD)	NA	70	38 (< - 2 SD)
SZÜLETÉSI FEJKÖRFOGAT (cm)	33 (- 2 SD)	relatív makrocefália	32 (- 2 SD)	32.5 (- 1.2 SD)	NA	NA	30 (- 2 SD)
SÚLY A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN (Kg)	1.0 SD	NA	- 3 SD	+ 2.6 SD	- 2.6 SD	?3	+ 1 SD
MAGASSÁG A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN (cm)	- 1.8 SD	NA	- 4 SD	- 3.5 SD	- 1.4 SD	?3	- 3 SD
FEJKÖRFOGAT A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN (cm)	- 1.1 SD	NA	- 3 SD	- 2.1 SD	- 2.5 SD	NA	+ 1 SD
CSALÁDI ANAMNÉZIS	-	-	-	-	-	-	-
KOPONYA MRI/CT	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EPILEPSZIA/KÓROS EEG	NA	NA	+	NA	NA	NA	NA
VISELKEDÉSZAVAR	-	-	NA	NA	NA	NA	NA
MENTÁLIS RETARDÁCIÓ	NA	NA	+	enyhe	közepes-súlyos	megkésett kognitív fejlődés	diszharmonikus intelligencia: verbális IQ 69 - 82; performációs IQ 53 - 70; ASD (DSM-IV)
BESZÉDFEJLŐDÉSI ZAVAR	NA	NA	megkésett beszédfejlődés	NA	NA	NA	NA
MOTOROS KÉPESSEGEK	NA	NA	megkésett pszichomotoros fejlődés	NA	NA	súlyosan megkésett pszichomotoros fejlődés	NA
IZOMHIPOTÓNIA	NA	NA	+	NA	NA	NA	NA
KARDIÁLIS DEFEKTUS	-	-	-	-	ASD	coarctatio aortae; mitralis stenosis és kis VSD	nyitott foramen ovale; II. típusú VSD; arteria pulmonalis stenosis
CRANIOFACIALIS JELLEGEK	extrém miopátia	-	jobb epicanthus	blepharophimosis; interpupilláris távolság 7.0 cm (- 3.4 SD)	blepharophimosis; epicanthus redő; divergens strabizmus	hipertelorizmus	aszimmetrikus szemrés
ORR	-	-	-	széles ornyereg	széles ornyereg	széles ornyereg	széles ornyereg
FÜLEK	-	-	-	halláskárosodás ~35 dB; mélyen ülő diszplasztikus fülek; keskeny hallójárat	bilaterális hallásvesztés; alacsonyán ülő diszplasztikus fülek	-	-
VÉGTAGOK	-	polydactylia	brachy-/clinodactylia; magasan invertált hüvelykujjak; hegyes ujjak; cubitus valgus	a 2. és 5. ujjak brachydactyliája; kis hüvelykujjak; talipes equinovarus; rövid lábujjak; 2-5 lábujjak középső ujjperce hiányzik; laza ízületek	a 2. és 5. ujjak brachydactyliája, kis hüvelykujjak; talipes equinovarus; rövid lábujjak; 2-5 lábujjak középső ujjperce hiányzik; laza ízületek	veleszületett függőleges ugrócsont	lapos ujjak; bilaterális abnormális hüvelykujjak; pes planus; rövidebb bal láb; csökkent supináció mindkét könyökben
EGYÉB JELLEGZETESSÉGEK	-	-	alacsony termet	törzsre lokalizált elhízás	-	GERD	-

9/b. táblázat: A 3. beteg összehasonlítása a szakirodalomban leírt deléciós esetekkel

	Tönnies (2001)	Bruce (2010)	Veenma (2010)	Klaassens (2005)	Klaassens (2005)	Klaassens (2005)	Klaassens (2005)
DELÉCIÓ POZÍCIÓJA	94,711,170 - 102,531,392 (7,820,223 bázis)	99,203,445 - 101,798,740 (2,595,296 bázis)	99,477,911 - 99,572,670 (94,759 bázis)	46,XY,t(1;14),inv(6),del(15)(q26) (6.3 Mb deléció)	46,XY,r(15)(p11q26) (19.9 Mb deletion)	46,XY,r(15)(p11q26) (23.3 Mb deléció)	46,XX,der(15)t(3;15)(q29;q26.1) (22.8 Mb deléció)
EREDET	De novo	De novo	Familial	NA	NA	NA	NA
NEM	lány	lány	fiú	NA	NA	NA	NA
KOR A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN	1 év 4 hónap	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SZÜLETÉSI SÚLY (g)	1980 (< 3 SD)	< 2 SD	NA	NA	NA	NA	NA
SZÜLETÉSI HOSSZ (cm)	42 (< 3 SD)	< 2 SD	NA	NA	NA	NA	NA
SZÜLETÉSI FEJKÖRFOGAT (cm)	30 (< 3 SD)	relatív makrocefália	NA	NA	NA	NA	NA
SÚLY A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN (Kg)	5,3 (<< 3 SD)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MAGASSÁG A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN (cm)	62 (<< 3 SD)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
FEJKÖRFOGAT A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN (cm)	39 (<< 3 SD)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
CSALÁDI ANAMNÉZIS	-	-	+	NA	NA	NA	NA
KOPONYA MRI/CT	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
EPILEPSZIA/KÓROS EEG	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
VISELKEDÉSZAVAR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MENTÁLIS RETARDÁCIÓ	enyhe	+	NA	NA	NA	NA	NA
BESZÉDFEJLŐDÉSI ZAVAR	NA	megkésett beszédfejlődés	NA	NA	NA	NA	NA
MOTOROS KÉPESSÉGEK	NA	megkésett pszichomotoros fejlődés	NA	NA	NA	NA	NA
IZOMHIPOTÓNIA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
KARDIÁLIS DEFEKTUS	VSD; ASD; preductalis coarctatio aortae; nyitott ductus arteriosus; arteria lusoria	-	NA	NA	NA	NA	NA
CRANIOFACIALIS JELLEGEK	-	-	NA	NA	NA	NA	NA
ORR	széles orrnyereg	-	NA	NA	NA	NA	NA
FÜLEK	mélyen ülő fülek	-	NA	NA	NA	NA	NA
VÉGTAGOK	-	clinodactylia; tág rés a 2. és 3. lábujjak között	NA	NA	végtag abnormalitások	NA	végtag abnormalitások
EGYÉB JELLEGZETESSÉGEK	alacsony termet; GERD	-	NA	kongenitális hernia diafragmatika; genitália anomáliák; IUGR	kongenitális hernia diafragmatika; vese és genitália abnormalitások; minor anomáliák; IUGR	kongenitális hernia diafragmatika; minor anomáliák; IUGR	kongenitális hernia diafragmatika; minor anomáliák; IUGR; kéteres köldökszínór

9/c. táblázat: A 3. beteg összehasonlítása a szakirodalomban leírt deléciós esetekkel

	Klaassens (2005)	Klaassens (2005)	Klaassens (2005)	Klaassens (2005)	Klaassens (2005)	Dhamija (2011)
DELÉCIÓ POZÍCIÓJA	46,XY,r(15)(p11q26.1) (23 Mb deléció)	46,XX,der(15)t(8;15)(q24.1;q26.1) (16.8 Mb deléció)	46,XX,del(15)(q25q26.3) (22.3 Mb deléció)	46,XX,r(15)(p11.1q26.3) (16.3 Mb deléció)	46,XY,del(15)(q26) (15.6 Mb deléció)	46,XX,del(15)(q26.1) (731,200 - 736,400 bázis)
EREDET	NA	NA	NA	NA	NA	De novo
NEM	NA	NA	NA	NA	NA	lány
KOR A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN	NA	NA	NA	NA	NA	9 év
SZÜLETÉSI SÚLY (g)	NA	NA	NA	NA	NA	1960 (25th PC)
SZÜLETÉSI HOSSZ (cm)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SZÜLETÉSI FEJKÖRFOGAT (cm)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
SÚLY A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN (Kg)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MAGASSÁG A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN (cm)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
FEJKÖRFOGAT A VIZSGÁLAT IDŐPONTJÁBAN (cm)	NA	NA	NA	NA	NA	48.5 (< 3th Pc; mikrocefália)
CSALÁDI ANAMNÉZIS	NA	NA	NA	NA	NA	-
KOPONYA MRI/CT	NA	NA	NA	NA	NA	normál
EPILEPSZIA/KÓROS EEG	NA	NA	NA	NA	NA	generalizált, absence, tónusos, mioclonusos és generalizált tónusos-clonusos rohamok
VISELKEZÉSZAVAR	NA	NA	NA	NA	NA	echolália; megkésett szociális fejlődés
MENTÁLIS RETARDÁCIÓ	NA	NA	NA	+	+	+
BESZÉDFEJLŐDÉSI ZAVAR	NA	NA	NA	NA	NA	megkésett beszédfejlődés
MOTOROS KÉPESSÉGEK	NA	NA	NA	NA	NA	megkésett pszichomotoros fejlődés
IZOMHIPOTÓNIA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
KARDIÁLIS DEFEKTUS	NA	NA	NA	-	-	magzati bradycardia
CRANIOFACIALIS JELLEG	NA	NA	NA	NA	NA	hipertelorizmus
ORR	NA	NA	NA	NA	NA	NA
FÜLEK	NA	NA	NA	NA	NA	diszplasztikus fülek
VÉGTAGOK	végtag abnormalitások	végtag abnormalitások	végtag abnormalitások	NA	NA	NA
EGYÉB JELLEGZETESSÉGEK	kongenitális hernia diafragmatika; minor anomáliák; genitália abnormalitások; IUGR	kongenitális hernia diafragmatika; hydrocephalus; minor anomáliák; vese és gerinc abnormalitások; IUGR	kongenitális hernia diafragmatika; minor anomáliák; vese abnormalitások; IUGR	minor anomáliák; IUGR	-	minor anomáliák

9/d. táblázat: A 3. beteg összehasonlítása a szakirodalomban leírt deléciós esetekkel

A 15-ös gyűrűkromoszómát hordozó betegekben gyakran megfigyelt alacsony növést és megkésett fejlődést a szakirodalom leggyakrabban a 15q26.3 genomi régióban található *Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R)* (*147370) gén deléciójával hozza összefüggésbe [199, 211, 216-219]. Betegünk anamnézisében intrauterin növekedési elmaradottságot, a klinikai vizsgálat időpontjában pedig a normálisnál kisebb testsúlyt és testmagasságot észleltünk az *IGF1R* gén kópiaszám vesztese nélkül. A 15-ös gyűrűkromoszómák és a növekedési visszamaradottság kapcsolatának vizsgálata során eddig csupán néhány irodalmi adat számolt be az *IGF1R* deléciója nélküli alacsony növéstről. Feltételezésük szerint ezen betegekben a 15-ös gyűrűkromoszóma jelenléte önmagában is hozzájárulhat a növekedési visszamaradottság kialakulásához [220]. Eredményeink alapján megerősíthetjük a hipotézist, miszerint nem kizárólag az *IGF1R* gén kópiaszám csökkenése állhat az alacsony testmagasságú és súlyú, 15-ös gyűrűkromoszómával rendelkező betegek esetén a fejlődés elmaradásának hátterében. Vizsgálataink és az irodalmi adatok alapján feltételezhetjük, hogy már a 15-ös gyűrűkromoszóma jelenléte önmagában is hozzájárulhat az alacsony testmagasság és súly megjelenéséhez, illetve az *IGF1R* géntől disztálisan elhelyezkedő genomi régió haploinsufficienciája is meghatározó lehet a növekedési elmaradás kialakításában.

7.4 A 4. beteg metafázis FISH és aCGH vizsgálata során detektált kópiaszám változások, valamint az érintett gének feltételezhető szerepének vizsgálata

4. betegünk vizsgálata során egy, a 9q34.3 terminális régió 138,831,145–141,018,984 pozíciójába eső, 2,188 Mb méretű delécióját detektáltuk. Az aCGH és FISH vizsgálatok alapján a 4. beteg a 9q34.3 (2,188 Mb, 138,831,145–141,018,984) kromoszómális régiót tekintve 1 kópiát hordoz. (17./b és 18. ábra)

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

A Kleefstra szindróma az egész szervezetet érintő, genetikai hátterű betegség. Jellemző tünetei közé tartozik a szomatomentális elmaradás, hypotonia, mikrokefália és brachykefália. Faciális jellegzetességei közé sorolható a synophrys, hipertelorizmus, arcközép hypoplasia, előre álló orrlyukak, prognátia, előrehajló ajkak és makroglossia. A Kleefstra szindrómában szenvedők esetén megfigyeltek strukturális agyi abnormalitásokat, veleszületett szív rendellenességeket, urogenitális rendellenességeket, rohamokat, valamint súlyos légúti fertőzésekre való hajlamot.

A tudomány jelenlegi állása szerint a Kleefstra szindróma genetikai hátterében az *Euchromatic Histone-Lysine N-Methyltransferase 1 (EHMT1)* (*607001) gén deléciója vagy funkcióvesztéses mutációja áll. Az *EHMT1* a 9-es kromoszóma q34.3 régiójára lokalizálódó gén. A hiszton metiltranszferázok a kromoszómák felépítésében szerepet játszó strukturális fehérjék, a hisztonok metil csoportok általi modifikációját végzik. A hisztonok metilálásával gátolni képesek a normál növekedéshez és működéshez szükséges gének aktivitását.

A Kleefstra-s betegek megközelítőleg 25%-a nem hordoz az *EHMT1* gént érintő deléciót. Ezen érintettek esetén a gén funkcióvesztéses mutációja áll a tünetek kialakulásának hátterében. A szindróma előfordulási gyakoriságát illetően pontos adatok nem ismertek, azonban a FISH és későbbiekben az aCGH széleskörű alkalmazása számos új eset diagnosztizálását tette lehetővé. Kleefstra és mtsai a 9q szubtelomerikus deléció szindróma kialakításában egy a 9q34 genomikus régióra eső, 14 gént tartalmazó, 1.2 Mb méretű minimális kritikus régiót határozott meg, az érintett genomi régió nagysága és a betegek által mutatott fenotípus súlyossága között azonban összefüggés nem mutatható ki [221]. Néhány beteg esetén a Kleefstra szindrómára jellemző alapvető fenotípusos kép hátterében a *Methyl-CpG binding domain protein 5 (MBD5)* (*611472), a *Myeloid/Lymphoid or mixed-lineage leukemia protein 3 (MLL3)* (*606833), a *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily B, member 1 (SMARCB1)* (*601607) és a *Nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3 (NR1I3)* (*603881) epigenetikus szabályozó génekben detektált de novo mutáció kialakulását feltételezik [222].

4. betegünk aCGH vizsgálata a 9q34.3 (2,188 Mb, 138,831,145–141,018,984) kromoszómális régió deléciójának detektálását eredményezte. Az érintett 2,188 Mb-os genomi régió 78 gént tartalmaz, köztük a Kleefstra szindróma kialakításában szerepet játszó *EHMT1* gént. Tünettanát tekintve a beteg fenotípusa teljes mértékben megfelel a Kleefstra szindrómában szenvedő betegek fenotípusos leírásának. (10. táblázat [223])

Tünetek	4. Beteg	5. Beteg	Kleefstra et al.
Nem	-	+	...
MR	+	+	28/28 (100)
Obezitás	-	-	5 (16)
Mikrokefália	-	+	25 (83)
Brachikefália	-	-	12 (33)
Lapos arc	+	+	5 (16)
Középarc hypoplasia	+	+	16 (53)
Durva arcvonások	-	-	8 (27)
Hipertelorizmus	-	+	15 (50)
Synophrys	-	-	16 (53)
Ferdén lefelé álló szemrések	+	-	6 (20)
Ferdén felfelé álló szemrések	-	+	5 (16)
Ívelt szemöldök	-	-	8 (27)
Rövid orr	+	+	17 (57)
Előre álló orrlyukak	-	-	12 (33)
Vastag ajkak	+	+	23 (77)
Makroglossia	-	-	12 (33)
Dens neonatalis	-	-	1 (3)
Vastag alsó ajak	-	+	5 (16)
Hegyes áll	-	+	5(16)
Fül malformációk	-	+	12 (33)
Brachydactylia	-	-	5 (16)
4 ujjas redő	-	-	10 (30)
Abnormális hímvénák	-		10 (33)
Vitium	+	-	15 (50)
Anális atresia	-	-	2 (7)
Alopecia	-	-	3 (10)
Depigmentáció	-	-	1 (3)
Vese ciszta	-	-	2 (7)
Hidronefrózis	-	-	2 (7)
Viselkedészavarok	-	+	4 (9)
Alvászavarok	-	-	3 (10)
Hallás veszteség	+	+	6 (20)
Hypotónia	+	+	15 (50)
Rohamok	+	+	10 (30)

10. táblázat: A 4. és 5. beteg klinikai képének összehasonlítása a szakirodalomban leírt Kleefstra szindrómában szenvedő betegek tünettáblájával

7.5 Az 5. beteg metafázis FISH és aCGH vizsgálata során detektált kópiaszám változások, valamint az érintett gének feltételezhető szerepének vizsgálata

5. betegünk vizsgálata a 9q34.3 terminális régió 139,641,471–140,852,911 pozíciójába eső, 1,211 Mb méretű deléciójának detektálását eredményezte. Az aCGH vizsgálat alapján az 5. beteg a 9q34.3 (1,211 Mb, 139,641,471–140,852,911) kromoszómális régiót tekintve 1 kópiát hordoz. A 4. beteghez hasonlóan a klinikai vizsgálat és a molekuláris diagnosztikai eredmények nála is a Kleefstra szindróma diagnózisának felállításához vezettek. (20./b és 21. ábra)

5. betegünk fenotípusos jegyeit összehasonlítva az irodalomban leírt Kleefstra szindrómás betegekkel, valamint az általunk diagnosztizált 4. beteggel, egy erre a szindrómára nem jellemző antiepileptikum (AED) rezisztenciát észleltünk. (10. táblázat [223]) FISH alapján kapott eredményeinkből kiindulva arra a következtetésre jutottunk, hogy az 5. beteg által mutatott AED rezisztencia hátterében a 4. beteg delécióján kívül eső gének állhatnak. Ezen elképzeléseinket azonban az 5. betegen elvégzett aCGH vizsgálat felülírta, miszerint meglepő módon az 5., AED rezisztenciát mutató betegünk deletált régiója (1,211 Mb, 139,641,471–140,852,911) beleesik a megfelelő AED választ adó 4. betegünk deletált kromoszómális régiójába (2,188 Mb, 138,831,145–141,018,984). (19. ábra) A két beteg deletált régiójába eső gének számának különbsége 21 (*UBAC1*, *NACC2*, *C9orf69*, *LHX3*, *QSOX2*, *GPSM1*, *DNLZ*, *CARD9*, *SNAPC4*, *SDCCAG3*, *PMPCA*, *INPP5E*, *SEC16A*, *C9orf163*, *NOTCH1*, *RP11-251M1.1*, *EGFL7*, *AGPAT2*, *FAM69B*, *SNHG7* és *LCN10*), melyek ezen eredmények alapján feltételezhetően nem játszanak szerepet az 5. beteg esetén tapasztalt AED rezisztencia kialakulásában.

A fenti eredmények alapján a módosult AED válasz kialakulásának hátterében feltételezhetően nem a deléció által érintett genomiális régió kópiaszám csökkenése áll. Más genomi régiók kópiaszám változásai, valamint DNS szekvenciában bekövetkező változások szerepet játszhatnak a Kleefstra szindrómára nem jellemző AED rezisztencia kialakulásában. A konkrét genetikai háttér meghatározásához további vizsgálatok elvégzésére van szükség.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

- Vizsgálataink során epilepsziával és minor anomáliákkal rendelkező betegekben sikerült kimutatnunk aCGH alkalmazásával a szakirodalomban leírt 15q11.2 és 15q13.3 genomi régiók rekurrens duplikációját, a 15q26.3 régiót érintő nem rekurrens deléciót, valamint a Kleefstra szindróma kialakításáért felelős 9q34 genomi régiót érintő deléciót.
- Betegeink genomiális eltéréseit és fenotípusos jegyeiket összehasonlítva a szakirodalomban ismertetett betegekkel, meghatároztuk az érintett régiókban található géneket, melyek a klinikai kép kialakításában szerepet játszhatnak.
- A 15q11.2q13.3 régiót érintő kópiaszám változások és az epilepsziás tünetek közti összefüggés tanulmányozása során arra a következtetésre jutottunk, hogy az érintett genomi régióba lokalizálódó *CHRNA7*, *OTUD7A*, *NDN*, *MAGEL2*, *MKRN3*, *TUBGCP5*, *CYFIP1*, valamint *NIPA1* és *NIPA2* gének kópiaszám többlete jelentős mértékben hozzájárul a posztnatális fejlődési visszamaradottság mellett az epilepsziás rohamok kialakításához is.
- A 15q11.2q13.3 régiót érintő kópiaszám változások és egyéb klinikai tünetek közti összefüggés vizsgálata során arra a következtetésre jutottunk, hogy a 15q13.3 régióba eső *KLF13* gén kópiaszám többlete a szakirodalomban Derwinska által leírtakkal ellentétben nem minden esetben jár szívfejlődési rendellenesség kialakulásával.
- A betegeinkben detektált 15q11.2q13.3 régiót érintő kópiaszám változások tanulmányozása alapján összefüggést feltételezünk a *GABRB3*, *GABRA5* és *GABRG3* gamma aminobutirát receptor alegységeket kódoló gének kópiaszám növekedése, valamint a GABA transzamináz aktivitásának csökkentését, így a GABA szintjének emelését eredményező vigabatrin és valproát pozitív antiepileptikus hatása között.
- A 15-ös gyűrűkromoszómán detektált 15q26.3 terminális deléció és a megfigyelt klinikai tünetek, valamint a szakirodalomban leírt adatok összehasonlítása során megerősítettük a *SELS*, *SNRPA1* és *PCSK6* gének kópiaszám vesztésének és a kialakított szívfejlődési rendellenességeknek ez idáig feltételezett összefüggését.

- A 15-ös gyűrűkromoszóma 15q26.3 régiójának kópiaszám vesztese és a vizsgált 3. beteg dystrophiája közti összefüggés vizsgálata nem támasztotta alá azt a szakirodalmi megállapítást, miszerint az *IGF1R* gént hordozó terminális delécióval rendelkező betegek esetén minden esetben az *IGF1R* gén kópiaszám vesztese áll az alacsony testmagasság hátterében. Feltételezéseink szerint már a 15-ös gyűrűkromoszóma jelenléte önmagában is hozzájárulhat a tünetek megjelenéséhez, illetve az *IGF1R* géntől disztálisan elhelyezkedő genomi régió haploinsufficienciája is meghatározó lehet a növekedési elmaradás kialakításában.

- A Kleefstra szindróma kialakításában szerepet játszó 9q34 genomi régió kópiaszám vesztese mind az általunk vizsgált 4., mind az 5. betegben a szindrómára specifikus tünetek kialakulását eredményezte, azonban az 5. beteg klinikai vizsgálata során AED rezisztenciát figyeltünk meg. Eredményeink alapján a módosult AED válasz kialakulásának hátterében feltételezhetően nem a deléció által érintett genomiális régió kópiaszám csökkenése áll. Más genomi régiók kópiaszám változásai, valamint DNS szekvenciában bekövetkező változások szerepet játszhatnak a Kleefstra szindrómára nem jellemző AED rezisztencia kialakulásában.

- Az epilepsziával és minor malformációkkal rendelkező betegek esetén bizonyítottuk az aCGH alkalmazásának fontosságát a kevésbé specifikus tünettán genetikai hátterének megállapítása érdekében.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Magiorkinis, E., K. Sidiropoulou, and A. Diamantis, *Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity*. Epilepsy Behav, 2010. **17**(1): p. 103-8.
2. Saraceno B, A.G., Lee P, , *Atlas: Epilepsy Care in the World*. 2005, World Health Organization.
3. *Epilepsy: historical overview*. 2011: World Health Organization.
4. Perucca, P. and F.G. Gilliam, *Adverse effects of antiepileptic drugs*. Lancet Neurol, 2012. **11**(9): p. 792-802.
5. Caravati, E.M. 2004: Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Medical toxicology (3. ed.).
6. Haas, L.F., *Hans Berger (1873-1941), Richard Caton (1842-1926), and electroencephalography*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2003. **74**(1): p. 9.
7. Lauterbur, P.C., *Image formation by induced local interactions. Examples employing nuclear magnetic resonance*. 1973. Clin Orthop Relat Res, 1989(244): p. 3-6.
8. PA, R., *The history of MRI*. 2014: Magnetic Resonance in Medicine, 8th edition.
9. Thurman, D.J., et al., *Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy*. Epilepsia, 2011. **52 Suppl 7**: p. 2-26.
10. *Epilepsy*. Vol. Fact Sheets. 2012: World Health Organization.
11. Brodie, M.J., A.T. Elder, and P. Kwan, *Epilepsy in later life*. Lancet Neurol, 2009. **8**(11): p. 1019-30.
12. Holmes, T.R.B., Gregory L. 2008: Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Handbook of epilepsy (4th ed.).
13. Wilden, J.A. and A.A. Cohen-Gadol, *Evaluation of first nonfebrile seizures*. Am Fam Physician, 2012. **86**(4): p. 334-40.
14. Berg, A.T., *Risk of recurrence after a first unprovoked seizure*. Epilepsia, 2008. **49 Suppl 1**: p. 13-8.
15. Centre, N.C.G., *Epilepsies: diagnosis and management*. 2012: National Clinical Guideline Centre. 21-28.
16. Mefford, H.C., *CNVs in Epilepsy*. Curr Genet Med Rep, 2014. **2**: p. 162-167.
17. Centre, N.C.G., *Epilepsies: diagnosis and management*. 2012: National Clinical Guideline Centre. 119-129.
18. Bradley, W.G. 2012: Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, Bradley's neurology in clinical practice. (6th ed. ed.).
19. Engel, J. 2008: Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Epilepsy : a comprehensive textbook (2nd ed. ed.).
20. Simon David A, G.M.J., Aminoff Roger P. 2012: New York: McGraw-Hill Medical, Clinical neurology (8th ed. ed.).
21. Hammer, S.J.M., Gary D. 2010: New York: McGraw-Hill Medical, Pathophysiology of disease : an introduction to clinical medicine (6th ed. ed.).
22. Hughes, J.R., *Absence seizures: a review of recent reports with new concepts*. Epilepsy Behav, 2009. **15**(4): p. 404-12.
23. Shearer, P. Emergency Medicine Practice, Seizures and Status Epilepticus: Diagnosis and Management in the Emergency Department.
24. CP, P. 2010: London: Springer, A clinical guide to epileptic syndromes and their treatment based on the ILAE classifications and practice parameter guidelines (Rev. 2nd ed. ed.).
25. Wheless, J.W. 2009: Shelton, Conn.: People's Medical Pub. House, Advanced therapy in epilepsy.
26. Schachter, S.C. 2008: New York: Demos, Behavioral aspects of epilepsy : principles and practice.
27. Xue, L.Y. and A.L. Ritaccio, *Reflex seizures and reflex epilepsy*. Am J Electroneurodiagnostic Technol, 2006. **46**(1): p. 39-48.
28. Hermann, S. Vol. 107 of Handbook of Clinical Neurology ed. 2012: Newnes, Epilepsy Part I: Basic Principles and Diagnosis E-Book: Handbook of Clinical Neurology.
29. Plioplys, S., D.W. Dunn, and R. Caplan, *10-year research update review: psychiatric problems in children with epilepsy*. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2007. **46**(11): p. 1389-402.
30. Reilly, C.J., *Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in childhood epilepsy*. Res Dev Disabil, 2011. **32**(3): p. 883-93.
31. Levisohn, P.M., *The autism-epilepsy connection*. Epilepsia, 2007. **48 Suppl 9**: p. 33-5.

32. Berkovic, S.F., et al., *Human epilepsies: interaction of genetic and acquired factors*. Trends Neurosci, 2006. **29**(7): p. 391-7.
33. Manford, M., *Assessment and investigation of possible epileptic seizures*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2001. **70 Suppl 2**: p. II3-8.
34. Bhalla, D., et al., *Etiologies of epilepsy: a comprehensive review*. Expert Rev Neurother, 2011. **11**(6): p. 861-76.
35. Shorvon, S.D. 2011: Cambridge University Press, The Causes of Epilepsy: Common and Uncommon Causes in Adults and Children.
36. Sellner, J. and E. Trinka, *Seizures and epilepsy in herpes simplex virus encephalitis: current concepts and future directions of pathogenesis and management*. J Neurol, 2012. **259**(10): p. 2019-30.
37. Newton, C.R. and H.H. Garcia, *Epilepsy in poor regions of the world*. Lancet, 2012. **380**(9848): p. 1193-201.
38. Helbig, I., et al., *Navigating the channels and beyond: unravelling the genetics of the epilepsies*. Lancet Neurol, 2008. **7**(3): p. 231-45.
39. Pandolfo, M., *Genetics of epilepsy*. Semin Neurol, 2011. **31**(5): p. 506-18.
40. Kumar, D. 2008: Oxford: Oxford University Press, Genomics and clinical medicine.
41. Mulley, J.C. and L.M. Dibbens, *Genetic variations and associated pathophysiology in the management of epilepsy*. Appl Clin Genet, 2011. **4**: p. 113-25.
42. Steinlein, O.K., *Genetics and epilepsy*. Dialogues Clin Neurosci, 2008. **10**(1): p. 29-38.
43. Wallace, R.H., et al., *Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel beta1 subunit gene SCN1B*. Nat Genet, 1998. **19**(4): p. 366-70.
44. Patino, G.A., et al., *A functional null mutation of SCN1B in a patient with Dravet syndrome*. J Neurosci, 2009. **29**(34): p. 10764-78.
45. Escayg, A., et al., *Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2*. Nat Genet, 2000. **24**(4): p. 343-5.
46. Mulley, J.C. and H.C. Mefford, *Epilepsy and the new cytogenetics*. Epilepsia, 2011. **52**(3): p. 423-32.
47. Sugawara, T., et al., *A missense mutation of the Na⁺ channel alpha II subunit gene Na(v)1.2 in a patient with febrile and afebrile seizures causes channel dysfunction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(11): p. 6384-9.
48. Heron SE, M.J., *The molecular genetics of the benign epilepsies of infancy*. 2011: Epilepsy. InTech Open Access Publishers.
49. Mefford, H.C. and J.C. Mulley, *Genetically complex epilepsies, copy number variants and syndrome constellations*. Genome Med, 2010. **2**(10): p. 71.
50. Lagrange, A., *Genetic variants in absence epilepsy: a contextual consideration of calcium current kinetics*. Epilepsy Curr, 2006. **6**(3): p. 99-101.
51. Steinlein, O.K., et al., *A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy*. Nat Genet, 1995. **11**(2): p. 201-3.
52. Ottman, R., et al., *Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q*. Nat Genet, 1995. **10**(1): p. 56-60.
53. Kalachikov, S., et al., *Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features*. Nat Genet, 2002. **30**(3): p. 335-41.
54. Baulac, S., et al., *First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene*. Nat Genet, 2001. **28**(1): p. 46-8.
55. Wallace, R.H., et al., *Mutant GABA(A) receptor gamma2-subunit in childhood absence epilepsy and febrile seizures*. Nat Genet, 2001. **28**(1): p. 49-52.
56. Cossette, P., et al., *Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy*. Nat Genet, 2002. **31**(2): p. 184-9.
57. Dibbens, L.M., et al., *GABRD encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABAA receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(13): p. 1315-9.
58. Dibbens, L.M., et al., *X-linked protocadherin 19 mutations cause female-limited epilepsy and cognitive impairment*. Nat Genet, 2008. **40**(6): p. 776-81.

59. *The identification of the PCDH19 mutations in females with epilepsy and cognitive impairment provides a novel class of epilepsy genes.*
60. Archer, H.L., et al., *CDKL5 mutations cause infantile spasms, early onset seizures, and severe mental retardation in female patients.* J Med Genet, 2006. **43**(9): p. 729-34.
61. Bahi-Buisson, N., et al., *Key clinical features to identify girls with CDKL5 mutations.* Brain, 2008. **131**(Pt 10): p. 2647-61.
62. Saitsu, H., et al., *De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy.* Nat Genet, 2008. **40**(6): p. 782-8.
63. Corbett, M.A., et al., *A focal epilepsy and intellectual disability syndrome is due to a mutation in TBC1D24.* Am J Hum Genet, 2010. **87**(3): p. 371-5.
64. Falace, A., et al., *TBC1D24, an ARF6-interacting protein, is mutated in familial infantile myoclonic epilepsy.* Am J Hum Genet, 2010. **87**(3): p. 365-70.
65. Shen, J., et al., *ASPM mutations identified in patients with primary microcephaly and seizures.* J Med Genet, 2005. **42**(9): p. 725-9.
66. Shen, J., et al., *Mutations in PNKP cause microcephaly, seizures and defects in DNA repair.* Nat Genet, 2010. **42**(3): p. 245-9.
67. Poirier, K., et al., *Large spectrum of lissencephaly and pachygyria phenotypes resulting from de novo missense mutations in tubulin alpha 1A (TUBA1A).* Hum Mutat, 2007. **28**(11): p. 1055-64.
68. Bahi-Buisson, N., et al., *Refinement of cortical dysgeneses spectrum associated with TUBA1A mutations.* J Med Genet, 2008. **45**(10): p. 647-53.
69. Jaglin, X.H. and J. Chelly, *Tubulin-related cortical dysgeneses: microtubule dysfunction underlying neuronal migration defects.* Trends Genet, 2009. **25**(12): p. 555-66.
70. Reiner, O., et al., *Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats.* Nature, 1993. **364**(6439): p. 717-21.
71. Gleeson, J.G., et al., *Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein.* Cell, 1998. **92**(1): p. 63-72.
72. des Portes, V., et al., *A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome.* Cell, 1998. **92**(1): p. 51-61.
73. Kitamura, K., et al., *Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans.* Nat Genet, 2002. **32**(3): p. 359-69.
74. Kitamura, K., et al., *Three human ARX mutations cause the lissencephaly-like and mental retardation with epilepsy-like pleiotropic phenotypes in mice.* Hum Mol Genet, 2009. **18**(19): p. 3708-24.
75. Fox, J.W., et al., *Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia.* Neuron, 1998. **21**(6): p. 1315-25.
76. Piao, X., et al., *G protein-coupled receptor-dependent development of human frontal cortex.* Science, 2004. **303**(5666): p. 2033-6.
77. Amir, R.E., et al., *Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2.* Nat Genet, 1999. **23**(2): p. 185-8.
78. Pericak-Vance, M.A., et al., *Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage.* Am J Hum Genet, 1991. **48**(6): p. 1034-50.
79. Corder, E.H., et al., *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families.* Science, 1993. **261**(5123): p. 921-3.
80. Saunders, A.M., et al., *Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease.* Neurology, 1993. **43**(8): p. 1467-72.
81. Fu, Y.H., et al., *Association of apolipoprotein E polymorphisms with temporal lobe epilepsy in a Chinese Han population.* Epilepsy Res, 2010. **91**(2-3): p. 253-9.
82. Tomlinson, I.P. and W.F. Bodmer, *The HLA system and the analysis of multifactorial genetic disease.* Trends Genet, 1995. **11**(12): p. 493-8.
83. Greenberg, D.A., et al., *Association of HLA class II alleles in patients with juvenile myoclonic epilepsy compared with patients with other forms of adolescent-onset generalized epilepsy.* Neurology, 1996. **47**(3): p. 750-5.

84. Reid, C.A., S.F. Berkovic, and S. Petrou, *Mechanisms of human inherited epilepsies*. Prog Neurobiol, 2009. **87**(1): p. 41-57.
85. Ottman, R., et al., *Genetic testing in the epilepsies--report of the ILAE Genetics Commission*. Epilepsia, 2010. **51**(4): p. 655-70.
86. Mulley, J.C., et al., *Channelopathies as a genetic cause of epilepsy*. Curr Opin Neurol, 2003. **16**(2): p. 171-6.
87. Prasad AN, P.C. 2008: New York: Pediatric epilepsy. Demos, Genetic influences on the risk for epilepsy.
88. Poduri, A. and D. Lowenstein, *Epilepsy genetics--past, present, and future*. Curr Opin Genet Dev, 2011. **21**(3): p. 325-32.
89. Claes, L., et al., *De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy*. Am J Hum Genet, 2001. **68**(6): p. 1327-32.
90. Depienne, C., et al., *Spectrum of SCN1A gene mutations associated with Dravet syndrome: analysis of 333 patients*. J Med Genet, 2009. **46**(3): p. 183-91.
91. Phillips, H.A., et al., *A de novo mutation in sporadic nocturnal frontal lobe epilepsy*. Ann Neurol, 2000. **48**(2): p. 264-7.
92. Bisulli, F., et al., *A de novo LGI1 mutation in sporadic partial epilepsy with auditory features*. Ann Neurol, 2004. **56**(3): p. 455-6.
93. Claes, L.R., et al., *De novo KCNQ2 mutations in patients with benign neonatal seizures*. Neurology, 2004. **63**(11): p. 2155-8.
94. Bertrand, D., et al., *The CHRN2 mutation I312M is associated with epilepsy and distinct memory deficits*. Neurobiol Dis, 2005. **20**(3): p. 799-804.
95. Michelucci, R., et al., *A de novo LGI1 mutation causing idiopathic partial epilepsy with telephone-induced seizures*. Neurology, 2007. **68**(24): p. 2150-1.
96. Ishii, A., et al., *A de novo KCNQ2 mutation detected in non-familial benign neonatal convulsions*. Brain Dev, 2009. **31**(1): p. 27-33.
97. Heron, S.E., et al., *Channelopathies in idiopathic epilepsy*. Neurotherapeutics, 2007. **4**(2): p. 295-304.
98. Ottman, R., et al., *Seizure risk in offspring of parents with generalized versus partial epilepsy*. Epilepsia, 1989. **30**(2): p. 157-61.
99. de Kovel, C.G., et al., *Recurrent microdeletions at 15q11.2 and 16p13.11 predispose to idiopathic generalized epilepsies*. Brain, 2010. **133**(Pt 1): p. 23-32.
100. Mefford, H.C., et al., *Genome-wide copy number variation in epilepsy: novel susceptibility loci in idiopathic generalized and focal epilepsies*. PLoS Genet, 2010. **6**(5): p. e1000962.
101. Heinzen, E.L., et al., *Rare deletions at 16p13.11 predispose to a diverse spectrum of sporadic epilepsy syndromes*. Am J Hum Genet, 2010. **86**(5): p. 707-18.
102. Helbig, I., et al., *15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy*. Nat Genet, 2009. **41**(2): p. 160-2.
103. Dibbens, L.M., et al., *Familial and sporadic 15q13.3 microdeletions in idiopathic generalized epilepsy: precedent for disorders with complex inheritance*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(19): p. 3626-31.
104. Sharp, A.J., et al., *A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures*. Nat Genet, 2008. **40**(3): p. 322-8.
105. International Schizophrenia, C., *Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia*. Nature, 2008. **455**(7210): p. 237-41.
106. Stefansson, H., et al., *Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia*. Nature, 2008. **455**(7210): p. 232-6.
107. Kirov, G., et al., *Support for the involvement of large copy number variants in the pathogenesis of schizophrenia*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(8): p. 1497-503.
108. Miller, D.T., et al., *Microdeletion/duplication at 15q13.2q13.3 among individuals with features of autism and other neuropsychiatric disorders*. J Med Genet, 2009. **46**(4): p. 242-8.
109. Pagnamenta, A.T., et al., *A 15q13.3 microdeletion segregating with autism*. Eur J Hum Genet, 2009. **17**(5): p. 687-92.

110. van Bon, B.W., et al., *Further delineation of the 15q13 microdeletion and duplication syndromes: a clinical spectrum varying from non-pathogenic to a severe outcome*. J Med Genet, 2009. **46**(8): p. 511-23.
111. Mefford, H.C., et al., *Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes*. N Engl J Med, 2008. **359**(16): p. 1685-99.
112. Sebat, J., et al., *Strong association of de novo copy number mutations with autism*. Science, 2007. **316**(5823): p. 445-9.
113. Ullmann, R., et al., *Array CGH identifies reciprocal 16p13.1 duplications and deletions that predispose to autism and/or mental retardation*. Hum Mutat, 2007. **28**(7): p. 674-82.
114. Bassett, A.S., et al., *Copy number variations and risk for schizophrenia in 22q11.2 deletion syndrome*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(24): p. 4045-53.
115. Brunetti-Pierri, N., et al., *Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities*. Nat Genet, 2008. **40**(12): p. 1466-71.
116. Cook, E.H., Jr. and S.W. Scherer, *Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions*. Nature, 2008. **455**(7215): p. 919-23.
117. Kumar, R.A., et al., *Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(4): p. 628-38.
118. Marshall, C.R., et al., *Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder*. Am J Hum Genet, 2008. **82**(2): p. 477-88.
119. Sharp, A.J., *Emerging themes and new challenges in defining the role of structural variation in human disease*. Hum Mutat, 2009. **30**(2): p. 135-44.
120. Slavotinek, A.M., *Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays*. Hum Genet, 2008. **124**(1): p. 1-17.
121. Weiss, L.A., et al., *Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism*. N Engl J Med, 2008. **358**(7): p. 667-75.
122. Hannes, F.D., et al., *Recurrent reciprocal deletions and duplications of 16p13.11: the deletion is a risk factor for MR/MCA while the duplication may be a rare benign variant*. J Med Genet, 2009. **46**(4): p. 223-32.
123. Itsara, A., et al., *Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease*. Am J Hum Genet, 2009. **84**(2): p. 148-61.
124. Need, A.C., et al., *A genome-wide investigation of SNPs and CNVs in schizophrenia*. PLoS Genet, 2009. **5**(2): p. e1000373.
125. Epi, K.C., *Epi4K: gene discovery in 4,000 genomes*. Epilepsia, 2012. **53**(8): p. 1457-67.
126. Bartnik, M., et al., *Application of array comparative genomic hybridization in 102 patients with epilepsy and additional neurodevelopmental disorders*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2012. **159B**(7): p. 760-71.
127. Mefford, H.C., et al., *Rare copy number variants are an important cause of epileptic encephalopathies*. Ann Neurol, 2011. **70**(6): p. 974-85.
128. Miller, D.T., et al., *Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies*. Am J Hum Genet, 2010. **86**(5): p. 749-64.
129. Centre, N.C.G., *Epilepsies: diagnosis and management*. 2012: National Clinical Guideline Centre. 57-83.
130. Eadie, M.J., *Shortcomings in the current treatment of epilepsy*. Expert Rev Neurother, 2012. **12**(12): p. 1419-27.
131. Centre, N.C.G., *Epilepsies: diagnosis and management*. 2012: National Clinical Guideline Centre. 55-56.
132. Wyllie, E. 2012: Lippincott Williams & Wilkins, Wyllie's Treatment of Epilepsy: Principles and Practice.
133. Steven R Flanagan, H.Z., Alex Moroz, *Medical aspects of disability; a handbook for the rehabilitation professional*. 4th ed. 2010: New York: Springer.
134. Nolan, S.J., et al., *Phenytoin versus valproate monotherapy for partial onset seizures and generalised onset tonic-clonic seizures*. Cochrane Database Syst Rev, 2013. **8**: p. CD001769.

135. *The Cochrane database of systematic reviews 8: CD001769.*
136. Tudur Smith, C., et al., *Carbamazepine versus phenytoin monotherapy for epilepsy*. Cochrane Database Syst Rev, 2002(2): p. CD001911.
137. *The Cochrane database of systematic reviews (2): CD001911.*
138. Prevention, C.f.D.C.a. *Birth Defects Research*. 2015; Available from: <http://www.cdc.gov/ncbddd/aboutus/annualreport2015/ar-birth-defects.html>.
139. O'Rahilly, R.M., F., *Human embryology & teratology*. 2001: New York: Wiley-Liss.
140. Trasler, J.M. and T. Doerksen, *Teratogen update: paternal exposures-reproductive risks*. *Teratology*, 1999. **60**(3): p. 161-72.
141. Rosenblum, N.D. *Overview of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT)*. 2015; Available from: <http://www.uptodate.com/contents/overview-of-congenital-anomalies-of-the-kidney-and-urinary-tract-cakut>.
142. Whichello, G.J., *Smith's Recognizable Patterns of Human Deformations*. 3rd ed. 2007: Philadelphia Saunders.
143. Daily, D.K., H.H. Ardinger, and G.E. Holmes, *Identification and evaluation of mental retardation*. *Am Fam Physician*, 2000. **61**(4): p. 1059-67, 1070.
144. Wilmschurst, L., *"General+learning+disability" Clinical and Educational Child Psychology and Ecological Transactional Approach to Understanding Child Problems and Intervention*. 2012: Hoboken: Wiley.
145. Badano, J.L., et al., *The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders*. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2006. **7**: p. 125-48.
146. Siderius, L.E., et al., *X-linked mental retardation associated with cleft lip/palate maps to Xp11.3-q21.3*. *Am J Med Genet*, 1999. **85**(3): p. 216-20.
147. Laumonnier, F., et al., *Mutations in PHF8 are associated with X linked mental retardation and cleft lip/cleft palate*. *J Med Genet*, 2005. **42**(10): p. 780-6.
148. G., M.D., *"In Raising the World's I.Q., the secret's in the Salt"*. 2006, New York Times.
149. Elek, S.D. and H. Stern, *Development of a vaccine against mental retardation caused by cytomegalovirus infection in utero*. *Lancet*, 1974. **1**(7845): p. 1-5.
150. Reynolds, D.W., et al., *Inapparent congenital cytomegalovirus infection with elevated cord IgM levels. Casual relation with auditory and mental deficiency*. *N Engl J Med*, 1974. **290**(6): p. 291-6.
151. Inc., S.C.S. *Intellectual Disability and Severity Codes - Intellectual Disabilities*. 2013; Available from: http://www.sevencounties.org/poc/view_doc.php?type=doc&id=10351.
152. Channel, B.H. *Intellectual Disability*. 2013; Available from: http://www.betterhealth.vic.gov.au/bhcv2/bhcarticles.nsf/pages/Intellectual_disability.
153. Initiative, S.F.A.R. *Intellectual disability's DSM-5 debut SFARI.org*. 2013; Available from: <http://sfari.org/news-and-opinion/specials/2013/dsm-5-special-report/intellectual-disabilitys-dsm-5-debut/>.
154. Kallioniemi, A., et al., *Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors*. *Science*, 1992. **258**(5083): p. 818-21.
155. Strachan T, R.A. 2010: Garland Science: Human Molecular Genetics.
156. Weiss, M.M., et al., *Comparative genomic hybridisation*. *Mol Pathol*, 1999. **52**(5): p. 243-51.
157. Pinkel, D. and D.G. Albertson, *Comparative genomic hybridization*. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2005. **6**: p. 331-54.
158. de Ravel, T.J., et al., *What's new in karyotyping? The move towards array comparative genomic hybridisation (CGH)*. *Eur J Pediatr*, 2007. **166**(7): p. 637-43.
159. Pinkel, D. and D.G. Albertson, *Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer*. *Nat Genet*, 2005. **37 Suppl**: p. S11-7.
160. Oostlander, A.E., G.A. Meijer, and B. Ylstra, *Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics*. *Clin Genet*, 2004. **66**(6): p. 488-95.
161. Ren, H., et al., *BAC-based PCR fragment microarray: high-resolution detection of chromosomal deletion and duplication breakpoints*. *Hum Mutat*, 2005. **25**(5): p. 476-82.
162. Urban, A.E., et al., *High-resolution mapping of DNA copy alterations in human chromosome 22 using high-density tiling oligonucleotide arrays*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(12): p. 4534-9.

163. Yang, J., et al., *A study of two Chinese patients with tetrasomy and pentasomy 15q11q13 including Prader-Willi/Angelman syndrome critical region present with developmental delays and mental impairment*. BMC Med Genet, 2013. **14**: p. 9.
164. Koochek, M., et al., *15q duplication associated with autism in a multiplex family with a familial cryptic translocation t(14;15)(q11.2;q13.3) detected using array-CGH*. Clin Genet, 2006. **69**(2): p. 124-34.
165. Wu, D.J., et al., *Autistic disorder associated with a paternally derived unbalanced translocation leading to duplication of chromosome 15pter-q13.2: a case report*. Mol Cytogenet, 2009. **2**: p. 27.
166. Tan, E.S., et al., *Chromosome 15q11-q13 copy number gain detected by array-CGH in two cases with a maternal methylation pattern*. Mol Cytogenet, 2014. **7**: p. 32.
167. Clayton-Smith, J., et al., *Duplication of chromosome 15 in the region 15q11-13 in a patient with developmental delay and ataxia with similarities to Angelman syndrome*. J Med Genet, 1993. **30**(6): p. 529-31.
168. Michelson, M., et al., *Familial partial trisomy 15q11-13 presenting as intractable epilepsy in the child and schizophrenia in the mother*. Eur J Paediatr Neurol, 2011. **15**(3): p. 230-3.
169. Mohandas, T.K., et al., *Paternally derived de novo interstitial duplication of proximal 15q in a patient with developmental delay*. Am J Med Genet, 1999. **82**(4): p. 294-300.
170. Kim, J.S., et al., *A case of isodicentric chromosome 15 presented with epilepsy and developmental delay*. Korean J Pediatr, 2012. **55**(12): p. 487-90.
171. Wang, H., et al., *Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation*. Nature, 2003. **421**(6921): p. 384-8.
172. Lacaze, E., et al., *De novo 15q13.3 microdeletion with cryptogenic West syndrome*. Am J Med Genet A, 2013. **161A**(10): p. 2582-7.
173. Valbonesi, S., et al., *Copy number variants in attention-deficit hyperactive disorder: identification of the 15q13 deletion and its functional role*. Psychiatr Genet, 2015. **25**(2): p. 59-70.
174. Soler-Alfonso, C., et al., *CHRNA7 triplication associated with cognitive impairment and neuropsychiatric phenotypes in a three-generation pedigree*. Eur J Hum Genet, 2014. **22**(9): p. 1071-6.
175. Lui, J.C., et al., *An imprinted gene network that controls mammalian somatic growth is down-regulated during postnatal growth deceleration in multiple organs*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. **295**(1): p. R189-96.
176. Tsang, H.T., et al., *The hereditary spastic paraplegia proteins NIPA1, spastin and spartin are inhibitors of mammalian BMP signalling*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(20): p. 3805-21.
177. Skryabin, B.V., et al., *Deletion of the MBII-85 snoRNA gene cluster in mice results in postnatal growth retardation*. PLoS Genet, 2007. **3**(12): p. e235.
178. Battaglia, A., *The inv dup (15) or idic (15) syndrome (Tetrasomy 15q)*. Orphanet J Rare Dis, 2008. **3**: p. 30.
179. Masurel-Paulet, A., et al., *Delineation of 15q13.3 microdeletions*. Clin Genet, 2010. **78**(2): p. 149-61.
180. Campos, C.M., et al., *Investigation of copy number variation in children with conotruncal heart defects*. Arq Bras Cardiol, 2015. **104**(1): p. 24-31.
181. Lavalley, G., et al., *The Kruppel-like transcription factor KLF13 is a novel regulator of heart development*. EMBO J, 2006. **25**(21): p. 5201-13.
182. Nemer, M. and M.E. Horb, *The KLF family of transcriptional regulators in cardiomyocyte proliferation and differentiation*. Cell Cycle, 2007. **6**(2): p. 117-21.
183. Derwinska, K., et al., *Assessment of the role of copy-number variants in 150 patients with congenital heart defects*. Med Wieku Rozwoj, 2012. **16**(3): p. 175-82.
184. Davis, R., D.H. Peters, and D. McTavish, *Valproic acid. A reappraisal of its pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy*. Drugs, 1994. **47**(2): p. 332-72.
185. Grant, S.M. and R.C. Heel, *Vigabatrin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in epilepsy and disorders of motor control*. Drugs, 1991. **41**(6): p. 889-926.
186. Shelp, B.J., A.W. Bown, and M.D. McLean, *Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid*. Trends Plant Sci, 1999. **4**(11): p. 446-452.

187. Robinson, W.P., et al., *Molecular, cytogenetic, and clinical investigations of Prader-Willi syndrome patients*. Am J Hum Genet, 1991. **49**(6): p. 1219-34.
188. Cassidy, S.B., et al., *Prader-Willi syndrome*. Genet Med, 2012. **14**(1): p. 10-26.
189. Szabo, A., et al., *Partial tetrasomy of the proximal long arm of chromosome 15 in two patients: the significance of the gene dosage in terms of phenotype*. Mol Cytogenet, 2015. **8**: p. 41.
190. Francois, C., et al., *Behavioural disorders induced by external globus pallidus dysfunction in primates II. Anatomical study*. Brain, 2004. **127**(Pt 9): p. 2055-70.
191. Nagase, T., R. Kikuno, and O. Ohara, *Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XXI. The complete sequences of 60 new cDNA clones from brain which code for large proteins*. DNA Res, 2001. **8**(4): p. 179-87.
192. Rainier, S., et al., *NIPA1 gene mutations cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia (SPG6)*. Am J Hum Genet, 2003. **73**(4): p. 967-71.
193. Zhao, J., et al., *Hereditary spastic paraplegia-associated mutations in the NIPA1 gene and its Caenorhabditis elegans homolog trigger neural degeneration in vitro and in vivo through a gain-of-function mechanism*. J Neurosci, 2008. **28**(51): p. 13938-51.
194. Goytain, A., R.M. Hines, and G.A. Quamme, *Functional characterization of NIPA2, a selective Mg²⁺ transporter*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **295**(4): p. C944-53.
195. Chai, J.H., et al., *Identification of four highly conserved genes between breakpoint hotspots BP1 and BP2 of the Prader-Willi/Angelman syndromes deletion region that have undergone evolutionary transposition mediated by flanking duplicons*. Am J Hum Genet, 2003. **73**(4): p. 898-925.
196. Schenck, A., et al., *A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8844-9.
197. DECIPHER. 2016; Available from: <https://decipher.sanger.ac.uk/patient/2502#overview>.
198. Ester, W.A., et al., *Two short children born small for gestational age with insulin-like growth factor 1 receptor haploinsufficiency illustrate the heterogeneity of its phenotype*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(12): p. 4717-27.
199. Rudaks, L.I., et al., *Short stature due to 15q26 microdeletion involving IGF1R: report of an additional case and review of the literature*. Am J Med Genet A, 2011. **155A**(12): p. 3139-43.
200. Rujirabanjerd, S., et al., *De novo subtelomeric deletion of 15q associated with satellite translocation in a child with developmental delay and severe growth retardation*. Am J Med Genet A, 2007. **143A**(3): p. 271-6.
201. Dateki, S., et al., *Identification of chromosome 15q26 terminal deletion with telomere sequences and its bearing on genotype-phenotype analysis*. Endocr J, 2011. **58**(3): p. 155-9.
202. Walenkamp, M.J., et al., *Successful long-term growth hormone therapy in a girl with haploinsufficiency of the insulin-like growth factor-I receptor due to a terminal 15q26.2->qter deletion detected by multiplex ligation probe amplification*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(6): p. 2421-5.
203. Lin, S.Y., et al., *Epigenetic profiling of the H19 differentially methylated region and comprehensive whole genome array-based analysis in Silver-Russell syndrome*. Am J Med Genet A, 2010. **152A**(10): p. 2521-8.
204. Pinson, L., et al., *Detection of an unexpected subtelomeric 15q26.2 --> qter deletion in a little girl: clinical and cytogenetic studies*. Am J Med Genet A, 2005. **138A**(2): p. 160-5.
205. Rump, P., et al., *Drayer's syndrome of mental retardation, microcephaly, short stature and absent phalanges is caused by a recurrent deletion of chromosome 15(q26.2-->qter)*. Clin Genet, 2008. **74**(5): p. 455-62.
206. Davidsson, J., et al., *Array based characterization of a terminal deletion involving chromosome subband 15q26.2: an emerging syndrome associated with growth retardation, cardiac defects and developmental delay*. BMC Med Genet, 2008. **9**: p. 2.
207. Poot, M., et al., *Variable behavioural phenotypes of patients with monosomies of 15q26 and a review of 16 cases*. Eur J Med Genet, 2013. **56**(7): p. 346-50.

208. Tonnie, H., et al., *De novo terminal deletion of chromosome 15q26.1 characterised by comparative genomic hybridisation and FISH with locus specific probes*. J Med Genet, 2001. **38**(9): p. 617-21.
209. Bruce, S., et al., *Submicroscopic genomic alterations in Silver-Russell syndrome and Silver-Russell-like patients*. J Med Genet, 2010. **47**(12): p. 816-22.
210. Veenma, D.C., et al., *Phenotype-genotype correlation in a familial IGF1R microdeletion case*. J Med Genet, 2010. **47**(7): p. 492-8.
211. Klaassens, M., et al., *Congenital diaphragmatic hernia and chromosome 15q26: determination of a candidate region by use of fluorescent in situ hybridization and array-based comparative genomic hybridization*. Am J Hum Genet, 2005. **76**(5): p. 877-82.
212. Dhamija, R., et al., *Microdeletion of chromosome 15q26.1 in a child with intractable generalized epilepsy*. Pediatr Neurol, 2011. **45**(1): p. 60-2.
213. Alanne, M., et al., *Variation in the selenoprotein S gene locus is associated with coronary heart disease and ischemic stroke in two independent Finnish cohorts*. Hum Genet, 2007. **122**(3-4): p. 355-65.
214. Cox, A.J., et al., *Polymorphisms in the Selenoprotein S gene and subclinical cardiovascular disease in the Diabetes Heart Study*. Acta Diabetol, 2013. **50**(3): p. 391-9.
215. Flaquer, A., et al., *Genome-wide linkage analysis of congenital heart defects using MOD score analysis identifies two novel loci*. BMC Genet, 2013. **14**: p. 44.
216. Biggio, J.R., Jr., et al., *Congenital diaphragmatic hernia: is 15q26.1-26.2 a candidate locus?* Am J Med Genet A, 2004. **126A**(2): p. 183-5.
217. Hatem, E., et al., *Molecular characterization of a ring chromosome 15 in a fetus with intra uterine growth retardation and diaphragmatic hernia*. Prenat Diagn, 2007. **27**(5): p. 471-4.
218. Lopez, I., et al., *Prenatal diagnosis of de novo deletions of 8p23.1 or 15q26.1 in two fetuses with diaphragmatic hernia and congenital heart defects*. Prenat Diagn, 2006. **26**(6): p. 577-80.
219. Roback, E.W., et al., *An infant with deletion of the distal long arm of chromosome 15 (q26.1----qter) and loss of insulin-like growth factor 1 receptor gene*. Am J Med Genet, 1991. **38**(1): p. 74-9.
220. Kosztolanyi, G., *Decreased cell viability of fibroblasts from two patients with a ring chromosome: an in vitro reflection of growth failure?* Am J Med Genet, 1987. **28**(1): p. 181-4.
221. Kleefstra, T., et al., *Disruption of the gene Euchromatin Histone Methyl Transferase1 (Eu-HMTase1) is associated with the 9q34 subtelomeric deletion syndrome*. J Med Genet, 2005. **42**(4): p. 299-306.
222. Kleefstra, T., et al., *Disruption of an EHMT1-associated chromatin-modification module causes intellectual disability*. Am J Hum Genet, 2012. **91**(1): p. 73-82.
223. Kleefstra, T., et al., *Loss-of-function mutations in euchromatin histone methyl transferase 1 (EHMT1) cause the 9q34 subtelomeric deletion syndrome*. Am J Hum Genet, 2006. **79**(2): p. 370-7.

10. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

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

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

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

Impakt Faktor: 2,14

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

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

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

Impakt Faktor: 2,14

Egyéb közlemények

Folyóirat cikkek

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

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

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

Impakt Faktor: 2,664

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

Sarlós P, Kövesdi E, Magyar L, Bánfai Zs, Szabó A, Jávornázy A, Melegh B
WORLD JOURNAL OF GASTROINTESTINAL PATHOPHYSIOLOGY 5:(3) pp. 304-321. (2014)

Impakt Faktor: 0

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

Szalai R, Magyar L, Mátyás P, Duga B, Bánfai Z, Szabó A, Kövesdi E, Melegh B
ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND PHARMACOLOGY 38:(3) pp. 814-820. (2014)

Impakt Faktor: 2,084

Idézhető absztraktok

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

Bánfai Zs, Szabó A, Sümegi K, Duga B, Magyar L, Kövesdi E, Mátyás P, Szalai R, Melegh B
EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS 22: p. 509. (2014)

2. CYP1A1 variant in Roma population samples

Magyar L, Szalai R, Kövesdi E, Bánfai Zs, Duga B, Mátyás P, Szabó A, Melegh B
EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS 22: p. 303. (2014)

3. Asthma related FCER2 variant in Roma and Hungarian populations

Mátyás, Szalai R, Magyar L, Duga B, Kövesdi E, Bánfai Zs, Szabó A, Melegh B
EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS 22: p. 501. (2014)

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

Szabó A, Bánfai Zs, Duga B, Szalai R, Magyar L, Mátyás P, Kövesdi E, Sümegi K, Melegh B

EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS 22: p. 320. (2014)

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

Szalai R, Mátyás P, Magyar L, Bene J, Duga B, Bánfai Zs, Szabó A, Melegh B

EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS 22: p. 298. (2014)

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

Bene J, Sümegi J, Járomi L, Magyar L, Kövesdi E, Duga B, Szalai R, Mátyás P, Szabó A, Bánfai Zs, Melegh B

EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS 21:(2) p. 404. (2013)

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

Duga B, Melegh B I, Járomi L, Magyar L, Sümegi K, Bánfai Zs, Komlósi K, Hadzsiev K, Szabó A, Szalai R, Kövesdi E, Bene J, Kisfali P, Melegh B

EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS 21:(2) p. 556. (2013)

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

Kövesdi E, Hadzsiev K, Komlósi K, Janicsek I, Bene J, Magyar L, Járomi L, Duga B, Sümegi K, Szabó A, Bánfai Zs, Melegh B

EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS 21:(2) p. 566. (2013)

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

Magyar L, Várszegi D, Sarlós P, Járomi L, Bene J, Duga B, Hadzsiev K, Kisfali P, Komlósi K, Kövesdi E, Mátyás P, Szabó A, Szalai R, Melegh B

EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS 21:(2) p. 565. (2013)

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

Szalai R, Sipeky Cs, Járomi L, Magyar L, Mátyás P, Bene J, Duga B, Kövesdi E, Szabó A, Melegh B

EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS 21:(2) p. 383. (2013)

11. Törökök, magyarok és romák keveredése a Kárpát-medencében

Bánfai Zs, Szabó A, Duga B, Sümegi K, Kövesdi E, Szalai R, Mátyás P, Magyar L, Melegh B

A Magyar Humángenetikai Társaság X. Kongresszusa, Budapest, 2014. szeptember 4-6.

12. Genetikai kapcsolat vizsgálata európai romák és 8 kaukázusi etnikum között, melyekkel feltételezhetően keveredtek vándorlásuk során.

Szabó A, Bánfai Zs, Duga B, Sümegi K, Kövesdi E, Magyar L, Mátyás P, Szalai R, Melegh B

A Magyar Humángenetikai Társaság X. Kongresszusa, Budapest, 2014. szeptember 4-6.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

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

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

12. MELLÉKLETEK

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

CASE REPORT

Open Access



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

Andras Szabo^{1,2}, Marta Czako^{1,2}, Kinga Hadzsiev^{1,2}, Balazs Duga^{1,2}, Katalin Komlosi^{1,2} and Bela Melegh^{1,2*}

Abstract

Background: Large amounts of low copy number repeats in the 15q11.2q13.3 chromosomal region increase the possibility of misalignments and unequal crossover during meiosis in this region, leading to deletions, duplications, triplications and supernumerary chromosomes. Most of the reported cases with epilepsy, autism and Prader-Willi/Angelman syndrome are in association with rearrangements of the proximal long arm of chromosome 15.

Results: Here we report the first two unrelated Hungarian patients with the same epileptic and dysmorphic features, who were investigated by array comparative genomic hybridization (array CGH). By G-banded karyotype followed by FISH and array CGH we could detect partial tetrasomy of the 15q11.2q13.3 chromosomal region, supporting proximal 15q duplication syndrome. Findings of the array CGH gave fully explanation of the phenotypic features of these patients, including epileptic seizures, delayed development, hyperactivity and craniofacial dysmorphic signs. Besides the described features of isodicentric (15) (idic(15)) syndrome Patient 1. suffered from bigeminec extrasystoles and had postnatal growth retardation, which had been published only in a few articles.

Conclusions: Dosage effect of some genes in the concerned genomic region is known, but several genes have no evidence to have dosage dependence. Our results expanded the previous literature data. We assume dosage dependence in the case of *CHRNA7* and *OTUD7A*, which might be involved in growth regulation. On the other hand increased dosage of the *KLF13* gene seems to have no direct causal relationship with heart morphology. The genomic environment of the affected genes may be responsible for the observed phenotype.

Keywords: Array CGH, Epilepsy, Dysmorphism, 15q duplication syndrome, Supernumerary chromosome

Background

Karyotyping and FISH are essential parts of the clinical evaluation of patients with epilepsy and dysmorphic features. FISH investigation is necessary in cases where (bi)satellited supernumerary chromosome is present in order to establish the chromosomal origin and the involvement of Prader-Willi/Angelman region (PWACR) in those with proven chromosome 15 (chr15) material. Increasing usage of array comparative genomic hybridization (array CGH) in the examination of patients with epilepsy and dysmorphic features allows the determination of the correlation between phenotype and genotype. Clinical studies investigated the function of chromosomal

microarray analysis in the diagnosis of patients with epilepsy, and described an association between chromosomal copy number variations, intrachromosomal rearrangements and epileptic features [1]. Nevertheless, the genetic background of dysmorphic features remains unidentified despite the extensive investigation. This complex disease is associated with several previously described chromosomal alterations.

Small supernumerary marker chromosomes derived from the chr15 (sSMC(15)s) has been more frequently reported in connection with dysmorphic features and cause several phenotypes including intellectual disability, growth deficiency, triangular facies, and brachydactyly [2,3]. During the formation of this sSMC(15) a translocation occurs between the homolog chr15s, typically in the course of maternal meiosis, mediated by the low copy repeats being present within 15q11-q14. The following

* Correspondence: melegh.bela@pte.hu

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

²Szentagotai Research Centre, Ifjusag 20, H-7624 Pecs, Hungary



© 2015 Szabo et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

step is a non-disjunction and usually inactivation of one of the centromeres. Due to postzygotic correction a mosaic state is not uncommon. Within the 15q11q14 region five common breakpoints were identified (BP1 to BP5). The classification of sSMC(15)s is based on the euchromatin content (namely on the site of recombination). In contrast with the small sSMC(15)s containing the chromosomal material proximal to 15q12 and being clinically neutral, the larger sSMC(15)s resulting in partial trisomy or tetrasomy of Prader-Willi/Angelman region cause abnormal phenotype, in particular when of maternal origin [4]. Symptoms can vary depending on location of the breakpoints, copy numbers of the PWACR region and on the ratio of mosaicism. Clinical phenotype mostly includes early-onset central hypotonia, seizures, poor motor coordination, speech delay, moderate to severe learning disability, mild dysmorphic features, autism and schizophrenia [5–18]. Cytogenetically visible duplications (OMIM #608636) of this region are also reported, and lead to a disorder called 15q duplication syndrome, mostly manifested by neurobehavioral phenotypes [19]. These duplications occur mostly in two forms, including an extra isodicentric 15 (idic (15)) chromosome or an interstitial duplication 15. Based on previous literature data we can assume that patients with idic (15) of paternal origin seem to have normal development however, maternal aberrations can lead to developmental problems [4,20,21]. In most of the cases the 15q duplication syndrome is not inherited, but occurs randomly during the formation of reproductive cells. Wide range of developmental disabilities was experienced in the case of the individuals with 15q duplication syndrome. Examinations of the syndrome could not show an obvious correlation between the severity of the symptoms and the size of the duplicated region. Copy number changes of this chromosomal region from three to six have been reported in the literature [4,22,21].

In order to establish the chromosomal content more precisely, we applied array CGH investigation of two Hungarian patients.

Case Presentation

Patients

We investigated 2 unrelated Hungarian patients with epilepsy and dysmorphic features.

Patient 1. is a 27 month old boy, first child of a non-consanguineous healthy young couple (father is 32 and mother is 31 years old), the mother has a boy from her first marriage. The family history and the pregnancy were unremarkable. He was delivered at the 40th week of gestation with a birth weight of 3200 g (25–50 pc) and an Apgar score 9/1 and 10/5, respectively. In the perinatal period cardiological examination was performed because of extrasystole. The Holter monitoring

revealed bigeminic extrasystoles, but it regressed spontaneously shortly. His first epileptic seizure developed at 5.5 months of age, and he was never seizure free in spite of numerous different antiepileptic drug combinations. His seizure pattern is very variable, and at four years of age hyperactivity developed. His developmental milestones were delayed, he crept and stood at 18 months, but he could not walk. Speech development was delayed as well, only bubbling was present at 28 months.

At 28 months of age as he was first examined in our institution, his weight was 10 kg (<5 pc), height was 90 cm (50–75 pc) and OFC was 46 cm (<–2 SD). Flat occipital region, epicanthal folds, hyperteloristic eyes, crease of earlobes, broad nasal bridge, micrognathia and severe generalized hypotonia were present.

Patient 2. is a 17 months old girl from the second pregnancy (G2P1) of a non-consanguineous healthy young Caucasian couple (both parents are 32 years old), the family history is unremarkable. The girl was delivered at 41st weeks of gestation with a birth weight of 3520 g (75–90 pc) and Apgar score 1/10 and 5/10. The perinatal period was uneventful. Because of developmental delay she received neurohabilitation from the fourth month of age and West syndrome developed at the sixth month. Therefore vigabatrin treatment was administered, which caused significant seizure frequency reduction. Congenital brain malformation was supposed in the background but the performed brain MRI out of dilated frontal and temporal liquor spaces gave negative results. Her developmental milestones were delayed. At 12 months she sat alone and crawled, at 13 months she stood up, but at 17 months her walking capability was yet very unstable. Her speech development was severely delayed too.

She was referred to our institution because of epilepsy, dysmorphic features and developmental delay at the age of 17 months. At the examination her weight was 13 kg (90 pc), height 85 cm (75–90 pc), OFC 46 cm (–1 SD), and only mild craniofacial dysmorphic signs (prominent forehead, flat occiput, broad face, turned-up nose), broad thorax and small feet could be observed. In her neurological status severe generalized hypotonia, tiptoe walking and stereotype hand movements (clapping and wringing of the hands) were seen.

At her second examination at 29 month of age she could not walk alone and her walk was yet broad-base. Babbling started, but she had no clear words. Her stereotype movements were constant, but her seizure pattern and the frequency were changed. Therefore valproic acid was administered instead of vigabatrin.

Results

GTG banding and FISH

GTG-banded chromosomes at the (550)-band level showed E-group sized supernumerary acrocentric marker

chromosome in Patient 1. and an additional bisatellited chromosome in Patient 2. Because of the clinical symptoms/clinical indication metaphase FISH analyses of the UBE3A locus (Prader-Willi/Angelman Critical Region) was performed in both cases which showed the presence of both, the D15Z1 and UBE3A regions (each in two copies) on the supernumerary marker chromosomes in addition to the normal chromosomes 15 (four copies in all in each cells) (Figure 1). Thus, the karyotype of Patient 1. can be described as 47,XY,+psu idic(15) (pter→q14::q14→pter) and that of Patient 2. is 47,XX,+idic(15)(pter→q14::q14→pter). Both abnormalities resulted in tetrasomy of the 15q11q13 region.

Parental cytogenetic studies were normal.

UPD study

Uniparental disomy of normal chromosomes 15 has been excluded using polymorphic STR markers. None of the two patients has uniparental disomy.

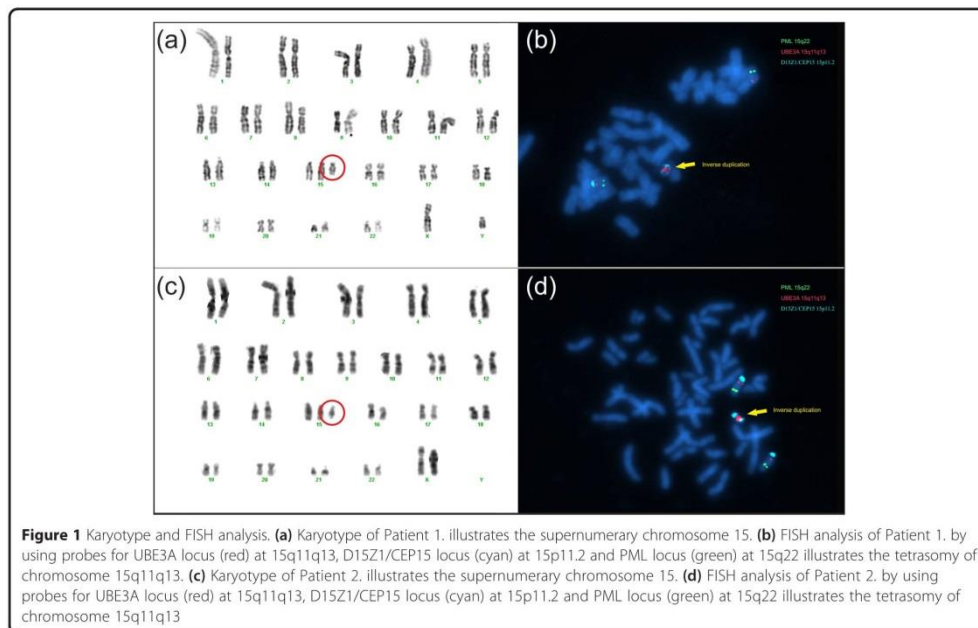
Array-based copy number analysis

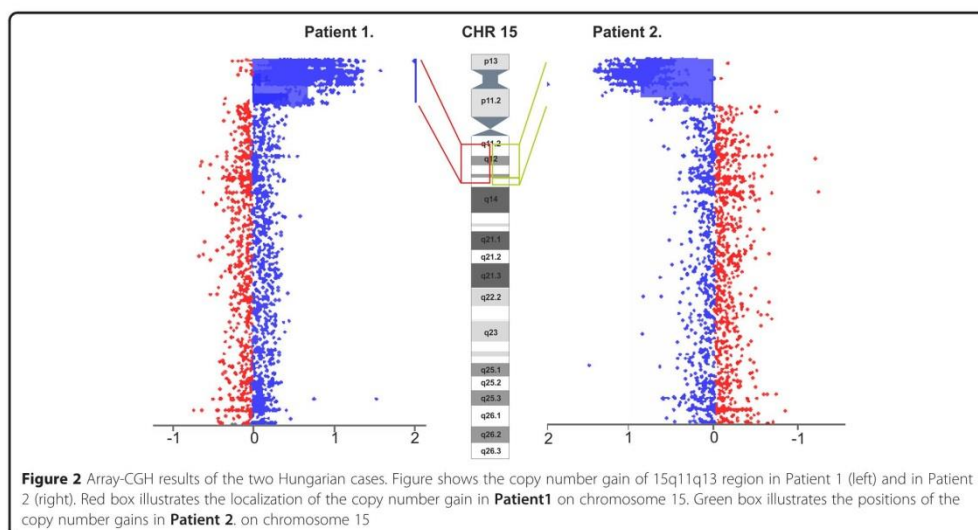
Array CGH of Patient 1. showed an abnormal male array profile with copy number gain in the region **15q11.2q13.3** (22,765,628-32,445,252), while in Patient 2. an abnormal female profile with additional dosage of the regions **15q11.2q13.2** (22,765,628-31,183,907) and **15q13.3** (31,261,835-32,861,626), respectively (Figure 2).

Both two investigated patients had gain in copy number of the 15q11.2q13.3 chromosomal region. Patient 1. had 4 copies of 15q11.2q13.3 (9.68 Mb, chr15:22,765,628-32,445,252), Patient 2. had 4 copies of 15q11.2q13.2 (8.42 Mb, chr15:22,765,628-31,183,907) and of 15q13.3 (1.6 Mb, chr15:31,261,835-32,861,626) chromosomal regions, demonstrating that the psu idic(15) contained two 9.68 Mb 15q11.2q13.3 segments (chr15:22,765,628-32,445,252) in Patient 1. and the +idic(15) contained two 15q11.2q13.2 segments with 8.42 Mb (chr15:22,765,628-31,183,907) and 1.6 Mb of 15q13.3 (chr15:31,261,835-32,861,626) regions in Patient 2.

Discussion

Alterations of the 15q11.2q13.3 chromosomal region lead to a complex phenotypic variability, which greatly complicates the setting of a specific clinical diagnose. Here we present the results of the first study of array CGH analysis in Hungarian patients with epileptic seizures, delayed development, hyperactivity and craniofacial dysmorphic signs where the copy number gain of the region 15q11.2q13.3 (22,765,628-32,445,252) (Patient 1.), and that of 15q11.2q13.2 (22,765,628-31,183,907) and 15q13.3 (31,261,835-32,861,626) (Patient 2.) have been identified in the background of the abnormal phenotype.

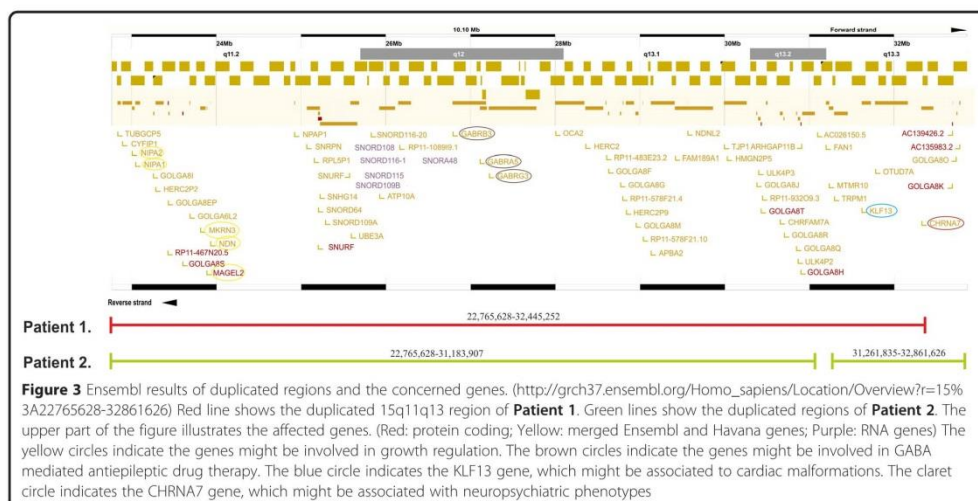




All of the protein coding genes, occurring in the 15q11.2q13.3 (22,765,628-32,861,626) duplicated region are shown in the Additional file 1: Table 1 and Figure 3. Genes within the affected regions are significantly linked to identified clinical disorders, mainly developmental, hereditary and neurological disorders. (Additional file 2: Table 2).

Based on our findings and previous literature data, we concluded, that most of the genes within the affected regions are significantly associated with the phenotypic

features of the two analyzed patients. Hypotonia, delayed motor milestones (sitting up, walking), delayed language development, progressed hypertonia, and similar facial characteristics, including flat nasal bridge, epicanthic and hyperteloristic eyes in Patient 1. can assume a 15q duplication syndrome that affected the 15q11.2q13.3 (22,765,628-32,445,252) chromosomal region [21]. In addition to the symptoms were seen in Patient 1., Patient 2. represented typical Angelman like features including



small feet, turned-up nose, tiptoe walking and stereotype hand movements (clapping and wringing of the hands).

After uneventful prenatal period, both of our patients had normal birth weight. By comparing our cases with the recently published patients investigated by array CGH and affected by 15q duplication syndrome we could identify more defined postnatal growth retardation in the case of Patient 1. (Additional file 3: Table 3). At 28 months of age his weight was only 10 kg (<5 pc), height was 90 cm (50–75 pc) and OFC was 46 cm (<–2 SD) comparing to Patient 2. with a 13 kg (90 pc) weight at age 17 months. On the contrary of the previous reported cases our Patient 1. had normal birth weight and the growth delay occurred subsequently. Proportional short stature was mentioned previously in many cases, but postnatal growth delay associated with low weight was observed to the best of our knowledge only in one 15q13.3 duplicated patient (DECIPHER), in which *CHRNA7* and *OTUD7A* genes have found within the duplicated chromosomal region. The role of the cholinergic nicotinic receptor *CHRNA7* gene has been attributed in neuropsychiatric disorders, epilepsy, cognitive impairment, furthermore, it is essential for inhibiting cytokine synthesis by the cholinergic anti-inflammatory pathway [23]. Dosage sensitivity of the gene has been reported in patients with 15q13.3 deletion in several cases, among them in a West-syndrome patient recently [24], and proved by Valbonesi et al. [25] in a cohort of ADHD patients where deletion and the resulting lower gene expression level was investigated. In a three-generation family with various neuropsychiatric phenotypes, copy number gain of *CHRNA7* showed co-segregation with the symptoms [26]. Our data/cases provide further evidence for the pathogenicity of copy number gain. Literature data of the intronless *NDN*, *MAGEL2*, *MKRN3* and the *NIPA1*, *NIPA2* genes confirm that these genes are involved in growth regulation, nervous system development or transcription. Deletion of the genes in mice and humans presents failure in nervous system development and growth regulation [27–29]. Increased dosage of the mentioned genes could play a role in the development of postnatal growth retardation.

The group of congenital heart defects is one of the most common causes of infant morbidity and mortality with an estimated prevalence of 1–5% of life births. Congenital heart defects caused by idic (15) duplication syndrome occur in about 25% of the cases [4] and 7–18% of patients with the 15q13.3 deletion syndrome (OMIM 612001) had heart defects [30,17,31,32]. Clinical findings from 15q microdeletion cases pointed that mitral valve prolapse, slightly enlarged left ventricle, tetralogy of Fallot and right cardiac hypoplasia with severe tricuspid stenosis could develop by the deletion of the *KLF13* gene of the BP4BP5 chromosomal region. *Kruppel-like transcription*

Factor 13 is a well conserved gene, which encodes a member of the Kruppel-like family of zinc-finger proteins. The protein is identified as a regulator of cardiac gene expression and heart morphogenesis [33,17]. Genetic studies in the *Xenopus* embryos also demonstrated a requirement for *KLF13* in cardiac progenitor cell proliferation and heart morphogenesis [34]. In *KLF13* functional knockout *Xenopus* embryos normal initial heart development was observed but, subsequently, the heart was visibly smaller and showed several defects including a lack of ventricular trabeculation, atrial septal defects, delayed atrioventricular cushion formation and maturation of valves [34]. Derwińska et al. presented a 1.6 Mb 15q13.3 duplication in a patient having cardiac phenotype and suggested that increased dosage of *KLF13* could be the causative of cardiac anomalies [35]. In our case neither patient showed cardiac anomalies, although Patient 1. did present bigemini extrasystole. Based on the limited data available and on our results, we cannot support Derwińska's findings about the association between the increased *KLF13* dosage and cardiac malformations.

Concerning the dosage sensitivity Hamid et. al. reported in the context of pericentric human chromosomal regions, that dosage dependent and dosage independent genes could stand in the background of the clinical effects of the sSMCs. He stated, that sSMCs containing only dosage independent genes could be harmless, while dosage dependent genes in the marker chromosomes could lead to clinical problems [36].

Regarding to the epilepsy specific treatment of the patients, antiepileptic drug therapy, using gamma aminobutyric acid transaminase inhibitor vigabatrin and valproic acid was effective. GABA acts at inhibitory synapses in the brain by binding to specific transmembrane receptors. Both of our patients have a gain in the GABA receptor subunit coding *GABRB3*, *GABRA5* and *GABRG3* genes, which could lead to an increased GABA receptor level. The used antiepileptic drugs increase the level of the GABA protein, by inhibiting the GABA metabolism of GABA transaminases. The higher receptor number associated with the increased GABA level could be a possible explanation for the reduced seizure frequency due to the successful treatment [37–39].

An other database was available [40] containing data of 43 cases with inv dup (15) and seizures. However in this database 42 cases were investigated only with simple karyotyping and only one with array CGH. Additional file 3: Table 3. contains this case. The other 42 patients, thus could be compared to our cases only based on the phenotype. Phenotypic manifestation was mostly the same in our cases and the examined patients, except the presence of defined postnatal growth retardation in the case of Patient 1. The lack of array CGH results could not allow the clarification of the gene-phenotype relationship.

Conclusions

We identified the first two array CGH examined Hungarian patients with tetrasomy of the proximal region of chromosome 15. Alterations of the 15q11.2q13.3 chromosomal region cause complex phenotypic variability, which greatly complicates the setting of a specific clinical diagnose. FISH analysis followed by array CGH provided clinically relevant information of the investigated patients. The copy number gain of the 15q11.2q13.3 chromosomal region could explain the phenotypic presentations characteristic for idic (15) syndrome observed in the patients, including epileptic seizures, delayed development, hyperactivity and craniofacial dysmorphic signs.

In case of a number of genes in the affected chromosomal regions dosage effect evidence was reported, however for certain genes, dosage dependence is not proven. Based on our findings, we could provide additional information for previous literature data in case, that increased dosage of *CHRNA7* and *OTUD7A* genes could lead to postnatal growth delay, so dose dependence of these genes could be assumed. In contrast, dosage dependence of the *KLF13* gene in a patient with an 1.6 Mb duplication involving the *KLF13* gene and in *KLF13* knockout *Xenopus* embryos was presumable, while none of our patients with higher copy number of *KLF13* showed cardiac anomalies. Thus, our results could not verify the dosage dependence of the *KLF13* gene. However it could be concluded, that not only the size of the duplicated region, but the gene content could be responsible for the whole clinical manifestation. Based on our results we can assume, that in case of these genes the development of the expected clinical features could be much better influenced by the copy number of the genes and their genomic environment, than only the size of the duplicated genetic material itself. Nevertheless, in the case of *NDN*, *MAGEL2*, *MKRN3* and the *NIPA1*, *NIPA2* genes confirmation is needed for the causal relationship between copy number gain and postnatal growth delay.

Further investigations are necessary to get better knowledge regarding to the association between the detailed genes and the phenotypes they might cause and to the dosage sensitivity of individual genes affected by the aberrations.

Materials And Methods

GTG banding

Karyotyping of the patient was performed by Giemsa–Trypsin (GTG) banding from peripheral blood lymphocytes using standard procedures [41].

Fluorescent in situ hybridization (FISH)

We performed fluorescence in situ hybridization for the investigation of the supernumerary marker chromosome, using the 15q11-q13 (D15S10/UBE3A) Prader-Willi/

Angelman probe with 15p11.2 (D15Z1/CEP15) and 15q22 (PML) as control probes (Vysis, Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, U.S.A.) [42].

Uniparental disomy study

Uniparental disomy of chromosomes 15 was examined using previously reported D15S11, D15S97, D15S122, D15S113, D15S659, D15S128, D15S210, D15S165, D15S10 and GABRB3 polymorphic STR markers [43,44].

Array CGH

Agilent Human Genome Unrestricted G3 ISCA v2 Sureprint 8x60K oligo-array (Amadid 031746) (Agilent, Santa Clara, CA) was used for array CGH [45]. This high resolution microarray contains 18,851 60-mer oligo probes in ISCA regions + 40,208 backbone probes including coding and non-coding genomic sequences with an average 60 KB overall median probe spacing, respectively (higher in ISCA regions).

DNA purification from blood was performed using the NucleoSpin[®]Dx Blood DNA Purification Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) applying the protocol of the producer. We measured the concentration and purity of the isolated DNA with the NanoDrop spectrophotometer. For labelling and for hybridization we used the Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis – Enzymatic Labelling Protocol. 1 µg from the patient DNA and from a sex-matched reference DNA were digested for 2.5 hrs at 37 °C with AluI and RsaI enzymes. For the labelling of the digested DNA we applied random priming using the Agilent Genomic DNA Labelling Kit (Agilent, Santa Clara, CA). Patient and control DNA were labelled differently. Cy5-dUTP was used for labelling the patient samples and Cy3-dUTP for the control samples. Labelled DNA samples were purified by Amicon Ultra AU-30 filters. The patient and sex-matched reference samples were combined and cohybridized at 65 °C for 24 hrs rotation with 50 µg Human Cot-1 DNA. Washing step was performed using the Agilent Protocol v7.2. Array image was obtained using an Agilent laser scanner G2565CA and analysed with the Agilent FeatureExtraction software (v10.10.1.1.).

The results were presented by Agilent Cytogenomics software (v2.5.8.11). DNA sequence information refers to the public UCSC database. The detected chromosomal changes were aligned to known aberrations listed in publicly available databases. We used the DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources), the Database of Genomic Variants, Ensembl and ECARUCA.

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.

Additional files

Additional file 1: Table 1. Function of protein coding genes of the 15q11.2q13.3 (22,765,628-32,861,626) chromosomal region according to Decipher. (<https://decipher.sanger.ac.uk/>) Notes: Bold: OMIM genes; Italic: Morbid genes; H(D): Haploinsufficiency scores from Decipher: values from 0-100%. Low values (0-10%) indicate more likely to exhibit Haploinsufficiency. The **a** labeling indicates the genes might be involved in growth regulation. The **β** labeling indicates the genes might be involved in GABA mediated antiepileptic drug therapy. The **γ** labeling indicates the KLF13 gene, which might be associated to cardiac malformations. The **δ** labeling indicates the CHRNA7 gene, which might be associated with neuropsychiatric phenotypes.

Additional file 2: Table 2. The list of the genes located in the duplicated regions and the associated diseases.

Additional file 3: Table 3. Comparing clinical features of array CGH investigated 15q11q13 duplication patients and our cases. **a** labeling indicates the postnatal growth retardation phenotype, while **γ** labeling indicates the cardiac symptom of Patient 1.

Abbreviations

Array CGH: Array comparative genomic hybridization; idic(15): Isodicentric chromosome 15; PWACR: Prader-Willi/Angelman critical region; Chr15: Chromosome 15; sSMC(15): Small supernumerary marker chromosome derived from chromosome 15; FISH: Fluorescent in situ hybridization; ASD: Atrial septum defect; VSD: Ventral septum disease; MRI: Magnetic Resonance Image; EEG: Electroencephalography; GTG banding: Giemsa Banding; 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: Database of Genomic Variants; ECARU: European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations.

Competing Interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' Contributions

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

Received: 27 February 2015 Accepted: 21 April 2015

Published online: 25 June 2015

References

- Moon HJ, Yim SV, Lee WK, Jeon YW, Kim YH, Ko YJ, et al. Identification of DNA copy-number aberrations by array-comparative genomic hybridization in patients with schizophrenia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;344(2):531–9. doi:10.1016/j.bbrc.2006.03.156.
- Nicholls RD, Knoll JH, Butler MG, Karam S, Lalande M. Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondeletion Prader-Willi syndrome. *Nature*. 1989;342(6247):281–5. doi:10.1038/342281a0.
- Roback EW, Barakat AJ, Dev VG, Mbikay M, Chretien M, Butler MG. An infant with deletion of the distal long arm of chromosome 15 (q26.1—qter) and

- loss of insulin-like growth factor 1 receptor gene. *Am J Med Genet*. 1991;38(1):74–9. doi:10.1002/ajmg.1320380117.
- Battaglia A. The inv dup (15) or idic (15) syndrome (Tetrasomy 15q). *Orphanet J Rare Dis*. 2008;3:30. doi:10.1186/1750-1172-3-30.
- Roberts SE, Maggouta F, Thomas NS, Jacobs PA, Crolla JA. Molecular and fluorescence in situ hybridization characterization of the breakpoints in 46 large supernumerary marker 15 chromosomes reveals an unexpected level of complexity. *Am J Med Genet*. 2003;73(5):1061–72. doi:10.1086/379155.
- Liehr T, Brude E, Gillissen-Kaesbach G, König R, Mrasek K, von Eggeling F, et al. Prader-Willi syndrome with a karyotype 47, XY,+min(15)(pter->q11.1) and maternal UPD 15—case report plus review of similar cases. *Eur J Med Genet*. 2005;48(2):175–81. doi:10.1016/j.ejmg.2005.01.004.
- Cotter PD, Ledesma CT, Dietz LG, Pusso S, Wohlferd MM, Goldberg JD. Prenatal diagnosis of supernumerary marker 15 chromosomes and exclusion of uniparental disomy for chromosome 15. *Prenat Diagn*. 1999;19(8):721–6.
- Dennis NR, Veltman MW, Thompson R, Craig E, Bolton PF, Thomas NS. Clinical findings in 33 subjects with large supernumerary marker(15) chromosomes and 3 subjects with triplication of 15q11-q13. *Am J Med Genet A*. 2006;140(5):434–41. doi:10.1002/ajmg.a.31091.
- Borelina D, Esperante S, Gutnisky V, Ferreira V, Ferrer M, Giliberto F, et al. Supernumerary marker 15 chromosome in a patient with Prader-Willi syndrome. *Clin Genet*. 2004;65(3):242–3.
- Mann SM, Wang NJ, Liu DH, Wang L, Schultz RA, Dorrani N, et al. Supernumerary trisomic derivative chromosome 15 in two boys with intractable epilepsy: another mechanism for partial hexasomy. *Hum Genet*. 2004;115(2):104–11. doi:10.1007/s00439-004-1127-5.
- Huang XL, de Michelena MI, Mark H, Harston R, Benke PJ, Price SJ, et al. Characterization of an anaphoid supernumerary marker chromosome derived from 15q25-qter using high-resolution CGH and multiplex FISH analyses. *Clin Genet*. 2005;68(6):513–9. doi:10.1111/j.1399-0004.2005.00523.x.
- Cheng SD, Spinner NB, Zackai EH, Knoll JH. Cytogenetic and molecular characterization of inverted duplicated chromosomes 15 from 11 patients. *Am J Med Genet*. 1994;55(4):753–9.
- Rineer S, Finucane B, Simon EW. Autistic symptoms among children and young adults with isodicentric chromosome 15. *Am J Med Genet*. 1998;81(5):428–33.
- McGinniss MJ, Brown DH, Burke LW, Mascarello JT, Jones MC. Ring chromosome X in a child with manifestations of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet*. 1997;70(1):37–42.
- Cockwell AE, Davalos IP, Rivera HR, Crolla JA. FISH characterisation of dynamic mosaicism involving an inv dup(15) in a patient with mental retardation. *Am J Med Genet*. 2001;103(4):289–94.
- Shibuya Y, Tonoki H, Kajii N, Niikawa N. Identification of a marker chromosome as inv dup(15) by molecular analysis. *Clin Genet*. 1991;40(3):233–6.
- van Bon BW, Mefford HC, Menten B, Koolen DA, Sharp AJ, Nillesen WM, et al. Further delineation of the 15q13 microdeletion and duplication syndromes: a clinical spectrum varying from non-pathogenic to a severe outcome. *J Med Genet*. 2009;46(8):511–23. doi:10.1136/jmg.2008.063412.
- Hogart A, Leung KN, Wang NJ, Wu DJ, Driscoll J, Vallero RO, et al. Chromosome 15q11-13 duplication syndrome brain reveals epigenetic alterations in gene expression not predicted from copy number. *J Med Genet*. 2009;46(2):86–93. doi:10.1136/jmg.2008.061580.
- Battaglia A, Parrini B, Tancredi R. The behavioral phenotype of the idic(15) syndrome. *Am J Med Genet C: Semin Med Genet*. 2010;154C(4):448–55. doi:10.1002/ajmg.c.30281.
- Moeschler JB, Mohandas TK, Hawk AB, Noll WW. Estimate of prevalence of proximal 15q duplication syndrome. *Am J Med Genet*. 2002;111(4):440–2. doi:10.1002/ajmg.10419.
- Yang J, Yang Y, Huang Y, Hu Y, Chen X, Sun H, et al. A study of two Chinese patients with tetrasomy and pentasomy 15q11q13 including Prader-Willi/Angelman syndrome critical region present with developmental delays and mental impairment. *BMC Med Genet*. 2013;14:9. doi:10.1186/1471-2350-14-9.
- Wang NJ, Liu D, Parokony AS, Schanen NC. High-resolution molecular characterization of 15q11-q13 rearrangements by array comparative genomic hybridization (array CGH) with detection of gene dosage. *Am J Med Genet*. 2004;75(2):267–81. doi:10.1086/422854.
- Wang H, Yu M, Ochanil M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*. 2003;421(6921):384–8. doi:10.1038/nature01339.

24. Lacaze E, Gruchy N, Penniello-Valette MJ, Plessis G, Richard NJ, Decamp M, et al. De novo 15q13.3 microdeletion with cryptogenic West syndrome. *Am J Med Genet A*. 2013;161A(10):2582–7. doi:10.1002/ajmg.a.36085.
25. Valbonesi S, Magri C, Traversa M, Faraone SV, Cattaneo A, Milanese E, et al. Copy number variants in attention-deficit hyperactive disorder: identification of the 15q13 deletion and its functional role. *Psychiatr Genet*. 2014. doi:10.1097/YPG.0000000000000056.
26. Soler-Alfonso C, Carvalho CM, Ge J, Roney EK, Bader PI, Kolodziejska KE, et al. CHRNA7 triplication associated with cognitive impairment and neuropsychiatric phenotypes in a three-generation pedigree. *Eur J Med Genet*. 2014;22(9):1071–6. doi:10.1038/ejhg.2013.302.
27. Lui JC, Finkelshtain GP, Barnes KM, Baron J. An imprinted gene network that controls mammalian somatic growth is down-regulated during postnatal growth deceleration in multiple organs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295(1):R189–96. doi:10.1152/ajpregu.00182.2008.
28. Tsang HT, Edwards TL, Wang X, Connell JW, Davies RJ, Durrington HJ, et al. The hereditary spastic paraplegia proteins NIPA1, spastin and spartin are inhibitors of mammalian BMP signalling. *Hum Mol Genet*. 2009;18(20):3805–21. doi:10.1093/hmg/ddp324.
29. Skryabin BV, Gubar LV, Seeger B, Pfeiffer J, Handel S, Robeck T, et al. Deletion of the MBII-85 snoRNA gene cluster in mice results in postnatal growth retardation. *PLoS Genet*. 2007;3(12):e235. doi:10.1371/journal.pgen.0030235.
30. Sharp AJ, Mefford HC, Li K, Baker C, Skinner C, Stevenson RE, et al. A recurrent 15q13.3 microdeletion syndrome associated with mental retardation and seizures. *Nat Genet*. 2008;40(3):322–8. doi:10.1038/ng.93.
31. Masurel-Paulet A, Andrieux J, Callier P, Cuiset JM, Le Caignec C, Holder M, et al. Delineation of 15q13.3 microdeletions. *Clin Genet*. 2010;78(2):149–61. doi:10.1111/j.1399-0004.2010.01374.x.
32. Campos CM, Zanardo EA, Dutra RL, Kulikowski LD, Kim CA. Investigation of Copy Number Variation in Children with Conotruncal Heart Defects. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2014;104(1):24–31.
33. Lavalley G, Andelfinger G, Nadeau M, Lefebvre C, Nemer G, Horb ME, et al. The Kruppel-like transcription factor KLF13 is a novel regulator of heart development. *EMBO J*. 2006;25(21):5201–13. doi:10.1038/sj.emboj.7601379.
34. Nemer M, Horb ME. The KLF family of transcriptional regulators in cardiomyocyte proliferation and differentiation. *Cell Cycle*. 2007;6(2):117–21.
35. Derwinska K, Bartnik M, Wisniewicka-Kowalik B, Jagla M, Rudzinski A, Pietrzyk JJ, et al. Assessment of the role of copy-number variants in 150 patients with congenital heart defects. *Med Wieku Rozwoj*. 2012;16(3):175–82.
36. Hamid A, Weise A, Voigt M, Bucksch M, Kosyakova N, Liehr T, et al. Clinical impact of proximal autosomal imbalances. *Balkan j med gen : BJMG*. 2012;15(2):15–22. doi:10.2478/bjmg-2013-0002.
37. Davis R, Peters DH, McTavish D. Valproic acid: A reappraisal of its pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy. *Drugs*. 1994;47(2):332–72.
38. Grant SM, Heel RC. Vigabatrin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in epilepsy and disorders of motor control. *Drugs*. 1991;41(6):889–926.
39. Shelp BJ, Bown AW, McLean MD. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Sci*. 1999;4(11):446–52.
40. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) [database on the Internet]. Available from: <http://ssmc-tl.com/chromosome-15.html#sei>.
41. Caspersson T, Zech L, Johansson C, Modest EJ. Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma*. 1970;30(2):215–27.
42. Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Seagraves R, Lucas J, et al. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(23):9138–42.
43. Glatt K, Sinnott D, Lalande M. The human gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta 3 and alpha 5 gene cluster in chromosome 15q11-q13 is rich in highly polymorphic (CA)_n repeats. *Genomics*. 1994;19(1):157–60. doi:10.1006/geno.1994.1027.
44. Gyapay G, Morissette J, Vignal A, Dib C, Fizames C, Millasseau P, et al. The 1993–94 Genethon human genetic linkage map. *Nat Genet*. 1994;7(2 Spec No):246–339. doi:10.1038/ng0694supp-246.
45. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992;258(5083):818–21.

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



Kleefstra syndrome in Hungarian patients: additional symptoms besides the classic phenotype

Kinga Hadzsiev^{1,2}, Katalin Komlosi^{1,2}, Marta Czako^{1,2}, Balazs Duga^{1,2}, Renata Szalai^{1,2}, Andras Szabo¹,
Etelka Postyeni¹, Titanilla Szabo¹, Gyorgy Kosztolanyi^{1,2} and Bela Melegh^{1,2*}

Abstract

Background: Kleefstra syndrome is a rare genetic disorder, with core phenotypic features encompassing developmental delay/intellectual disability, characteristic facial features – brachy(micro)cephaly, unusual shaped eyebrows, flat face with hypertelorism, short nose with anteverted nostrils, thickened lower lip, carp mouth with macroglossia – and childhood hypotonia. Some additional symptoms are observed in different percentage of the patients. Epilepsy is common symptom as well. The underlying cause of the syndrome is a submicroscopic deletion in the chromosomal region 9q34.3 or disruption of the euchromatin histone methyl transferase 1.

Case presentation: We describe two Hungarian Kleefstra syndrome patients, one with the classic phenotype of the syndrome, the diagnosis was confirmed by subtelomeric FISH. Meanwhile in our second patient beside the classic phenotype a new symptom – abnormal antiepileptic drug metabolic response – could be observed. Subtelomere FISH confirmed the 9q34.3 terminal deletion. Because of the abnormal drug metabolism in our second patient, we performed array CGH analysis as well searching for other rearrangements. Array CGH analysis indicated a large – 1.211 Mb –, deletion only in the 9q subtelomeric region with breakpoints ch9:139,641,471-140,852,911.

Conclusions: This is the first report on Kleefstra syndrome in patients describing a classical and a complex phenotype involving altered drug metabolism.

Keywords: Kleefstra syndrome, 9q subtelomeric deletion syndrome, Epilepsy, Drug metabolism

Background

Kleefstra syndrome (OMIM 610253) (KS), also known 9q subtelomeric deletion syndrome is a rare genetic disorder. The definite incidence is yet unknown, however, since the widespread application of subtelomeric FISH and later of array comparative genomic hybridization (aCGH) a number of new cases were diagnosed. In the phenotype of the syndrome developmental delay/intellectual disability, characteristic facial features – brachy(micro)cephaly, unusual shaped eyebrows, flat face with hypertelorism, short nose with anteverted nostrils, thickened lower lip, carp mouth with macroglossia – and childhood hypotonia are present in all

of the patients [1]. Additional symptoms, as heart defects, microcephaly, genital/renal anomaly, recurrent infections, hearing impairment, tracheo/bronchomalacia are observed in different percentage of the patients. Epilepsy and psychiatric problems are important and common symptoms. While epilepsy is generally well controlled with standard medications, psychiatric abnormalities include apathy, aggressive periods, psychosis, autistic features, bipolar mood disorders and regression in daily function and cognitive abilities. There are also some other, less common symptoms observed, like micropenis, cryptorchidism and vesicourethral reflux [1–4]. The underlying cause of the syndrome is, in the majority of the patients, a submicroscopic deletion in the chromosomal region 9q34.3 or disruption of the Euchromatin Histone Methyl Transferase 1 (Eu-HMTase1), which leads to haploinsufficiency of the *EHMT1* gene. In a study Kleefstra et al. found that

* Correspondence: melegh.bela@pte.hu

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

²Szentagothai Research Center, University of Pecs, Ifjusag 20, H-7624 Pecs, Hungary



© 2016 Hadzsiev et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

the minimum critical region is 1.2 Mb and includes 14 genes on the long arm of chromosome 9, which could be responsible for the 9q subtelomeric deletion syndrome [5]. No genotype-phenotype correlation was observed so far with the size of the deletion or between patients with deletions and those with mutations. Meanwhile in her study Yatsenko et al. found that specific clinical endophenotypes are correlated with the extent of the deletion [6].

There are also some patients showing the core phenotypic features, but with phenotypic heterogeneity of KS in whom Kleefstra et al. identified *de novo* mutations in four epigenetic regulator genes, namely in *MBD5*, *MLL3*, *SMARCB1* and *NR1H3* [7].

We describe KS in Hungarian patients for the first time. Of the two patients identified one showed the classic phenotype of the syndrome, a second patient presented with a new symptom beside the classic phenotype – namely an abnormal antiepileptic drug (AED) metabolic response.

Case presentation

Patients

The two hereafter outlined patients were referred to our clinic because of developmental delay and minor anomalies.

Patient 1. is a 22 months old girl from the first pregnancy of a non-consanguineous healthy young Caucasian couple (father 30 and mother 26 years old). The only remarkable point in her family history is thyroid hypofunction in her mother, in the two sisters of her mother and in the maternal grandmother. Following the diagnosis of a hypoplastic aortic arch at the 26th week of pregnancy the girl was delivered at 40 weeks of gestation with a birth weight of 2740 g (10–25 percentiles). An aortic stenosis and coarctation of the aortae was confirmed by cardiological examination on the first day of life. Her developmental milestones were delayed. She turned at 8 months, at 20 months she sat alone and tried to crawl, and her eye contact evolved around 8 months. Babbling started timely but stopped at 20 months. The objective audiometry showed bilateral hearing impairment. After adjustment of a hearing aid, considerable advance was not detected in her auditive attention. The first epileptic seizure developed at 22 months, which had an adequate therapeutic response to valproate treatment. Brain MRI detected symmetrical dilated liquor space with a consequent gracile hippocampus and subcortical ischemic lesions. The characteristic features are illustrated in Fig. 1.

She was referred to our institution because of dysmorphic features at the age of 8 months. At that examination her weight was 7850 g (50 percentile) height 68 cm (25–50 percentile) and OFC 42 cm (–1 SD), she

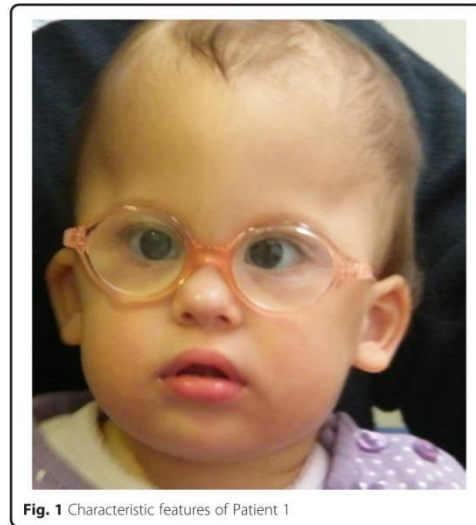


Fig. 1 Characteristic features of Patient 1

had brachycephaly, flat face, midface hypoplasia, down-slanting palpebral fissure, convergent strabismus, short nose, high palate, tented lip and severe generalized hypotonia.

Patient 2. is a 30 month old boy, second child (G2P1) of a non-consanguineous healthy young couple (father is 34 and mother is 31 years old), his family history was unremarkable. Because of endometriosis hormone therapy was applied in the mother before pregnancy. In the fetus dysmaturity was observed from the 34th week of gestation. He was delivered at 38 weeks of gestation with a birth weight of 2600 g. His developmental milestones were delayed, he sat alone at 12 months, stood at 15 months but at 18 months he could not walk. Speech development was delayed as well, only bubbling was present at 18 months. The objective audiometry showed bilateral hearing impairment and in the first year of life he went through multiple pneumonias. The pulmonary examination revealed tracheomalacia in the background. His first epileptic seizure developed at 20 months of age, since then the seizures are therapy-resistant focal seizures. An abnormal AED metabolism was observed in the boy, namely minimal AED doses already cause a toxic drug blood level (at 0.03 mg/kg clonazepam 600 nmol/l blood level and at 11 mg/kg levetiracetam 330 nmol/l blood level occur). At 18 months of age as he was first examined in our institution his weight was 10 kg (<5 pc) height was 81 cm (<5 pc) and OFC was 45 cm (<–2 SD). Brachymicrocephaly, flat face, midface hypoplasia, hypertelorism, short nose, tented lip, thick lower lip, pointed chin, malformed ears and mild

hypotonia were present. The characteristic features can be seen in Fig. 2.

Results

Patient 1: GTG-banded chromosomes at the 450 (550)-band level showed 46, XX normal female karyotype and subtelomeric FISH confirmed the 9q34.3 terminal deletion. The size of the deletion (2.188 Mb) was established by array CGH: ch9:138,831,145–141,018,984.

Patient 2: GTG-banded chromosomes at the 450 (550)-band level were normal and subtelomeric FISH confirmed the 9q34.3 terminal deletion. Performed aCGH indicate a 1.211 Mb deletion in the 9q subtelomeric region with the breakpoints ch9:139,641,471–140,852,911.

Conclusions

In the present work we describe two unrelated Hungarian children with a phenotype characteristic of Kleefstra syndrome. We made a comparison between the symptoms of our patients and of patients with 9q subtelomeric deletions presented by Kleefstra (Table 1) [8].

Initially, regarding Patient 1 with terminal deletion of 9q, she was merely diagnosed using conventional FISH method. Her facial features (brachycephaly, flat face, midface hypoplasia, down-slanting palpebral fissure, short nose, high palate, tented lip) and her mental development agree with KS. From her other features the cardiac anomaly is presented in 50 % of Kleefstra's cohort, while in another review with nine patients a cardiac anomaly was observed in 87 % of the patients [3]. Another important symptom of our Patient 1 is the hearing

Table 1 Clinical features of the presented cases compared with patients with 9q subtelomeric deletion presented by Kleefstra et al.

Features	Kleefstra et al. [8]	Patient 1	Patient 2
Gender	...	-	+
MR	28/28 (100)	+	+
Obesity	5 (16)	-	-
Microcephaly	25 (83)	-	+
Brachycephaly	12 (33)	-	-
Flat face	5 (16)	+	+
Midface hypoplasia	16 (53)	+	+
Coarse facies	8 (27)	-	-
Hypertelorism	15 (50)	-	+
Synophrys	16 (53)	-	-
Down slant palpebral fissures	6 (20)	+	-
Up slant palpebral fissures	5 (16)	-	+
Arched eyebrows	8 (27)	-	-
Short nose	17 (57)	+	+
Anteverted nostrils	12 (33)	-	-
Carp mouth	23 (77)	+	+
Macroglossia	12 (33)	-	-
Natal teeth	1 (3)	-	-
Thick lower lip	5 (16)	-	+
Pointed chin	5 (16)	-	+
Malformed ears	12 (33)	-	+
Brachydactyly	5 (16)	-	-
Simian crease	10 (30)	-	-
Abnormal male genitals	10 (33)	-	-
Cardiac anomaly	15 (50)	+	-
Anal atresia	2 (7)	-	-
Alopecia	3 (10)	-	-
Depigmentation	1 (3)	-	-
Renal cysts	2 (7)	-	-
Hydronephrosis	2 (7)	-	-
Behavioral problems	4 (9)	-	+
Sleep disturbances	3 (10)	-	-
Hearing loss	6 (20)	+	+
Hypotonia	15 (50)	+	+
Seizures	10 (30)	+	+



Fig. 2 Patient 2 with representative phenotype

loss, which was presented in 20 % of Kleefstra's patients and is not reported in any patient of Iwakoshi's cohort. From 22 months of age she had epileptic seizures well-controlled with AED. This symptom was presented in similar rate in Kleefstra's (30 %) and in Iwakoshi's (50 %) group, conversely hypotonia was presented in all of Iwakoshi's and in 50 % of Kleefstra's patients.

Similar to Patient 1 the phenotype and mental development of our Patient 2 are also characteristic for KS

and the diagnosis was confirmed by FISH examination. The symptoms of Patient 2 are also evaluated (Table 1). Behavioral problems which are slightly more common in patients with intragenic mutations as in patients with 9q34.3 deletion could be observed in Patient 2 at the age of 3 years [9]. He had a known, but rare symptom of KS, namely the tracheomalacia, making him susceptible to pneumonia in his first years of life. At 20 month of age, first, focal epileptic seizures presented, which became, after a short therapy responsive period, therapy resistant. Meanwhile an abnormal AED metabolism became evident. This feature has not been published as part of KS and there is no data to be found in the literature that the haploinsufficiency of *EHMT1* causes a symptom as seen in our patient [10].

As the result of the completed aCGH a 1.211 Mb deletion with the breakpoints ch9:139,641,471–140,852,911 was detected (the deleted region is represented by probes A_14_P200264 → A_16_P38909067). In their study Yatsenko et al. defined a minimal critical region of ~700 kb which was deleted in all of the patients they studied [6]. They suggest that the genes located in this region are responsible for the common clinical features and occurrence of other features depends on the size of the deletions. In another study of these

authors deletions of 28 patients are interpreted, except of one all patients' phenotypes fit with the syndrome [11]. In the phenotype of our patient the most of the symptoms agree with KS, except the abnormal AED metabolism. On a figure the genes located in the deletion of our Patient 2 are demonstrated (Fig. 3). In this region there are some genes which may have a potential effect on AED metabolism or impact. The proteins of these genes are expressed in brain and may influence and limit the penetration, efficacy, transport and bioavailability of the administered drugs via altered channel function or neural impairment. The mechanism of action of levetiracetam is unknown, but it is thought, that it stimulates synaptic vesicle protein 2A (SV2A) and inhibiting neurotransmitter release [12]. As regards to clonazepam, this benzodiazepine AED also displays inhibitory properties through the gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor, a ligand-gated chloride ion channel, activated by GABA [13]. One of the mentioned genes, the *ABCA2* gene encodes a membrane-associated protein by this gene is an ABC-transporter family member that is highly expressed in brain tissue and we supposed that it may have a role in neural development [14]. The *ABCA2* is important in the central nervous system

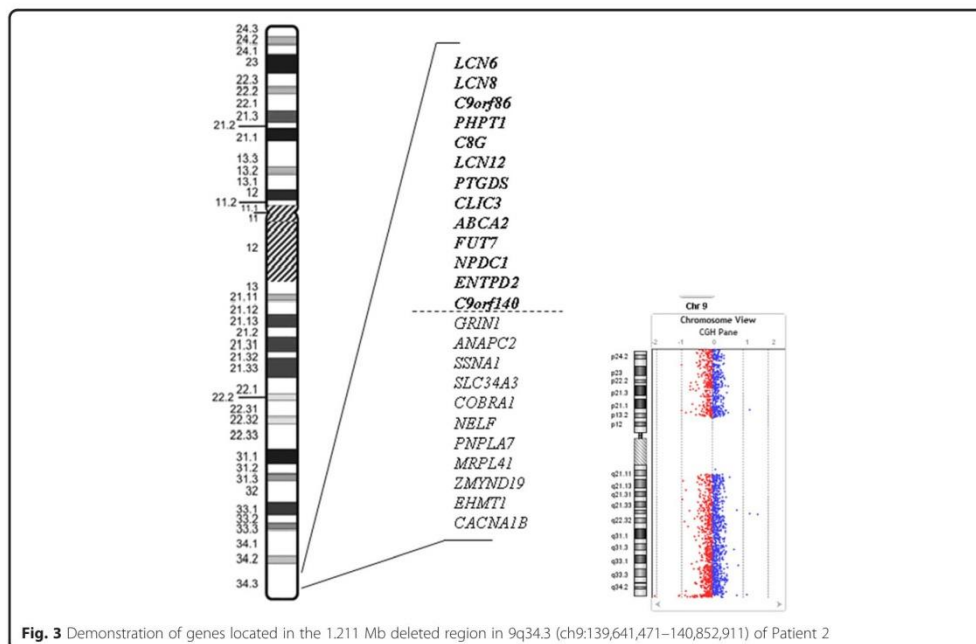


Fig. 3 Demonstration of genes located in the 1.211 Mb deleted region in 9q34.3 (ch9:139,641,471–140,852,911) of Patient 2

and in lipid transport necessary for the myelination process [15–17]. Previous findings of other researchers suggest that *ABCA2* is a novel lysosome-associated membrane protein involved in myelination or other kinds of metabolism in the central nervous system [15]. Two other genes in this region are channel genes. The *PHPT1* gene encodes an enzyme that catalyzes the dephosphorylation of histidine residues in protein, and in this way may be part of the group of the calcium-activated potassium channel genes [18]. Many human hereditary diseases are associated with abnormal phosphorylation of cellular proteins [19]. The other one is the *CLIC3* gene, which encodes a p64 family member protein that stimulates chloride ion channel activity [20]. Chloride channels regulate fundamental cellular processes including stabilization of cell membrane potential, transepithelial transport, maintenance of intracellular pH, and regulation of cell volume and various chloride channels have also been implicated in human diseases [21–23]. Also an interesting point is the *C9orf86* (chromosome 9 open reading frame 86, also known as *RABL6*) gene, the encoded protein plays a role in neurotransmitter release in the membrane of synaptic vesicles and the *NPDC1* gene with a role in neural proliferation, differentiation and control [24, 25].

Because of ambiguous assumptions, we carried out the aCGH analysis in case of Patient 1 as well, to find the probable responsible gene in the background of the abnormal AED response. Interestingly, after aCGH examination, the observed deletion in the subtelomeric region of chromosome 9q was larger in Patient 1 compared to the deletion was found in Patient 2 (2.188 Mb vs. 1.211 Mb, respectively). Twenty-four additional genes (*UBAC1*, *LHX3*, *QSOX2*, *CARD9*, *PMPCA*, *INPP5E*, *SEC16A*, *NOTCH1*, *MIR126*, *AGPAT2*, *LCN10*, *NACC2*, *C9orf69*, *LOC26102*, *GPSM1*, *DNLZ*, *SNAPC4*, *SDCCAG3*, *C9orf163*, *EGFL7*, *FAM69B*, *SNHG7*, *SNORA4* and *SNORA17*) were detected in Patient 1 beyond the deleted genes in Patient 2, which also contained the *EHMT1* gene responsible for KS. Subsequently, the above mentioned genes presumably have no role in the insufficient drug metabolism and effect, and our earlier conjecture was disproved. Further clinical and laboratory investigations are needed to identify the causes behind the modified AED response, which presumably could not be explained with chromosomal abnormalities, rather with DNA sequence alterations or modified epigenetic mechanisms.

In conclusion, we report two Hungarian KS patients, one with the classic phenotype of the syndrome, while in our other patient beside the classic phenotype a new symptom – namely an abnormal drug metabolic response – could be observed.

Materials and methods

Because of the abnormal drug metabolism, we performed aCGH analysis as well in Patient 2 searching for other rearrangements. Chromosomal microarray indicated only a large – 1.211 Mb –, deletion in the 9q subtelomeric region with the breakpoints ch9:139,641,471–140,852,911. No other CNV was detected in the index patient. Parental samples were analyzed using the same array and gave normal results. The detailed data of the detected deletion is depicted on Fig. 3.

Subtelomeric FISH was performed on metaphase chromosomes prepared from peripheral blood according to the protocol of the manufacturer of the probe used (Vysis ToTelVysion Multicolor FISH Probe Kit, Abbott Molecular Inc., USA). The specimens were evaluated in epifluorescent microscope (Zeiss, Axioskop 2). Visualization and analysis was done using CytoVysion software (Applied Imaging, UK).

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.

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, Cat. No.: G1471 and G1521, 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). Washing was performed according to the Agilent Protocol v7.2. 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 (v2.9.2.4). 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), DGV (Database of Genomic Variants), Ensembl and ECAR-UCA (European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations).

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

aCGH: array comparative genomic hybridization; AED: antiepileptic drug; CNV: copy number variation; 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; FISH: fluorescent in situ hybridization; KS: Kleeftstra syndrome; MRI: magnetic resonance image; OFC: occipitofrontal circumference.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Authors' contributions

KH, KK and GyK were responsible for the patient's clinical genetic examination. KH and KK contributed to the clinical description. BM, MCz, BD and TSz conceived and designed the molecular experiments. MCz, BD, ASz and EP performed the array CGH and analyzed the data. RSz, MCz, KH, KK, and BM co-wrote the manuscript and revised 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 TAMOP-4.2.4/A-2-11/1-2012-0001 'National Excellence Program' and by the Janos Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences to KK. The acquisition of equipment was supported by the OTKA 103983.

Received: 21 September 2015 Accepted: 19 February 2016

Published online: 25 February 2016

References

- Kleeftstrasynndrome Leaflet "Unique". 2009. <http://www.rarechromo.org/information/Chromosome%20%209/Kleeftstra%20Syndrome%20FTNP.pdf>.
- Kleeftstra T, van Zelst-Stams WA, Nillesen WM, Cormier-Daire V, Houge G, Foulds N, et al. Further clinical and molecular delineation of the 9q subtelomeric deletion syndrome supports a major contribution of EHMT1 haploinsufficiency to the core phenotype. *J Med Genet*. 2009;46(9):598–606.
- Iwakoshi M, Okamoto N, Harada N, Nakamura T, Yamamori S, Fujita H, et al. 9q34.3 deletion syndrome in three unrelated children. *Am J Med Genet A*. 2004;126A(3):278–83. doi:10.1002/ajmg.a.20602.
- Verhoeven WM, Egger JI, Vermeulen K, van de Warrenburg BP, Kleeftstra T. Kleeftstra syndrome in three adult patients: further delineation of the behavioral and neurological phenotype shows aspects of a neurodegenerative course. *Am J Med Genet A*. 2011;09/13 ed2011. p. 2409–15.
- Kleeftstra T, Smidt M, Banning MJ, Oudakker AR, Van Esch H, de Brouwer AP, et al. Disruption of the gene Euchromatin Histone Methyl Transferase1 (Eu-HMTase1) is associated with the 9q34 subtelomeric deletion syndrome. *J Med Genet*. 2005;42(4):299–306. doi:10.1136/jmg.2004.028464.
- Yatsenko SA, Cheung SW, Scott DA, Nowaczyk MJ, Tarnopolsky M, Naidu S, et al. Deletion 9q34.3 syndrome: genotype-phenotype correlations and an extended deletion in a patient with features of Optic C trigonocephaly. *J Med Genet*. 2005;42(4):328–35. doi:10.1136/jmg.2004.028464.
- Kleeftstra T, Kramer JM, Neveling K, Willemsen MH, Koemans TS, Vissers LE, et al. Disruption of an EHMT1-associated chromatin-modification module causes intellectual disability. *Am J Hum Genet*. 2012;91(1):73–82.
- Kleeftstra T, Brunner HG, Amiel J, Oudakker AR, Nillesen WM, Magee A, et al. Loss-of-function mutations in euchromatin histone methyl transferase 1 (EHMT1) cause the 9q34 subtelomeric deletion syndrome. *Am J Hum Genet*. 2006;79(2):370–7.
- Willemsen MH, Vulto-van Silfhout AT, Nillesen WM, Wissink-Lindhout WM, van Bokhoven H, Philip N, et al. Update on Kleeftstra Syndrome. *Mol Syndromol*. 2011;2(3–5):202–12.
- Balemans MC, Ansar M, Oudakker AR, van Caam AP, Bakker B, Vitters EL, et al. Reduced Euchromatin histone methyltransferase 1 causes developmental delay, hypotonia, and cranial abnormalities associated with increased bone gene expression in Kleeftstra syndrome mice. *Dev Biol*. 2014;386(2):395–407.
- Yatsenko SA, Brundage EK, Roney EK, Cheung SW, Chinault AC, Lupski JR. Molecular mechanisms for subtelomeric rearrangements associated with the 9q34.3 microdeletion syndrome. *Hum Mol Genet*. 2009;18(11):1924–36.
- Wright C, Downing J, Mungall D, Khan O, Williams A, Fonkem E, et al. Clinical pharmacology and pharmacokinetics of levetiracetam. *Front Neurol*. 2013;4:192. doi:10.3389/fneur.2013.00192.
- Nutt DJ, Malizia AL. New insights into the role of the GABA(A)-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *Br J Psychiatry*. 2001;179:390–6.
- Mack JT, Brown CB, Tew KD. ABCA2 as a therapeutic target in cancer and nervous system disorders. *Expert Opin Ther Targets*. 2008;12(4):491–504. doi:10.1517/14728222.12.4.491.
- Zhou C, Zhao L, Inagaki N, Guan J, Nakajo S, Hirabayashi T, et al. Atp-binding cassette transporter ABC2/ABCA2 in the rat brain: a novel mammalian lysosome-associated membrane protein and a specific marker for oligodendrocytes but not for myelin sheaths. *J Neurosci*. 2001;21(3):849–57.
- Schmitz G, Kaminski WE. ABCA2: a candidate regulator of neural transmembrane lipid transport. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(8):1285–95.
- Tanaka Y, Yamada K, Zhou CJ, Ban N, Shioda S, Inagaki N. Temporal and spatial profiles of ABCA2-expressing oligodendrocytes in the developing rat brain. *J Comp Neurol*. 2003;455(3):353–67. doi:10.1002/cne.10493.
- Zhang XQ, Sundh UB, Jansson L, Zetterqvist O, Ek P. Immunohistochemical localization of phosphatidylcholine phosphatase PHPT1 in mouse and human tissues. *Ups J Med Sci*. 2009;114(2):65–72.
- Hunter T. Signaling—2000 and beyond. *Cell*. 2000;100(1):113–27.
- Qian Z, Okuhara D, Abe MK, Rosner MR. Molecular cloning and characterization of a mitogen-activated protein kinase-associated intracellular chloride channel. *J Biol Chem*. 1999;274(3):1621–7.
- Bretag AH. Muscle chloride channels. *Physiol Rev*. 1987;67(2):618–724.
- Koch MC, Steinmeyer K, Lorenz C, Ricker K, Wolf F, Otto M, et al. The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science*. 1992;257(5071):797–800.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989;245(4922):1066–73.
- Ádám V. Orvosi biokémia. 1st ed. A kémiai idegrendszer átvitel (neurotransmisszió) molekuláris alapjai. Medicina Könyvkiadó Rt.: Budapest; 2001.
- Dupont E, Sansal I, Toru D, Evrard C, Rouget P. Identification of NPDC-1, gene involved in the control of proliferation and differentiation of neural and glial precursors. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1997;191(1):95–104.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

