

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS**

**Szubtelomerikus kromoszóma átrendeződések kimutatása  
és a Smith-Lemli-Opitz szindróma genetikai és biokémiai  
eltéréseinek vizsgálata mentálisan retardált betegekben**

**Dr. P. Szabó Gabriella**

**Témavezető: Prof. Dr. Oláh Éva**



**DEBRECENI EGYETEM**

**KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2013**

# TARTALOMJEGYZÉK

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>1. BEVEZETÉS</b> .....	5. old.
<b>1.1. Mentális retardáció fogalma, előfordulási gyakorisága</b> .....	5. old.
<b>1.2. Mentális retardáció etiológiája</b> .....	6. old.
<b>1.2.1. Klasszikus kromoszóma rendellenességek</b> .....	9. old.
<b>1.2.2. Folyamatos gén deléció/duplikációs szindrómák</b> .....	10. old.
<b>1.2.3. Szubtelomerikus kromoszóma átrendeződések</b> .....	10. old.
<b>1.2.4. Kópiaszám variációk</b> .....	11. old.
<b>1.2.5. Monogénes (egy génpár által meghatározott, monolókuszos) szindrómák</b> .....	12. old.
<b>2. CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	15. old.
<b>3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	17. old.
<b>3.1. Szubtelomerikus kromoszóma aberrációk</b> .....	17. old.
<b>3.2. Smith-Lemli-Opitz szindróma (SLO)</b> .....	20. old.
<b>4. BETEGEK és MÓDSZEREK</b> .....	23. old.
<b>4.1. Szubtelomerikus kromoszóma átrendeződések vizsgálata</b> .....	23. old.
4.1.1. Betegek.....	23. old.
4.1.2. Módszerek:.....	24. old.
4.1.2.1. Szubtelomerikus FISH vizsgálat.....	24. old.
4.1.2.2. Array-Comparativ Genomiális Hibridizáció (CGH).....	25. old.
<b>4.2. SLO szindrómás betegek vizsgálata</b> .....	26. old.
4.2.1. SLO szindrómás betegek kiválasztása.....	26. old.
4.2.2. Módszerek.....	27. old.
4.2.2.1. Biokémiai vizsgálat (7-DHC meghatározás).....	27. old.
4.2.2.2. <i>DHCR7</i> mutáció vizsgálata molekuláris genetikai módszerrel.....	28. old.
4.2.2.3. Statisztikai vizsgálat.....	28. old.
<b>5. EREDMÉNYEK</b> .....	29. old.
<b>5.1. A szubtelomerikus vizsgálat eredményei</b> .....	29. old.
5.1.1. Esetismertetések.....	31. old.
5.1.1.1. Familiáris kiegyensúlyozatlan transzlokációk.....	31. old.
5.1.1.2. <i>De novo</i> esetek.....	48. old.
<b>5.2. Az első SLO szindrómás gyermek klinikai és genetikai diagnosztikája</b> <b>Terápiás próbálkozások</b> .....	51. old.
<b>5.3. A 15 magyar SLO szindrómás beteg klinikai és biokémiai paraméterek</b> <b>közötti összefüggés vizsgálata</b> .....	56. old.
<b>6. MEGBESZÉLÉS</b> .....	60. old.
<b>6.1. Diagnosztikai eszközök felhasználása a mentális retardáció diagnosztikájában,</b> <b>genetikai eltérések pontos meghatározása</b> .....	62. old.
6.1.1. Szubtelomerikus kromoszóma átrendeződések.....	62. old.
6.1.2. SLO szindróma.....	65. old.
<b>6.2. Genotípus - fenotípus korrelációk</b> .....	67. old.

<b>6.3. Az eredmények gyakorlati hasznosítása.....</b>	<b>76.old.</b>
<b>7. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>80.old.</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>82.old.</b>
<b>8. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>84.old.</b>
<b>A Phd értekezés alapjául szolgáló közlemények.....</b>	<b>96.old.</b>
<b>További közlemények.....</b>	<b>97.old.</b>
<b>9. TÁRGYSZAVAK.....</b>	<b>98.old.</b>
<b>10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>99.old.</b>
<b>11. FÜGGELÉK.....</b>	<b>100.old.</b>

## **RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

**array-CGH:** Array Comparative Genomic Hybridization

**CNVs:** Copy number variations

**CMA:** chromosomal microarray

**ECARUCA:** European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome

Aberrations

**7-DHC:** 7-dehidrokoleszterin

**FISH:** Fluoreszcenz In Situ Hybridizáció

**IQ:** Intelligence Quotient

**Kb:** Kilobázis

**Mb:** Megabázis

**MR:** mentális retardáció

**MAPH:** Multiplex-Amplifiable-Probe-Hybridisation

**MAWI:** Magyar Wechsler Intelligencia teszt

**mFISH:** multicolor-FISH

**MLPA:** Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

**OMIM:** Online Mendelian Inheritance In Man

**P-W:** Prader-Willi

**PCR:** Polymerase Chain Reaction

**SLO:** Smith-Lemli-Opitz

**SNP:** single nucleotide polymorphism

# 1. BEVEZETÉS

## 1.1. A mentális retardáció fogalma, előfordulási gyakorisága

Az értelmi képesség, az intelligencia multifaktoriális meghatározottságú, genetikai háttér és környezeti tényezők kölcsönhatása eredményeképpen kialakult állapot, ami az egyed környezethez való viszonyát tükrözi. Intelligencia szintjük szerint a népesség egyedei a Gauss görbével jellemezhető normális megoszlást mutatnak: a görbe jobb szélső értékei a magas IQ-val rendelkező, kiemelkedő képességű egyedeket reprezentálják, míg a bal oldali alsó értékek alacsony IQ-t, enyhe értelmi fogyatékossgot jelentenek. Az ide tartozó egyedek szüleinek IQ-ja is rendszerint alacsonyabb. Ezekben az esetekben specifikus okot nem kell keresnünk. Az értelmi fogyatékossgához vezető okok keresése elsősorban a súlyos vagy közepesen súlyos értelmi fogyatékossg esetében indokolt.

Az *American Mental Retardation Association (2002)* definíciója szerint az értelmi fogyatékossg (nemzetközi irodalomban: intellectual disability, learning disability, mental retardation) egy speciális funkcionális állapot, amely 18 éves kor alatt manifesztálódik, s amit 70 alatti intelligencia hányados (IQ), valamint a tíz megkülönböztetett adaptív funkció közül kettő vagy három károsodása jellemez (**1. táblázat**). Az IQ alapján megkülönböztetünk enyhe (IQ: 70-51), közepes (IQ: 50-35) és súlyos fokú (IQ: 35-20) értelmi fogyatékossgot. A mentális retardáció prevalenciája átlagosan 2-3 % körüli, de ez az érték populációnként és az alkalmazott vizsgálati módszerektől függően 1-10 % között változik [Battaglia és mtsai., 1999, Moser, 2004, Ropers és Hamel, 2005].

## 1. Táblázat A tíz specifikus adaptív képesség

<b>Kommunikáció</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• verbális</li><li>• szimbolikus</li></ul>
<b>Önellátás</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• evés</li><li>• öltözködés</li><li>• szobatisztaság</li></ul>
<b>Háztartás ellátása</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• mosás</li><li>• takarítás</li><li>• főzés</li></ul>
<b>Szociális magatartás</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• szeretet</li><li>• barátság</li><li>• mosoly</li></ul>
<b>Társadalom nyújtotta lehetőségek kihasználása</b>
<b>Önirányítás</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• döntés</li><li>• választás</li><li>• probléma megoldás</li></ul>
<b>Egészség, biztonság</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• fizikális jólét</li><li>• diéta</li><li>• törvényesség</li></ul>
<b>Tanulási képesség független élethez szükséges alapismeretek</b>
<b>Szabadidő</b>
<b>Munkavégzés</b>

### 1.2. A mentális retardáció etiológiája

A mentális retardáció etiológiája rendkívül heterogén. A háttérben álló okok lehetnek öröklött, genetikai ártalmak (**2. táblázat**) vagy pre-, peri-, vagy posztnatális életben szerzett betegségek.

Az értelmi fogyatékosághoz vezető szerzett okok között **prenatálisan** ható exogén vagy endogén ártalmak említendők: intrauterin infekciók, teratogén ártalmak (pl. magzati

alkohol szindróma, drog stb), anyai szervi vagy anyagcserebetegségek (pl. súlyos szív-, vagy tüdőbetegségek, anyai PKU). A **perinatális** időszakban súlyos agyi károsodást és következményes mentális retardációt okozhatnak az elhúzódó szülés, a következményes hypoxia, a koraszülés, asphyxia, agyvérzés, szülés alatt szerzett infekció (pl. herpes simplex). A **posztnatális** ártalmak lehetnek központi idegrendszeri infekciók, agyvérzés, koponyasérülés stb.

## 2. Táblázat Értelmi fogyatékhossághoz vezető genetikai okok

<p><b>Kromoszóma rendellenességek</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• számbeli/szerkezeti</li> <li>• mikrodeléciók kórképek, szubtelomerikus átrendeződések</li> </ul>
<p><b>Egy génpár által meghatározott monogénes mendeli szindrómák</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Autoszómális domináns</li> <li>• Autoszómális recesszív</li> <li>• X-hez kötött domináns</li> <li>• X-hez kötött recesszív</li> </ul>
<p><b>Atípusos mendeli öröklődés mendeli fenotípushoz vezető kromoszómális mechanizmusok</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ivarsejtek mozaikossága</li> <li>• Uniparentális disomia, genomikus imprinting</li> <li>• Triplet expanzió okozta neurodegeneratív kórképek – anticipáció</li> </ul>
<p><b>Nem mendeli öröklődésű kórképek</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Multifaktoriális kórképek</li> <li>• Mitokondriális öröklődésű kórképek</li> </ul>

A genetikai tényezőkről szerzett ismereteink a citogenetikai, molekuláris citogenetikai és molekuláris biológiai technikák fejlődésével egyre inkább bővülnek, így a genetikai háttérrel bíró értelmi fogyatékhosság etiológiai csoportosításának szempontjai is folyamatosan

változnak. A genetikai módszerek fejlődése ellenére a súlyos/közepesen súlyos értelmi fogyatékosok csupán 60-75 %-ában áll rendelkezésünkre etiológiai diagnózis, míg az enyhe értelmi fogyatékosok 80 %-ában a mentális retardáció oka ismeretlen marad [Inlow és Restifo 2004; Rauch és mtsai, 2006]. A genetikai diagnózis pontos ismeretében lehetőség nyílik a patogenetikai háttér megismerésére, a prognózis megítélésére és – ami a legfontosabb - a családon belüli ismétlődés megelőzésére. Az értelmileg súlyosan károsodott gyermek ápolása, ellátása jelentős anyagi ráfordítást igényel és súlyos fizikai és lelki terhet jelent a családnak és a társadalomnak. Ezért az érintett családon belül újabb beteg gyermek születésének megelőzése - a prenatális genetikai diagnosztika segítségével - társadalmi, népegészségügyi szempontból kiemelten fontos kérdés.

A genetikai okok között kiegyensúlyozott és kiegyensúlyozatlan eltérések különböztethetők meg. A kiegyensúlyozatlan eltérések, amelyek lehetnek fénymikroszkóppal látható nagyméretű kromoszóma rendellenességek (triszómiák, monoszómiák, duplikációk, deléciók) vagy csupán finomabb molekuláris módszerekkel kimutatható kisméretű genetikai anyag hiányok és többletek. A kiegyensúlyozott eltérések olyan kromoszóma átrendeződések (transzlokációk, inverziók, inzerciók), amelyekben citogenetikai módszerekkel genetikai anyag többlet vagy hiány nem igazolható. A korszerű molekuláris genetikai módszerekkel vált ismertté, hogy a töréspontokban ezekben az esetekben is kimutathatók mikroduplikációk és/vagy mikrodeléciók. A génen belüli változások: a nukleotid csere vagy nukleotid sorrend megváltozása okozta mutációk különböző – mentális retardációval járó - kórképek kialakulásához vezetnek látható morfológiai eltérésekkel vagy azok nélkül. A genetikai eltérések típusától (méretétől, szintjétől) és a kimutatásukra alkalmas módszerektől függően az értelmi fogyatékosághoz vezető genetikai eltérések alábbi alcsoportjait különböztethetjük meg:

- klasszikus kromoszóma rendellenességek,

- rejtett (hagyományos citogenetikai vizsgálattal nem kimutatható) kromoszóma rendellenességek,
- kópiaszám variációk (copy number variations, CNVs),
- mendeli és nem mendeli öröklődésű génmutációk (monogénes betegségek, X-hez kötött mentális retardáció, mitokondriális betegségek)
- a génextpressziót megváltoztató genetikai mechanizmusok (uniparentális diszómia, genomikus imprinting) és epigenetikai történések.

Számos genetikai kórkép, mint pl. Down szindróma, Rett szindróma, mucopolisaccharidosis stb. jól körvonalazható fenotípusos jegyek alapján felismerhető, diagnosztikája genetikában jártas klinikus számára nem okoz gondot. Nagyobb kihívást jelent a klinikai genetikusnak a társuló rendellenességgel nem rendelkező közepes/enyhe értelmi fogyatékos beteg, az ún. nem-szindrómás mentális retardáció diagnosztikája [Shevell és mtsai., 2008; Raymond, 2010], de a nagyszámú, kevésbé ismert multiplex rendellenességgel járó ritka szindróma besorolása is.

### **1.2.1. Klasszikus kromoszóma rendellenességek**

A **klasszikus kromoszóma rendellenességek** előfordulása mentálisan retardált betegekben átlagosan 16,1 % (4-34,1 %, 3906/24245). E gyakoriság jelentősen függ az alkalmazott vizsgálati módszerektől és a betegek kiválasztásának szempontjaitól [Xu és Chen, 2003]. Az elmúlt 50 évben a hagyományos citogenetikai és a molekuláris citogenetikai módszerek rohamos fejlődésének köszönhetően egyre több lehetőség nyílt az értelmi fogyatékos és a fejlődési rendellenességek kromoszómális hátterének tisztázására. Kezdetben csupán a számbeli kromoszóma rendellenességek kimutatására volt mód, majd az 1970-es években kidolgozott sávozási (Q-, G-, R-) technika már a szerkezeti kromoszóma rendellenességek (deléciók, duplikációk stb.) felismerését is lehetővé tette [Bhvana és Sanger, 2007]. A klasszikus citogenetikai vizsgálat – mely 450-550 sáv elkülönítésére alkalmas -

továbbfejlesztett változata a high-resolution technika, amely 800-1200 G-sáv elkülönítését is lehetővé teszi. Ez úgy érhető el, hogy a limfocita kultúrát profázisban vagy prometáfázisban blokkolják, rövidebb colchicin expozíciót, illetve kondenzációgátlókat (actinomycin-D, ethidiumbromid) alkalmaznak [Yunis, 1976, 1981, Shaffer, 2005]. A >650 G-sáv szám 3-5 Mb nagyságú mikrodéláció, mikroduplikáció kimutatására már alkalmas lehet. A citogenetikai diagnózis és a kromoszóma aberráció felismerése az alkalmazott metodikán túl nagymértékben függ a citogenetikus gyakorlottságától, az érintett kromoszóma régió méretétől és festődésétől, valamint a preparátum minőségétől [Rauch és mtsai., 2006].

### **1.2.2. Folyamatos géndélációs/duplikációs szindrómák**

Az 1990-es években bevezetésre került új módszer, a fluoreszcensz *in situ* hibridizáció (FISH) segítségével a 4 Mb-nál kisebb, a hagyományos citogenetikai vizsgálattal nem látható, **rejtett kromoszóma rendellenességek**, mikrodélációkkal és mikroduplikációkkal járó ún. „folyamatos géndélációs/génduplikációs” szindrómák finom eltérései is kimutathatóvá váltak. Így a klinikailag jellemző tünetegyüttessel bíró Williams-, Wolf-Hirshhorn-, Di George-, Angelman-, Prader-Willi szindrómák háttérében álló mikrodélációk igazolhatók [Kuwano és mtsai., 1991; Nickerson és mtsai., 1995; Ligon és mtsai., 1997].

### **1.2.3. Szubtelomerikus kromoszóma átrendeződések**

A fenti módszerek mellett is nehézséget jelentett a kromoszómák génben gazdag telomerikus, szubtelomerikus régiói rejtett aberrációinak (deléción, duplikáción, transzlokáción) kimutatása, amelyek a hagyományos G-sávtechnikával – világos (negatív) festődésük miatt - nem ismerhetők fel [Ning és mtsai., 1996]. A kromoszómák e génben gazdag régióinak detektálására vezették be 1995-ben a *szubtelomerikus FISH vizsgálatot* [Flint és mtsai., 1995]. Ezzel a módszerrel a közepes és súlyos fokban mentálisan retardáltak 6,8 %-ában, míg az enyhe mentális retardációk 0,5 %-ában igazoltak szubtelomerikus kromoszóma aberrációt

[Flint és Knight, 2003; Ravnan és mtsai., 2005]. Több ezer publikált eset jelent meg az elmúlt 15 évben, melyben új, fenotípusosan jól körvonalazható szubtelomerikus szindrómák kerültek leírásra mint, pl. a 3q29 és a 1p36 deléciós szindrómák. A szubtelomerikus aberrációk kimutatásának másik igen költség-hatékony módszere a 2002-ben bevezetett MLPA (multiplex-ligation-dependent-probe amplification) technika [Schouten és mtsai., 2002; Rooms és mtsai., 2004].

#### **1.2.4. Kópiaszám variációk**

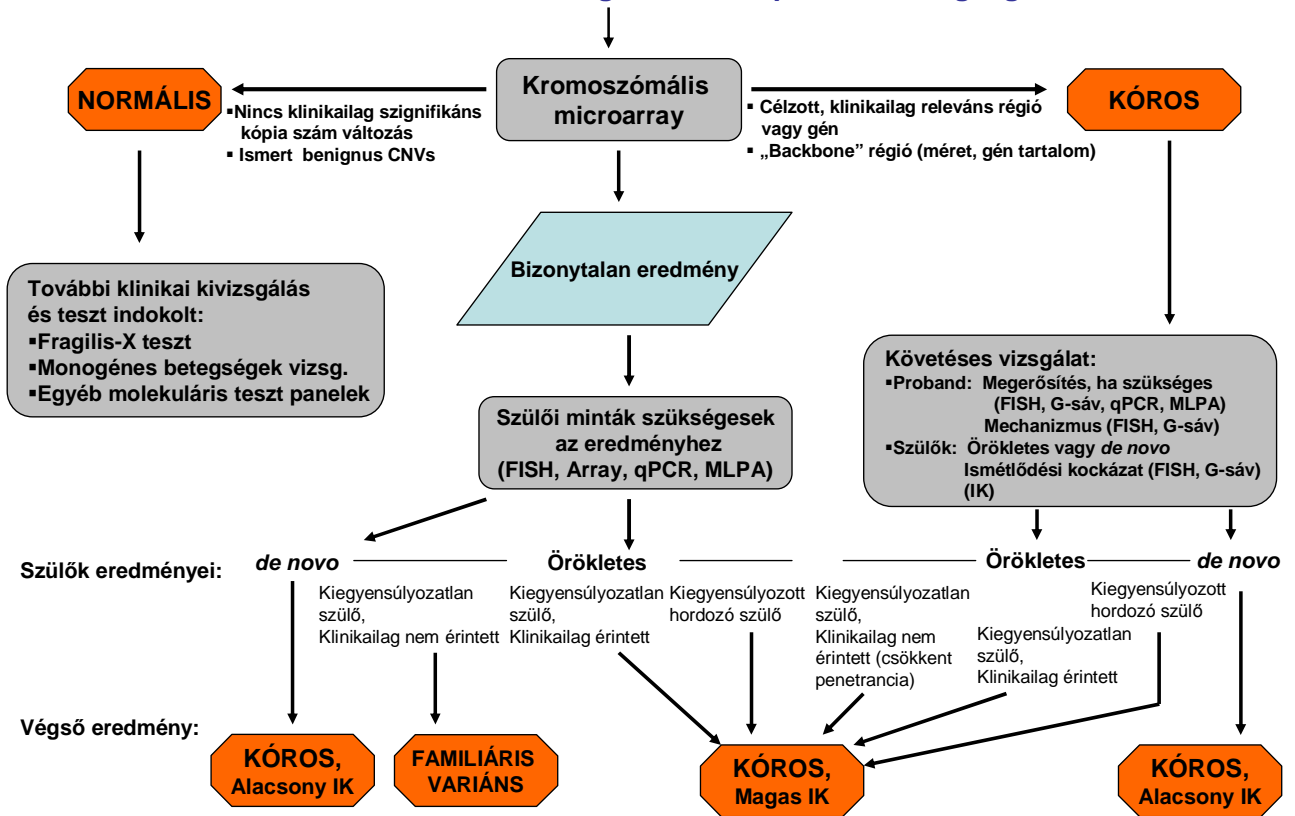
A molekuláris citogenetikai technikák további fejlődésével lehetőség nyílt a humán genomnak a hagyományos citogenetikai vizsgálattól 50-100x nagyobb felbontású vizsgálatára, a finom kópiaszám variációk (CNVs) kimutatására [Pinkel és mtsai., 1998; Lucito és mtsai., 2003; Ried, 2004]. Így a szubtelomerikus régiókon túl az intersticiális deléciók, duplikációk, kiegyensúlyozatlan átrendeződések kimutatása is lehetővé vált. A „kromoszómális microarray” (CMA) vagy „molekuláris kariotipizálás” elnevezés magába foglalja az összes array-alapú genomiális kópiaszám analízist, mint az array-alapú komparatív genomiális hibridizációt (array comparative genomic hybridisation: aCGH) és a single nucleotid polymorphism (SNP)-array technikákat [Rauch és mtsai., 2004, de Vries és mtsai., 2005; Vermeesch és Rauch, 2006; Miller és mtsai., 2010]. Több ezer értelmi fogyatékos beteget vizsgáló tanulmányokban az érintettek 10-14.2 %-ában mutattak ki szignifikáns kópiaszám változásokat [Vissers és mtsai., 2010; Bruno és mtsai., 2009; Cooper és mtsai., 2011]. A patogén kópiaszám változás jellemzői a következők: 1. relatíve nagy méretű; 2. ritka, 3. *de novo*, 4. deléció vagy egy kópiaszámot meghaladó amplifikáció, 5. az érintett régió az OMIM adatbázis szerint a fenotípussal kapcsolatba hozható géneket tartalmaz, 6. ismert deléciós-duplikációs szindrómákban ill. mentális retardációban ismert régiókkal átfedés van, 7. gében gazdag régiót érint [Galasso és mtsai., 2010]. Az array-technikák elterjedésével egyre több patológiás CNVs –t írtak le, számos genotípus-fenotípus kapcsolat felismerésére és közlésére

került sor és egyre több - az értelmi fogyatékoság kialakulásában szerepet játszó és az agy szinaptikus plaszticitásáért felelős - gén szerepe körvonalazódott. Napjaink klinikai genetikai diagnosztikájában a modern technikáknak köszönhetően első helyre került a genotípus megismerése, amit a fenotípusos jegyek részletes elemzése követ. Erre utal az angol nomenklatúrában használt: „genotype first approach” vagy „reverse phenotypics” kifejezés is [Shaffer és mtsai., 2007; Vissers és mtsai., 2010]. Az International Standard Cytogenomic Array (ISCA) Konzorcium (2010) ajánlása a mentális retardáció/veleszületett rendellenességek kivizsgálási algoritmusában az array technikákat helyezi első helyre a diagnosztikai lépések között, melyeket az Egyesült Államokban és a fejlett Nyugat-Európai országokban már rutinszerűen alkalmaznak. A Miller és munkatársai által ajánlott diagnosztikai algoritmust az **1. ábra** mutatja. Az alábbi algoritmus szerint ma már részletes fenotípus elemzésre nincs is szükség a genomikai vizsgálat előtt, de a mentális retardáció felismerése mindenképpen szükséges ahhoz, hogy a vizsgálat indikációja megszülessen.

#### **1.2.5. Monogénes (egy génpár által meghatározott, monolókuszos) szindrómák**

A **monogénes szindrómák** gyakran mentális retardációval társulnak. A mendeli öröklődésű, egy génpár által meghatározott betegségek lehetnek autoszómális domináns és recesszív, valamint X-hez kötött domináns és recesszív öröklődésűek. A betegséghez vezető specifikus génmutáció PCR alapú mutáció analízissel ill. direkt szekvenálással mutatható ki. Recesszív kórképek esetében gyakran találkozunk a családban rokonházassággal. E betegségekben nagy jelentősége van a családspecifikus mutációk kimutatásának, mert mindkét szülő hordozó státusza esetén a betegség ismétlődési kockázata 25%. Ritka esetekben egyik szülő heterozigóta státusza uniparentális diszómia révén szintén az utód betegségét eredményezheti. Autoszómális domináns betegségek familiáris előfordulása esetén az ismétlődési kockázat 50%. Egészséges szülők domináns öröklődésű kórképben szenvedő gyermekénél új mutációra

**Klinikai genetikai kivizsgálási algoritmus a megkésett fejlődés/ mentális retardáció/ többszörös veleszületett rendellenesség/autizmus-spektrum betegség esetén**



**1. ábra** A megkésett fejlődés/mentális retardáció/többszörös veleszületett rendellenesség/autizmus-spektrum betegség kivizsgálási algoritmus a nemzetközi protokoll szerint. IK: ismétlődési kockázat. Miller és mtsai., 2010.

vagy a gén expresszió metiláció okozta szuppressziójára (csökkent penetrancia) kell gondolnunk. A fenti lehetőségeket figyelembe kell vennünk a genetikai tanácsadás során az ismétlődési kockázat megítélésakor. Az autoszómális mendeli öröklődésű kórképek mellett az X-kromoszómához kötött domináns és recesszív öröklődésű betegségek egy része is társul értelmi fogyatékkal. Elsőként említendő a Rett szindróma, amely az X-kromoszómán lokalizálódó MECP2 (Methyl-CPG-Binding Protein-2) gén mutációja okozta – fiúkban rendszerint letális, döntően lányokat érintő - súlyos értelmi fogyatékoság [Zapella és mtsai., 2001]. Azonos klinikai képet eredményez az CDKL5 (Cyclin-Dependent-Kinase-Like 5) és FOXG1 (Forkhead Box G1) gén mutációja is [Weaving és mtsai., 2004; Ariani és mtsai.,

2008]. X-kromoszómához kötött recesszív kórképek (XR) többsége (pl. haemophilia A és B, dystrophia musculorum progressiva Duchenne és Becker típusa, stb.) nem jár értelmi fogyatékkal. A mucopolysaccharidosis XR öröklődésű II-es típusában (Hunter kór) azonban súlyos, progresszív értelmi fogyatékos állapotot látunk. Rauch és munkatársai (2006) 570 értelmi fogyatékos beteg 4,8 %-ában igazoltak monogénes betegséget. Néhány példa: Smith-Lemli-Opitz szindróma, mucopolysaccharidosisok több típusa, Cohen szindróma, Fragilis-X szindróma és számos további kórkép. Természetesen a monogénes kórképek többségében az értelmi fogyatékos állapot változatos szomatikus tünetekkel is társul, amelyekre támaszkodhatunk a kórkép diagnózisának megállapításában. Ugyancsak figyelmet érdemel, hogy a különböző genetikai háttérű értelmi fogyatékos esetekben, az intelligencia és adaptív funkciók is különböző mértékben és módon károsodnak, így eltérő klinikai mintázatok jönnek létre, amelyek típusos esetekben jellemzőek lehetnek egy-egy kórképre. Így pl. más a fogyatékos jellege, a kognitív funkciók károsodásának mértéke, a gyermek viselkedésének, magatartásának zavara, a nyelv- és a beszédképesség elmaradása Down szindrómában, mucopolysaccharidosisban, Rett szindrómában és egyéb mentális retardációval járó kórképekben.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Munkám során céлом volt Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Gyermekgyógyászati Intézet, Klinikai Genetikai Központjának genetikai szakrendelésén vizsgált értelmi fogyatékos betegek közül kiválasztani azokat akiknél a nemzetközi kritériumok (Lam és munkatársai, 2006) alapján indokolt a szubtelomerikus FISH vizsgálat elvégzése. Céлом volt a kromoszómák terminális részei átrendeződéseinek kimutatását szolgáló szubtelomerikus FISH vizsgálat bevezetése, a vizsgálati módszer értékelése, indikációjának meghatározása és a diagnosztikus folyamatban való elhelyezése, kivizsgálási algoritmus kidolgozása.
2. A laboratóriumunkban rendelkezésünkre álló módszerekkel nyert eredmények molekuláris szintű pontosítására – kollaborációban - array Comparatív Genomiális Hibridizáció (CGH) vizsgálatok végzésére törekedtünk. A pontos genetikai diagnózis birtokában vizsgálni kívántam a genotípus-fenotípus összefüggéseket: az érintett régiókba lokalizálódó gének adatbankból való visszakeresésével összefüggést keresve a génfunkciók és az észlelt vagy várható klinikai tünetek között.
3. Céлом volt az SLO szindróma klinikai, biokémiai, genetikai diagnosztikája lehetőségének megteremtése központunkban egy – a téma iránt érdeklődő – munkacsoport létrehozásával. Tapasztalatot kívántam szerezni a kezelés hatásosságáról.
4. Választ kerestem arra a kérdésre, hogy vajon van-e összefüggés a Magyarországon eddig diagnosztizált SLO szindrómás betegek fenotípusos jellemzői és a biokémiai paraméterek között? Van-e prognosztikai értéke a kezdeti koleszterin szintnek vagy a 7-DHC-nak?

5. Feladatul tűztem ki a betegek és családtagjaiknak gondozását. A diagnózis pontosításával lehetőséget kívántunk biztosítani prenatális diagnosztika segítségével a családon belüli ismétlődések megelőzésére.

### **3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS**

Munkám során a mentálisan retardált betegek eltérő genetikai csoportjai közül két, módszertanilag és klinikailag is eltérő megközelítést igénylő betegcsoporton végzett vizsgálataim eredményét foglalom össze. 1/. a kiegyensúlyozatlan szubtelomerikus kromoszóma aberrációval járó esetek, valamint 2/. a Smith-Lemli-Opitz (SLO) szindrómában szenvedő gyermekek vizsgálatával szerzett tapasztalataimat összegzem.

#### **3.1. Szubtelomerikus kromoszóma átrendeződések**

A kromoszómák génben gazdag telomerikus, szubtelomerikus régióinak aberrációi (deléció, duplikáció, transzlokáció) világos (negatív) festődésük miatt hagyományos G-sávtechnikával nem mutathatók ki (rejtett aberrációk) [Ning és mtsai., 1996]. A kromoszómák e génben gazdag régióinak vizsgálatára 1995-ben Flint és munkatársai vezették be a szubtelomerikus FISH vizsgálatot [Flint és mtsai., 1995]. Az említett szerzők e módszerrel a közepes és súlyos mentális retardáltak 6,8 %-ában, míg az enyhe mentális retardációk 0,5 %-ában igazoltak szubtelomerikus kromoszóma aberrációt [Flint és Knight, 2003]. A szubtelomerikus kromoszóma aberrációk változatos tünetegyütteseket hoznak létre. A módszer bevezetése óta a különböző tanulmányokban több, mint tízezer esetről számoltak be. Észleltek olyan szubtelomerikus kromoszóma régiókat, mint az 1pter, 2qter, 22qter, Xqter, amelyek átrendeződései - más kromoszómákkal összehasonlítva - gyakrabban fordultak elő a vizsgált betegcsoportokban [Flint és Knight, 2003; Shao és mtsai, 2008]. Számos szindróma (1p36 szubtelomerikus deléció, 3q29 szubtelomerikus deléció) klinikai jellemzői jól körülhatárolt, gyakorlott szindromatológus számára könnyen felismerhető tünetcsoportot alkotnak. A szubtelomerikus FISH vizsgálat költség- és munkaigényes, ezért a betegek megfelelő kiválasztása kulcsfontosságú, ugyanakkor túl szigorú szelekciós kritériumok alkalmazása esetén a pozitív esetek egy része felismeretlen marad. Az eltérően megválasztott betegkiválasztási szempontok magyarázzák, hogy a vizsgálat találati aránya a különböző

vizsgálatokban eltérő [Riegel és mtsai., 2001]. De Vries és munkacsoportja score rendszert dolgozott ki a szubtelomerikus kromoszóma aberrációban szenvedő betegek klinikai és anamnesztikus adatainak figyelembe vételével. Azt találták, hogy a prenatalisan észlelt növekedési retardáció, a mentális retardációra nézve a pozitív családi anamnézis a szubtelomerikus aberrációkra vonatkozóan prediktív értékű a betegek kiválasztása során [De Vries és mtsai., 2001/b]. Egy svájci munkacsoport két centrum eredményének összehasonlítása alapján a legfontosabb szelekciós paraméternek szintén az értelmi fogyatékoság családi halmazódását találta [Riegel és mtsai., 2001]. Lam és munkatársai – saját kritériumrendszert alkalmazva - a közepesen-súlyos mentálisan retardált betegek 10 %-ában igazoltak szubtelomerikus kromoszóma átrendeződést [Lam és mtsai., 2006]. A szubtelomerikus kromoszóma eltérések fele familiáris eredetű, azaz az egyik szülő kiegyensúlyozott transzlokáció hordozó. A meiosis során az ivarsejtekben a kromoszómák szegregációjának következtében parciális deléciók, duplikációk alakulhatnak ki<sup>1</sup>.

A fenotípust a deletált és duplikálódott gének együttesen határozzák meg. Battaglia és munkacsoportjának adatai szerint az utódokban inkább a deléciós fenotípus a penetráns és meghatározó, de a klinikai kép az egyes esetekben nagy változatosságot mutathat. Kiegyensúlyozatlan transzlokációk esetén a transzlokációban részt vevő partner kromoszómák jelentősen befolyásolják a klinikai képet [Battaglia, 2007].

A szubtelomerikus átrendeződések és egyéb rejtett kromoszóma rendellenességek kimutatására alkalmas további módszerek még a Multiplex-Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA), a Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation (MAPH) és az array-Comparative Genomic Hybridisation (CGH) technikák [Koolen és mtsai., 2004; Rooms és mtsai., 2004; Vissers és mtsai., 2010]. A modern molekuláris citogenetikai technikák

---

<sup>1</sup> A gaméták kialakulása során az alábbi lehetőségekkel kell számolni: az ivarsejtbe jutnak 1/ transzlokációban érintett két kromoszóma normális homológjai (egészséges utód, 25%), 2/. mindkét érintett kromoszóma (kiegyensúlyozott transzlokáció: 25%), az egyik érintett kromoszóma a másik normális homológjával (az érintett kromoszóma parciális deléciója, a normális homológ parciális duplikációja: 50%).

fejlődésével egyre több, ritka, kiegyensúlyozatlan transzlokációval járó eset kerül felismerésre. A klinikai és citogenetikai adatok rögzítésére jött létre a European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations (ECARUCA) adatbázis, amely nagy segítséget nyújt a klinikai genetikusok és citogenetikusok mindennapi munkájában [Feenstra és mtsai., 2005]. Kiindulási lépés a feltételezett klinikai diagnózis felállítása, ami a betegek pontos, mindenre kiterjedő fenotípusos jellemzésén alapszik.

A nagyszámú irodalmi megfigyelés hívta fel a figyelmünket a szubtelomerikus átrendeződések vizsgálatának szükségességére. Ma még meglehetősen kevés szubtelomerikus átrendeződéssel összefüggésbe hozható entitás ismert. Ezért a gyakorlatban – a kromoszóma végek érintettségének várható gyakorisága alapján – valamennyi kromoszóma szubtelomerikus régiójának vizsgálatára sort kell keríteni (az acrocentrikus kromoszómák rövid karja kivételével). További entítások felismeréséhez nagyszámú beteg vizsgálata, fenotípus-genotípus elemzések szükségesek. Ezek ismeretében a vizsgálat célzottabban, a várható kromoszóma átrendeződés kimutatására irányultan, s ezáltal költséghatékonyabban végezhető el. Az irodalmi adatok azt is igazolják, hogy azonos kromoszómák szubtelomerikus átrendeződései esetén is vannak fenotípusos különbségek, amelyek a töréspontok eltérő voltával lehetnek összefüggésben. Ezért az átrendeződés kimutatásán túl ma már törekednünk kell a deléció/duplikáció pontos méretének meghatározására, ami lehetővé teszi az érintett régióban lokalizálódó gének és funkcióik megismerését, így a tünetegyüttes patogenetikai hátterének tisztázását. Fentiekből kiindulva munkánk során olyan közepes és súlyos értelmi fogyatékos betegek szubtelomerikus FISH vizsgálatát végeztük el, akiknél a hagyományos kromoszóma vizsgálat normális kariotípust igazolt és egyéb célzott genetikai vizsgálat sem utalt ismert genetikai kórképre (Fragilis-X szindróma, mikrodeléciós szindróma stb.) fennállására. Vizsgáltuk a kiválasztott betegpopulációban a szubtelomerikus kromoszóma átrendeződést mutató esetek előfordulási gyakoriságát, azok *de novo* vagy familiáris jellegét

és a kóros esetekben – a pontos töréspont meghatározásával - genotípus-fenotípus elemzést végeztünk, összehasonlítva a fenotípusos jellemzőket az irodalomban közöltekkel.

### **3.2. Smith-Lemli-Opitz szindróma**

A Smith-Lemli-Opitz szindróma (SLO) (McKusick 270400), egy autoszómális recesszíven öröklődő, enyhétől a súlyosig változó klinikai tünetekkel járó, többszörös fejlődési rendellenesség, melyet a koleszterin bioszintézis zavara okoz [Opitz, 1999]. A szindrómát Smith és munkatársai írták le 1964-ben, akik három betegben arcdysmophiát, microcephaliát, hypospadiasist és súlyos növekedési retardációt észleltek [Smith és mtsai.,1964]. Az SLO szindróma becsült incidenciája a Kaukázusi populációban 1:20 000 és 1:40 000 közé tehető, a hordozó gyakoriság 1 : 50-1 : 70 terjed [Tint és mtsai.,1994; Porter, 2002].

A betegség biokémiai háttere a koleszterin bioszintézis utolsó lépését katalizáló enzim, a 7-dehidrokoleszterin reduktáz (7-DHCR) defektusa. Az enzim csökkent vagy hiányzó működése az enzimblokk előtti szubsztrát, a 7- és 8-dehidrokoleszterin (7-DHC, 8-DHC) felszaporodását, ugyanakkor alacsony koleszterin szintet eredményez [Tint és mtsai., 1994]. Az SLO szindrómás beteg plazmájában és szöveteiben mért emelkedett 7-DHC koncentráció és az egyidejű alacsony koleszterin szint diagnosztikus értékű [Irons és mtsai., 1993]. A koleszterin fontos összetevője a sejt membránnak, a lipid raftoknak, a myelinhüvelynek és prekursora az epesavnak, szteroid hormonoknak, neurosteroidoknak. A koleszterin - az embriogenezis során - a Hedgehog szignálproteinekhez történő kötődése révén fontos szabályozó szerepet játszik a végtag, a genitalia és az agy embrionális fejlődésében [Kelley és mtsai., 1996]. Az SLO szindrómás betegekben a felhalmozódott 7-DHC – helyettesítve a koleszterint – a membrán szterol és kaveolin gazdag régióhoz kötődve a 7-DHC-ből

keletkező oxiszterolok révén megváltoztatja a sejt szignalizációs folyamatát [Ren és mtsai., 2011; Korade és mtsai., 2010].

A klinikai tünetek SLO szindrómában nagyon jellegzetesek: mentális retardáció, microcephalia, holoprosencephalia, táplálási- és magatartás zavar, arcdysmorphia, végtagrendellenességek, a nemi szervek és a vese rendellenességei [(Kelley és Hennekam, 2000)]. A klinikai tünetek nagy változatosságot mutatnak, ezért a fenotípusos jellemzők pontosabb megítéléséhez és az SLO szindróma súlyossági fokainak meghatározásához 2000-ben Kelley és Hennekam egy súlyossági score rendszert dolgozott ki, mely 10 anatómiailag különböző régió (agy, száj-szájpad, végtag, vese, szív, bél rendszer, nemi szervek, máj, tüdő, szem) fejlődési rendellenességeit veszi figyelembe. A pontrendszernek megfelelően megkülönböztetnek enyhe (<20), típusos (közepes súlyos) (20-50) és súlyos (>50) SLO szindrómát [Kelley és Hennekam, 2000].

A betegségért felelős humán *DHCR7* gént - mely a 11q13 régióba lokalizálódik, 14,100 bp nagyságú és kilenc exont tartalmaz - 1998-ban klónozták. Jelenleg a Human Gene Mutation adatbázis (HGMD) szerint a *DHCR7* génnek összesen 164 különböző mutációját azonosították, ebből misszensz/nonszensz mutáció: 142; splicing: 6; kis deléción: 8; kis inzerción: 2; kis index: 1; nagy deléción: 5 [www.hgmd.cf.ac.uk].

A biokémiai háttér tisztázásával az SLO szindrómában lehetőség nyílt különböző terápiás beavatkozásokra, amelyek azonban csak szupportív jellegűek. Az 1990-es években számos multicentrikus tanulmány beszámolt arról, hogy a koleszterin pótlás epesavval vagy epesav nélkül SLO szindrómás betegekben egyaránt javíthatja a beteg klinikai állapotát és a biokémiai paramétereket. A koleszterin pótlás ajánlott adagja 50 mg/kg/nap, mely szükség szerint 300 mg/kg/nap dózissá emelhető [Irons és mtsai., 1997; Nwokoro és Mulwihil, 1997]. A sztatin vegyületekről kimutatták, hogy alternatív útvonalon segítik a 7-DHC → koleszterin átalakulást és a 7-DHCR reziduális aktivitását fokozzák. Stark és munkatársai a szimvasztatin

adását követően észleltek klinikai javulást SLO szindrómás betegekben [Starck és mtsai., 2002]. Az SLO szindrómában alkalmazott kezelések hatékonyságát napjainkban kétségbevonják. Az utóbbi években számos - a korábbi pozitív megfigyeléseket, a klinikai javulást megkérdőjelező - tanulmány jelent meg, amelyek szerzői nem találtak szignifikáns javulást a kezelés hatására [Haas és mtsai., 2007; Tierney és mtsai., 2010].

## **4. BETEGEK és MÓDSZEREK**

### **4.1. Szubtelomerikus kromoszóma átrendeződések vizsgálata**

#### **4.1.1. Betegek**

A DE OEC Gyermekgyógyászati Intézet Klinikai Genetika Központ Genetikai szakrendelésén 2008.01.01. és 2012.12.31. között megjelent többszörös fejlődési rendellenességben szenvedő, mentálisan retardált gyermek közül 125 beteget választottunk ki a Lam és munkatársai által javasolt szelekciós kritériumok alapján. A Genetikai Laboratóriumban összesen 149 szubtelomerikus FISH vizsgálatot végeztünk, ebből 125 mentálisan retardált beteg volt, 24 pedig egészséges hozzátartozó. Az értelmi fogyatékos betegeknél a hagyományos citogenetikai vizsgálat normális kariotípust eredményezett és egyéb célzott genetikai vizsgálat sem utalt ismert genetikai kórkép (Fragilis-X szindróma, mikrodeléciós szindróma stb.) fennállására. A betegek kiválasztásakor alkalmazott, a nemzetközi irodalomban javasolt szelekciós kritériumok a következők [Lam, 2006]: Major kritériumok: 1/. hagyományos G-sáv technikával normális kariotípus (350-450 sáv), 2/. közepes vagy súlyos mentális retardáció (IQ <50, Brunet-Lezine score). Minor kritériumok: 1/. legalább két arcrégiót érintő dysmorphia, 2/. veleszületett szervi rendellenesség, 3/. pre-és/vagy posztnatálisan észlelhető növekedési zavar, 4/. magatartászavarok, 5/. családban mentális retardáció előfordulása, 6/. az anamnézisben perinatális halálozás, spontán vetélés. A vizsgálat indikációjához a két major és három minor kritérium jelenléte szükséges. A mintavételre, a minta tárolására és a vizsgálatok elvégzésére vonatkozó beleegyező nyilatkozatot a betegek törvényes képviselőitől minden esetben megkaptuk. Az esetismertetéseknel a fényképek bemutatása szülői beleegyezéssel történt. Az anamnesztikus és klinikai adatok pontos rögzítésére kérdőívet készítettünk. A kérdőív adatai a családban előforduló betegségekre, megelőző vetélésekre, halvaszületésekre vonatkozó kérdések mellett magukba foglalták az adott terhességre vonatkozó jellemzőket, a prenatális szűrővizsgálat eredményeit, a perinatális problémákat, a csecsemő- és kisdedkori fejlődési adatokat, valamint az idegrendszeri és egyéb szervek betegségére utaló tüneteket és

leleteket. A kérdőív végén az orvos által észlelt dysmorphiás tünetek feltüntetésére és családfa készítésre került sor. A részletes kérdőív a Függelékben mellékelve. (Függelék 1.)

## **4.1.2. Módszerek**

### **4.1.2.1. Szubtelomerikus FISH vizsgálat**

A FISH vizsgálat elvégzésére a betegek perifériás vér mintájából készült, metanol-ecetsav 3:1 arányú keverékében fixált kromoszóma preparátumokat használtunk. A szubtelomerikus FISH vizsgálatot ToTelVysion próba panel alkalmazásával (Abbott Molecular/Vysis Inc., Des Plaines, IL) végeztük. A próba panel 15 egyedi „ready-to-use” direkt jelölésű próba keverékből áll, amely valamennyi kromoszóma p és q karjának telomer régiójára specifikus próbát tartalmazza (kivéve az akrocentrikus kromoszómák - 13, 14, 15, 21, 22 - p karjait).

#### **Próba keverékek összetétele:**

**1-es próbakeverék:** 1p-Spektrumzöld, 1q-Spektrumnarancs, Xp/Yp-Spektrumzöld és Spektrumnarancs, CEP X- SpektrumAqua

**2-es próbakeverék:** 2p-Spektrumzöld, 2q-Spektrumnarancs, Xq/Yq-Spektrumzöld és Spektrumnarancs, CEP X- SpektrumAqua

**3-as próbakeverék:** 3p-Spektrumzöld, 3q-Spektrumnarancs, 22q-Spektrumzöld és Spektrumnarancs, LSI bcr(22q11)- SpektrumAqua

**4-es próbakeverék:** 4p-Spektrumzöld, 4q-Spektrumnarancs, 21q-Spektrumzöld és Spektrumnarancs, LSI AML (21q22)- SpektrumAqua

**5-ös próbakeverék:** 5p-Spektrumzöld, 5q-Spektrumnarancs

**6-os próbakeverék:** 6p-Spektrumzöld, 6q-Spektrumnarancs, 13q-Spektrumzöld és Spektrumnarancs, LSI 13 (13q14)- SpektrumAqua

**7-es próbakeverék:** 7p-Spektrumzöld, 7q-Spektrumnarancs, 14q-Spektrumzöld és Spektrumnarancs, LSI TCR (14q11.2)- SpektrumAqua

**8-as próbakeverék:** 8p-Spektrumzöld, 8q-Spektrumnarancs, 17p-Spektrumzöld és Spektrumnarancs, CEP17- SpektrumAqua

**9-es próbakeverék:** 9p-Spektrumzöld, 9q-Spektrumnarancs, 17q-Spektrumzöld és Spektrumnarancs, CEP17- SpektrumAqua

**10-es próbakeverék:** 10p-Spektrumzöld, 10q-Spektrumnarancs, 15q-Spektrumzöld és Spektrumnarancs, LSI PML (15q22)- SpektrumAqua

**11-es próbakeverék:** 11p-Spektrumzöld, 11q-Spektrumnarancs, 18p-Spektrumzöld és Spektrumnarancs, CEP18- SpektrumAqua

**12-es próbakeverék:** 12p-Spektrumzöld, 12q-Spektrumnarancs, 18q-Spektrumzöld és Spektrumnarancs, CEP18- SpektrumAqua

**13-as próbakeverék:** 16p-Spektrumzöld, 16q-Spektrumnarancs

**14-es próbakeverék:** 19p-Spektrumzöld, 19q-Spektrumnarancs, LSI 19p13 SpektrumAqua

**15-ös próbakeverék:** 20p-Spektrumzöld, 20q-Spektrumnarancs

A próbakeverékben lévő CEP és LSI próbák belső kontrollként a kromoszómák azonosítására szolgálnak. A célzott vizsgálatokat 10pter (D10S2488), 21qter (D21S1446), 8pter (RH65733), 12pter (D12S158) szubtelomerikus és centromer specifikus CEP10 (D10Z1), CEP8 (D8Z2) próbákkal (Poseidon RF, Kreatech Diagnostic, Vysis) végeztük. Az 1p36.33 régió (D1S2217) deléciójának kimutatásához a szubtelomerikus régióra specifikus FISH próbát (Kreatech) alkalmaztuk. A FISH módszer technikai lépéseit illetően a gyártók ajánlásait követtük. Az értékeléshez *Axioplan 2* (Zeiss) fluoreszcensz mikroszkópot és képanalizáló szoftvert (*MetaSystems, Altussheim, Germany*) használtunk. Minden próbakeverék esetében legalább 15-15 metafázist értékeltünk.

#### **4.1.2.2. Array-Comparativ Genomiális Hibridizáció (CGH)**

Az array-CGH vizsgálatot kollaborációban Alida C. Knegt, az Amsterdami Egyetem Klinikai Genetika Centrumának citogenetikusa végezte. A diagnózishoz használt array-CGH paraméterei: Agilent 180K oligo-array (Amadid 023363); 13kb overall median probe spacing; NCBI Build 36.1). A jelölési és hibridizációs lépések során a standard metodikát, az array CGH profilok elemzéséhez az Agilent szoftvert használták.

## 4.2. A Smith-Lemli-Opitz (SLO) szindróma diagnosztizálása

### 4.2.1. Az SLO szindrómás betegek kiválasztása

Munkánk során az SLO szindróma klinikai, biokémiai, genetikai diagnosztikáját kívántuk megvalósítani egy – a témában elkötelezett – munkacsoport létrehozásával és tapasztalatot kívántunk szerezni a kezelés hatásosságáról. Az SLO program egy eset fenotípusos jellemzők alapján felvetett klinikai diagnózisával kezdődött, amit biokémiai és molekuláris vizsgálattal erősítettünk meg. Majd UV spektrofotometria módszerével az SLO szindrómában szenvedő gyermeknél a szimvasztatin és a koleszterin szubsztitúciós kezelés hatékonyságát vizsgáltuk a 7-DHC és koleszterin értékek monitorozásával. A Brnoban dolgozó Libor Kozak professzorral<sup>2</sup> kollaborációban elvégzett molekuláris genetikai vizsgálat indította el azt a hazai kezdeményezést, amelynek során összegyűjtöttük az általunk és egyéb hazai genetikai centrumokban diagnosztizált SLO-s betegeket. A vizsgált 15 magyarországi SLO szindrómás beteg adatainak összegyűjtésével lehetőség nyílt a DE OEC KBMPI (ma: Laboratóriumi Medicina Intézet: LMI) Molekuláris Genetika Laboratóriumában a *DHCR7* gén molekuláris genetikai vizsgálatára és az LMI és Gyermekgyógyászati Intézet együttműködésében egy „SLO-szindróma diagnosztikai és terápiás munkacsoport”-ot hoztunk létre. Jelen értekezésben molekuláris genetikai vizsgálattal elsőként diagnosztizált magyar SLO szindrómás gyermek genotípus-fenotípus összefüggésének és az alkalmazott terápia hatékonyságának vizsgálatával szerzett tapasztalataimat ismertetem és beszámolok az általunk vizsgált tizenöt magyarországi SLO szindrómás beteg klinikai tüneteinek és biokémiai paraméterei között észlelt összefüggésről. A 15 SLO szindrómás eset ismertetése és genotípus-fenotípus vizsgálata egyéb közlemények alapjául szolgált [Balogh és mtsai., 2012]. A 15 beteg (életkor: 0,1-18 év; ffi:nő= 8:7) diagnosztizálása a fenotípusos jellemzők alapján, majd a biokémiai és molekuláris genetikai tesztekkel történt. A fenotípusos jellemzők alapján az SLO szindróma

---

<sup>2</sup> 2009-ben sajnálatos baleset kapcsán életét veszítette.

súlyosságát Kelley és Hennekam 2000-ben közzétett súlyossági score rendszere alapján határoztuk meg (Függelék 2.). Ennek megfelelően megkülönböztetünk enyhe (score:<20), közepes (tipikus) (score: 20-50) és súlyos SLO fenotípust (score:>50). Az enyhe fenotípusú csoportba négy beteget soroltunk (n=4, diagnóziskor életkoruk: 0,5-18 év). A tipikus csoportba hét gyermek tartozott (n=7, életkoruk a diagnóziskor: 0,1-7 év), akik közül két beteg két éves életkor előtt meghalt. A súlyos fenotípusú csoportba tartozó négy gyermek mindegyike csecsemőkorában meghalt (n=4, életkoruk diagnóziskor: < 2 hónap).

#### **4.2.2. Módszerek**

##### **4.2.2.1. Biokémiai vizsgálat (7-DHC meghatározás)**

A koleszterin szint meghatározásához koleszterin oxidáz enzimátikus módszert alkalmaztunk (CHOD-PAP, Roche Diagnostics, Modular P). A szérum 7-DHC gyors meghatározása a Honda által módosított UV spektrofotometriás vizsgálattal történt, melyet összehasonlítottunk a Kelley által leírt GC/MS módszerrel [Kelley és mtsai., 1995; Honda és mtsai, 1997]. Negatív kontrollnak Humatrol normális szérumot használtunk (Human, Germany, Cat. No. 13511). A módszer detekciós határa 10 mg/L körül van és a változások a 10-400 mg/L-es tartományban lineárisak. Az extrakció során 0,2 mL szérum és 1,6 mL c-hexán:i-propanol 3:1 arányú keverékét vortexeltük 20 másodpercig, majd centrifugáltuk (10 perc, 900G). A centrifugálást követően a tiszta felülúszó abszorbanciáját 282 nm-en mértük meg. A 7-DHC koncentrációkat összehasonlítottuk a publikált GC/MS eredményekkel [Kelley, 1995]. Tíz szérum mintát analizáltunk párhuzamosan GC-MS és UV spektrofotométerrel. Ugyanazon minták bizonyultak pozitívnak (n: 3) és negatívnak (n: 6) mind a két módszerrel. Egy hordozó szérum mintája mutatott csupán különbséget a két metodika között. Az UV spektrofotométer alacsonyabb detektálási határa miatt a 0,49 mg/L 7-DHC érték az UV spektrofotometriával nem volt kimutatható. A szérum lipid és lipoprotein szint mérése fotometriával történt (Modular-P, Roche), kivéve a VLDL-koleszterin arány meghatározását (agaróz

gélelektroforézis, Sebia). A szérumban D<sub>3</sub> vitamin szintet kemilumineszcensz immunoassayvel mértük (Modular E-170, Roche).

#### **4.2.2.2. *DHCR7* gén mutáció vizsgálata molekuláris genetikai módszerrel**

- *PCR/RFLP analízis*

A genomiális DNS-t 5-10 mL EDTA-val alvadésgátolt vérből izoláltuk só precipitációs módszerrel. Egy gyors PCR-alapú DNS analízist használtunk, nyolc – az európai populációban gyakran előforduló - *DHCR7* mutáció kimutatására (p.W151X, p.L157P, p.V326L, IVS8-1G>C, p.L109P, p.R446Q, p.R352Q és p.C380Y). A genotipizálás az eredetileg ott levő vagy a PCR primer által beépített restrikciós helyek használatával történt.

- *Szekvencia analízis*

Az exonok és az exon-intron határok szekvenálása Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit-tel történt (Amersham Biosciences, UK) ALFexpress II (Amersham Biosciences, UK) analizátoron a gyártói ajánlásoknak megfelelően. A PCR termékeket mindkét irányból megszekvenáltuk.

#### **4.2.2.3. *Statisztikai analízis***

A statisztikai analízishez a Microsoft Office Excel 2003 Analysis ToolPak Add-In (Regression Tool) programot használtuk. A p értékek mindegyik kiválasztott időpontban szignifikánsnak bizonyultak ( $p < 0,05$ ).

A koleszterin, a 7-DHC és az  $\alpha$ -lipoprotein szintek statisztikai összehasonlítását a három betegcsoportban Kruskal-Wallis teszttel végeztük. Tekintettel arra, hogy a koleszterin és az  $\alpha$ -lipoprotein szintek Gauss-görbe szerinti eloszlást mutatnak, az értékek páronkénti összehasonlítására a Bonferroni tesztet alkalmaztuk.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1 A szubtelomerikus vizsgálat eredményei

A DE OEC Gyermekgyógyászati Intézet Klinikai Genetika Központ Genetikai Laboratóriumában 2008.01.01. és 2012.12.31. között összesen 149 szubtelomerikus FISH vizsgálatot végeztünk. Ebből 125 mentálisan retardált beteg (ffi:nő = 73:52, átlag életkor: 9,8 év, szélső értékek: 4 év - 27 év) 24 pedig egészséges hozzátartozó volt. A nemzetközi kritérium rendszer alapján kiválasztott 125 idiopátiás mentális retardációban szenvedő beteg közül 13 esetben (13/125; 10,4 %) mutattunk ki szubtelomerikus kromoszóma aberrációt, ebből négy *de novo*, míg kilenc eset familiáris eredetűnek bizonyult. ***De novo*** keletkezett eltérések: **ish del(3)(qter-)** (1 beteg); **ish del(1)(pter-)** (2 beteg); **ish del(22)(qter-)** (1 beteg). **Familiáris aberrációk:** **ish der(8)t(8;12)(pter-,pter+)** (2 beteg); **ish der(21)t(10;21)(pter+,qter-)** (3 beteg); **ish der(4)t(4;8)(pter-;qter+)** (1 beteg); **ish der(3)t(3;8)(pter-;pter+)** (1 beteg); **ish der(10)t(10;17)(qter-;qter+)** (2 beteg) (3. táblázat). A 24 egészséges hozzátartozó FISH vizsgálata hét esetben igazolt kiegyensúlyozott transzlokáció hordozást. Mind a 41 szubtelomerikus kromoszóma régiót 81 (81/125) esetben vizsgáltuk meg, 44 esetben célzott FISH vizsgálatra került sor (44/125).

Célzott szubtelomerikus FISH vizsgálatot a szubtelomerikus kromoszóma eltérést hordozó esetek egyenesági hozzátartozóiban (szülők, testvérek, nagyszülők, nagynénik, nagybácsik, unokatestvérek) vagy a fenotípusos eltérések alapján egy konkrét szubtelomerikus kromoszóma aberráció gyanúja esetén végeztünk. Minden kromoszómarégió vizsgálatakor kilenc beteg esetében (9/81), a célzott vizsgálati csoportban pedig négy esetben (4/44) mutattunk ki szubtelomerikus kromoszóma aberrációt.

Sajnálatos módon, a familiáris esetekben a második vagy harmadik beteg gyermek megszületése után került csak sor a család vizsgálatára, amikor 2008-ban bevezettük a

szubtelomerikus FISH módszert és az idiopátiás mentálisan retardált betegeket a kritérium rendszer alapján kiválasztva, megfelelő indikáció esetén, a vizsgálatot elvégezhettük.

Az 1p36 deléciós szindróma, az egyik leggyakoribb szubtelomerikus kromoszóma aberráció, melyet a közepes/súlyos mentális retardáció, jellegzetes arcdysmorphia, izomhypotonia, obesitás és epilepszia jellemez. A klinikai tünetek gyakran átfedést mutatnak a Prader-Willi szindróma jellemzőivel, ezért 12 olyan Prader-Willi szindrómára jellemző fenotípusú betegnél végeztük el az 1p36 szubtelomerikus deléció FISH vizsgálatát, akikben a Prader-Willi szindróma, a 15q11.2-régió specifikus FISH próbával nem igazolódott. Az uniparentális diszómia lehetőségét csak négy esetben zártuk ki. A 12 Prader-Willi szindrómára gyanús esetből kettőben igazoltuk az 1p36.33 deléciót (ish subtel del(1pter)), mely mindkét esetben *de novo* eredetűnek bizonyult. A további hat beteg UPD és metilációs mintázat vizsgálata folyamatban van.

### 3. Táblázat Szubtelomerikus kromoszóma aberrációk

<i>Aberráció típusa</i>	<i>Betegek száma</i>	<i>Aberráció eredete</i>	<i>Genetikai központ</i>
<b>ish der(8)t(8;12)(pter-,pter+)</b>	<b>2</b>	<b>familiáris</b>	<b>DE OEC</b>
<b>ish der(21)t(10;21)(pter+,qter-)</b>	<b>3</b>	<b>familiáris</b>	<b>DE OEC</b>
<b>ish der(4)t(4;8)(pter-,qter+)</b>	<b>1</b>	<b>familiáris</b>	<b>DE OEC</b>
<b>ish der(3)t(3;8)(pter-,pter+)</b>	<b>1</b>	<b>familiáris</b>	<b>Szegedi Egyetem</b>
<b>ish der(10)t(10;17)(qter-,qter+)</b>	<b>2</b>	<b>familiáris</b>	<b>DE OEC</b>
<b>ish del(1)(pter-)</b>	<b>2</b>	<b>de novo</b>	<b>DE OEC</b>
<b>ish del(3)(qter-)</b>	<b>1</b>	<b>de novo</b>	<b>DE OEC</b>
<b>ish del(22)(qter-)</b>	<b>1</b>	<b>de novo</b>	<b>Zalaegerszeg</b>

Fekete színnel jelöltem azokat az eseteket, mely FISH vizsgálatot önállóan végeztem és a részletes genotípus-fenotípus elemzés része a disszertációnak.

A kék színnel jelöltem azokat az eseteket melyet önállóan végeztem, de a részletes genotípus-fenotípus elemzés nem része a disszertációnak. Piros szín jelzi azt a két más genetikai centrumhoz tartozó esetet, melyet munkatársam Dr. Ujfalusi A. diagnosztizált.

#### 5.1.1. Esetismertetések

##### 5.1.1.1. *Familiáris kiegyensúlyozatlan transzlokációk*

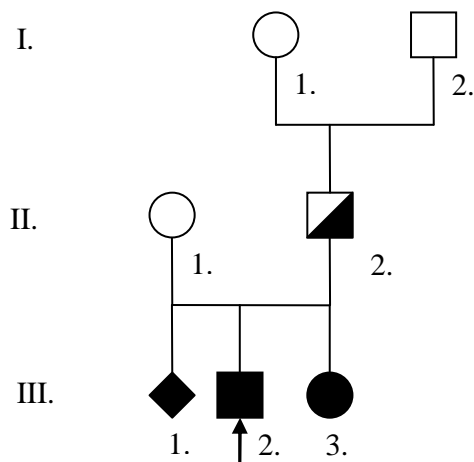
###### *ish der(8)t(8;12)(pter-,pter+)*

**1. család:** Az érintett családban egy testvérpár vizsgálatára került sor. A klinikai tünetek feltűnően azonosak voltak s ezek háttérében azonos genetikai eltérés állt. A gyermekek a genetikai hibát hordozó apjuktól örökölték.

###### *1. beteg (III/2 – 2. ábra)*

A proband az anya egy spontán vetélést követő második terhességéből, első élő gyermekként spontán született, 38. gesztációs hétre, 2750g (10 pc) születési súllyal (**2. ábra, III/2.**).

Pszichomotoros fejlődése megkésett volt. Három éves korától myoclonus epilepszia miatt lamotrigine, clobazam és valproát terápiában részesül. Egy hónapos korában jelentkezett először genetikai rendelésen, ahol fizikális vizsgálat során izomhypotóniát, posztaxialis polydactyliát és arcdysmophiát (lapos arcközép, hypertelorismus, ptosis, alacsonyan ülő kicsi fülkagyló, lefelé tekintő szájjug) észleltünk (**3. ábra**). A szemészeti vizsgálat retinitis pigmentosát, nystagmust, decolorált papillákat igazolt. Jelenleg 11 éves, IQ-ja: 35.



**2. ábra 1. család családfája -  $ish\ der(8)t(8;12)(pter-,pter+)$**

Az üres szimbólum az egészséges egyéneket, a besatírozott szimbólum kiegyensúlyozatlan transzlokáció hordozó betegeket, a félig besatírozott szimbólum a kiegyensúlyozott transzlokáció hordozó egyént, a fekete rombusz spontán vetélést jelöl.

**2. beteg (III/3 – 2. ábra)**

Lánytestvére, az anya harmadik terhességéből született, 39. gesztációs hétre, 3200g (50 pc) születési súllyal, medencevégű fekvés miatt császármetszéssel (**2. ábra, III/3.**). Megkésett pszichomotoros fejlődést, myoclonus epilepsziát és a testvéréhez teljesen hasonló fenotípusos jegyeket észleltünk (**3. ábra**).



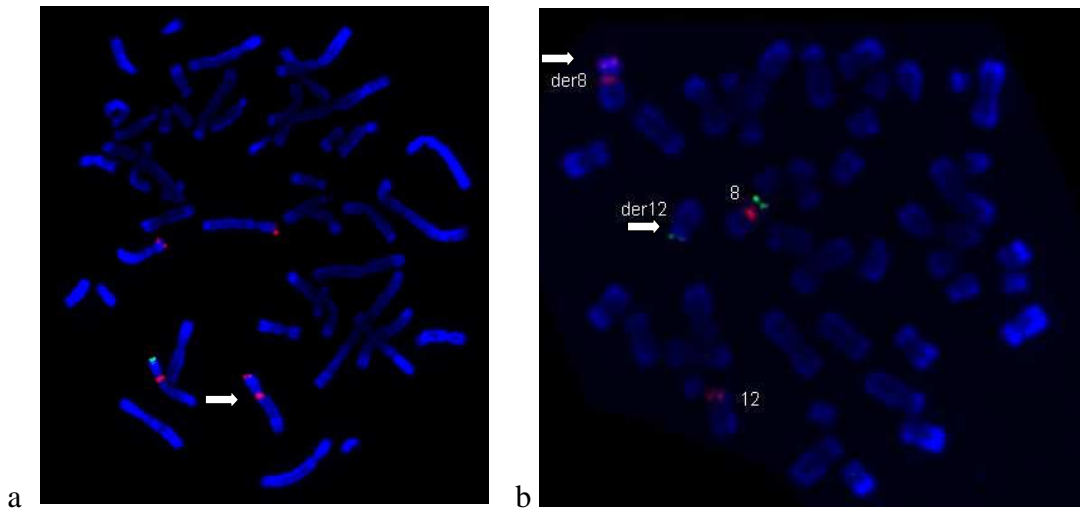
1. beteg (III/2.)



2. beteg (III/3)

**3. ábra.** Az *ish der(8)t(8;12)(pter-,pter+)* kiegyensúlyozatlan transzlokációt hordozó *testvérpár* (Jellegzetes arcdysmorphia: lapos arcközép, hypertelorismus, ptosis, alacsonyan ülő kicsi fülkagyló, lefelé tekintő szájjug)

Mivel a klinikai kép specifikus szindrómának nem felelt meg, elvégeztük a szubtelomerikus FISH vizsgálatot, amely a 8pter régió delécióját és a 12pter régió duplikációját mutatta. A vizsgálatot 8pter, 12pter és CEP8 próbakeverék alkalmazásával megismételve, a 8pter és 12pter régiók közötti kiegyensúlyozatlan transzlokáció igazolódott: **ish der(8)t(8;12)(pter-,pter+)** (4/a ábra). A szubtelomerikus FISH vizsgálat a testvérével megegyező eltérést mutatott: **ish der(8)t(8;12)(pter-,pter+)**. A családvizsgálat az apa (II/2) kiegyensúlyozott transzlokáció hordozását igazolta. Mivel az apai nagyszülőknél az eltérés nem volt kimutatható, az apa eltérése *de novo* kiegyensúlyozott transzlokációnak tekintendő: **ish t(8;12)(pter-,pter+;pter-,pter+)dn** (4/b. ábra).



**4./a ábra Az *ish der(8)t(8;12)(pter-,pter+)* kiegyensúlyozatlan szubtelomerikus transzlokáció FISH képe**

Piros szignál: CEP8 (D8Z2), 12pter (D12S158) régió. Zöld szignál: 8pter (RH65733) régió. A nyíl a derivált 8-as kromoszómát jelöli, ahol a zöld szignál hiánya jelzi a deletált szubtelomerikus részt és a 12p specifikus piros szignál jelenléte mutatja a 12p szubtelomerikus duplikációt.<sup>3</sup>

**4./b ábra Az *ish t(8;12)(pter-,pter+;pter-,pter+)dn* kiegyensúlyozott szubtelomerikus transzlokáció FISH képe**

Piros szignál: CEP8 (D8Z2), 12pter (D12S158) régió. Zöld szignál: 8pter (RH65733) régió. A nyílak a 12pter és 8pter régiók transzlokációját mutatja.

***ish der(21)t(10;21)(pter+;qter-)***

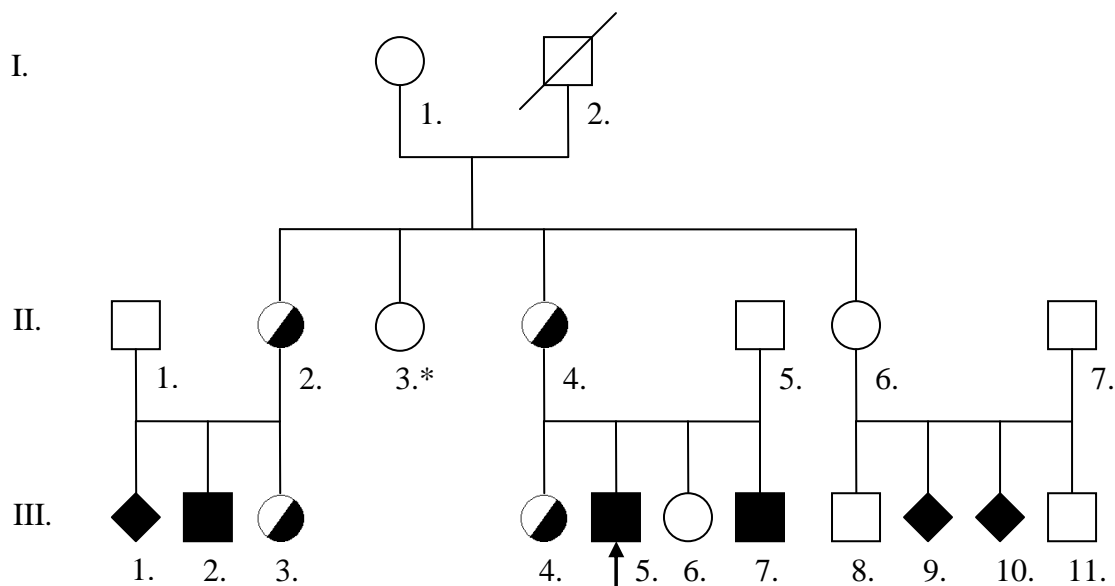
**2. család.:** Egy tetsvérpárt és unokatestvérüket vizsgáltuk. A *dysmorphiás tünetek és a mentális retardáció súlyossága mindhárom esetben hasonló volt. A FISH vizsgálat és az array CGH molekuláris szinten is azonos genetikai eltérést igazolt.*

**1. beteg (III/5 - 5. ábra)**

A 12 éves fiúgyermek egészséges szülők nem-rokon házasságából, az édesanya második, eseménytelen terhességéből, 37. gesztációs hétre per vias naturales született. Születési súlya 3000g (25 pc), hossza 50 cm (50 pc, fejkörfogata 34 cm (50 pc) volt [Joubert és mtsai., 1993]. Magzatvíz aspiráció és perinatális distresszes tünetek (Apgar: 5/8) miatt intubálták és gépi lélegeztetést kezdtek. Csecsemőkorában pszichomotoros fejlődése normális ütemben zajlott: 6 hónaposan segítséggel, 8 hónaposan segítség nélkül ült; 10 hónaposan egyedül állt; 18

<sup>3</sup> ish: in situ hibridizáció

hónaposan elindult. Három éves korában szobatiszta lett. Beszédfejlődése kifejezetten megkésett volt, csak 4,5 évesen kezdett el szavakat mondani. Fizikális vizsgálat során észlelt fenotípusos jellemzők a következők: aszimmetrikus ptosis, középarc hypoplasia, hosszú philtrum, malformált fülek (enyhén prominens antihelix, prominens antitragus, nagy felfelé ívelő fülcimpa), keskeny gótikus szápad, vékony felső ajakpír, micrognathia) (6. ábra). A kardiológiai és radiológiai vizsgálatok során pitvari septum defektus, scoliosis és kyphosis igazolódott. Koponya MRI vizsgálat corticalis atrophiát mutatott. Tizenkét éves korában végzett genetikai kontroll vizsgálat alkalmával a beteg testsúlya 32 kg (10 pc), testmagassága 131 cm (3 pc-6.37 cm), fejkörfogata 52 cm (10 pc). Intelligencia teszt (Brunet-Lèzine) mérsékelt fokú mentális retardációt igazolt (IQ: 48).



**5. ábra A 2. család családfája - *ish der(21)t(10;21)(pter+,qter-)***

A kiegyensúlyozatlan transzlokáció hordozókat besatírozott szimbólum jelöli. 1. beteg: III/5; 2. beteg: III/7; 3. beteg: III/2. A kiegyensúlyozott transzlokáció hordozókat a félig besatírozott szimbólum mutatja. A spontán vetélést fekete rombuszal ábrázoltuk. Az egészséges családtagokat üres jelek szimbolizálják. Az I/1, II/6, III/8, III/11 családtagok nem egyeztek bele a FISH vizsgálatba. \* II/3, a beteg nagynénje szintén értelmi fogyatékos, hasonló fenotípusos jellemzőkkel bír, de nem egyezett bele a FISH vizsgálatba.



1. beteg (III/5)

2. beteg (III/7)



3. beteg (III/2)

**6. ábra** Az *ish der(21)t(10;21)(pter+;qter-)* kiegyensúlyozatlan transzlokációt hordozó **betegek** (Jellegzetes arcdysmorphia: középarc hypoplasia, ptosis, micrognathia, malformált fül (nagy felfelé ívelő fülcimpa, enyhén prominens antihelix, prominens antitragus)).

### **2. beteg (III/7- 5. ábra)**

A beteg III/5 testvére, a szülők negyedik gyermeke (**5. ábra**). Eseménytelen terhességet követően született harántfekvés miatt császármetszéssel a 37. gesztációs héten. Születési súlya 3450g (50 pc), hossza 51 cm (50 pc), fejkörfogata 35 cm (75 pc) volt. Egy hónapos korában generalizált izomhypotoniát észleltek, ezért koponya MRI vizsgálat történt, melyen cerebelláris hypoplasia, corticalis atrophia és egy 4 mm-es nagyságú septum pellucidum cysta ábrázolódott. Csecsemőkorában pszichomotoros fejlődése - az intenzív neurorehabilitációs

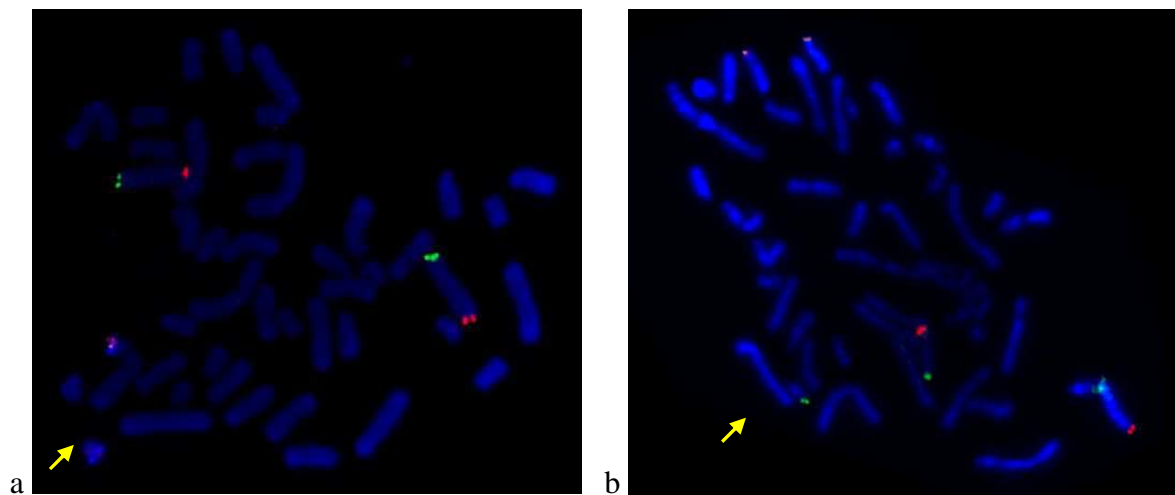
tréningnek köszönhetően- normális ütemben zajlott. Hat hónapos korában egyedül ült, 10 hónapos korában segítség nélkül felállt, 18 hónapos korában elindult. Három évesen szobatiszta lett. Beszédfejlődése – hasonlóan testvéréhez – megkésett volt, négy évesen kezdett el beszélni. A bátyjához teljesen hasonló dysmorph jegyeket mutat: aszimmetrikus ptosis, középarc hypoplasia, hosszú philtrum, micrognathia, malformált fül (enyhén prominens antihelix, prominens antitragus, nagy felfelé ívelő fülcimpa), keskeny, gótikus szápad és vékony felső ajakpír (**6. ábra**). Szervi rendellenességek közül pitvari septum defektus, agyi anomália emelhető ki. Öt éves kontroll vizsgálat alkalmával testsúlya 16.8 kg (25 pc), magassága 110 cm (50 pc), fejkörfogat 52 cm (90 pc). Intelligencia teszt (Brunet-Lèzine) közepes fokú értelmi fogyatékoságot igazolt (IQ: 47).

### **3. beteg (III/2 - 5. ábra)**

A 22 éves férfi beteg – az III/5 és III/7 beteg unokatestvére – egészséges, nem-rokon házaspár első élő gyermekeként született. A mater terhességi anamnézisében egy korábbi spontán abortus szerepelt. Eseménytelen terhességet követően született spontán, 40. gesztációs hétre. Születési súlya 3300 g (50 pc), hossza 50 cm (50 pc) és fejkörfogata 35 cm (75 pc) volt. Perinatalis distresszes tünetek miatt újraélesztést igényelt. Pszichomotoros és beszédfejlődése egyaránt megkésett volt: segítséggel 8 hónaposan, segítség nélkül 12 hónaposan ült, 18 hónapos korában állt fel és önállóan 24 hónaposan indult el. Négy és fél éves korában kezdett el beszélni. Az észlelhető fenotípusos jegyek nagyon hasonlítanak az unokatestvéreinél észleltekhöz. Ptosis, középarc hypoplasia, micrognathia, hosszú philtrum, malformált fül (enyhén prominens antihelix, prominens antitragus, nagy felfelé ívelő fülcimpa), vékony felső ajakpír (**6. ábra**). További észlelt rendellenességek: mitrális prolapsus, kyphosis, scoliosis, a thenar és hypothenar izmok atrophiája, ízületi hyperflexibilitás, habituális patella luxáció. Az alsó és felső végtagi izmokban közepes fokú gyengeség és atrophia észlelhető. EMG vizsgálat során csökkent amplitúdójú és időtartamú potenciálok voltak detektálhatók a jobb musculus

deltoideus posteriorban, a bal musculus extensor digitalis communisban és a bal musculus tibialis anteriorban. Ezek az eltérések közepes fokú miogén lézióra utaltak. Agy MRI vizsgálat kóros eltérést nem igazolt. MAWI-teszt szerint intelligencia hányadosai a következőképpen alakultak: IQ: 49, VQ: 60, PQ: 44. Speciális iskolát végzett, jelenleg felnőtt foglalkoztató intézménybe jár, írni-olvasni alapszinten tud.

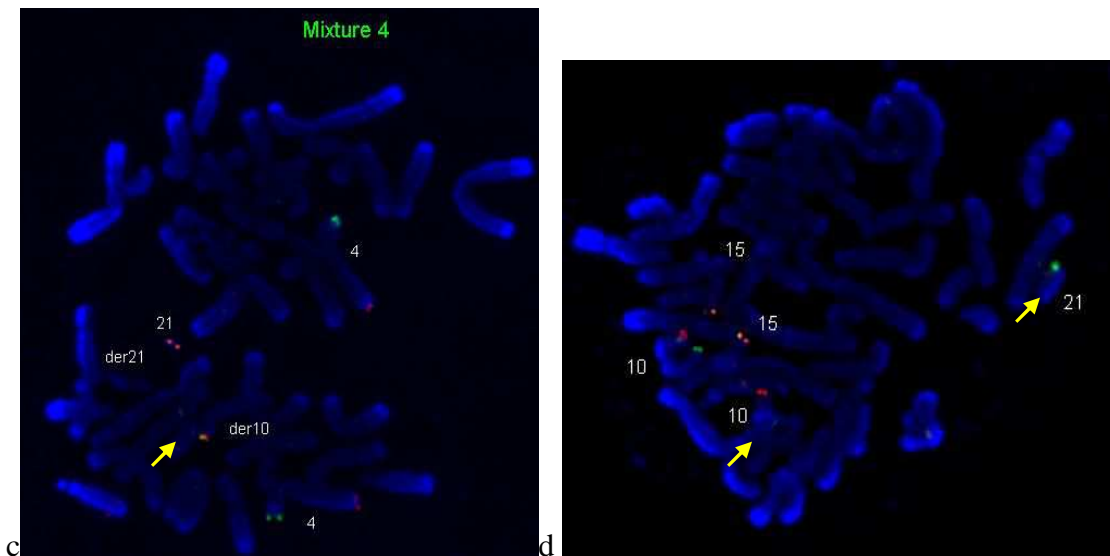
A szubtelomerikus FISH vizsgálat során egy 21qter és három 10pter specifikus szignált detektáltunk mindhárom érintett betegben, melyek 21qter deléciót és 10pter duplikációt igazoltak kiegyensúlyozatlan transzlokáció formájában: **ish der(21)t(10;21)(pter+;qter-)**. A transzlokáció során a 10pter régió arra a der(21)-es kromoszómára transzlokálódott, amelynek deletálódott a qter szubtelomerikus régiója (**7./a,b ábra**). Mindegyik egyenesági rokonnál elvégeztük a FISH vizsgálatot 10pter, 21qter specifikus próbákkal. A proband édesanyja (II/4), lánytestvére (III/4), nagynénje (II/2) és unokatestvére (III/3) kiegyensúlyozott transzlokáció hordozónak bizonyult: **ish t(10;21)(pter+,qter-;pter+,qter-)**. (**7/c,d. ábra**).



**7./a ábra** Az **ish der(21)t(10;21)(pter+;qter-)** kiegyensúlyozatlan szubtelomerikus transzlokáció FISH képe

**a.** FISH kép a ToTelVysion Multi-color DNS Próba kit, 4-es keverékének felhasználásával (4pter régió (zöld szignál), 4qter régió (piros szignál), 21qter régió (fúziós szignál), a nyíl a 21qter szubtelomerikus szignál hiányát jelöli a 21-es kromoszóma deletált régiójában. **b.** FISH kép a ToTelVysion Multi-color DNS Proba kit 10-es keverékének felhasználásával (10pter régió (zöld szignál), 10qter régió (piros szignál), 15qter régió (fúziós szignál), a nyíl a 10pter szubtelomerikus szignál duplikációjára.<sup>4</sup>

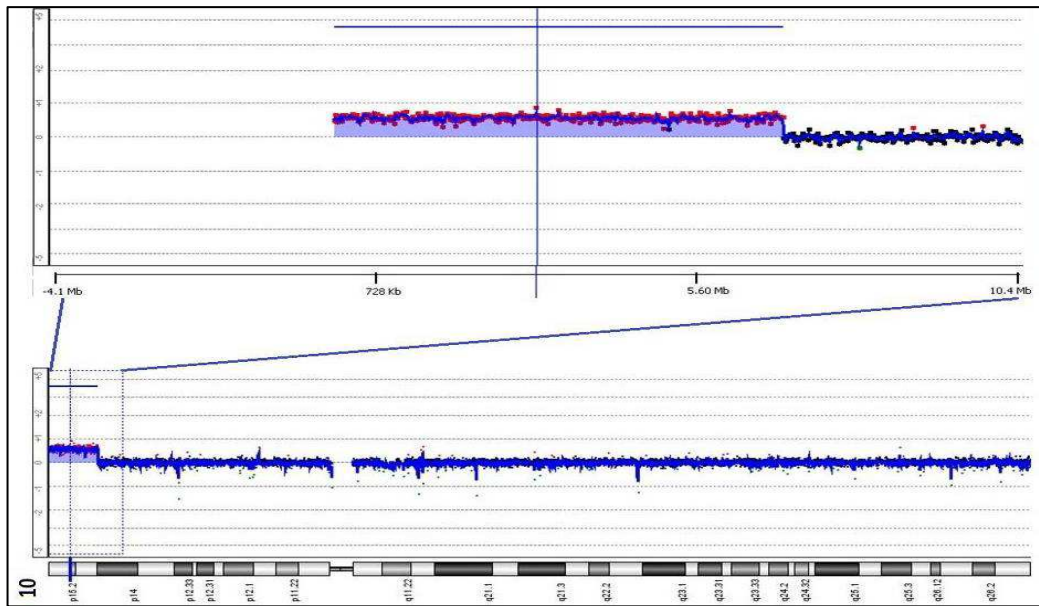
<sup>4</sup> Fúziós szignál: Egy zöld és egy piros szignál egymás mellé vetüléséből adódó narancsszínű szignálminta.



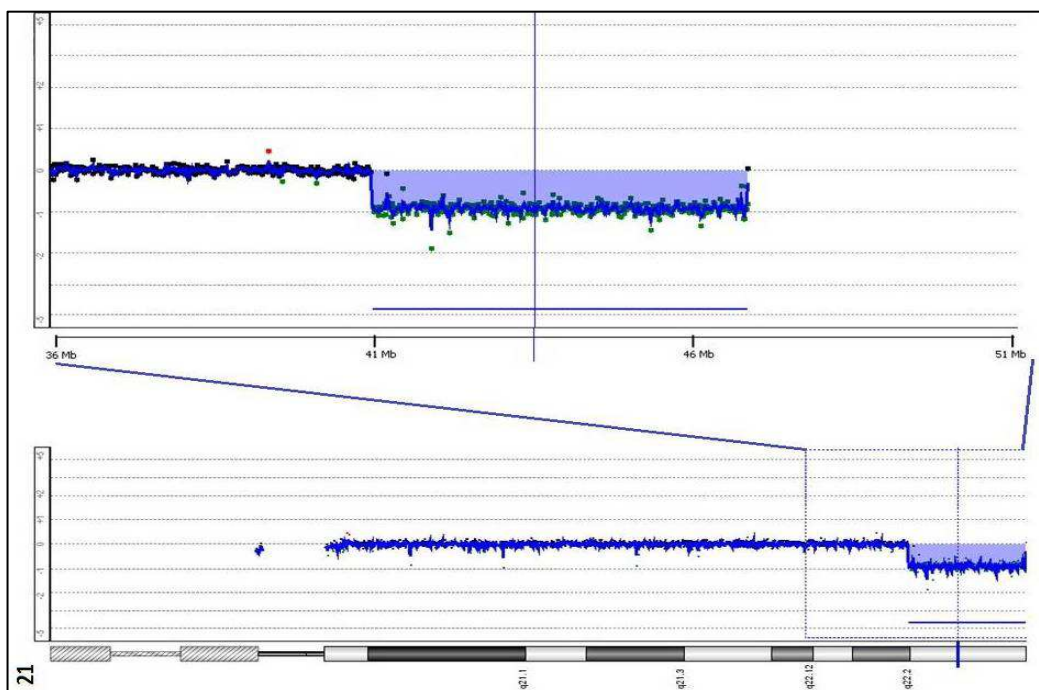
**7./c,d ábra Az *ish t(10;21) (pter+,qter-;pter+,qter-)* kiegyensúlyozott szubtelomerikus transzlokáció FISH képe**

**c.** FISH kép a ToTelVysion Multi-color DNS Próba kit, 4-es keverékének felhasználásával (4pter régió (zöld szignál), 4qter régió (piros szignál), 21qter régió (fúziós szignál), a nyíl a der10-es kromoszómát mutatja, melyre 21qter szubtelomerikus szignál transzlokálódott. **d.** FISH kép a ToTelVysion Multi-color DNS Proba kit 10-es keverékének felhasználásával (10pter régió (zöld szignál), 10qter régió (piros szignál), 15qter régió (fúziós szignál), a két nyíl mutatja a 10pter specifikus régió transzlokációját a 21qter régióba.

**Array-CGH.** Az array profil megerősítette a szubtelomerikus FISH vizsgálat eredményét. A 10-es kromoszómán elhelyezkedő disztális duplikáció nagysága 6,7 Mb és a p15.3-p14 régióban helyezkedik el (410 oligo's) míg a 21-es kromoszóma disztálisan elhelyezkedő deléciója a q22.2-22.3 régióban 5,6 Mb nagyságú (412 oligo's). A töréspont a 10-es kromoszóma rövid karján a 6873275 és 6885392 bp között, a 21-es kromoszómán a 41244147 és 41270119 bp között helyezkedik el. Az array kariotípus a következő: **arr10p15.3-14(138206-6873275)x3,21q22.2-22.3(41270119-46920225)x1 (8/a,b ábra).**



a



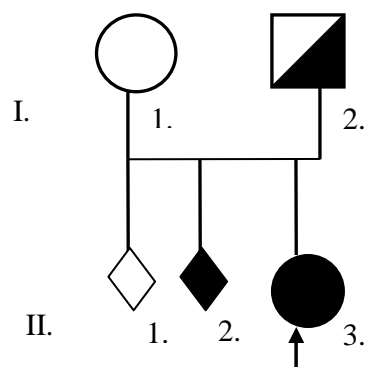
b

**8.ábra** Az *ish der(21)t(10;21)(pter+;qter-)* kiegyensúlyozatlan transzlokációnak oligonukleotid microarray eredménye **a.** Az ábra mutatja az egy kópia számú többletet a 10pter-p14 régióban, ~6.7 Mb nagyságban (chr 10:138206-7873216) **b.** egy kópia-vesztést a 21q22.2-qter régióban, ~5.6 Mb nagyságban (chr 21: 41270119-46920225). Az adatokat az UCSC 2006 hg18 assembly alapján állítottuk össze. Az *x-tengelyre* a próbák a tényleges lokalizációjuknak megfelelően vannak rendelve, a disztális régiótól a proximális felé haladva az **8. a ábrán** balról-jobbra, míg a **8. b ábrán** jobbról-balra haladva. Az *y-tengely* értékei reprezentálják a beteg értékeit log<sub>2</sub> arány formában és a kontroll szignál intenzitásokat.

**ish der(4)t(4;8)(pter-;qter+)**

**3. család** *A kiegyensúlyozatlan transzlokációt mutató gyermek a genetikai eltérést a kiegyensúlyozott transzlokáció hordozó apától örökölte.*

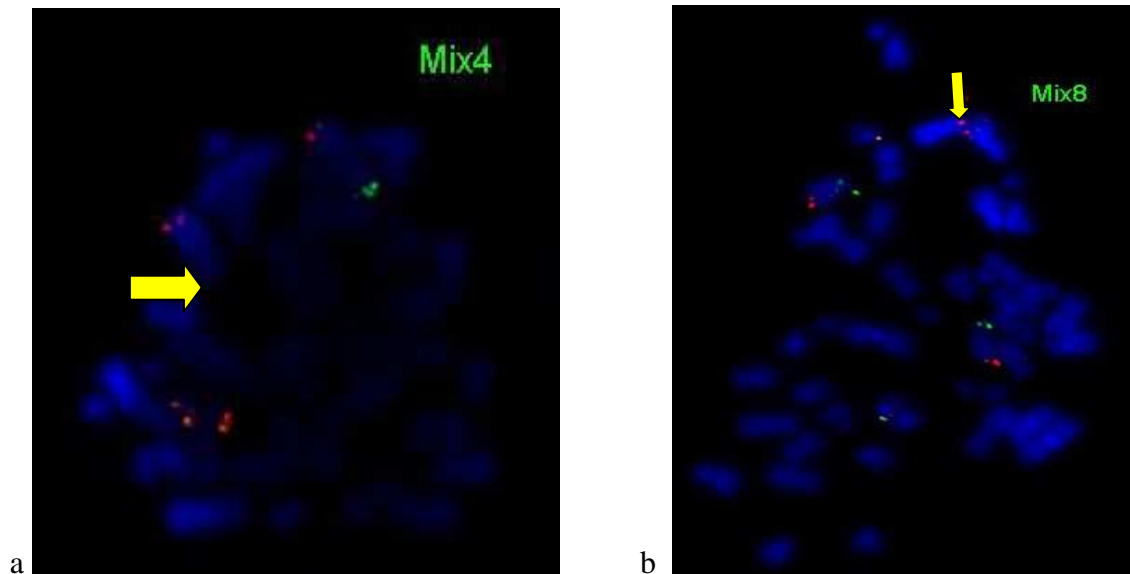
A proband (II/3), a 39 éves anya harmadik terhességéből (egy művi, egy spontán vetélés), első élő gyermekként császármetszéssel született, 38. gesztációs hétre (**9. ábra**). Születési súlya 1340g (<3 pc), születési hossz 39 cm (<3 pc), fejkörfogat 28 cm (<3 pc) volt. Matert a többször operált ajakhasadéka és előrehaladott életkora miatt genetikai tanácsadó gondozta. Terhességi biokémiai vizsgálat eltérést nem mutatott, de a 21. gesztációs héttől észlelhető volt a magzat növekedési retardációja. Prenatális kromoszóma vizsgálat nem történt. Pszichomotoros fejlődése megkésett volt: segítséggel 12 hónaposan ült, forgott, 15 hónapos korában kúszott. Generalizált izomhypotonia és hét hónapos korában kezdődött epilepszia miatt neurológiai gondozás alatt állt. Koponya MRI vizsgálat során hipopláziás corpus callosum volt látható, elkésett mielinizációval, dominálón a capsula interna mellső szarvának megfelelően. A fizikális vizsgálat során észlelhető volt a súlyos szomatikus retardáció (testsúly: 6500 g (<3 pc), hossz: 65 cm (<3 pc), fejkörfogat: 40,5 cm (<3 pc)), microcephalia, generalizált izomhipotónia. Kétoldali dongaláb, arcdysmorphia: aszimmetrikus homlok és occiput, jobb oldali homlokdudor prominens, hemifacialis microsomia, szűk szemrés, pici orr, hipopláziás orrszárny, kerekded orrcsúcs, rövid philtrum, retrognathia, lefelé tekintő szájzug. Klasszikus citogenetikai vizsgálat szabályos női kariotípust mutatott, anyagcsere vizsgálat kóros eltérést nem igazolt. A szülők a fényképek bemutatásához nem járultak hozzá.



**9. ábra A 3. család családfája: *ish der(4)t(4;8)(pter-;qter+)***

Az üres szimbólum az egészséges egyéneket, a besatírozott a kiegyensúlyozatlan transzlokáció hordozót, a félig besatírozott a kiegyensúlyozott transzlokáció hordozó egyént, az üres rombusz a művi abortuszt, a fekete rombusz a spontán vetélést jelöli.

Szubtelomerikus FISH vizsgálat a betegben a 4pter régió delécióját és a 8qter régió duplikációját igazolta. A kiegyensúlyozatlan transzlokáció hordozás FISH eredménye a következő: ***ish der(4)t(4;8)(pter-;qter+)*** (10/a,b ábra). A transzlokáció során a 8qter régió arra a der(4)-es kromoszómára transzlokálódott, amelynek deletálódott a pter szubtelomerikus régiója. A szülők FISH vizsgálata az adott (4-es, 8-es) próbakeveréssel az apa kiegyensúlyozott transzlokáció hordozó voltát igazolta: ***ish subtel t(4;8)(pter-,qter+; pter+,qter-)***. A kiegyensúlyozott hordozó FISH képét a metafázisok nem megfelelő minősége miatt nem mutatjuk be. Az apai nagyszülőknél a vizsgálatot nem tudtuk elvégezni.



**10./a ábra Az *ish der(4)t(4;8)(pter-;qter+)* kiegysúlyozatlan transzlokáció FISH képe**

**a.** FISH kép a ToTelVysion Multi-color DNS Próba kit, 4-es keverékének felhasználásával (4pter régió (zöld szignál), 4qter régió (piros szignál), a nyíl a 4-es kromoszóma pter deletált régióját mutatja. **b.** FISH kép a ToTelVysion Multi-color DNS Proba kit 8-as keverékének felhasználásával (8pter régió (zöld szignál), 8qter régió (piros szignál)), a nyíl a der(4)-es kromoszómát mutatja, melyre a 8qter szubtelomerikus régió transzlokálódott, annak duplikációját okozva.

***ish der(10)t(10;17)(qter-;qter+)***

**4. család** Az érintett családban egy testvérpár vizsgálatára került sor. A klinikai tünetek nagyon hasonlóak voltak. A kórkép háttérében álló genetikai eltérést array-CGH vizsgálattal is megerősítettük. A gyermekek a genetikai hibát hordozó apjuktól örökölték.

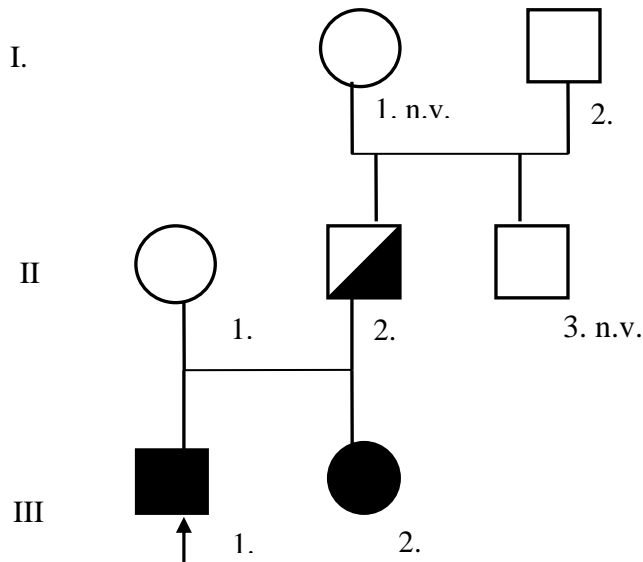
**1. beteg (III/1.- 11. ábra )**

A proband (III/1), az anya első terhességéből, első élő gyermekként spontán született, 38. gesztációs hétre, 3400 g (75 pc) születési súllyal (**11. ábra**). Mater terhességi anamnézise negatív volt. Pszichomotoros fejlődése kissé megkésett: segítség nélkül 12 hónaposan ült, 12 hónapos korában mászott, 18 hónaposan indult el. Dysplasia coxae miatt terpeszbetétes pelenkát viselt, ortopédiai vizsgálat során spina bifida occulta igazolódott. Tizennyolc hónapos kora után kezdett egyszerű szótagokat mondani. Három évesen lett szobatiszta. Növekedés elmaradás miatt három éves korától endokrinológiai gondozás alatt állt. Hat éves

korában tonsillectomia történt. A kilenc éves korában készült citogenetikai vizsgálat és Fra-X teszt negatív eredményt mutatott. Jelenleg 16 éves, normális iskolába jár, de sok segítséget és gyakorlást igényel a tanulás során. Intelligencia teszt 15 éves korában MAWI szerint: IQ:84; VQ: 97; PQ: 73. Fizikális vizsgálat során észlelhető volt a proporcionált alacsonynövés (TM: 155 cm, <3 pc, TS: 34 kg, <3 pc) és az arcdysmorphia: széles orrnyereg, prominens orrcsúcs, intercanthalis távolság 3,5 cm, alacsonyan ülő fül, hanyag testtartás, enyhe scoliosis. A szülők fényképek készítéséhez nem járultak hozzá.

## **2. beteg (III/2.- 11. ábra)**

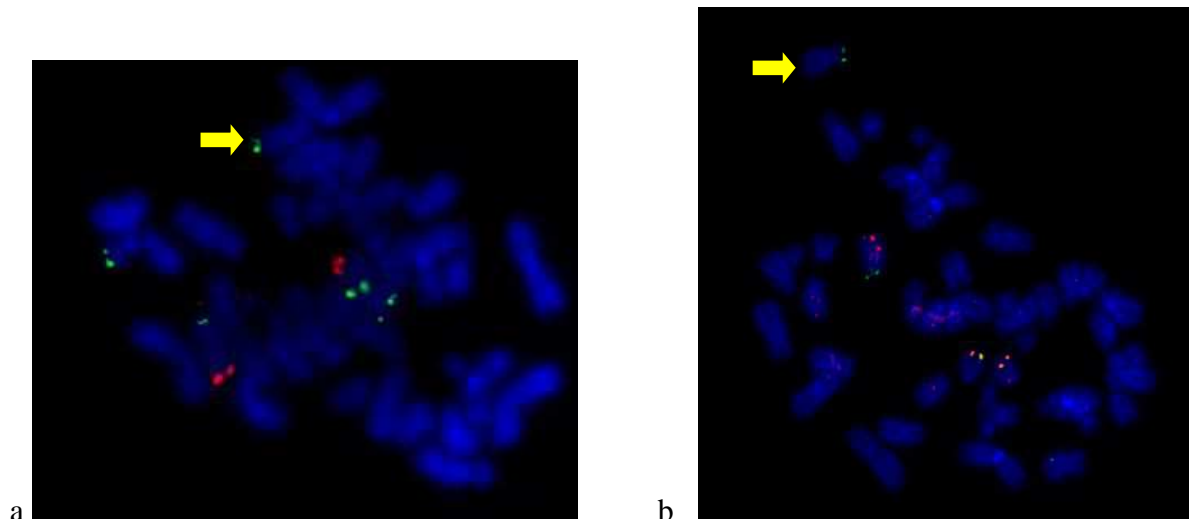
A proband lánytestvére, az anya második terhességéből született, 38. gesztációs hétre, 3100g (50 pc) születési súllyal, spontán (**11. ábra, III/2.**). Zavartalan perinatalis adaptációt követően csecsemőkorában táplálási nehézség és vontatott pszichomotoros fejlődés volt jellemző. Intelligencia teszt 13 éves korában MAWI szerint: IQ:73; VQ: 79; PQ: 65. A testvéréhez teljesen hasonló fenotípusos jegyeket észleltünk. Fizikális vizsgálat során proporcionált alacsonynövés (TM: 135 cm, <3 pc, TS: 27 kg, <3 pc) és arcdysmorphia: széles orrnyereg, prominens orrcsúcs, intercanthalis távolság 3,5 cm, alacsonyan ülő fül, hanyag testtartás, enyhe scoliosis volt észlelhető. A szülők a fényképek készítéséhez nem járultak hozzá.



**11. ábra A 4. család családfája - ish der(10)t(10;17)(qter-;qter+)**

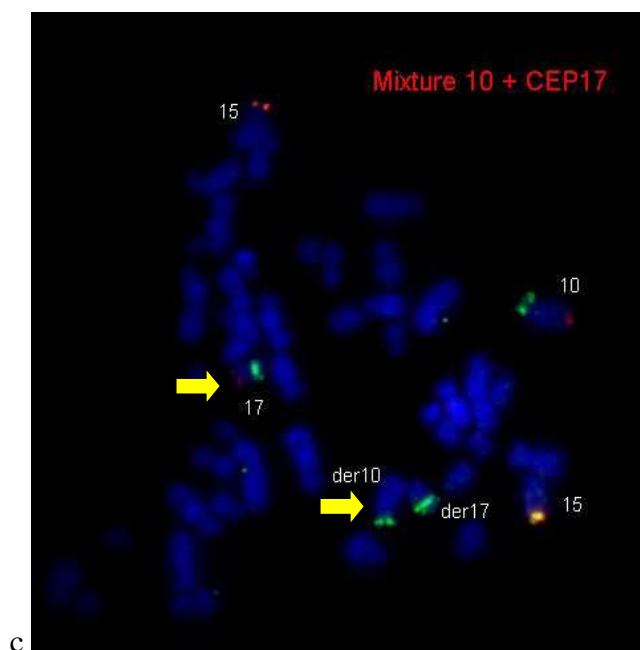
Az üres szimbólum az egészséges egyéneket, a besatírozott a kiegyensúlyozatlan transzlokáció hordozókat, a félig besatírozott a kiegyensúlyozott transzlokáció hordozó egyént jelöli. Az I/1 (apai nagymama) és II/3 (apai nagybácsi) egyének nem egyeztek bele a FISH vizsgálatba.

Szubtelomerikus FISH vizsgálat során egy 10qter és három 17qter specifikus szignált detektáltunk mindkét érintett betegben, mely 10qter deléció és 17qter duplikációt igazolt. A kiegyensúlyozatlan transzlokáció hordozás eredménye a következő: **ish der(10)t(10;17)(qter-;qter+)** (12/a,b ábra). A transzlokáció során a 17qter régió arra a der(10)-es kromoszómára transzlokálódott, melynek deletálódott a qter szubtelomerikus régiója. A szülőknél elvégeztük a FISH vizsgálatot az adott (9-es, 10-es) próbakeveréssel és az apa bizonyult kiegyensúlyozott transzlokáció hordozónak: **ish t(10;17)(qter-,pter+; qter-,pter+)** (12/c ábra). A nagymama és az apai nagybácsi vizsgálatát beleegyezés hiányában nem tudtuk elvégezni.



**12./a,b ábra Az *ish der(10)t(10;17)(qter-;qter+)* kiegyensúlyozatlan transzlokáció hordozás FISH képe**

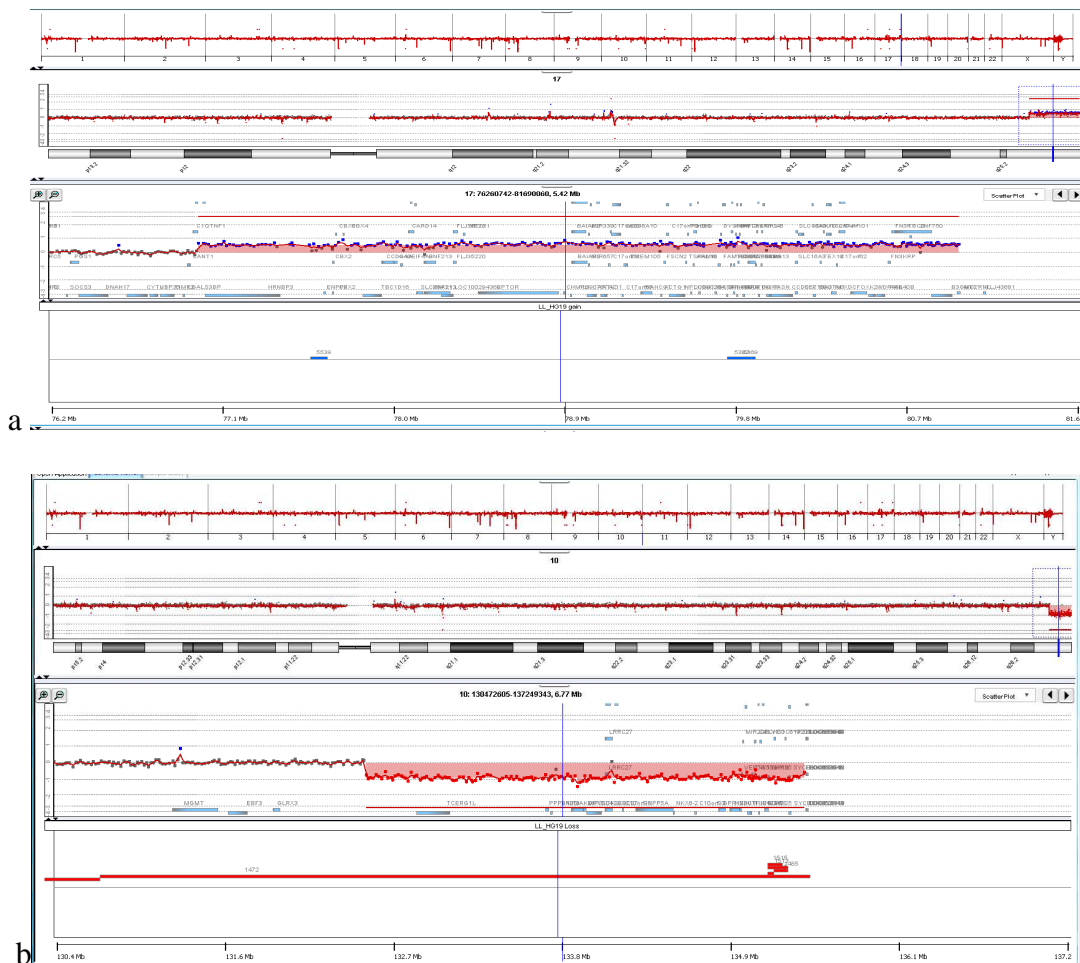
**a.** FISH kép a ToTelVysion Multi-color DNS Próba kit, 9-es keverékének felhasználásával, a nyíl a 17qter specifikus extra szignált mutatja **b.** FISH kép a ToTelVysion Multi-color DNS Próba kit 10-es keverékének felhasználásával (10pter régió (zöld szignál), 10qter régió (piros szignál), 15qter régió (fúziós szignál), a nyíl a 10qter szubtelomerikus szignál delécióját mutatja.



**12./c ábra Az *ish t(10;17)(qter-,pter+; qter-,pter+)* kiegyensúlyozott transzlokáció hordozás FISH képe**

A FISH kép a ToTelVysion Multi-color DNS Próba kit 10-es keverékének és a CEP17-es próba felhasználásával készült: 10pter régió (zöld szignál), 10qter régió (piros szignál), 15qter régió (fúziós szignál), CEP17 régió (zöld szignál). A két nyíl a 10qter szubtelomerikus régió áthelyeződését mutatja a 17qter régióra.

**Array-CGH.** Az array profil megerősítette a szubtelomerikus FISH vizsgálat eredményét. A 10-es kromoszómát érintő 2,9 Mb deléción a 10q26.3 régióban helyezkedik el, míg a 17q25.3 régióban egy 4 Mb méretű duplikáció volt detektálható. A töréspont a 10-es kromoszóma hosszú karján a 132555396 és 132539691 bp között, a 17-es kromoszómán a 77049814 és 77038050 bp között helyezkedik el. Az array kariotípus a következő: **arr 10q26.3(132555396-135474787)x1,17q25.3(77049814-81045222)x3** (13/a, b ábra).



**13. ábra Az *ish der(10)t(10;17)(qter-;qter+)* kiegyensúlyozatlan transzlokációnak oligonukleotid microarray eredménye**

a., egy kópia számú többletet a 17q25.3 régióban, ~4,0 Mb nagyságban (chr 17:77049814-77038050) b. egy kópia-vesztést a 10q26.3 régióban, ~2,9 Mb nagyságban (chr 10:132555396-132539691). Az adatokat az UCSC 2006 hg19 assembly alapján állítottuk össze. Az *x-tengelyre* a próbák a tényleges lokalizációjuknak megfelelően vannak rendelve, a disztális régiótól a proximális felé haladva a **13.a és b ábrán** jobbról-balra haladva. Az *y-tengely* értékei reprezentálják a beteg értékeit log<sub>2</sub> arány formában és a kontroll szignál intenzitásokat.

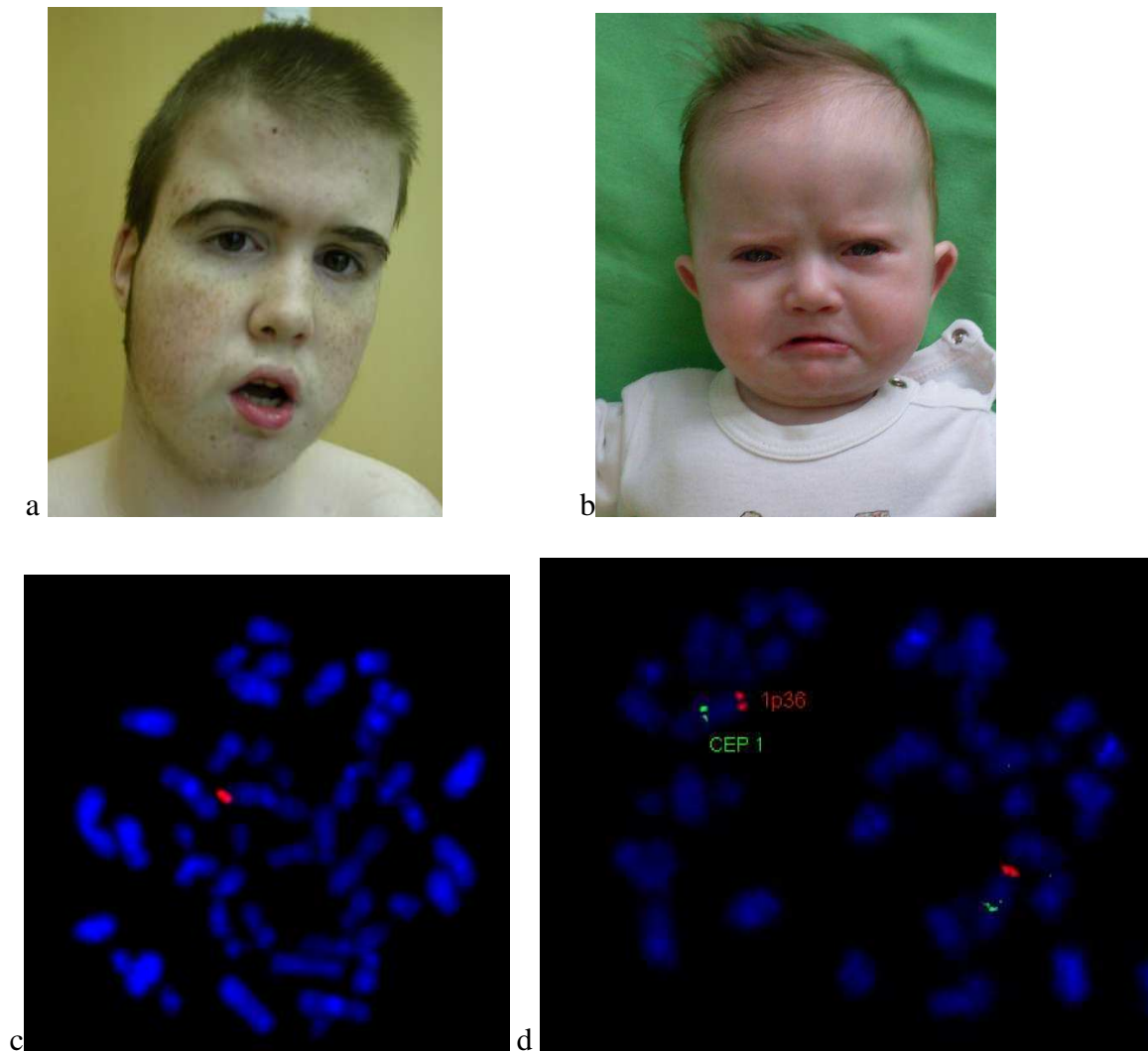
### 5.1.1.2. *De novo* esetek

#### **ish subtel del(1pter)**

*Prader-Willi szindrómára emlékeztető fenotípusos jegyek miatt két gyermek esetében célzott FISH vizsgálatot végeztünk az 1pter szubtelomerikus deléció kimutatására.*

#### **1. beteg (14/a ábra)**

A proband anyja második terhességéből, második élő gyermekként 40. gesztációs hétre, 2250 g (< 3pc) születési súllyal hüvelyi úton született. Mater terhességi anamnézise negatív volt. Két hónapos kora óta epilepsziás. Táplálási nehezítettség miatt több alkalommal feküdt csecsemőkorában kórházban. Pszichomotoros fejlődése megkésett volt: nyolc hónapos korában fordult meg, 10 hónapos korában ült fel, 12 hónaposan elindult, 24 hónaposan kezdett beszélni, de beszéde érthetetlen, halandzsa beszéd. Ortopédia szakrendelés genu valgum és pes planus miatt gondozza. Fizikális vizsgálat során a betegnél az alábbi fenotípusos jellemzőket láttuk: izomhyotónia, hyperflexibilis ízületek, obesitas, cryptorchismus, mentális retardáció, kicsi kéz és láb, arcdysmorphia (kifejezetten lapos arc, brachycephalia, kicsi orr, rövid philtrum, pontszerű áll, egyenes vonalú szemöldök, alacsonyan ülő fül) **(14/a ábra)**. Intelligencia teszt nem kivitelezhető a beszédfejlődés zavara miatt, FQ-ja 23 volt. Klasszikus kromoszóma vizsgálat során normál férfi kariotípust detektáltunk, Fragilis-X és Prader-Willi szindróma FISH teszt is negatívnak bizonyult. A jellegzetes fenotípusos jellemzők miatt célzottan az 1p36.33 régió delécióját vizsgáltuk az adott régió specifikus FISH próbával (D1S2217, Kreatech) **(14/c ábra)**. A szülőknél elvégzett FISH vizsgálat negatívnak bizonyult, mely alátámasztotta a kromoszóma aberráció *de novo* eredetét **(14/d ábra)**.



**14. ábra. a.** Az *1p36* deléziós szindrómára jellegzetes arckarakter az **1. betegnél** (kifejezetten lapos arc, brachycephalia, kicsi orr, rövid philtrum, pontszerű áll, egyenes vonalú szemöldök, alacsonyan ülő fül) **b.** Az *1p36* deléziós szindrómára jellegzetes arckarakter csecsemőkorban a **2. betegnél**; **c.** *1p36* deléció FISH képe (a piros szignál a normál 1-es kromoszóma szubtelomerikus régióját jelöli, a második szignál hiánya a delécióra utal) **d.** 1pter és CEP1 régiókat reprezentáló normál szignálmintázat.

### **2. beteg (14/b ábra)**

A beteg anyja második terhességéből, második élő gyermekként 40. gesztációs hétre, 1900 g (<3 pc) születési súllyal született császármetszéssel 8/1, 8/5, 9/10-es Apgar értékekkel. Terhesség alatt végzett ultrahang vizsgálat ventriculomegaliát mutatott. Négy és fél hónapos kora óta epilepsziás, dysplasia coxae miatt Pavlik-hámot viselt. Kardiológiai vizsgálat során nyitott foramen ovale volt kimutatható. Pszichomotoros fejlődése megkésett, a genetikai vizsgálat idején 11 hónapos, még nem forog, nem mászik. Pajzsmirigy funkciós vizsgálat hypothyreosist igazolt, pajzsmirigy hormon szubsztitúciót igényelt. Fizikális vizsgálat során a

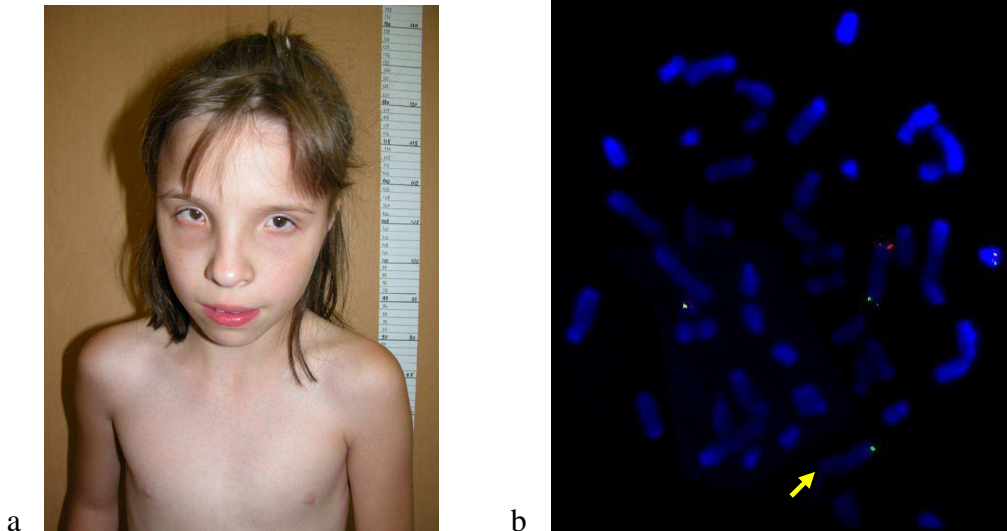
betegnél észlelt fenotípusos jellemzők: izomhypotónia, mérsékelt obesitas, kicsi kéz és láb, arcdysmorphia (kifejezetten lapos arc, brachycephalia, kicsi orr, rövid philtrum, pontszerű áll, egyenes vonalú szemöldök, alacsonyan ülő fül) **(14/b ábra)**. Nyakon laza extra bőrredők. Intelligencia teszt, fejlődési kvóciens a beteg életkora miatt még nem kivitelezhető. Kromoszóma vizsgálat során normál női kariotípust detektáltunk, Prader-Willi szindrómára specifikus FISH teszt negatívnak bizonyult. A jellegzetes fenotípusos jellemzők miatt célzottan az 1p36.33 régió delécióját vizsgáltuk az adott régióra specifikus FISH próbával (D1S2217, Kreatech). A vizsgálat az adott régió delécióját igazolta. A szülőknél elvégzett FISH vizsgálat negatívnak bizonyult, igazolva a kromoszóma aberráció *de novo* eredetét.

### **ish subtel del(3qter)**

*3q29 szubtelomerikus deléciót igazoltunk jellegzetes fenotípussal, mely ebben az esetben ritka szemészeti rendellenességgel (uvea coloboma) járt.*

A proband az anya első terhességéből, első élő gyermekként született spontán 10/10-es Apgar státuszban. Születési súlya 2800g (10-25 pc), hossza 47 cm (3-10 pc), fej körfogata 32 cm (25 pc) volt. Perzisztáló ductus arteriosus miatt négyhónapos korában ductus ligatura történt. Pszichomotoros fejlődése vontatott volt, 30 hónaposan kezdett beszélni, hat éves korában lett szobatiszta. Szemészeti vizsgálat során microphthalmia, konvergáló strabismus, kétoldali uvea coloboma volt kimutatható. Scoliosis, coxa valga miatt ortopédiai gondozás alatt áll. Jelenleg 10 éves, súlya 22 kg (3pc-1,52 kg), testmagassága 122 cm (3 pc-4,8 cm), fej körfogata: 47 cm (3pc-2,55 cm). Négy éves korában FQ értéke: 52, hét éves korában mért IQ: 37 volt. Az arcdysmorphia jellemzői: keskeny hosszúkás arc, hypertelorismus, kiemelkedő orrnyereg, orrcsúcs bunkósan megvastagodott, rövid philtrum **(15/a ábra)**. A korábban említett ortopédiai eltérések mellett V. ujj clinodactylia, hosszú elvékonyodó ujjak jellemzik. A szubtelomerikus FISH vizsgálat a 3qter (D3S4560) szubtelomerikus régió delécióját

mutatta: **ish del(3)(qter-)** (15/b ábra). A szülők célzott szubtelomerikus FISH vizsgálata negatívnak bizonyult, a deléció *de novo* keletkezett. A szülők FISH képét a metafázisok gyenge minősége miatt nem tudjuk bemutatni.



**15. ábra a:** A *3q29* szindrómára jellegzetes arckarakter (keskeny hosszúkas arc, hypertelorismus, kiemelkedő orrnyereg, orrcsúcs bunkósan megvastagodott, rövid, elsimult philtrum, vékony felső ajakpír) **b:** A *3qter* régió szubtelomerikus deléciója (FISH a ToTelVysion Multi-color DNS Próba kit, 3-as keverékkel. Zöld szignál: 3pter régió; piros szignál: 3qter szignál; Dupla festődésű régió: 22qter régiók. A nyíl a piros szignál hiányát mutatja a deletált 3q29 régióban).

## 5. 2. Az első SLO szindrómás gyermek klinikai és genetikai diagnosztikája

### Terápiás próbálkozásaink

A nyolc éves fiú egészséges, nem-rokon házasságban élő szülők harmadik gyermeke. Spontán, gemini „B”magzatként született a 34. gesztációs hétre, születési súlya 2040 g (< 3 pc), hossza 46 cm (< 3 pc), fejkörfogata 31 cm (< 3 pc) volt. Már születéskor észlelhetők voltak a klinikai tünetek: arcdysmorphia (ptosis, epicanthus, micrognathia, széles orrgyök és orrcsúcs előretekintő orrnyílásokkal, submucosus szájpadasadék, alacsonyan ülő malformált fülkagyló), microcephalia, cryptorchismus, hypospadiasis, 2.-3. lábujj közötti syndactylia, pitvari septum defektus. Csecsemőkorában kifejezett izomhypotonia és súlyos táplálási nehezítettség. Az első genetikai vizsgálat során a fenotípusos jegyek alapján már felmerült az

SLO szindróma lehetősége, majd az életkor előrehaladtával az arcdysmorphia egyre kifejezettebbé vált ( **16. ábra**).



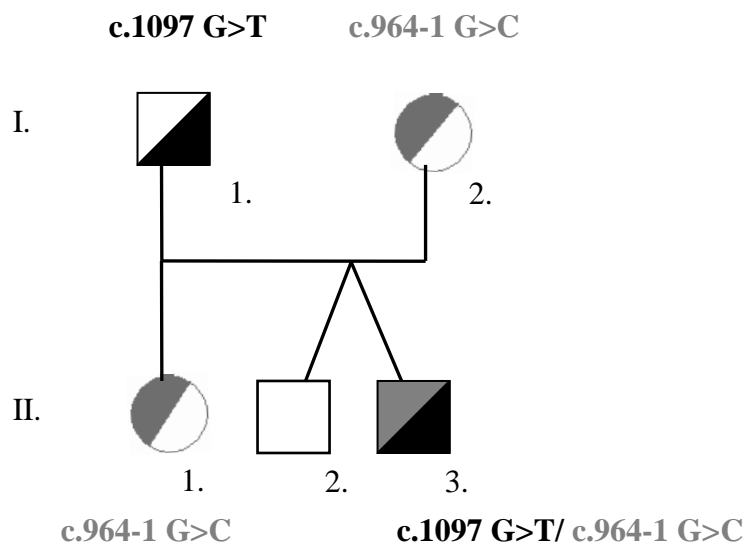
**16. ábra** Az SLO szindrómára jellemző arckarakter a 6 éves betegnél (ptosis, epicanthus, micrognathia, széles orrgyök és orrcsúcs előretékintő orrnyílással, alacsonyan ülő malformált helix, előretékintő fülcimpa, microcephalia)

Hat éves korában végzett vizsgálatkor súlyos növekedési és mentális retardáció volt észlelhető, beszélni nem tudott, kúszva közlekedett a lakásban. Testsúlya 14 kg (<3 pc), hossza 104 cm (<3 pc), fejkörfogat 45,5 cm (<3 pc). Négy éves kora óta hallókészüléket visel. Pszichológiai teszt (Brunet-Lèzine) súlyos értelmi fogyatékoságot mutatott ki (DQ: 18). Szülei a szülői interjú során súlyos magatartási problémákról számoltak be: autoagresszivitás, irritabilitás és alvászavar. Kelley és Hennekam által felállított súlyossági score szerint 25 pontot kapott, ez SLO szindróma „típusos” (közepes súlyossági fokú) csoportjának felel meg (a típusos csoport score értéke: 20-50) [Kelley és Hennekam, 2000]. A SLO szindróma diagnózisát megerősítette az alacsony koleszterin szint (2,77 mmol/L) és a magas 7-DHC (102 mg/L, ref: < 0, 15 mg/L). Kiterjesztett lipoprotein (TG, HDL-, LDL-, VLDL-koleszterin, Lp(A), apolipoprotein-A1) és D3 vitamin (118 nmol/L) vizsgálatok kóros eltérést nem mutattak, kivéve a mérsékelten alacsonyabb apolipoprotein B-100 értéket (0,38 g/L) (**4. táblázat**).

4. Táblázat SLO szindrómás beteg klinikai, biokémiai és molekuláris-genetikai eredményei

<b>Klinikai jellemzők</b>			
<b>Kor (év)</b>	<b>6</b>		
<b>Nem</b>	<b>férfi</b>		
<b>Fenotípusos jellemzők</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- arc dysmorphia</li> <li>- submucosus szájpadhasadék</li> <li>- microcephalia</li> <li>- cryptorchismus, hypospadiasis</li> <li>- 2.-3. lábujj közötti syndactylia</li> <li>- pitvari septum defektus</li> <li>- izomhypotonia</li> <li>- súlyos táplálási nehezítettség</li> <li>- súlyos fokú mentális retardáció</li> </ul>		
<b>Score</b>	<b>25</b>		
<b>Biokémiai jellemzők</b>			
	<i>Referencia tartomány</i>		<i>Módszer</i>
<b>7-DHC (mg/L)</b>	<b>102</b>	<b>0,15 mg/L</b>	UV spektrofotometria
<b>Koleszterin (mmol/L)</b>	<b>2,77</b>	<b>3,25-5,95 mmol/L</b>	enzim assay
<b>TG (mmol/L)</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25-1,48 mmol/L</b>	enzim assay
<b>LDL (mmol/L)</b>	<b>1,1</b>	<b>0,98-3,6 mmol/L</b>	homogén enzim assay
<b>VLDL (mmol/L)</b>	<b>0,34</b>	<b>0,11-0,63 mmol/L</b>	Sebia agaróz gél elektroforézis
<b>HDL (mmol/L)</b>	<b>1,03</b>	<b>0,7-1,9 mmol/L</b>	homogén enzim assay
<b>ApoA1 (g/L)</b>	<b>1,1</b>	<b>1,05-1,6 g/L</b>	immunoszturbidimetria
<b>ApoB-100 (g/L)</b>	<b>0,38</b>	<b>0,44-1,12 g/L</b>	immunoszturbidimetria
<b>Lp(A) (mg/L)</b>	<b>&lt;80</b>	<b>0-178 mg/L</b>	immunoszturbidimetria
<b>Vitamin D<sub>3</sub> (nmol/L)</b>	<b>118</b>	<b>28-118 nmol/L</b>	kemilumineszcens immunassay
<b>Genetikai jellemzők</b>			
<b>Genotípus</b>	<b>c.964-1G&gt;C/c.1097 G&gt;T</b>		PCR/RFLP analízis szekvencia analízis

Molekuláris genetikai vizsgálat során a betegnél összetett heterozigótaság igazolódott, a beteg genotípusa: c.964-1 G>C/c.1097 G>T (p.G366V). A c.1097 G>T mutáció - mely a *DHCR7* gén 9-es exonjában helyezkedik el és a 4. citoplazmatikus hurkot érinti, egy új mutáció, mely guanin-timin nukleotid cserével jár és glicin-valin aminosav cserét eredményez a 7-dehidrokoleszterin reduktáz enzimben. A c.964-1 G>C mutáció ismert, az SLO szindrómára jellemző genetikai eltérés. A c.964-1 G>C mutációt az édesanya és a lánytestvér, míg a c.1097 G>T mutációt a beteg édesapja hordozza. Betegség-specifikus mutáció az iker fiútestvérben nem volt kimutatható (17. ábra).

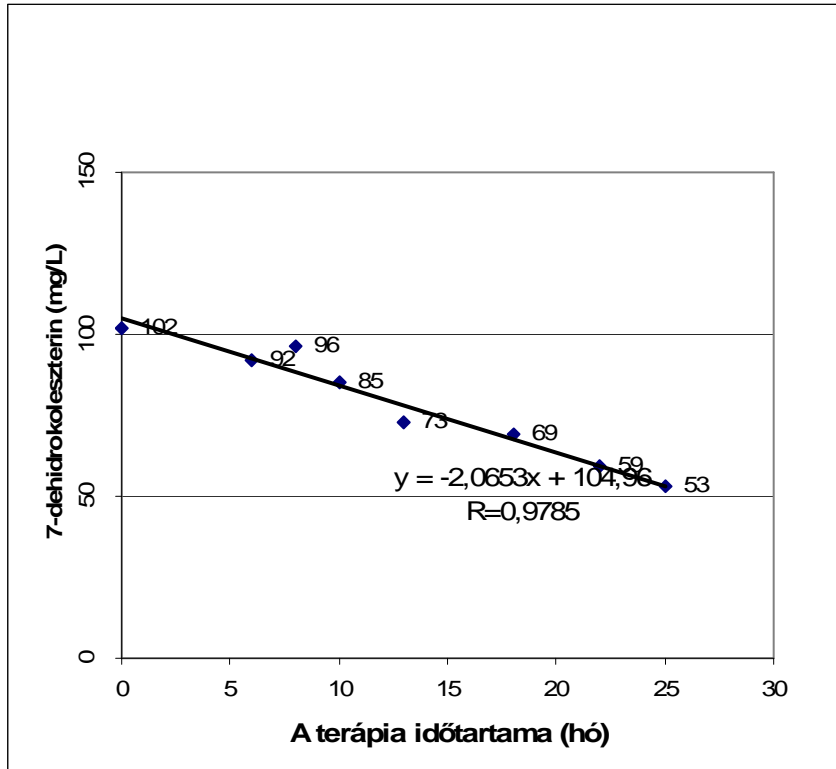


### 17. ábra SLO szindrómás beteg családfája

Az üres szimbólum az egészséges egyéneket, a besatírozott (szürke-fekete) az SLO szindrómás beteget, a félig szürkével besatírozott szimbólum a c.964-1 G>C mutációt hordozó egyént, míg a félig feketével besatírozott a c.1097 G>T mutációt hordozó egyént jelöli.

A koleszterin szubsztitúciós kezelést az Irons és munkatársai (1997) által javasolt protokoll szerint kiviteleztük (Cholesterol Module, 100 mg/kg/day, Nutricia; product code number 18,012), míg a szimvastatin kezelésnél Jira és munkatársai (2000) (0,2 mg/kg/day) ajánlását követtük [Irons és mtsai., 1997; Jira és mtsai., 2000]. A kezelést a beteg hat éves korában kezdtük el, mindvégig jól tolerálta, gyógyszer mellékhatás nem jelentkezett. A 25-hónapos

kezelési időszak alatt szignifikáns mértékben emelkedett a szérumban a koleszterin szint (2,77 mmol/L → 3,2 mmol/L) és csökkent a szérumban a 7-DHC érték (102 mg/L → 53 mg/L) (18. ábra, 5. táblázat).



18. ábra A 7-dehidrokoleszterin szint változása a szimvasztatin és a koleszterin-pótló kezelés alatt

5. Táblázat A 7-dehidrokoleszterin és a koleszterin értékek változásai a szimvasztatin és koleszterin-pótló (Cholesterol Module) kezelés alatt

	Terápia előtt	6. hó	8. hó	10. hó	13. hó	18. hó	22. hó	25. hó
<b>7-DHC</b> (mg/L)	102	92	96	85	73	69	59	53
(mmol/L)	0,26	0,24	0,25	0,22	0,19	0,18	0,15	0,14
<b>Koleszterin</b> (mmol/L)	2,77	2,4	2,7	3,03	2,46	3,04	3,6	3,2

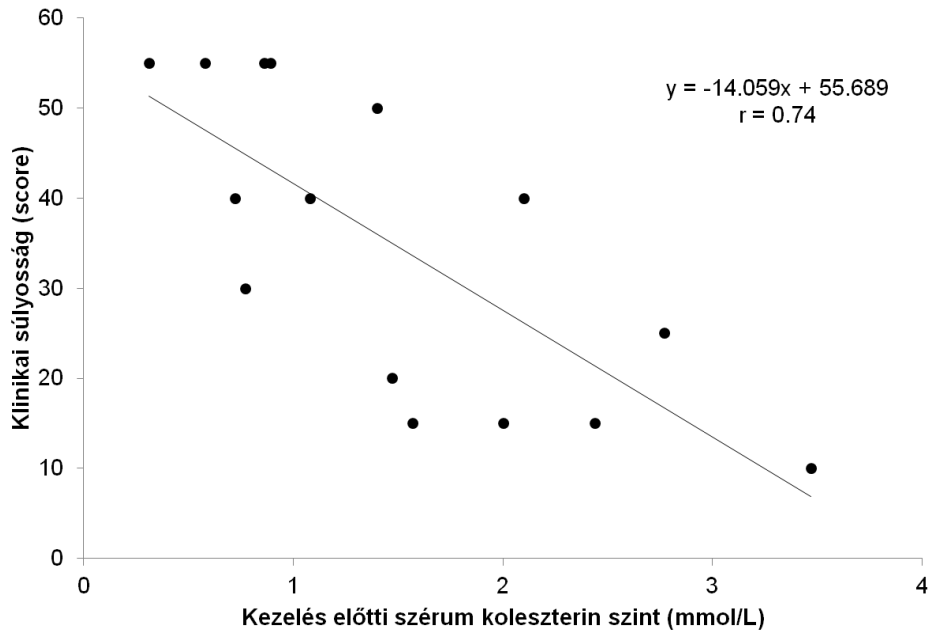
A beteget kéthavonta rendszeresen ellenőriztük, és a következő paramétereket rögzítettük: testsúly, testhossz, mell-és fejkörfogat, valamint a szérum triglicerid, koleszterin, HDL, LDL, 7-DHC, GOT, GPT, CK, AP,  $\gamma$ GT.

A beteg viselkedésének változását és a pszichomotoros fejlődését két módszerrel mértük: 1. szülői interjú; 2. Vineland Adaptív Viselkedési Skála. A szülők szerint a beteg gyermek kevésbé volt irritábilis, csökkentek az autoagresszív megnyilvánulásai, javult az alvása és jobb lett az étvágya a kezelés ideje alatt. Az adaptív funkciókban bekövetkezett változásokat a Vineland Adaptive Viselkedési Skálával objektivizáltuk, mely szerint a hétköznapi rutin tevékenységek (Daily Living Skill-personal subdomain) és a nagy mozgások (Motor Skill-gross subdomain)) területén mérsékelt javulás volt kimutatható a terápia alatt. A beteg fejlődési hányadosa (DQ) nem változott.

### **5.3. A 15 magyar SLO szindrómás beteg klinikai és biokémiai paraméterek közötti összefüggésének vizsgálata**

Az SLO szindrómás betegek életkora a diagnózis megállapításakor széles tartomány között mozgott (0,5-18 év). Az enyhe fenotípusú csoportban (n=4; score: <20), a szérum koleszterin átlagértéke  $2,37 \pm 0,8$  mmol/L, a 7-DHC átlaga pedig  $0,38 \pm 0,14$  mmol/L ( $147 \pm 55$  mg/L) volt. A közepes súlyosságú – tipikus - csoportban (n=7; score: 20-50) a diagnózist korábbi életkorban állították fel (0,1-7 év), a biokémiai vizsgálatok eredményei a következők: szérum koleszterin átlagértéke  $1,47 \pm 0,7$  mmol/L, a 7-DHC átlaga pedig  $0,53 \pm 0,20$  mmol/L-nek ( $202 \pm 77$  mg/L) bizonyult. Azok a betegek akik már újszülött korban vagy fiatal csecsemőkorban (2 hónapos koruk előtt) meghaltak, a társuló rendellenességeik alapján mindannyian a súlyos fenotípusú csoportba voltak besorolhatók (n=4, score: > 50). Ebben a csoportban a 7-DHC értékek ( $0,47 \pm 0,14$  mmol/L;  $181 \pm 52$  mg/L) hasonlóak voltak a tipikus csoportba sorolt betegek értékeihez, de a koleszterin értékek szignifikánsan alacsonyabbnak

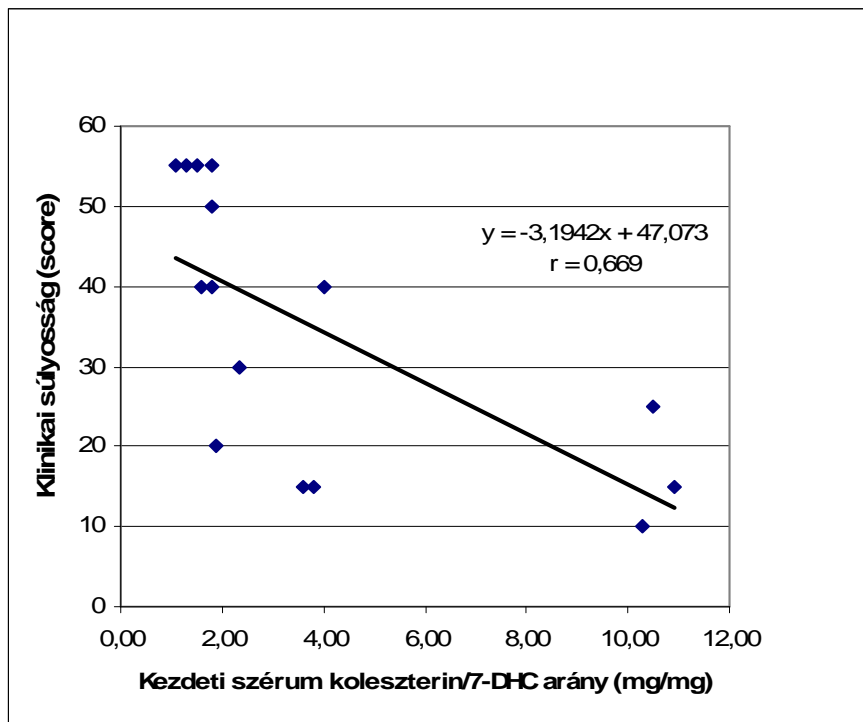
( $0,66 \pm 0,27$  mmol/L) bizonyultak összehasonlítva az enyhe SLO fenotípusú csoport ( $2,37 \pm 0,8$  mmol/L) betegeivel (**19. ábra**).



**19. ábra** A kezdeti koleszterin szint és az SLO szindrómás betegek klinikai súlyosságának összefüggése ( $n=15$ )

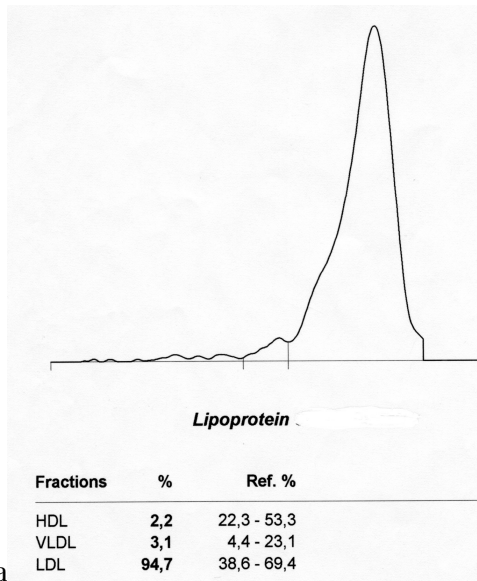
(A kezdeti koleszterin szint jelentősen meghatározza az SLO szindróma súlyosságát és a betegek életkilátásait)

A kezdeti koleszterin/7-DHC aránya tükrözi a betegség súlyosságát, ez az arányszám a terápia monitorozására is alkalmas. A 20. ábra a koleszterin/7-DHC arányának és a klinikai súlyosság fordított arányosságát mutatja, szignifikáns különbség figyelhető meg az egyes betegcsoportok között (Kruskal-Wallis teszt,  $p=0,004$ ; **20. ábra**).

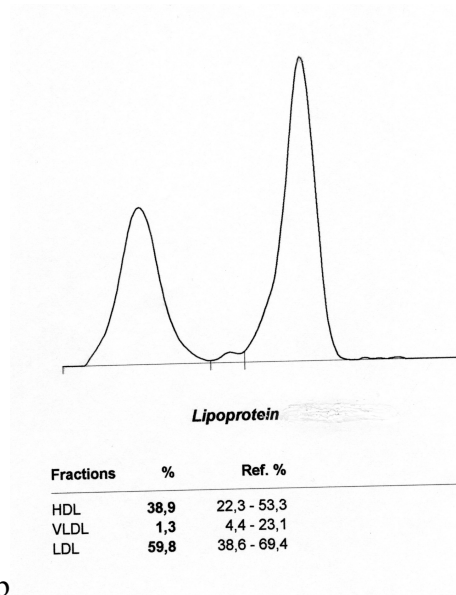


**20.ábra** A kezdeti koleszterin/7-DHC arány és az SLO szindrómás betegek klinikai súlyosságának összefüggése (n=15)

A lipoprotein gél elektroforézis során a súlyos SLO csoportban csökkent  $\alpha$ -lipoprotein %-ot ( $7 \pm 5$  %) detektáltunk, összehasonlítva az egészséges kor-specifikus kontroll csoporttal ( $25,4 \pm 1,6$ %), n=5; 0-3 év) vagy a tipikus ( $31,6 \pm 9$  %) és enyhe ( $33 \pm 6$  %) SLO-s betegcsoporttal. Bonferoni teszt szerint az  $\alpha$ -lipoprotein arány szignifikánsan alacsonyabb volt a súlyos csoportban, mint a tipikus (p=0,003) és az enyhe fenotípusú SLO szindrómás betegek csoportban (p=0,004) (21./a, b ábra).



a



b

**21. ábra Sebía gél elektroforézis eredménye súlyos és enyhe SLO szindrómás betegben**

**a.** Az  $\alpha$ -lipoproteinek alig detektálhatók súlyos SLO szindrómás beteg esetében. **b.** Normális lipoprotein frakciók aránya enyhe SLO szindrómás betegben

## 6. MEGBESZÉLÉS

A mentális retardáció etiológiája rendkívül heterogén. Számos környezeti ártalom, mint perinatalis infekciók, perinatalis asphyxia, intrauterin elszennvedett teratogén hatás (pl. magzati alkohol szindróma, maternális PKU) állhat a mentális retardáció hátterében. Az esetek jelentős részében azonban öröklött vagy szerzett genetikai károsodás a mentális retardáció oka. Mindennapi munkánkban gyakran jelent nehézséget a genetikai eltéréssel nem járó szerzett vagy a genetikai károsodás okozta fogyatékos állapotok elkülönítése. Érthető ez, hiszen a központi idegrendszer morfológiai vagy funkcionális károsodásának klinikai következményei – mint pl. epilepszia, mentális retardáció, viselkedés-, és magatartászavarok stb. - gyakran teljesen hasonlóak. Sokszor halljuk a genetikával nem foglalkozók szájából, hogy nincs értelme a túlzott diagnosztikus erőfeszítéseknek, hiszen az ok kiderítése nem változtat a gyermek állapotán, sőt a fejlesztési és kezelési lehetőségek is hasonlóak az etiológiától függetlenül. Miért kell mégis törekednünk a genetikai diagnózis minél pontosabb tisztázására? Ennek számos oka van:

- A korszerű és intenzíven fejlődő genetikai módszerek lehetővé teszik a genetikai eltérésben érintett gének pontos meghatározását, funkcióik ismeretében genotípus-fenotípus összefüggések tisztázását, a betegségek patomechanizmusának egyre pontosabb megismerését. Az ismeretek egyre gazdagodó tárháza az eredményes kezelés előfeltétele.
- Gyakorlati szempontból a pontos diagnózisnak számos előnye van:
  - A genetikai diagnózis, az etiológia segít meghatározni a szindróma-specifikus és társuló szomatikus tüneteket, amelyek kezelése, korrekciója (pl. siketség, nagyothallás esetén halló készülék) nem egyszer az értelmi fogyatékoságot is kedvezően befolyásolja.

- A genetikai eltérés pontos ismerete esetenként a még nem észlelhető, de várhatóan később fellépő tünetekre is felhívhatja a figyelmet, ami megelőzésre vagy korai felismerésre és ezáltal eredményesebb kezelésre nyújt lehetőséget.
- A genetikai eltérés meghatározza az értelmi fogyatékoság típusát, súlyosságát és a várható prognózist. Mindez támpontot nyújt a beteg célzott, a várhatóan legeredményesebb kezelés megválasztásához, a korai fejlesztés és a megelőzési programok megszervezéséhez.
- A már megszületett beteg gyermek ellátása, felnevelése, gondozása óriási anyagi, fizikai és lelki terhet jelent az egyed, a család és a társadalom számára egyaránt. A túlnyomó részben értelmi fogyatékosággal (is) járó genetikai betegségek jelentőségét növeli gyakoriságuk és a csecsemő- és gyermekkori halálozásban való jelentős részvételük. Ugyancsak fontos szempont, hogy mai ismereteink szerint – legalábbis a genetikai defektust illetően – nem kezelhetők (kivéve pl. a diétával befolyásolható anyagcserebetegségeket). Ezért a megelőzésre kell törekednünk. A hatásos megelőzés feltétele azonban a pontos genetikai diagnózis, amelynek birtokában az érintett családokban egy következő terhesség esetén prenatális vizsgálat elvégzésére, s ezáltal az újabb beteg gyermek születésének megelőzésére nyílik lehetőség.

Mindezek alapján nem kétséges, hogy minden eszközzel törekednünk kell az etiológia, az értelmi fogyatékoság háttérében álló genetikai eltérés pontos kimutatására. Minden egyes eset tisztázása előbbre visz a fent említett célok eléréséhez.

## **6.1 Diagnosztikai eszközök felhasználása a mentális retardáció diagnosztikájában, genetikai eltérések pontos meghatározása**

A genetikai tényezőkről szerzett ismereteink a citogenetikai, molekuláris citogenetikai és molekuláris biológiai technikák fejlődésével napról napra bővülnek. Mégis, - a genetikai módszerek rohamos fejlődése ellenére - a súlyos/közepesen súlyos értelmi fogyatékosoknak ma is mindössze 60-75 %-ában áll rendelkezésünkre etiológiai diagnózis, az enyhe értelmi fogyatékosoknak pedig 80 %-ában marad ismeretlen a mentális retardáció oka [Inlow és Restifo 2004; Rauch és mtsai, 2006]. Ezért tűztem ki célul, olyan új genetikai diagnosztikai módszer bevezetését és alkalmazását laboratóriumunkban, amely lehetőséget kínált arra, hogy a korábbi módszerekkel nem tisztázható, ismeretlen eredetű mentális retardációk eseteiben vagy legalább azok egy részében pontos genetikai diagnózishoz jussunk. A szubtelomerikus kromoszóma átrendeződések kimutatására szolgáló módszerek egyike a szubtelomerikus FISH vizsgálat. A módszer bevezetésével lehetőség nyílt a kiválasztott betegcsoportban a mentális retardáció genetikai hátterének tisztázására. Emellett a monogénes szindrómák egyikében, a Smith-Lemli-Opitz szindrómában szenvedő betegek molekuláris genetikai vizsgálattal Magyarországon elsőként diagnosztizált esetét és a Magyarországon munkacsoportunk által összegyűjtött 15 SLO szindrómás beteg klinikai és biokémiai paraméterei között kimutatott összefüggést mutatom be.

### **6.1.1. Szubtelomerikus kromoszóma átrendeződések**

A szubtelomerikus kromoszóma átrendeződések olyan kromoszóma aberrációk, amelyek a hagyományos kromoszóma analízissel kimutatható kromoszóma eltérésektől méretükben kisebbek és a halványan festődő kromoszóma végeken, a telomerikus régiókban helyezkednek el. Emiatt a hagyományos módszerekkel nem detektálhatók. Ugyanakkor génben gazdag területekről van szó, amelyek kiegyensúlyozatlan kópiaszám variációi (deléciói és duplikációi) súlyos tünetegyüttesekhez vezetnek. Mivel az akrocentrikus

kromoszómák rövid karja kivételével bármely kromoszóma rövid vagy hosszú karja részt vehet egy ilyen átrendeződésben és a töréspontoktól függően a deletált vagy duplikálódott régiók mérete, így az elvesztett vagy duplikálódott gének száma és funkciója különböző lehet, a kórképek igen változatosak. Vannak azonban bizonyos jól felismerhető entitások, amelyek azonos kromoszóma azonos vagy hasonló törésponttal járó eltéréseinek következményei. Ezekben az esetekben célzott vizsgálatok végezhetők az adott régióra specifikus próbák alkalmazásával, míg ismeretlen tünetegyüttesek esetén valamennyi telomerikus rész vizsgálatára sort kell keríteni az eltérés felismeréséig. A fénymikroszkóppal látható kromoszóma aberrációkhoz hasonlóan a kiegyensúlyozatlan eltérést mutató beteg utód hívja fel a figyelmet a lehetséges szubtelomerikus delécióra vagy duplikációra. Jelentős részük szülői kiegyensúlyozott transzlokációból származik, míg mások újonnan fellépő mutáció eredményei. Az eltérések familiáris, vagy *de novo* formáinak elkülönítése fontos az ismétlődési kockázat megítélése és az érintett családokban újabb beteg gyermek születésének megelőzése céljából.

A DE OEC Gyermekgyógyászati Intézet Klinikai Genetika Központ Genetikai Laboratóriumában 125 mentálisan retardált beteg és 24 egészséges hozzátartozó esetében végeztünk szubtelomerikus FISH vizsgálatot. A vizsgálat detekciós rátája 10,4 % volt, amely érték magasabbnak bizonyult, mint a nemzetközi irodalomban közölt értékek többsége [De Vries és mtsai., 2003; Ravnan és mtsai., 2006; Shao és mtsai., 2008]. A szubtelomerikus FISH vizsgálat költség- és munkaigényes, ezért a betegek megfelelő kiválasztása kulcsfontosságú, ha azonban túl szigorú szelekciós kritériumokat alkalmazunk, a pozitív esetek egy része felismeretlen marad. Vizsgálatainkban Lam és munkatársai (2006) által javasolt kritériumrendszert alkalmaztuk. Az említett szerzők a közepesen súlyos, súlyos értelmi fogyatékos betegek 10%-ában mutattak ki szubtelomerikus kromoszóma átrendeződést. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, - hasonlóan a svájci munkacsoport megfigyeléséhez - hogy a

legfontosabb szelekciós paraméter az értelmi fogyatékoság családi halmozódása [Riegel és mtsai., 2001]. Több ezer vizsgálat és a közölt esetek elemzése lehetővé tette bizonyos szubtelomerikus régiókhoz tartozó tünetegyüttesek megismerését, új szindrómák leírását. A leggyakrabban előforduló szindrómák az irodalom szerint a következők: del(1pter), del(1qter), del(2qter), del(22qter) [Flint és mtsai., 2003]. Ezért a szubtelomerikus vizsgálataink során esetenként a fenotípusos jegyek alapján is indikáltunk célzott vizsgálatokat, különös tekintettel az 1p36 deléció kimutatására. Az említett szindróma fenotípusos jegyei ugyanis bizonyos tekintetben átfedést mutatnak a Prader-Willi szindróma klinikai tüneteivel.

A nemzetközi kritérium rendszer alapján kiválasztott 125 mentálisan retardált beteg közül 13 esetben (10,4%) mutattunk ki szubtelomerikus kromoszóma aberrációt, ebből 4 *de novo* eset, míg 9 eset familiáris eredetűnek bizonyult.

**De novo** keletkezett eltérések: **ish del(3)(qter-)** (1 beteg); **ish del(1)(pter-)** (2 beteg); **ish del(22)(qter-)** (1 beteg). **Familiáris aberrációk:** **ish der(8)t(8;12)(pter-,pter+)** (2 beteg); **ish der(21)t(10;21)(pter+,qter-)** (3 beteg); **ish der(4)t(4;8)(pter-;qter+)** (1 beteg); **ish der(3)t(3;8)(pter-;pter+)** (1 beteg); **ish der(10)t(10;17)(qter-;qter+)** (2 beteg).

Célzott vizsgálatokat értelmi fogyatékos beteg hozzátartozójánál már az ismert eltérés kimutatására vagy ismert entitásra jellemző fenotípusos jegyek észlelésekor végeztünk. Az 1p36 deléciós szindróma, az egyik leggyakoribb szubtelomerikus deléciós szindróma, melyet a közepes/súlyos mentális retardáció, jellegzetes arcdysmorphia, izomhypotónia, obesitas és epilepszia jellemez. A klinikai tünetek gyakran átfedést mutatnak a Prader-Willi szindróma jellemzőivel, ezért 12 olyan Prader-Willi szindrómára jellemző fenotípusú betegnél végeztük el az 1p36 szubtelomerikus deléció FISH vizsgálatát, akiknél a Prader-Willi szindróma specifikus genetikai tesztek negatív eredményt adtak.

A szubtelomerikus FISH vizsgálatot megelőző Prader-Willi kimutatására szolgáló vizsgálatok: a specifikus régió (15q11.2) deléciójának kimutatása FISH módszerrel, a gén inaktiválódásának vizsgálatára szolgáló metilációs mintázat analízise és az inaktív anyai allél megduplázódását eredményező anyai uniparentális diszómia (UPD) kimutatása. A deléciót egyetlen esetben sem tudtuk igazolni. A 12 FISH-negatív eset közül négyben került sor UPD vizsgálatra, negatív eredménnyel. A 12 betegből két betegnél igazoltuk az 1p36.33 deléciót (**ish del(1pter)**), mely mindkettő *de novo* eredetűnek bizonyult. A Prader-Willi és az 1p36 deléciós szindrómák közös vezető tünete az újszülött korban jelentkező generalizált izomhypotonia, a „floppy-baby”-tünet. Tapasztalataink alapján felvetjük, hogy minden hypotoniás újszülöttnél érdemes a FISH tesztek elvégzése a Prader-Willi és az 1p36 deléciós szindróma kizárására.

### **6.1.2. SLO szindróma**

Az értekezésben bemutatott SLO szindrómás gyermek klinikai, biokémiai és genetikai diagnosztikája indította újtára a Debrecenben létrehozott SLO diagnosztikus és terápiás munkacsoportot, ami ma már országos központként biztosítja az SLO-s betegek komplex vizsgálatát. A bemutatott gyermek esetében egy eddig le nem írt új mutációt azonosítottunk, ami egy ismert mutációval összetett (compound) heterozigótaság formájában vezetett a kórkép kialakulásához.

A bemutatott SLO-s betegnél a szindróma lehetőségét - a fenotípus alapján - már a gyermek fél éves korában felvetettük – de csak évekkel később került sor a biokémiai és genetikai háttér tisztázására. Ebben az UV spektrofotometria új módszerének bevezetése és a molekuláris genetikai vizsgálat lehetőségének megteremtése játszott döntő szerepet. Ez tette lehetővé a diagnózis biokémiai és genetikai megerősítését, valamint a szimvasztatin és koleszterin szubsztitúciós kezelés hatásának laboratóriumi követését. A diagnózist alátámasztotta az alacsony koleszterin szint (2,77 mmol/L) és a magas 7-DHC (102 mg/L, ref:

< 0,15 mg/L). A kiterjesztett lipoprotein (TG, HDL-, LDL-, VLDL-koleszterin, Lp(A), apolipoprotein-A1) és D3 vitamin (118 nmol/L) vizsgálatok kóros eltérést nem mutattak, csupán mérsékelten alacsonyabb apolipoprotein B-100 értéket (0,38 g/L) mértünk. Molekuláris genetikai vizsgálat során a betegnél összetett heterozigótaság igazolódott, a beteg genotípusa: **c.964-1 G>C/c.1097 G>T** (p.G366V). A c.1097 G>T mutáció, amely a *DHCR7* gén 9-es exonjában helyezkedik el és a 4. citoplazmatikus hurkot érinti, egy korábban nem közölt új mutáció, mely guanin-timin nukleotid cserével jár és glicin-valin aminosav cserét eredményez a 7-dehidrokoleszterin reduktáz enzimben. A c.964-1 G>C mutációt az édesanya és a lánytestvér, míg a c.1097 G>T mutációt a beteg édesapja hordozza. Betegség-specifikus mutáció az iker fiútestvérből nem volt kimutatható. A terápia hatékonyságának megítélésében a klinikai tünetek alakulására és a 7-DHC és koleszterin értékek változásának monitorozására támaszkodtunk.

A külföldi kollaborációban elvégzett első molekuláris genetikai vizsgálatot követően a 15 magyarországi SLO szindrómás beteg összegyűjtésével lehetőség nyílt a DE OEC LMI Molekuláris Genetika Laboratóriumában a *DHCR7* gén molekuláris genetikai vizsgálatára és az LMI és Gyermekgyógyászati Intézet Klinikai Genetikai Központ munkatársai együtt egy SLO-szindrómás diagnosztikai és terápiás munkacsoportot hoztak létre. A bemutatott eset a molekuláris genetikai módszerrel elsőként diagnosztizált magyarországi beteg. Ezt az esetet követően került be a rutin diagnosztikába a 7-DHC meghatározása UV-spektrofotometriás módszerrel, amellyel lehetővé vált az új esetek diagnózisának megerősítése és a szimvasztatin és koleszterin szubsztitúciós terápia monitorozása. A létrehozott munkacsoportban (az LMI Molekuláris Genetikai Részlegén) az első eset óta bevezetett *DHCR7*-gén molekuláris genetikai vizsgálata lehetővé teszi az új esetek családspecifikus mutációinak kimutatását és újabb terhességvállalás esetén prenatális diagnosztikai vizsgálat elvégzését.

A diagnózis megerősítését követően a betegnél a koleszterin szubsztitúciós kezelést Irons és munkatársai protokollja szerint kiviteleztük, míg a szimvastatin kezelésnél Jira és munkatársai ajánlását követtük [Irons, 1997; Jira, 2000]. A kezelést a beteg jól tolerálta, gyógyszer mellékhatás nem jelentkezett. A 25-hónapos kezelési időszak alatt szignifikáns mértékben emelkedett a szérumban a koleszterin szint (2,77 mmol/L → 3,2 mmol/L) és csökkent a szérumban a 7-DHC érték (102 mg/L → 53 mg/L). A laboratóriumi paramétereken kívül javulást mutattunk ki a beteg antropometriai paramétereiben és magatartásában is, jóllehet a beteg kezelését a diagnózis biokémiai és genetikai megerősítését követően, csupán hat éves korban volt módunk elkezdeni. Az SLO szindrómában sajnálatos módon a károsodás, már a korai embrionális életben kialakul, ezért a már korábbi életkorban bevezetett terápia hatékonysága is kétséges.

Fordított arányú összefüggést találtunk az általunk vizsgált 15 magyarországi SLO szindrómás beteg klinikai súlyossági foka és a kezdeti koleszterin értékek között. Mivel a súlyos fenotípusú betegcsoportban szignifikánsan alacsonyabb kezdeti koleszterin értékeket mértünk összehasonlítva az enyhe fenotípusú csoporttal, úgy gondoljuk, hogy a kezdeti koleszterin szint jelentősen meghatározza a beteg klinikai állapotát, életkilátásait, így prognosztikai jelentőségű. Megállapítottuk, hogy a koleszterin/7-DHC hányados és az  $\alpha$ -lipoprotein aránya is szintén prognosztikai értékű lehet SLO szindrómában.

## **6.2 Genotípus-fenotípus korrelációk**

A szubtelomerikus kromoszóma eltérések csaknem fele familiáris eredetű, azaz az egyik szülő kiegyensúlyozott transzlokáció hordozó. A meiosis során a kromoszómák szegregációjának következtében parciális deléciók, duplikációk alakulhatnak ki. A fenotípust a deletált és duplikálódott gének együttesen határozzák meg. Az irodalom szerint az utódokban inkább a deléciós fenotípus a penetráns és meghatározó, de a klinikai kép az egyes

esetekben nagy változatosságot mutathat [Battaglia, 2007]. A deletált és duplikálódott régiók nagyságának és a töréspontoknak a pontos meghatározására alkalmas módszer az array-CGH. A töréspontok ismeretében lehetőség nyílik az érintett gének tanulmányozására, a genotípus-fenotípus kapcsolatának pontos megismerésére. A genotípus ismeretében a meghatározó tünetekre, a betegség klinikai megjelenési formájára és várható kórlefoiyásra (esetleg később megjelenő tünetekre) is következtethetünk. Array-CGH vizsgálatra két család beteg tagjaiban került sor.

**ish t(8;12)(pter-,pter+;pter-,pter+)**

Az *első családban* vizsgált testvérpár mindkét tagja (1. család) egy derivált 8-as kromoszómát örökölt az apától, amelynek szubtelomerikus régiójában egy 12-es kromoszóma eredetű kromoszóma részlet volt kimutatható, így 8pter deléció és 12pter duplikáció alakult ki. A **8pter deléció** mentális és növekedési retardációval, szívfejlődési rendellenességgel és magatartási problémával járó tünetegyüttes [Digilio és mtsai., 1998]. De Vries és munkatársai (2001/a) beszámoltak két <5,1 Mb nagyságú 8pter deléciós esetről, ahol enyhe értelmi fogyatékoságot és magatartászavart találtak egyidejű szívfejlődési rendellenesség nélkül. Kimutatták, hogy a <5,1 Mb nagyságú deléció proximális helyzete miatt a *GATA4* gén, amely a szívfejlődési rendellenességekkel hozható összefüggésbe, nem deletálódott. Az általunk vizsgált első családban mindkét testvérnél a **dup(12p) szindrómára** jellemző fenotípusos eltérések, elsősorban az arcdysmorphia jellemző tünetei is megfigyelhetők voltak. Az eddig közölt dup(12p) szindrómás esetek nagy része familiáris eredetű. Annak ellenére, hogy a fenotípust a duplikáció mérete ill. az átrendeződésben részt vevő partner kromoszóma jelenléte jelentősen befolyásolja, az arcdysmorphia a dup(12p) szindrómában, mint esetünkben is, nagyon jellemző. A lapos arc, prominens homlok és áll, rövid orr, lefelé tekintő szájjug, hypertelorismus, hátrafelé rotált fülkagyló figyelhető meg [Rauch és mtsai., 1996; Allen és mtsai., 1996; Battaglia és mtsai., 2007].

*ish der(21)t(10;21)(pter+,qter-)*

A *második családban* kimutatott kiegyensúlyozatlan transzlokáció a 10p15.3-14 és a 21q22.2-22.3 régiók között jött létre, s mindhárom betegben közepes mértékű mentális retardációt, a beszédfejlődés késését, izomhypotoniát, arcdysmorphiát (ptosis, középarc hypoplasia, micrognathia, hosszú philtrum, malformált fülkagyló, vékony felső ajakpír), szívfejlődési és ortopédiai rendellenességet eredményezett. A **szubmikroszkópikus 10p triszómiát** eddig négy esetben írták le, az általunk bemutatott család érintett tagjai a legnagyobb hasonlóságot a Stone által közölt esettel mutatják [Stone és mtsai., 1996; Fryns és mtsai., 1997; Benzacken és mtsai., 1998; Courtens és mtsai., 2006]. Az ismertetett betegeknél kimutatott 6,7 Mb nagyságú 10p duplikáció, az eddig közölt esetekkel összehasonlítva, a legkisebb. A Stone által leírt család két tagjánál a kiegyensúlyozatlan transzlokáció a 10p és 9p kromoszóma régiók között jött létre, a 10p14-15 régiót érintő duplikáció 9 Mb nagyságúnak bizonyult [Stone és mtsai., 1996]. Benzacken és munkatársai által 1998-ban közölt *de novo* kiegyensúlyozatlan transzlokáció a 6p és 10p kromoszóma régiót érintette, mely a csecsemőnél izomhypotoniát és arcdysmorphiát eredményezett. A duplikálódott kromoszóma régió a 10p14-pter régióban volt. Courtens közleményében beszámolt egy betegről, akinél 6,9 Mb nagyságú szubtelomerikus 10p duplikációt (10pter-p15) és egy 18q szubtelomerikus deléciót (18q23-qter) detektáltak. A beteg fenotípusos jellemzői a következők voltak: pszichomotoros retardáció, cardiomyopathia, strabismus, köldöksérv és arcdysmorphia.

A **parciális 21q monoszómia** egy ritka, változatos klinikai megjelenésű kromoszóma aberráció. A klinikai tünetek függenek a deléció méretétől, a deletált szakasz lokalizációjától és a transzlokációban részt vevő partner kromoszómától is. Holoprosencephalia jelenlétét a tiszta parciális 21q22.3 monoszómiás betegben írta le Estabrooks 1990-ben. A HPE1 régiót magában foglaló, kiegyensúlyozatlan transzlokációból származó két 21q22.3 parciális

monoszómiás esetet közöltek az irodalomban, ahol a 4 Mb nagyságú deléció a legdisztálisabban helyezkedett el (chr21:41521879-46944323, UCSC 2006 hg18 assembly) [Muenke és mtsai., 1995]. A 21q monoszóma szindróma genotípus-fenotípus összefüggése jelenleg még nem teljesen körvonalazott. A korábban már közölt parciális 21q monoszómiás esetek kapcsán öt fő fenotípusos jellemzőt meghatározó régióról tesznek említést, mely mindegyike az *ETS2* géntől proximálisan helyezkedik el [Chettouh és mtsai., 1995]. McGinnis és munkatársai a terminális deléció proximális határát a *HMG14* és *MXI* gének között helyezték el [McGinnis és mtsai., 1992]. Egy másik tanulmányban, ahol egy betegnél 7,9 Mb nagyságú 21q terminális deléciót detektáltak - amely magában foglalta az *ETS2* gént is - nagyon enyhe fenotípust írtak le: vékony, marfanoid testalkat, enyhe értelmi fogyatékoság, arcdysmorphia [Ehling és mtsai., 2004]. Esetünkben, ahol az *ETS2*, *HMG14* gének nem deletálódtak és a töréspont a *MXI* géntől proximálisan helyezkedik el, a következő fenotípusos jellemzőket észleltük: közepes fokú mentális retardáció, beszédfejlődés késése, izomhypotonia, arcdysmorphia (ptosis, középarc hypoplasia, micrognathia, hosszú philtrum, malformált fül, vékony felső ajakpír), szív fejlődési rendellenesség, scoliosis és kyphosis. A betegünkben észlelt 21q deléció – a HPE1 kritikus régiót tekintve - átfedést mutat a Muenke által leírt delécióval (UCSC 2006 hg18 assembly). A közös fenotípusos jellemzők a mentális retardáció, megkésett fejlődés, patella anomalia voltak [Muenke és mtsai., 1995].

A betegnél az array-CGH segítségével detektált 6,7 Mb nagyságú duplikáció a 10p15.3-14 régióban, az 5,6 Mb deléció pedig a 21q22.2-22.3 régióban helyezkedik el. A duplikálódott régióban (10p15.3-14) 21 lokalizálódó gén közül az OMIM adatbázis szerint a következő gének funkció-fenotípus kapcsolata ismert: *AKR1C2* (OMIM ref.: 600450, HGNC ID: 385), *IL2RA* (OMIM ref.: 147730, HGNC ID: 6008). A deletálódott régióban (21q22.2-22.3) 54 gén érintett, a fenotípussal összefüggésbe hozható géneket a **6. táblázatban** foglaltam össze. A *COL6A1* és *COL6A2* gének trunkált és misszenz mutációi Bethlem myopathiát okozhatnak,

mely egy autoszómális dominánsan öröklődő, a törzs és végtag izmainak közepes fokú gyengeségével és atrophijával járó, benignus myopathia az EMG kép myopathiára jellegzetes mintázatot mutat [Bethlem és Winjngaarden,1976; Merlini és mtsai., 1994; Gualandi és mtsai., 2009]. A 2. család, III/2 betegénél észlelt izomatrophia, izomgyengeség, scoliosis, kyphosis, ízületi hyperflexibilitás és habituális patella sublúxió összefüggésbe hozható a *COL6A1* és *COL6A2* gének haploinsufficienciája okozta gén-termék, illetve génfunkció kiesésével. Természetesen az említett összefüggések csupán a klinikai kép és a genetikai eredmények alapján született felvetések, amelyek csupán a gén termékek kimutatásával és funkciójuk vizsgálatával lenne bizonyítható.

### **3q29 mikrodeléciós szindróma**

A **3q29 mikrodeléciós** szindróma, egy jól körvonalazott genetikai betegség, melyet Rossi írt le elsőként 2001-ben. Ezt követte Willatt 2005-ben, aki hat esetben mutatta ki a 3q29 régió ~1,5 Mb nagyságú delécióját. A fenotípusra a következő tünetek a jellemzőek: enyhe-közepes fokú értelmi fogyatékoság, hosszú, vékony arc, rövid philtrum, magas ornyereg, autisztikus viselkedés, ataxia, mellkas deformitás, hosszú, elvékonyodó ujjak, microcephalia, szájpád-ajakhasadék, patkóvese, hypospadiasis, laza ízületek, kóros pigmentáció, visszatérő középfül infekciók. Később számos munkacsoport számolt be további fenotípusos jellemzők előfordulásáról, mint csigolya rendellenességek, ízületi kontraktúrák, nazális hang, kongenitális cataracta és egyéb szemrendellenesség, hasadt hüvelykujj [Baynan és mtsai., 2006; Ballif és mtsai., 2008; Polazzon és mtsai., 2009; Tyshchenko és mtsai., 2009]. Az általunk vizsgált esetben a 3q29 mikrodeléciós szindrómára jellegzetes fenotípusos eltérések mellett, ritka szemészeti rendellenesség, uvea coloboma fordult elő.

## 6. Táblázat A 21q22.2-22.3 régióban lokalizálódó gének összefoglalása

Gén	Gén teljes neve	OMIM ref.	HGNC azonosító
<i>TMPRSS3</i>	Transmembrane protease, serine 3	605511	11877
<i>CRYAA</i>	Alpha-crystallin A chain	123580	2388
<i>TRAPPC10</i>	Trafficking protein particle complex subunit 10	602103	11868
<i>AIRE</i>	Autoimmune regulator	607358	360
<i>TRPM2</i>	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 2	603749	12339
<i>COL6A1</i>	Collagen alpha-1 (VI) chain Precursor	120220	2211
<i>COL6A2</i>	Collagen alpha-2 (VI) chain Precursor	120240	2212
<i>COL18A1</i>	Collagen alpha-1 (XVIII) chain Precursor	120328	2195
<i>NDUFV3</i>	NADH-dehydrogenase flavoprotein 3	602184	7719
<i>CBS</i>	Cystathionine beta-synthase	236200	1550
<i>U2AF1</i>	U2 snRNP auxiliary factor small subunit	191317	12453
<i>CSTB</i>	Cystation-B (Stefin-B)	601145	2482
<i>PFKL</i>	6-phosphofruktokinase, liver type	171860	8876
<i>ITGB2</i>	Integrin beta-2 Precursor	600065	6155
<i>FTCD</i>	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase	606806	3974
<i>PCNT</i>	Pericentrin	605926	16068

### **1p36 deléziós szindróma**

Az **1p36 deléziós szindrómát** Shapira és munkatársai írták le 1997-ben. Az egyik leggyakoribb szubtelomerikus kromoszómaaberráció, incidenciája 1:5000-1:10000. Nagyon jellegzetes és könnyen felismerhető klinikai entitás. Fenotípusos jellemzői a mentális

retardáció, brachycephalia, arcdysmorphia, izomhypotonia, kis kéz és láb, agyi fejlődési rendellenesség, epilepszia, vitium, szemészeti rendellenesség, obesitas és hypothyreosis. A genetikai diagnózis 5 Mb-nál nagyobb deléció és komplex átrendeződések esetén high-resolution citogenetikai vizsgálattal is lehetséges, az 5 Mb-nál kisebb szubtelomerikus vagy intersticiális deléciók esetén szubtelomerikus FISH ill. array-CGH módszer áll rendelkezésünkre [Battaglia és mtsai., 2008]. Differenciál diagnosztikai szempontból felmerülő szindrómák: a Prader-Willi szindróma, az Angelman szindróma és a Rett szindróma. Az 1p36 deléció klinikailag leginkább a Prader-Willi szindrómával mutat átfedést, ezért számos tanulmány jelent meg a „Prader-Willi-like” fenotípusú betegben végzett vizsgálatokról [Slavotinek és mtsai.,1999; D’Angelo és mtsai., 2006; Rodríguez és mtsai., 2008; D’Angelo és mtsai., 2009]. D’Angelo és Slavotinek összefüggést találtak a Prader-Willi fenotípus és az 1p36 deléciós szindróma között, míg Rodríguez cáfolta ezt. Az 1p36 deléciós szindróma jellegzetes tünete az epilepszia, amely klinikai megjelenésében nagy változatosságot mutat az 1p36 deléciós szindrómás betegekben [Bahi-Buisson és mtsai., 2008]. Az epilepszia patomechanizmusa ebben a kórképben még nem teljesen tisztázott, a klinikai megjelenés a génben gazdag 1p terminális szakasz deléciójának (nagyság, kiterjedés) függvénye. A szindrómában az elvesztett szakaszokon két ismert epilepszia gént mutattak ki: az egyik a *KCNAB2*, egy feszültség-függő kálium csatorna  $\beta$ -alegység gén [Heilstedt és mtsai., 2001], a másik pedig a *GABRD*, egy human  $\gamma$ -aminovajsav A receptor delta-alegység gén [Windpassinger és mtsai., 2002]. E megfigyelések megerősítik, hogy az epilepsziával járó szubtelomerikus szindrómák array-CGH vizsgálata segítséget jelentene az epilepszia kialakulásában szerepet játszó gének megismerésében.

### **Smith-Lemli-Opitz szindróma**

Az SLO szindróma várható incidenciája 1:15900 és 1:17000 közé tehető [Nowaczyk és mtsai., 2006]. A szomszédos országokban, Csehországban és Szlovákiában 1:10000- től

1:20000-ig terjed, míg Lengyelországban 1:25000 között van. Magyarországi incidenciára vonatkozó adat jelenleg még nem áll rendelkezésünkre. Ahhoz, hogy meg tudjuk becsülni a betegség ill. a hordozók gyakoriságát a magyar populációban is, a kórkép alkalmazott biokémiai és molekuláris genetikai diagnosztikájának hazai bevezetése és a magyarországi esetek összegyűjtése szükséges. Örömkre szolgál, hogy ezt a folyamatot Debrecenben, munkacsoportunk közreműködésével sikerült elindítani. Az SLO szindróma fenotípusa nagyon változatos megjelenésű. Számos munkacsoport talált összefüggést bizonyos mutációk jelenléte és a betegség klinikai súlyossági foka között, így pl. a W151X nonszenz mutáció és az I251N mutáció az SLO szindróma súlyos formáját okozza [Bzduch és mtsai., 2000; Romano és mtsai., 2005]. Ezzel ellentétben az IVS8-1G>C/V326L genotípus enyhe tünetekkel jár [Kozak, 2000]. Yu és munkatársai úgy találták, hogy a genotípus és a fenotípus között nincs egyértelmű korreláció, mivel egyéb paraméterek szintén szerepet játszhatnak a prognózis meghatározásában, így pl. a magasabb szérum koleszterin szint kedvezőbb prognózissal jár. A fenti szerzők megerősítették azt a korábbi megfigyelést, hogy a 7-DHC érték nem mutat összefüggést a klinikai súlyossággal [Cunnif és mtsai., 1997; Yu és mtsai., 2000]. A betegség súlyossága és a szérum koleszterin közötti fordított arányú korrelációt munkacsoportunk is megerősítette [Oláh és mtsai., 2013]. A leggyakrabban előforduló *DHCR7* génmutációk a következők: IVS8-1G>C (27,3 %), T93M (10,4 %), W151X (5,7 %), V326L (4,8 %) és R404C (4,5 %). Az említett öt mutáció az ismert mutációk 50-60 %-át adja. A kevésbé gyakori mutációk között a R352W (2,8 %), E448K (2,8%), G410S (1,9 %), R242C (1,6%), S169L (1,6%) és a F302L (1,5%) említendő [Yu és Patel, 2005]. Witsch-Baumgartner és munkacsoportja 14 új patogén mutációt írt le SLO szindrómában. Vizsgálatuk során kifejezett földrajzi különbséget figyeltek meg a mutációk spektrumában, a mediterrán országok (Spanyolország, Olaszország), az Észak- és Közép Európai országok (Csehország,

Szlovákia, Németország, Lengyelország) és az Egyesült Királyság között [Witsch-Baumgartner és mtsai., 2005].

Az általunk bemutatott beteg genotípusának jelentősége, hogy a kettős heterozigóta beteg egyik alléljének mutációja, a c.1097 G>T mutáció, egy eddig le nem írt új patogén mutáció. A mutáció a *DHCR7* gén 9-es exonjában helyezkedik el, a negyedik citoplazmatikus hurkot érinti - s guanin-timin nukleotid cserével jár, ami a kódolt fehérjében, a 7-dehidrokoleszterin reductáz enzimben glicin-valin aminosavcserét eredményez. A c.1097 G>T mutációt a beteg édesapja hordozza. Az anyától örökölt másik mutáció egy ismert patogén mutáció.

A 90-es évek óta az SLO szindrómában alkalmazott terápiás beavatkozásokról számos multicentrikus tanulmány jelent meg. Kézenfekvőnek látszott a betegekben igazolt biokémiai eltérés, mindenekelőtt az alacsony koleszterinszint korrekciójával való próbálkozás. Kimutatták, hogy a koleszterin szubsztitúció hatására javulnak a biokémiai paraméterek [Ullrich és mtsai., 1996; Irons és mtsai., 1997]. Ezt a sztatín terápiás bevezetése követte, amit két megfigyelés támasztott alá: a HMG-CoA reductáz enzim gátlásával a kórosan felszaporodott prekursorok, a 7-DHC és 8-DHC mennyisége csökkenthető [Jira és mtsai., 2000], másrészt az a megfigyelés, hogy *in vitro* koleszterinmentes-közegben tartott humán fibroblaszt tenyészetben lovasztatin hozzáadásával a 7-DHCR aktivitásának upregulációja volt igazolható [Shefer és mtsai., 1997].

A szimvasztatin képes a deficiens 7-DHCR expresszióját is növelni [Jira és mtsai., 2000]. A javuló koleszterin szintézis a mutáns allél expressziójának növekedésével, így az enzim reziduális funkciójának fokozódásával magyarázható [Wassif és mtsai., 2005]. A terápiásan adott koleszterin pótlás a perifériás szövetekben javította a szterol profilt, de a központi idegrendszer szöveteiben nem. A *Dhcr7* egerek (T93M/Delta 3-5) szimvasztatinnal történő kezelése csökkentette a 7-DHC szintet a perifériás szövetekben, de az agyban a szint változatlan maradt [Correra-Cerro, 2006]. Magunk a beteg hat éves korában kezdtük el a

koleszterin szubsztitúciót és a szimvasztatin terápiát, aminek hatására definitív javulást észleltünk a biokémiai paraméterekben és néhány magatartási mintában is enyhülés volt megfigyelhető. Az SLO szindrómában alkalmazott kezelések hatékonyságát ma már kétségbevonják. Az utóbbi években ugyanis számos - a korábbi pozitív megfigyeléseket, a klinikai javulást megkérdőjelező tanulmány jelent meg, melyekben nem tudtak szignifikáns javulást igazolni a kezelés eredményeképpen [Haas és mtsai., 2007; Tierney és mtsai., 2010]. Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy az intrauterin életben elszenvedett koleszterin hiány már a korai embrionális életben súlyos, több szervet érintő irreverzibilis károsodásokhoz vezet, amelyek később már nem korrigálhatók. Ez a megfigyelés a genetikai diagnosztika fontosságát és prenatális diagnosztika lehetősége megteremtésének fontosságát húzza alá, tekintettel arra, hogy az anya anyagcsereje nem kompenzálja a koleszterin hiányt, mint más anyagcserebetegségekben.

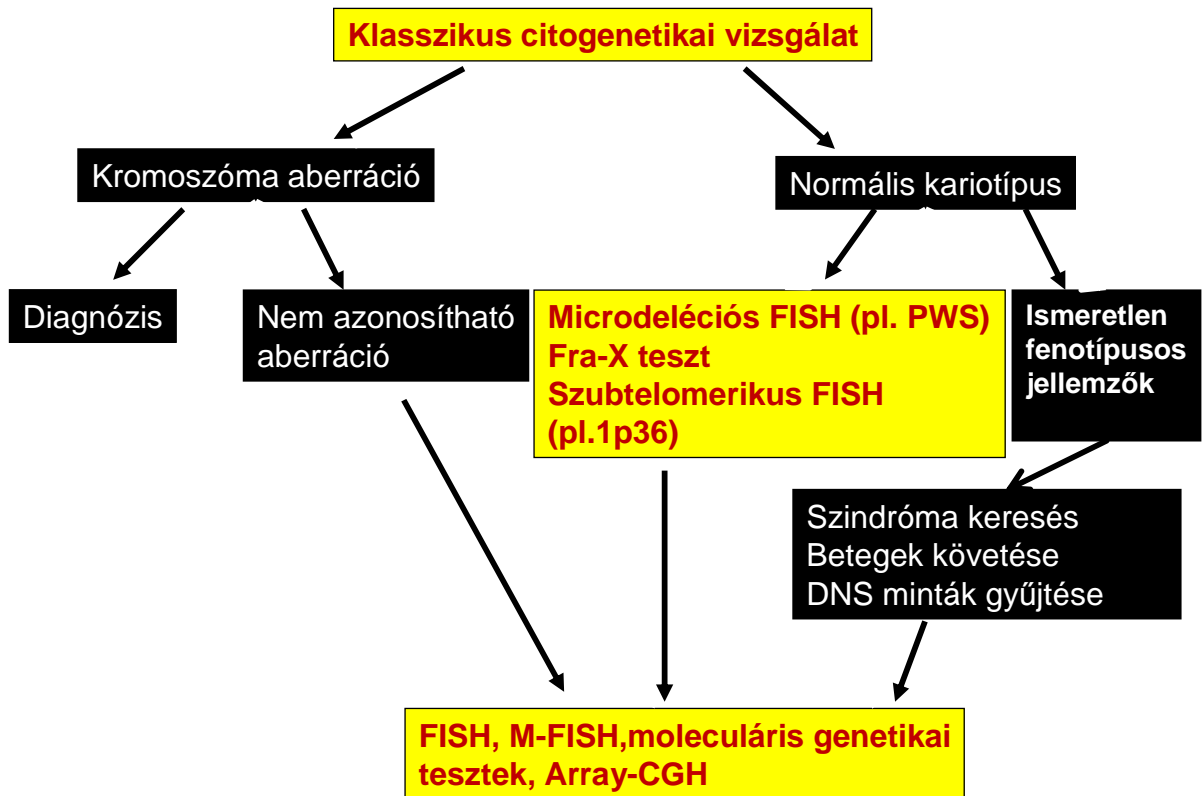
### **6.3. Az eredmények gyakorlati hasznosítása**

- *Kivizsgálási algoritmus kidolgozása és továbbfejlesztése*

A bevezetőben bemutatott kivizsgálási algoritmus az International Standard Cytogenomic Array (ISCA) Konzorcium (2010) javaslatának megfelelően a mentális retardáció/veleszületett rendellenességek kivizsgálásában az array technikákat helyezi a diagnosztikai lépések első helyére, melyet az Egyesült Államokban és a Nyugat-Európai országokban már rutinszerűen alkalmaznak [Miller és mtsai., 2010] (**1. ábra**). Hazánkban az array technikák rutinszerű alkalmazására jelenleg nem adottak a feltételek, így a magyar klinikai genetikus „rákényszerül” egy hazai kivizsgálási algoritmus kidolgozására és alkalmazására. Minden olyan esetben, amikor mentális retardációt észlelünk többszörös rendellenességhez társulva vagy anélkül, első lépésként a hagyományos citogenetikai vizsgálat elvégzését javasoljuk. Jóllehet, ez a módszer nem nyújt molekuláris szintű információt a háttérben álló genetikai eltérésről, a pozitív eredmény a klinikai igényeket

kielégíti: tisztázza a rendellenesség vagy az értelmi fogyatékoság okát és eszközt ad a kezünkbe az érintett család esetében egy következő terhesség során prenatális vizsgálat elvégzésére. Normális kariotípus vagy nem egyértelmű eredmény (pl.: marker kromoszóma) esetén kiegészítő molekuláris citogenetikai vizsgálatok pl.: mikrodéléción FISH, szubtelomerikus FISH, mFISH elvégzése szükséges (**22. ábra**). Amennyiben monogénes szindróma merül fel, mint. pl. SLO szindróma, Rett szindróma, Fragilis-X szindróma, a klinikai tünetek alapján, molekuláris genetikai vizsgálat javasolt. Ha az elvégzett vizsgálatok negatív eredménnyel zárulnak, vagy a szubtelomerikus FISH vizsgálattal kóros eltérést kapunk – a töréspontok pontos azonosítása érdekében – javasolt array-CGH vizsgálat elvégzése. Az érintett gének és funkcióik megismerésével klinikai-genetikai összefüggések vizsgálhatók, információt nyerünk a betegség patomechanizmusáról, esetleg később várható tünetek megjelenéséről, s a betegség várható lefolyásáról, a prognózisról.

## A mentális retardáció/veleszületett rendellenességek klinikai genetikai kivizsgálási algoritmus



**22. ábra** A mentális retardáció/veleszületett rendellenességek klinikai genetikai kivizsgálási algoritmus a hazai gyakorlatban

A genotípus-fenotípus összefüggések ismerete és rögzítése lehetővé teszi a szubtelomerikus deléciók klinikai képpel való összefüggésének tisztázását, újabb specifikus entitások leírását, ezáltal a betegek fenotípus alapján történő pontosabb kiválasztását, azaz a vizsgálat indikációjának pontosítását, ezáltal a próba panelek célzottabb megválasztását. A diagnózishoz szükséges idő lerövidítésén túl ily módon javítható a költség-haszon arány. Emellett a továbbfejlesztett beteg-szelekciós kritériumok alkalmazásával nagyobb találati arányt érhetünk el és csökkenthetjük a felesleges vizsgálatok számát.

Remélhető, hogy a molekuláris genetikai technikák fejlődésével egyre kevesebb esetben találkozunk tisztázatlan háttérű értelmi fogyatékosokban szenvedő gyermekkel és egyre ritkábban állunk tehetetlenül az érintett családok veszélyeztetett terhességei előtt. Az értelmi fogyatékoság genetikai hátterének tisztázásával a familiáris esetekben, a kiegyensúlyozott transzlokáció hordozó szülők és családtagok vagy heterozigóta mutációt hordozók újabb terhessége esetén megelőzhetjük a betegség családon belüli ismétlődését. Az sem közömbös, hogy a hordozó családtagok kiszűrésével már az első beteg gyermek megszületése is megelőzhető és a prenatális vizsgálattal a kóros gének populáción belüli gyakorisága is csökkenthető. Mindez felbecsülhetetlen fontosságú a beteg gyermek, a család és a társadalom terheinek csökkentése szempontjából.

### **A PhD értekezés új eredményei**

1. Ismeretlen eredetű mentális retardáció/többszörös veleszületett rendellenességek kivizsgálási menetébe beillesztettük a szubtelomerikus FISH vizsgálatot a nemzetközi kritérium rendszer alapján kiválasztott értelmi fogyatékos betegcsoportban, s a hazai lehetőségekre alapozva diagnosztikus algoritmust dolgoztunk ki. A szubtelomerikus FISH vizsgálatok során kilenc familiáris és négy *de novo* esetben mutattunk ki szubtelomerikus kromoszóma aberrációt – 10,4 %-os találati aránnyal (13/125).
2. Kollaborációban végzett array-CGH vizsgálattal meghatároztuk a deléció és duplikáció nagyságát, tanulmányoztuk a transzlokációban érintett géneket, lehetőséget teremtve a pontosabb genotípus-fenotípus összefüggések megismerésére (COL6A1 és 2 gének).
3. Az SLO szindrómás betegnél eddig nem közölt patogén mutációt (p.G366V) írtunk le összetett (compound) heterozigóta formában. Az SLO szindrómában tapasztalatot szereztünk a koleszterin szubsztitúciós és szimvasztatin kezelés alkalmazását illetően.

Egy eset kapcsán javulást tapasztaltunk a biokémiai paraméterekben, valamint bizonyos klinikai tünetekben, melyet a szülői interjú és a Vineland Adaptív Viselkedési Skála segítségével objektivizáltunk. Diagnosztikus és terápiás munkacsoportot hoztunk létre a hazai SLO-s betegek ellátása érdekében a Gyermekgyógyászati Intézet és a Laboratóriumi Medicina Intézet munkatársaival együtt.

4. Munkacsoportunk által összegyűjtött 15 magyarországi SLO szindrómás betegekben fordított arányú összefüggést mutattunk ki a betegség klinikai súlyossága és a kezdeti koleszterin szint között. A kezdeti koleszterin szint mellett a 7-DHC és az  $\alpha$ -lipoprotein értékek prediktív értéke lehet az SLO szindróma prognózisának megítélésében.
5. A genetikai diagnózis pontosításával, a családspecifikus mutáció kimutatásával lehetőség nyílt arra, hogy prenatális diagnosztikával a családon belüli ismétlődéseket megelőzzük, aminek eredményeképpen eddig öt egészséges gyermek született az „SLO családokban”.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A mentális retardáció etiológiája rendkívül heterogén. A háttérben álló okok lehetnek öröklött, genetikai ártalmak vagy pre-, peri-, vagy posztnatális életben szerzett betegségek. A citogenetikai, molekuláris citogenetikai és molekuláris biológiai technikák fejlődése ellenére a súlyos/közepesen súlyos értelmi fogyatékos betegek 60-75 %-ában, míg enyhe értelmi fogyatékosok 80 %-ában a mentális retardáció oka ismeretlen marad. Munkám célja: új genetikai diagnosztikai módszerek alkalmazása laboratóriumunkban, mellyel a korábbi módszerekkel nem tisztázható, ismeretlen eredetű mentális retardációk további részében pontos genetikai diagnózishoz jutunk. A szubtelomerikus kromoszóma átrendeződések kimutatására szolgáló módszerek egyike a szubtelomerikus FISH vizsgálat, mellyel a kromoszóma végeken elhelyezkedő génben gazdag területek átrendeződései kimutathatók. A 125 mentálisan retardált beteg közül 13 esetben mutattunk ki szubtelomerikus kromoszóma aberrációt, ebből négy *de novo* eset, míg kilenc familiáris eredetűnek bizonyult. **De novo** keletkezett eltérések: **ish del(3)(qter-); ish del(1)(pter-); ish del(22)(qter-).** **Familiáris aberrációk:** **ish der(8)t(8;12)(pter-,pter+); ish der(21)t(10;21)(pter+,qter-); ish der(4)t(4;8)(pter-,qter+); ish der(3)t(3;8)(pter-,pter+); ish der(10)t(10;17)(qter-,qter+).** Ez az egyéb módszerrel tisztázatlanul maradt esetek egy tizedében vezetett a genetikai eltérés tisztázásához. A fenti kromoszóma eltéréssel járó esetek mellett az értekezésben egy monogénes kórképben, a súlyos értelmi fogyatékosággal járó Smith-Lemli-Opitz szindrómában szenvedő, molekuláris genetikai vizsgálattal Magyarországon elsőként diagnosztizált esetet mutatok be. A beteg genetikai vizsgálata során eddig nem közölt új patogén mutációt igazoltunk, amely egy már ismert mutációval együtt, összetett heterozigóta formában vezetett a betegséghez: **c.964-1 G>C/c.1097 G>T (p.G366V).** A hazai SLO-s betegek klinikai, biokémiai és genetikai diagnózisának biztosítására munkacsoportot hoztunk létre. Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a kezdeti koleszterin érték jelentősen

meghatározza az SLO szindróma súlyosságát és a betegek életkilátásait, valamint a koleszterin/7-DHC hányados és az  $\alpha$ -lipoprotein további prognosztikai értékkel bír. A genetikai eltérések igazolása lehetőséget teremt a családon belüli ismétlődések megelőzésére, a genotípus-fenotípus összefüggések elemzése pedig a betegség patomechanizmusának megismerésében, a betegség prognózisának megítélésében és az adekvát beavatkozás megtervezésében nyújthat segítséget.

## SUMMARY

The etiology of mental retardation is extremely heterogenous. Either inherited genetic factors or acquired disorders during the pre-, peri- or postnatal life could be responsible for mental retardation. Despite the enormous development of cytogenetic, molecular cytogenetic and molecular biological techniques, the cause of mental retardation remains unknown in about 60-75 % of moderate/severe mentally retarded patients and in 80 % of those with mild form of mental retardation. The aim of my work was to apply new genetic methods in our laboratory to either confirm or establish genetic diagnosis in those patients with idiopathic mental retardation in which previous methods failed to reveal adequate diagnosis. The subtelomeric FISH is a useful method to detect subtelomeric chromosomal rearrangements of chromosomal segments at gene-rich subtelomeric regions. Beyond chromosomal structural abnormalities, monogenic disorders are common causes of mental retardations. In my thesis I present the first Hungarian SLO patient of whom the diagnosis was confirmed by mutation analysis. In 13 out of 125 mentally retarded patients of unknown origin subtelomeric chromosomal aberrations were identified. Among them four proved to be of *de novo* origin while nine other cases turned out to be familiar. **De novo aberrations were as follows: ish del(3)(qter-); ish del(1)(pter-); ish del(22)(qter-). Familiar aberrations: ish der(8)t(8;12)(pter-,pter+); ish der(21)t(10;21)(pter+,qter-); ish der(4)t(4;8)(pter-;qter+); ish der(3)t(3;8)(pter-;pter+); ish der(10)t(10;17)(qter-;qter+).**

Both biochemical and molecular genetic examinations were introduced to confirm the diagnosis of SLO syndrome. A novel, previously not published, pathogenic mutation was detected in a compound heterozygosity form: **c.964-1 G>C/c.1097 G>T** (p.G366V) – in a patient diagnosed as first one in Hungary with SLO syndrome. Our findings suggest that the initial level of serum cholesterol fundamentally determines the severity of the disease and life expectancy of SLO patients and that the ratio of Cho/7-DHC and  $\alpha$ -lipoprotein is prognostic

values as well. Detection of genetic aberrations allows to prevent the recurrence of a further affected offspring in the family, whereas analysis of the genotype-phenotype correlations offers a useful tool to learn the pathogenesis and assess the prognosis.

## 8. IRODALOMJEGYZÉK

American Association on mental retardation. Mental retardation: Definition, Classification, and Systems of support, 10th ed. Washington, DC: American Association on mental retardation; 2002

Allen, T.,L., Brothman, A.,R., Carey, J.C. és mtsai: Cytogenetic and molecular analysis in trisomy 12p. *Am J Med Genet*, 1996, 63: 250-256.

Ariani, F., Hayek, G., Rondinella, D. és mtsai: FOXP1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome. *Am J Hum Genet*, 2008, 83: 89-93.

Bahi-Buisson, N., Guttierrez-Delicado, E., Soufflet, C. és mtsai.: Spectrum of epilepsy in terminal 1p36 deletion syndrome. *Epilepsia*, 2008, 49(3): 509-515.

Ballif, B., C., Theisen, A., Coppinger, J. és mtsai: Expanding the clinical phenotype of the 3q29 microdeletion syndrome and characterization of the reciprocal microduplication. *Mol Cytogenetic*, 2008, Apr 28;1:8.

Battaglia, A., Bianchini, E., Carey, J.,C.: Diagnostic yield of the comprehensive assessment of developmental delay/ mental retardation in an institute of child neuropsychiatry. *Am J Med Genet*, 1999, 82: 60-66.

Battaglia, A., Novelli, A., Ceccarini, C. és mtsai: Subtelomeric analysis detects a familial 10p;12p rearrangement in two relatives with a distinct syndrome. *Am J Med Genet Part A*, 2007, 143A:184-188.

Battaglia, A., Shaffer, L.G.: 1p36 deletion syndrome. *GeneReviews*, 2008, Febr 01.

Baynam, G., Goldblatt, J., Townshend, S.: A case of 3q29 microdeletion with novel features and a review of cytogenetically visible terminal 3q deletions. *Clin Dysmorph*, 2006, 15: 145-148.

Benzacken, B., Lapierre, J.M., Siffroi, J.P. és mtsai: Identification and characterization of a de novo trisomy 10p by comparative genomic hybridization (CGH). *Clin Genet*, 1998, 54:334-340.

Bethlem J, van Winjngaarden GK.: Benign myopathy, with autosomal dominant inheritance-a report on three pedigrees. *Brain*, 1976, 99:91-100.

Bhvana, J., D., Sanger, W., G.: Role of cytogenetics and molecular cytogenetics in the diagnosis of genetic imbalances. *Semin. Pediatr Neurol.*, 2007, 14: 2-6.

Bruno D.L., Ganesamoorthy, D., Schoumans, J. és mtsai: Detection of cryptic pathogenic copy number variations and constitutional loss of heterozygosity using high resolution SNP microarray analysis in 117 patients referred for cytogenetic analysis and impact on clinical practice. *J Med Genet*, 2009, 46:123-131.

Bzduch, V.: Incidence of Smith-Lemli-Opitz Syndrome in Slovakia. *Am J Med Genet*, 2000, 90:260.

Chettouch, Z., Croquette, M.F., Delobel, B. és mtsai.: Molecular mapping of 21 features associated with partial monosomy 21: Involvement of the APP-SOD1 region. *Am J Hum Genet*, 1995, 57 (1): 62-71.

Cooper, G.M., Coe, B.P., Girirajan, S. és mtsai: A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet*, 2011, 43, (9): 838-846.

Correra-Cerro, L.S., Wassif, C.A., Kratz, L. és mtsai.: Development and characterization of a hypomorphic Smith-Lemli-Opitz syndrome mouse model and efficacy of simvastatin therapy. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(6): 839-851.

Courtens, W., Wuyts, W., Scheers, S. és mtsai.: A de novo subterminal trisomy 10p and monosomy 18q in a girl with MCA/MR: case report and review. *Eu J Med Genet*, 2006, 49: 402-413.

Cunnif, C., Kratz, L.E., Moser, A. és mtsai.: Clinical and biochemical spectrum of patients with RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome and abnormal cholesterol metabolism. *Am J Med Gen*, 1997, 68: 263-269.

D'Angelo, C.S., Da Paz, J.A., Kim, C.A. és mtsai.: Prader-Willi-like phenotype: investigation of 1p36 deletion in 41 patients with delayed psychomotor development, hypotonia, obesity and/or hyperphagia, learning disabilities and behavioral problems. *Eur J Med Genet*, 2006, 49: 451-460.

D'Angelo, C.S., Kohl, I., Varela, M. C. és mtsai.: Extending the phenotype of monosomy 1p36 syndrome and mapping of a critical region for obesity and hyperphagia, *Am J Med Genet Part A*, 2009, 152A: 102-110.

De Vries, B.,B.,A., Lees M., Knight, S.,J.,L. és mtsai: Submicroscopic 8pter deletion, mild mental retardation, and behavioral problems caused by a familial t(8;20)(p23;p13). *Am. J. Med. Genet.*, 2001, 99:314-319.

De Vries, B.B.A., White, S.M., Knight, S.J.L. és mtsai: Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet*, 2001, 38: 145-150.

De Vries, B.B.A., Winter, R., Schinzel, A. és mtsai.: Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet*, 2003, 40 (6): 385-398.

De Vries, B.B., Pfundt, R., Leisink, M. és mtsai: Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet*, 2005, 77: 606-616.

Digilio, M., C., Marino, B., Guccione, P. és mtsai: Deletion 8p syndrome. *Am J Med Genet*, 1998, 75: 534-536.

Ehling, D., Kennerknecht, I., Junge, A. és mtsai.: Mild phenotype in two unrelated patients with a partial deletion of 21q22.2-q22.3 defined by FISH and molecular studies. *Am J Med Genet*, 2004, 131A: 265-272.

Estabrooks, L.L., Rao, K.W., Donahue, A.S. és mtsai.: Holoprosencephaly in an infant with minute deletion of chromosome 21(q22.3). *Am J Med Genet*, 1990, 36:306-309.

Feenstra, I., Fang, J., Koolen, D.A. és mtsai: European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations (ECARUCA); an online database for rare chromosome abnormalities. *Eur J Med Genet*, 2006, 49: 279-291.

Flint, J., Wilkie, A.,O., Buckle, V.,J. és mtsai: The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat Genet*, 1995, 9: 132-140.

Flint, J., Knight, S.: The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. *Curr Opin Genet Dev*, 2003, 13: 310-316.

Fryns, J.P., Vandenberghe, K., Deschrijver, D.: Early urethral obstruction sequence and unbalanced translocation with terminal 10p duplication/1p deficiency. *Genet Counsel*, 1997, 8: 349-350.

Galasso C., Lo-Castro, A., El-Malhany, N. és mtsai.: "Idiopathic" mental retardation and new chromosomal abnormalities. *Italian J Ped*, 2010, 36:17.

Gualandi, F., Urciuolo, A., Martoni, E. és mtsai.: Autosomal recessive Bethlem myopathy. *Neurology*, 2009, 73: 1883-1891.

Haas, D., Garbade, S.F., Vohwinkel, C.: Effects of cholesterol and simvastatin treatment in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome (SLOS). *J Inherit Metab Dis*, 2007, 30:375-387.

Heilstedt, H.A., Burgess, D.L., Anderson, A.E. és mtsai.: Loss of the potassium channel beta-subunit gene, *KCNAB2*, is associated with epilepsy in patients with 1p36 deletion syndrome. *Epilepsia*, 2001, 42(9):1103-1111.

Honda, A., Batta, A.K., Salen, G. és mtsai.: Screening for abnormal cholesterol biosynthesis in the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet*, 1997, 68: 288-293.

Inlow J.K., Restifo L.L.: Molecular and comparative genetics of mental retardation. *Genetics*, 2004, 166: 835-881.

Irons, M., Elias E.R., Salen, G. és mtsai: "Defective cholesterol biosynthesis in Smith-Lemli-Opitz syndrome." *Lancet*, 1993, 341:1414.

Irons M., Elias E.R., Abuleo D. és mtsai: Treatment of Smith-Lemli-Opitz Syndrome: Results of a Multicenter Trial. *Am J Med Genet*, 1997, 68: 311-314.

Jira, P.E., Wevers, R.A., De Jong, J. és mtsai. : Simvastatin. A new therapeutic approach for Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Lipid Res*, 2000, 41:1339-1346.

Joubert, K., Darvay, S., Ágfalvi, R.: Hungarian growth standars. 1993. in: Oláh É. *Gyermekgyógyászati kézikönyv*, Medicina Könyvkiadó Zrt. 2009, p.1578-1600.

Kelley, R.I.: Diagnosis of Smith-Lemli-Opitz syndrome by gas chromatography/mass spectrophotometry of 7-dehydrocholesterol in plasma, amniotic fluid and cultured skin fibroblasts. *Clin Chim Acta*, 1995, 236: 45-58.

Kelley, R.L., Roessler, E., Hennekam R.C. és mtsai: "Holoprosencephaly in RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome: does abnormal cholesterol metabolism effect the function of Sonic Hedgehog?". *Am J Med Genet*, 1996, 66: 478-484.

Kelley, R.I., Hennekam, R.C.M.: The Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Genet*, 2000, 37: 321-335.

Koolen, D.A., Nillesen, W.M., Versteeg, G.F. és mtsai: Screening for subtelomeric rearrangements in 210 patients with unexplained mental retardation using multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA). *J Med Genet*, 2004, 41: 892-899.

Korade, Z., Xu, L., Shelton, R. és mtsai.: Biological activities of 7-dehydrocholesterol-derived oxysterols: implications for Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Lipid Res*, 2010, 51:3259-3269.

Kozák, L., Francová, H., Hrabínová, E. és mtsai.: Smith-Lemli-Opitz syndrome: Molecular genetic analysis of ten families. *J Inherit Metab Dis*, 2000, 23: 409-412.

Kuwano, A., Ledbetter, S.A., Dobyns, W.B. és mtsai: Detection of deletions and cryptic translocations in Miller-Dieker syndrome by in situ hybridization. *Am J Hum Genet*, 1991, 49: 707-714.

Lam, A.C.F., Lam, S.T.S., Lai, K.K.S. és mtsai: High rate of detection of subtelomeric aberration by using combined MLPA and subtelomeric FISH approach in patients with moderate to severe mental retardation. *Clin Biochem*, 2006, 39 (3): 196-202.

Ligon, A.H., Beaudet, A.L., Shaffer, L.G. és mtsai: Simultaneous, multilocus FISH analysis for detection of microdeletions in the diagnostic evaluation of developmental delay and mental retardation. *Am J Hum Genet*, 1997, 61: 51-59.

Lucito, R., Healy, J., Alexander, J. és mtsai: Representational oligonucleotide microarray analysis: a high-resolution method to detect genome copy number variation. *Genome Res*, 2003, 13: 2291-2305.

McGinniss, M.J., Kazazian, H.H. Jr, Stetten, G. és mtsai: Mechanisms of ring chromosome formation in 11 cases of human ring chromosome 21. *Am J Hum Genet*, 1992, 50(1):15-28.

Merlini, L., Morandi, L., Granata, C. és mtsai.: Bethlem myopathy: early onset benign autosomal dominant myopathy with contractures: description of two new families. *Neuromuscul Disord*, 1994, 4: 502-11.

Miller, D.T., Adam, M.P., Aradhya, S. és mtsai: Consensus statement: chromosomal microarray in a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet*, 2010, 86: 749-764.

Moser, H., W.: Genetic causes of mental retardation. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1038: 44-48.

Muenke, M., Bone, L.J., Mitchell, H.F. és mtsai.: Physical mapping of the holoprosencephaly critical region in 21q22.3, exclusion of SIM2 as a candidate gene for holoprosencephaly, and mapping of SIM2 to a region of chromosome 21 important for Down syndrome. *Am J Hum Genet*, 1995, 57 (5):1074-1079.

Nickerson, E., McCaskill, C., Greenberg, F. és mtsai: Deletions of the elastin gene at 7q11.23 occur in approximately 90 % of patients the Williams syndrome. *Am J Hum Genet*, 1995, 56: 1156-1161.

Ning, Y., Roschke, A., Smith, A.C., és mtsai: A complete set of human telomeric probes and their clinical application. *Nat Genet*, 1996, 14: 86-89.

Nowaczyk, M.J.M., Waye, J.S., Douketis, J.D.: *DHCR7* mutation carrier rates and prevalence of the RSH/ Smith-Lemli-Opitz Syndrome: Where are the patients? *Am J of Med Genet Part A*, 2006, 140A: 2057-2062.

Nwokoro, N.A., Mulvihill, J.J.: Cholesterol and bile acid replacement therapy in children and adults with Smith-Lemli-Opitz (SLO/RSH) syndrome. *Am J Med Gen*, 1997, 68:315-321.

Opitz, J.M.: RHD (so-called Smith-Lemli-Opitz) syndrome. *Curr Opin Pediatr*, 1999, 11:353

362.

Pinkel D., Se Graves R., Sudar D és mtsai: High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*, 1998, 20: 207-211.

Polazzon, M., Grosso, S., Papa, F.,T. és mtsai: A 9.3 Mb microdeletion of 3q27.3q29 associated with psychomotor and growth delay, tricuspid valve dysplasia and bifid thumb. *Eur J Med Genet*, 2009, 52: 131-133.

Porter, F.D.: "Malformation syndromes due to inborn errors of cholesterol synthesis." *J Clin Invest*, 2002, 110: 715-24.

Rauch, A., Trautmann, U., Pfeiffer, A.,R.: Clinical and molecular cytogenetic observations in three cases of „trisomy 12p syndrome”. *Am J Med Genet*, 1996, 63: 243-249.

Rauch, A., Ruschendorf, F., Huang, J. és mtsai: Molecular karyotyping using an SNP array for genomwide genotyping. *J Med Genet*, 2004, 41: 916-922.

Rauch, A., Hoyer J., Guth S. és mtsai: Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet Part A*, 2006, 140A: 2063-2074.

Ravnan, J.B., Tepperberg, J.H., Papenhausen, P. és mtsai: Subtelomere FISH analysis of 11,688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet*, 2006, 43(6): 478-489.

Raymond, F.L.: Monogenic causes of mental retardation. *Monogr Hum Genet*, 2010, 18: 89-100.

Ren, G., Jacob, P.F., Kaulin, Y. és mtsai.: Alterations in membrane caveolae and BKCa channel activity in skin fibroblasts in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Mol Genet Metab*, 2011, 104: 346-355.

Ried, T.: Cytogenetic-in color and digitized. *N Engl J Med*, 2004, 350:1597-1600.

Riegel, M., Baumer, A., Jamar, M. és mtsai.: Submicroscopic terminal deletions and duplications in retarded patients with unclassified malformation syndromes. *Hum. Genet*, 2001, 109: 286-294.

Rodríguez, V.R., Mazzucato, L.F., Pina-Neto, J.M.: Lack of evidence for monosomy 1p36 in patients with Prader-Willi-like phenotype. *Braz J Med Biol Res*, 2008, 41: 681-683.

Romano, F., Fiore, B., Pezziano, F.M. és mtsai.: A novel mutation of the DHCR7 gene in a sicilian compound heterozygote with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Mol Diagn*, 2005, 9(4): 201-204.

Rooms L., Reyniers, R., van Luijk, R. és mtsai.: Subtelomeric deletion detected in patients with idiopathic mental retardation using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). *Hum Mutat*, 2004, 23: 17-21.

Ropers, H.H., Hamel, B.C.: X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 46-57.

Rossi, E., Piccini, F., Zollino, M. és mtsai.: Cryptic telomeric rearrangements in subjects with mental retardation associated with dysmorphism and congenital malformations. *J Med Genet*, 2001, 38: 417-420.

Schouten, J.P., McElgunn, C.J., Waaijer, R. és mtsai.: Relative quantification of 20 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(12): 57.

Shaffer, L.G.: American College of Medical Genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation. *Genetics in Medicine*, 2005, 7(9): 650-654.

Shaffer, L.G., Theisen, A., Bejjani, B.A. és mtsai: The discovery of microdeletion syndromes in the post-genomic area: review of the methodology and characterization of a new 1q42q42 microdeletion syndrome. *Genet Med*, 2007, 9: 607-616.

Shao, L., Shaw, C.A., Lu, X-Y. és mtsai: Identification of chromosome abnormalities in subtelomeric regions by microarray analysis: A study of 5,380 cases. *Am J Med Genetics Part A*, 2008, 146A: 2242-2251.

Shapira, S.K., McCaskill, C., Nortrup, H. és mtsai.: Chromosome 1p36 deletions: The clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am J Hum Genet*, 1997, 61: 642-650.

Shefer, S., Salen, G., Honda, A. és mtsai.: Rapid identification of Smith-Lemli-Opitz syndrome homozygotes and heterozygotes (carriers) by measurement of deficient 7-dehydrocholesterol-delta 7-reductase activity in fibroblasts. *Metabolism*, 1997, 46: 844-850.

Shevell, M.I., Bejjani, B.A., Srour, M. és mtsai: Array comparative genomic hybridization in global developmental delay. *Am J Med Genet*, 2008, 147B: 1101-1108.

Slavotinek, A., Shaffer, L.G., Shapira, S.K.: Monosomy 1p36. *J Med Genet*, 1999, 36: 657-663.

Smith, D.W., Lemli, L., Opitz, J.M.: A newly recognized syndrome of multiple congenital anomalies. *J Pediatr*, 1964, 64: 210-217.

Starck, L., Lovgren-Sandblom, A., Bjorkhem, I.: Simvastatin treatment in the SLO syndrome: a safe approach? *Am J Med Genet*, 2002, 113:183-189.

Stone, D., Ning, Y., Guan, X.Y. és mtsai.: Characterization of familial partial 10p trisomy by chromosomal microdissection, FISH and microsatellite dosage analysis. *Hum Genet*, 1996, 98: 396-402.

Tierney, E., Conley, S.K., Goodwin, H. és mtsai.: Analysis of short-term behavioral effects of dietary cholesterol supplementation in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Med Genet Part A*, 2010, 152A: 91-95.

Tint, G.S., Irons, M., Elias, E.R. és mtsai.: Defective cholesterol biosynthesis associated with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *N Eng J Med*, 1994, 330: 107-113.

Tyshchenko, N., Hackmann, K., Gerlach, E.M. és mtsai.: 1.6 Mb deletion in chromosome band 3q29 associated with eye abnormalities. *Eur. J. Med. Genet*, 2009, 52:128-130.

Ullrich, K., Koch, H.G., Meschede, D.: Smith-Lemli-Opitz syndrome; treatment with cholesterol and bile acids. *Neuropediatrics*, 1996, 27: 111-112.

Weaving, L.S., Christodoulou, J., Williamson, S.L. és mtsai.: Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation. *Am J Hum Genet*, 2004, 75:1079-1093.

Vermeesch, J.R., Rauch, A.: „Molecular karyotyping“. *Eur J Hum Genet*, 2006, 14: 1063-1064.

Vissers, L.E.M., de Vries, B.B., Veltman, J.A.: Genomic microarrays in mental retardation: from copy number variation to gene, from research to diagnosis. *J Med Genet*, 2010, 47: 289-297.

Wassif, C.A., Krakowiak, P.A., Wright, B.S. és mtsai.: Residual cholesterol synthesis and simvastatin induction of cholesterol synthesis in Smith-Lemli-Opitz syndrome fibroblasts. *Mol Genet Metabol*, 2005, 85: 96-107.

Willatt, L., Cox, J., Barber J. és mtsai: 3q29 microdeletion syndrome: clinical and molecular characterization of a new syndrome. *Am J Hum Genet*, 2005, 77: 154-160.

Windpassinger, C., Kroisel, P.M., Wagner, K. és mtsai.: The human gamma-aminobutyric acid A receptor delta (GABRD) gene: molecular characterization and tissue-specific expression. *Gene*, 2002, 292(1-2): 25-31.

Witsch-Baumgartner, M., Clayton, P., Clusellas, N. és mtsai.: Identification of 14 novel mutations in DHCR7 causing of Smith-Lemli-Opitz syndrome and delineation of the DHCR7 Mutational Spectra in Spain and Italy. *Hum Mutat Mutation*, 2005, 25(4): 412.

Xu, J., Chen, Z.: Advances in molecular cytogenetics for the evaluation of mental retardation. *Am. J. Med. Genet. Part C*, 2003, 117C: 15-24.

Yu, H., Lee, M.H., Starck, L. és mtsai.: Spectrum of  $\Delta^7$ -dehydrocholesterol reductase mutations in patients with the Smith-Lemli-Opitz (RSH) syndrome. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(9): 1385-1391.

Yu, H. és Patel, S.B.: Recent insights into the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Clin Genet*, 2005, 68: 383-391.

Yunis J.J.: High resolution of human chromosomes. *Science*, 1976, 191: 1268-1270.

Yunis J.J.: Mid-prophase human chromosomes. The attainment of 2000 bands. *Hum Genet*, 1981, 56: 293-298.

Zapella, M., Meloni, I., Longo, I. és mtsai: Preserved speech variants of the Rett syndrome: molecular and clinical analysis. *Am J Med Genet*, 2001, 104: 14-22.

Iktatószám: DEENKÉTK/299/2013.  
Tételszám:  
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: P. Szabó Gabriella

Neptun kód: BAFBXD

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Oláh, A.V., **P. Szabó, G.**, Varga, J., Balogh, L., Csábi, G., Csákváry, V., Erwa, W., Balogh, I.: Relation between biomarkers and clinical severity in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Eur. J. Pediatr.* 172 (5), 623-630, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00431-012-1925-z>  
IF:1.907 (2012)
2. **P. Szabó, G.**, Knegt, A.C., Ujfalusi, A., Balogh, E., Szabó, T., Oláh, É.: Subtelomeric 6.7 Mb trisomy 10p and 5.6 Mb monosomy 21q detected by FISH and array-CGH in three related patients. *Am. J. Med. Genet. A.* 158A (4), 869-876, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.35236>  
IF:2.304
3. **P. Szabó, G.**, Oláh, A.V., Kozak, L., Balogh, E., Nagy, A., Blahakova, I., Oláh, É.: A patient with Smith-Lemli-Opitz syndrome: Novel mutation of the DHCR7 gene and effects of therapy with simvastatin and cholesterol supplement. *Eur. J. Pediatr.* 169 (1), 121-123, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00431-009-0987-z>  
IF:1.644
4. **P. Szabó G.**, Bessenyei B., Balogh E., Ujfalusi A., Szakszon K., Oláh É.: Szubtelomerekus kromoszómaátrendeződések kimutatása idiopathiás mentális retardációban. *Orv. Hetil.* 151 (27), 1091-1098, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2010.28911>



### További Közlemények

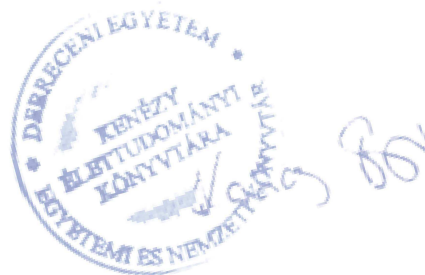
5. Balogh, I., Koczok, K., **P. Szabó, G.**, Török, O., Hadzsiev, K., Csábi, G., Balogh, L., Dzsudzsák, E., Ajzner, É., Szabó, L., Csákváry, V., Oláh, A.V.: Mutational spectrum of smith-lemli-opitz syndrome patients in Hungary.  
*Mol Syndromol.* 3 (5), 215-222, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000343923>

**Összesített impakt faktor: 5.855**

**Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 5.855**

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.09.09



## 9. TÁRGYSZAVAK

SLO szindróma, mentális retardáció, szubtelomerikus FISH, szubtelomerikus kiegyensúlyozatlan transzlokáció, array-CGH, 7-dehidrokoleszterin, *DHCR7* gén

SLO syndrome, mental retardation, subtelomeric FISH, unbalanced subtelomeric translocation, array-CGH, 7-dehydrocholesterol, *DHCR7* gene

## 10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom, témavezetőmnek és korábbi intézetvezetőmnek, **Dr. Oláh Éva professzor asszonynak**, aki TDK-s hallgató koromtól, 1995 óta témavezetőm és mentorom. Lehetőséget adott arra, hogy az általa létrehozott Genetikai Laboratóriumban megismerhettem a genetikai diagnosztikai munka alapjait, önálló munkát végezhettem, később pedig a tudományos munkán kívül lehetőséget adott a klinikum – gyermekgyógyászat, klinikai genetika – megismerésére is. Kezdetektől önzetlenül segített és mindig bátorított, ha valamilyen nehéz feladat előtt álltam.

Továbbá szeretném megköszönni a genetikai munkacsoport további tagjainak: **Dr. Balogh Erzsébetnek**, hogy naprakész információkkal és építő jellegű kritikákkal emelte munkám értékét és **Dr. Ujfalusi Anikónak** és **Bessenyei Beátának**, akik metodikai kérdésekben hasznos tanácsokkal láttak el. Nem utolsó sorban említeném a genetikai munkacsoport humán genetikai szakasszisztenseit is - **Orvos Gáborné, Bodnár Ferencné, Nagy Éva** - akiknek precíz munkája nélkül egyetlen eredmény és közlemény sem születhetett volna meg.

Köszönettel tartozom **Dr. Balla György professzor úrnak**, aki lehetőséget adott arra, hogy a Gyermekgyógyászati Intézet keretein belül nappali PhD hallgatóként dolgozhattam.

Szeretném megköszönni hazai (**Dr. V. Oláh Anna, Dr. Balogh István**) és külföldi (**Dr. Libor Kozak, Dr. Alida C. Knekt**) kollaborációs partnereimnek a segítséget és a hozzájárulást a munkámhoz.

Köszönöm férjemnek, **Dr. Szabó Tamásnak** és **szüleimnek**, hogy szeretetükkel, biztatásukkal minden nehézségen átvezettek, akaratot és lendületet adtak nekem a nehéz időkben is.

*Ajánlom ezt a munkát fiaimnak, Ádámnak és Kristófnak, nagy szeretettel!*

## 11. FÜGGELÉK

Függelék 1.

### ***Kérdőív - klinikai adatok***

(A szubtelomerikus FISH vizsgálatok kiválasztására)

Beteg TAJ száma:

Szülő elérhetősége, cím, telefonszám:

#### **Előzmények**

A családban fordult-e elő értelmi fogyatékoság, fejlődési rendellenesség?

Igen..... Nem

Terhesség alatt volt-e valamilyen probléma?

Hányadik terhesség ?....., Hányadik szülés ?....., Vetélés, abortusz.....

Környezeti expozíció volt-e ? Igen....., Nem.

Fertőzés, anyai betegség volt-e ? Igen....., Nem.

Terhességi szűrővizsgálatok eredményei:

Ultrahang 12.hét: .....

18. hét.....

Biokémia: AFP:

HCG:

SP1:

Egyéb:

Milyen volt a szülés módja?spontán... császármetszés.....oka:.....

#### **A gyermek újszülöttkori adatai:** (Zárójelentés másolatát csatolni szíveskedjen)

Születési hossz:

Születési súly:

Születési fejkörfogat:

Újszülött kori problémák, betegségek:

Sárgaság.....

Élesztés.....

Perinatális fertőzés.....

Táplálási problémák .....

Újszülött kori görcsök.....

Izomhypotonia.....

#### **A gyermek csecsemő- és kisdted kori adatai:** (Zárójelentés másolatát csatolni szíveskedjen)

Fejlődés mérföldkövei:

Fejét megtartja....., Segítséggel ül....., Segítség nélkül ül.....,

Kúszik.....Mászik....., Áll....., Jár.....,

beszél....., szobatisztaság.....

Betegségek:

Izomhypotonia.....

Táplálási nehézség.....

Epilepszia, egyéb neurológiai betegség.....  
Szemészet.....  
Kardiológia.....  
Ortopédia.....  
Fül-Orr-Gégészet.....  
Nephrológia.....  
Egyéb fejlődési rendellenesség.....  
Koponya CT, MRI.....  
Pszichológiai vizsgálat.....  
    FQ:....., IQ.....

Jelenlegi súly....., hossz....., fejkörfogat.....

Arcdysmorphia

.....  
.....  
.....  
..... (Az orvos

tölti ki, fénykép)

Családfa:

Függelék 2.

**Súlyossági score-rendszer SLO szindróma súlyossági fokának megítéléséhez**

SZERVEK	PONT	KRITÉRIUMOK
<b>Agy</b>	<b>1</b>	Görcsök, kvalitatív MRI abnormalitás
	<b>2</b>	Központi idegrendszeri defectus, gyrifikációs zavarok
<b>Száj</b>	<b>1</b>	Úvula bifida vagy submucosus száypadhasadék
	<b>2</b>	Kemény száypad hasadék, median ajakhasadék
<b>Végtagok</b>	<b>0</b>	Non-Y minimális syndactylia
	<b>1</b>	2/3 syndactylia, dongaláb, polydactylia, egyéb syndactylia
	<b>2</b>	Bármelyik kettő a fentiekből
<b>Szem</b>	<b>2</b>	Cataracta, microphthalmia
<b>Szív</b>	<b>0</b>	Funkcionális defectus
	<b>1</b>	Egy kamra, vagy ér defectus
	<b>2</b>	Komplex szívrendellenesség
<b>Máj</b>	<b>0</b>	Indukált máj abnormalitás
	<b>1</b>	Egyszerű szerkezeti eltérés
	<b>2</b>	Progresszív májbetegség
<b>Vese</b>	<b>0</b>	Funkcionális defectus
	<b>1</b>	Egyszerű cystás vesebetegség
	<b>2</b>	Vese agenesis, klinikailag jelentős cystás vesebetegség
<b>Tüdő</b>	<b>0</b>	Funkcionális tüdőbetegség
	<b>1</b>	Abnormális lebenyképződés, tüdőhypoplasia
	<b>2</b>	Tüdő cysták, egyéb rendellenesség
<b>Bélrendszer</b>	<b>0</b>	Funkcionális GI betegség
	<b>1</b>	Pylorus stenosis
	<b>2</b>	Hirschprung betegség
<b>Genitalia</b>	<b>1</b>	Egyszerű hypospadiasis
	<b>2</b>	Kétes genitália

**Enyhe: <20 (<4 pont); Tipusos (közepesen súlyos): 20-50 (4-10 pont); Súlyos: >50 (>10 pont) (Kelley & Hennekam, 2000)**

(A táblázatban adható legmagasabb 20 pont, 100 score értéknek felel meg.)