

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A koponyacsontosodási zavarok háttérében álló genetikai eltérések, genotípus-fenotípus elemzések

Bessenyei Beáta

Témavezető: Prof. Dr. Oláh Éva



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2015

TARTALOM

1. BEVEZETÉS.....	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
2. 1. A koponya fejlődése	5
2.2. A koponyacsontosodási zavarok definíciója és osztályozása.....	6
2.3. A koponyacsontosodási zavarok etiológiája.....	7
2.3.1. Génszintű eltérések.....	8
2.3.2. Kromoszóma eltérések	12
2.4. Craniosynostosis szindrómák	12
2.4.1. Apert szindróma	12
2.4.2. Crouzon szindróma.....	14
2.4.3. Pfeiffer szindróma	14
2.4.4. Muenke szindróma	15
2.4.5. Saethre-Chotzen szindróma.....	16
3. CÉLKITŰZÉSEK.....	17
4. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK.....	18
4.1. Betegek	18
4.2. Módszerek	18
4.2.1. DNS izolálás.....	19
4.2.2. Az FGFR1, 2, 3 és TWIST1 gének mutáció analízise	19
4.2.3. Az új mutáció patogenitásának vizsgálata.....	20
4.2.4. Citogenetikai vizsgálat	21
4.2.5. A TWIST1 gén FISH vizsgálata.....	22
4.2.6. ArrayCGH analízis	23
4.2.7. Statisztikai analízis	23
5. EREDMÉNYEK.....	23
5.1. A klinikai vizsgálat eredményei szindrómás betegekben.....	24
5.2. Genetikai eltérések szindrómás betegekben	26
5.3. Az új mutáció (p.Ser176Arg) patogenitását alátámasztó vizsgálati eredmények	30

5.4. Esetismertetések	31
5.4.1. Változó expresszivitás Pfeiffer szindrómában szenvedő probandban és családtagjaiban	31
5.4.2. Achondroplasia társulása több varratot érintő craniosynostosisal	36
5.5. Perinatális tényezők szerepe a nem-szindrómás csoportban	39
6. MEGBESZÉLÉS	41
6.1. Genetikai eltérések szindrómás craniosynostosisban	42
6.1.1. Genotípus-fenotípus összefüggések	43
6.1.2. Craniosynostosis és achondroplasia együttes előfordulása	46
6.2. Perinatális tényezők szerepe izolált craniosynostosisban.....	48
6.3. Diagnosztikai szempontok és kivizsgálási algoritmus	48
6.4. Új eredmények és gyakorlati jelentőség	52
7. ÖSSZEFOGLALÁS	55
8. IRODALOMJEGYZÉK	58
9. TÁRGYSZAVAK	78
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	79

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

arrayCGH: array komparatív genom hibridizáció

bHLH: bázikus hélix-hurok-hélix domén

BMP: bone morphogenetic protein

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

FGFR: fibroblast növekedési faktor receptor

FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció

IgI, II, III: immunoglobulin szerű domének I, II, III

ISCN: International System for Human Cytogenetic Nomenclature

MSX2: Msh homeobox 2

NP40: Nonidet P-40

PCR: polimeráz láncreakció

RFLP: restrikciós fragmenthossz polimorfizmus

TWIST1: twist family basic helix-loop-helix transcription factor 1

1. BEVEZETÉS

A koponyacsontosodási zavarok, a craniosynostosisok a koponyacsontok idő előtti záródásával járó kórképek, melyek közös jellemzője a normálistól eltérő koponyaforma kialakulása. A koponyacsontosodási zavarok alapvetően két formában jelentkezhetnek: az izolált (nem-szindrómás) formák esetén a koponyadeformitáshoz más szervi eltérések nem társulnak, míg a szindrómás formákban egyéb, leggyakrabban arcdysmorphiás tünetek és végtageltérések is megfigyelhetők.

A koponyadeformitás az esztétikai problémán túl, a betegség típusától és etiológiájától függően, súlyos neurológiai, szemészeti és légzőszervi következményekkel is járhat, mely korai sebészeti beavatkozást tesz szükségessé, ezért a craniosynostosis korai felismerése, kezelése, az egyes altípusok elkülönítése fontos feladat. A betegség diagnosztikájában, az izolált és szindrómás formák elkülönítésében a fizikális vizsgálat és a képalkotó eljárások (röntgen, CT) mellett fontos a genetikai háttér tisztázása, ami segítséget nyújt a betegség osztályozásában, a szindrómás formák azonosításában. A kimutatott genetikai eltérésnek prognosztikai szerepe van és lehetőséget teremt újabb terhesség esetén célzott prenatális vizsgálat elvégzésére, amelynek eredménye alapján a házaspár dönthet a terhesség sorsáról.

A magyarországi koponyacsontosodási zavarban szenvedő betegek klinikai és genetikai jellemzőiről hiányosak az ismereteink. A szindrómás formák felismerése gyakran diagnosztikai kihívást jelent ritkaságuk és változó súlyosságú megjelenésük miatt. A betegcsoport célzott tanulmányozására a betegek tapasztalt szakemberekkel dolgozó központokban történő kivizsgálása és kezelése teremt jó lehetőséget, amely hazánkban 2005-ben valósult meg. A magyarországi koponyarekonstrukciós műtétekre ettől az évtől kezdődően a Debreceni Egyetem Idegsebészeti Klinikáján kerül sor, a betegek pre- és posztoperatív ellátása pedig a Gyermekgyógyászati Intézetben zajlik neonatológus,

gyermekgyógyász és klinikai genetikus szakemberek közreműködésével. Ez a helyzet teremt lehetőséget a betegek genetikai vizsgálatát végző szakember számára a vizsgált betegek kapcsán szerzett tapasztalatok összefoglalására, a genetikai eltérések és a klinikai kép összefüggésének tanulmányozására.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2. 1. A koponya fejlődése

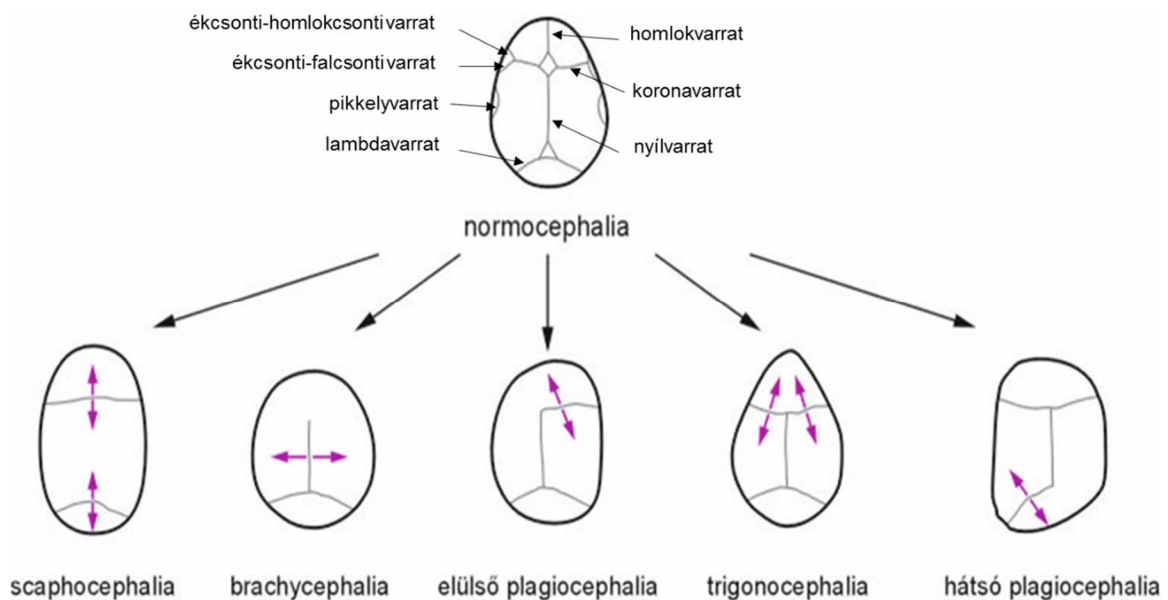
Az emlős szervezetek koponyája az agyat körülvevő és védő agykoponyából (neurocranium), és az arc vázát alkotó arckoponyából (viscerocranium) áll. A koponya fejlődésében két csontképződési folyamat játszik szerepet. A desmalis csontosodással kialakuló desmocranium csontjai, mint a koponyatetőcsontok, közvetlenül a mesenchyma sejtekből fejlődnek ki, míg a chondrocranium (os occipitale, os sphenoidale stb.) porcos előtelepből jön létre. A két fejlődési forma az arc- és az agykoponya kialakulásában is részt vesz. A koponyaboltozat kialakulása az embrionális fejlődés 13. hetében kezdődik el több csontosodási centrumból kiindulva. A gesztáció 18. hetére a csontszélek összeérnek, és a találkozási felszíneknél varratok alakulnak ki [Wilkie, 1997]. A sűrű, rostos kötőszövetből álló varratok lehetővé teszik a koponya szülőcsatornán való áthaladását, valamint a csontos koponya növekedését az agy növekedésének megfelelő ütemben. A koponyaboltozat csontjainak növekedése a varratok mentén történik desmalis csontosodással, azaz a mesenchyma sejtek közvetlenül osteoblastokká differenciálódnak porcszövet kialakulása nélkül. A koponyaboltozat varratainak záródása 22-26 éves korban kezdődik el, kivéve a homlokvarratot, melynek elcsontosodása már kétéves korban kezdetét veszi [Cohen, 2005]. A varratok teljes elcsontosodása csak 75-80 éves kor körül fejeződik be.

2.2. A koponyacsontosodási zavarok definíciója és osztályozása

A koponyacsontosodási zavarok, a craniosynostosisok egy vagy több koponyavarrat idő előtti záródásának következtében kialakuló, a koponya deformitásával járó kórképek. A craniosynostosis az egyik leggyakoribb koponyát érintő rendellenesség, incidenciája 1: 2100-2500 újszülött [Lajeunie és mtsai, 1995]. A korai csontosodási folyamat többnyire már a prenatális időszakban kezdetét veszi, ezért a koponyadeformitás gyakran már újszülött korban felismerésre kerül. A betegség izolált (nem-szindrómás) típusában, a betegek kb. 80-85%-ában, a koponyacsontosodási zavaron és az ennek következményeként esetenként fellépő másodlagos tüneteken (pl. intracranialis nyomásfokozódás, agyi véráramlási zavar, légzésvizsgálat, látás- és halláskárosodás stb.) kívül más jellegzetes szervi és fejlődésbeli eltérés nem figyelhető meg. A szindrómás formákban, a szindrómákra összességében jellemző, de az egyes szindrómák között gyakran átfedő fenotípusbeli eltérések, leggyakrabban változatos arcdysmorphiás tünetek és végtageltérések jelentkeznek. Jelenleg több mint száz craniosynostosisal társuló szindrómát ismerünk.

A koponya normálistól eltérő irányú növekedésének hátterében a varratok mentén kialakuló fokozott csontosodási folyamat áll. A korán elcsontosodott varratra merőlegesen a csontnövekedés leáll, ami a nem fúzionált varratoknál kompenzációs túlnövekedést eredményez. A koponya nem megfelelő irányú növekedése befolyásolja az agy növekedését is, ami esetenként súlyos neurológiai következményekhez vezet. Attól függően, hogy mely varratok záródnak, és milyen sorrendben, különböző koponyaformák jöhetnek létre (1. ábra). Leggyakoribb a nyílvarrat korai elcsontosodása (az összes craniosynostosis 40-55%-a), melyet a koronavarrat (20-25%), majd a homlokvarrat (5-15%) idő előtti záródása követ. A lambdavarrat korai synostosisa viszonylag ritka (<5%). Az esetek 5-15%-ában egynél több varrat van érintve [Cohen, 2000; Wilkie és mtsai, 2010].

A nyílvarrat korai záródása csónakfejűséghez (scaphocephalia) vezet: a koponya hosszú és keskeny, a homlok és a nyakszirti rész kidomborodik. A koronavarrat elcsontosodása rövidfejűséget (brachycephalia) vagy ferdefejűséget (elülső plagiocephalia) okoz: a koponya széles, a nyakszirti részen lecsapott, féloldali synostosis esetén aszimmetrikus [Pásztor, 2007]. A homlokvarrat eltűnése háromszögfejűséghez (trigonocephalia), a lambda varrat féloldali elcsontosodása hátsó plagiocephaliához, a korona- és lambdavarrat együttes fúziója csúcsfejűséghez (oxycephalia) vezet.



1. ábra A koponya főbb varratai és korai varratzáródás következtében kialakuló koponyaformák (felülnézet). A rózsaszín nyilak a növekedés irányát jelzik (Forrás: Oláh és mtsai, 2015). Megj.: az oxycephalia felülnézetből nem ábrázolható (lásd 4. ábra).

2.3. A koponyacsontosodási zavarok etiológiája

Az izolált formák elsősorban sporadikus megjelenésűek, etiológiájuk kevésbé ismert. Jelen ismereteink szerint az izolált craniosynostosisok multifaktoriális kórképek, azaz kialakulásukban a genetikai háttér és a környezeti faktorok egyaránt fontos szerepet játszanak [Boyadjiev és mtsai, 2007]. A genetikai háttér jelentőségét támasztja alá az

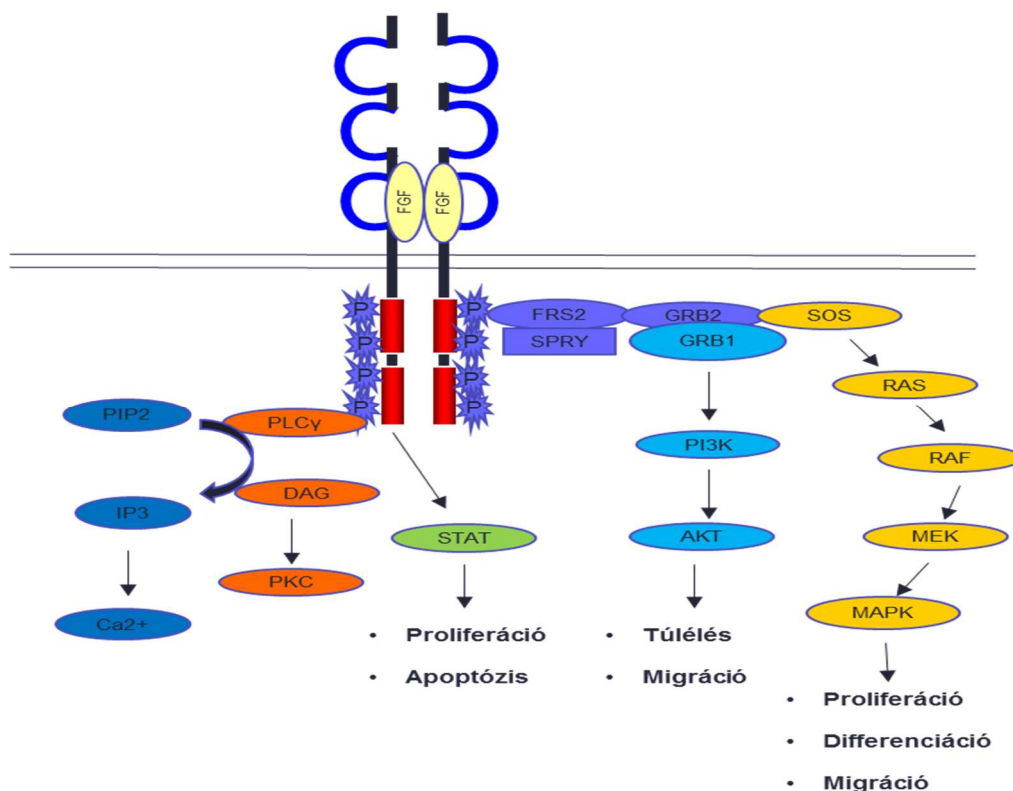
egypetűjű ikrekben kimutatható, a kétpetűjű ikrekhez képest magasabb (kb. 30-40 %-os) konkordancia arány, a fiúk gyakoribb érintettsége (fiú: lány arány: 2,1:1), valamint az érintett családokban észlelt nagyobb ismétlődési kockázat [Lajeunie és mtsai, 1996, 2005]. Epidemiológiai tanulmányok alapján a nem-szindrómás craniosynostosis kialakulásában kockázati faktort jelent, többek között, a férfi nem, a magas (>4000g) vagy alacsony (<1500g) születési súly, az idő előtti (<37 hét) és a farfekvéses szülés, az ikerterhesség és a magasabb (>35 év) anyai életkor [Alderman és mtsai, 1988; Singer és mtsai, 1999; Gill és mtsai, 2012]. Az anyai dohányzás, bizonyos gyógyszerek (pl. antiepileptikumok) vagy alkohol fogyasztása a terhesség során szintén növelhetik a craniosynostosis kialakulásának esélyét [Hackshaw és mtsai, 2011; Källen és Robert-Gnansia, 2005; Sanchez-Lara és mtsai, 2010]. Az izolált csoporttal ellentétben, a szindrómás formák hátterében elsősorban genetikai okok állnak, melyek gén- vagy kromoszómaszintű eltérések lehetnek.

2.3.1. Génszintű eltérések

A koponyacsontosodási zavarok kb. 25%-ában patogén mutációk azonosíthatók az osteoblastok differenciációjában, proliferációjában és a csontfejlődésben fontos szerepet játszó génekben [Wilkie és mtsai, 2010]. Az első craniosynostosisban leírt genetikai eltérés egy, az *MSX2* (Msh homeobox 2) génben bekövetkező heterozigóta aminosav cserével járó mutáció (p.Pro148His) volt, melyet egy Boston típusú craniosynostosisban szenvedő családban azonosítottak [Jabs és mtsai, 1993]. Az *MSX2* gén (5q35) pontmutációi rendkívül ritkák, a gén duplikációjáról azonban már többen beszámoltak [Kariminejad és mtsai, 2009; Pelegriño és mtsai, 2012]. A leggyakoribb gének, melyek mutációi patogén szerepet játszanak a koponyacsontosodási zavarok létrejöttében, a fibroblast növekedési faktor receptorokat és a TWIST1 (twist family basic helix-loop-helix transcription factor 1) transzkripciósfaktort kódolják.

Fibroblast növekedési faktor receptorok (FGFR) és génjeik

A négytagú FGF receptorcsalád tagjai (FGFR1-4) tirozinkináz aktivitással rendelkező, transzmembrán jelátviteli molekulák, melyek egy extracelluláris ligand kötő részből (IgI, IgII, IgIII immunglobulin szerű domének), egy transzmembrán szakaszból és egy osztott intracelluláris tirozin kináz doménből állnak (2. ábra). Az FGFR1, 2 és 3 receptorok esetén az IgIII domént két exon határozza meg: a domén N terminális felét a IIIa exon, a C terminális felét pedig a IIIb vagy a IIIc exon kódolja. A IIIb és IIIc izoformák alternatív splicing révén jönnek létre és szövetspecifikusak: a IIIb forma az epithelsejtekben expresszálódik, míg a IIIc forma a mesenchymalis eredetű sejtekben fordul elő [Dell és Williams, 1992]. Az IgIII domén a receptor ligandkötő részének központi részén helyezkedik el, ezért aminosav összetétele alapvetően meghatározza a receptor ligandkötő specificitását. A receptorok ligandjai a 23 tagot magába foglaló FGF család tagjai; az egyes receptorok ligandspecificitása eltérő [Zhang és mtsai, 2006]. A receptor-ligand kapcsolat a receptorok dimerizációjához vezet, ami a tirozinkináz régió transz-autofoszforylációját vonja maga után [Eswarakumar és mtsai, 2005]. Az aktivált receptorok különböző jelátviteli útvonalakon (RAS/MAP kináz, foszfatidil inozitol 3-OH kináz, foszfolipáz C γ) keresztül szabályozzák a sejtek proliferációját, differenciációját és a sejthalált [LaVallee és mtsai, 1998; Mansukhani és mtsai, 2000]. Fontos szerepet töltenek be az organogenezisben, neurogenézisben, angiogenezisben, a sebgyógyulás folyamatában, valamint alapvető fontosságúak mind az enchondralis, mind a desmalis csontosodási folyamatokban [Lonic és mtsai, 2013].



2. ábra Az FGF receptorok szerkezete és főbb szignalizációs útvonalai. Az FGF molekula receptorhoz való kötődése a receptor dimerizációjához és transz-autofoszforylációjához vezet. A tirozin kináz domének aktivációja a RAS/MAPK, PI3K, PLC γ és STAT útvonalakon keresztül szabályozza a sejtek proliferációját, differenciációját, apoptózist és migrációját. (PIP2:phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate; IP3: inositol 1, 4, 5-trisphosphate; PLC γ : phospholipase C gamma; DAG: diacylglycerol; PKC: protein kinase C; STAT: signal transducer and activator of transcription; FRS2: fibroblast growth factor receptor substrate 2; SPRY: sprouty; GRB: growth factor receptor-bound protein; PI3K: phosphatidyl inositol 3-kinase; AKT: protein kinase B; SOS: son of sevenless protein; RAS: rat sarcoma protein; RAF: rapidly accelerated fibrosarcoma protein; MEK: mitogen activated protein kinase kinase; MAPK: mitogen activated protein kinase.)

A craniosynostosisok kialakulásában az *FGFR1-3* gének játszanak szerepet. Az *FGFR2* gén (10q26) heterozigóta, aktiváló mutációi számos craniosynostosis szindrómában, így Apert, Crouzon vagy Pfeiffer szindrómában igazolhatók. A mutációk többsége aminosavcserével jár, melyek jelentős része a gén két forrópont régiójába, a IIIa és IIIc exonokba összpontosul. Az *FGFR1* gén (8p11) p.Pro252Arg mutációja a Pfeiffer szindróma 1-es típusában fordul elő, míg az *FGFR3* génben (4p16) két olyan aminosav cserével járó mutáció található, amely szindrómás craniosynostosiszt okoz (p.Pro250Arg,

Muenke szindróma; p.Ala391Glu, acanthosis nigricanssal társuló Crouzon szindróma). Az *FGFR* génekben bekövetkező mutációk funkcionyeréssel járnak, azaz az általuk kódolt receptorok tartósan aktív állapotban maradnak. Ez kialakulhat úgy, hogy megnő a receptor ligandkötő képessége, vagy a receptor a ligandtól függetlenül is aktiválódik [Ibrahimi és mtsai, 2004; Neilson és Friesel, 1995]. Egyes mutációk a receptor ligand-specifitását csökkenéséhez vezetnek [Yu és mtsai, 2000]. A fokozott jelátvitel az osteoblastok megnövekedett proliferációját és differenciációját eredményezi, ami intenzív csontosodást indukál [Fanganiello és mtsai, 2007; Park és mtsai, 2012; Marie, 2012].

TWIST1 transzkripció faktor és génje

A hélix-hurok-hélix transzkripció faktor családba tartozó TWIST1 molekula a mesenchymalis sejthalál kulcsmolekulájaként fontos szerepet játszik a vázrendszer kialakulásában. A TWIST1 számos molekuláris útvonal szabályozása révén pozitív vagy negatív hatást fejt ki az osteoblastok növekedésére, differenciálódására és túlélésére. Indirekt módon szabályozza a koponyavarratok kialakulását a BMP (bone morphogenetic protein) és az FGF útvonalakon keresztül [Miraoui és Marie, 2010]. A *TWIST1* gén (7p21) egyetlen kódoló exonjában előforduló heterozigóta funkcióvesztő mutációk változatosak: aminosav cserével, stop kodon kialakulásával, olvasási keret eltolódással járó eltérések. Egyes esetekben a teljes gén deléciója is bekövetkezik, magába foglalva akár nagyobb régiókat is, ami a Saethre-Chotzen szindróma mikrodeléció formájának kialakulásához vezet [Johnson és mtsai, 1998]. A *TWIST1* gén mutációi haploinsufficienciát okozva vezetnek a koponyacsontosodási zavarhoz.

A gyakoribb szindrómák többsége autoszomális domináns módon öröklődik. A súlyos fenotípussal járó szindrómákban (pl. Apert szindróma vagy Pfeiffer szindróma 2-es típusa) új mutáció megjelenésére számíthatunk, míg az enyhébb kórképekben (pl. Muenke vagy Crouzon szindróma) családi halmozódás előfordulhat.

2.3.2. Kromoszóma eltérések

Számos kromoszóma eltérést leírtak már craniosynostosisban, többségük azonban csak egy-egy esethez köthető [Wilkie és mtsai, 2010]. A citogenetikai eltérések egy része a *TWIST1* gént magába foglaló 7p21.1-es régiót érinti, melynek transzlokációja vagy deléciója a Saethre-Chotzen szindrómára jellemző tünetekkel jár [Shetty és mtsai, 2007; Cho és mtsai, 2013]. Egyéb eltérések között a 9p terminális deléció, 11q23 deléció, 22q11 deléció, 1p36 triszómia, 5q35 triszómia stb. említendők [Kimonis és mtsai, 2007; McDonald-McGinn és mtsai, 2005; Gajecka és mtsai, 2005; Wang és mtsai, 2007]. Hazánkban Kárteszi és mtsai közöltek 22q11 delécióval járó esetet (Kartesz és mtsai, 2004). A klasszikus citogenetikai vizsgálattal negatív esetek egy részében multiplex ligáció-függő próba amplifikáció vagy array komparatív genom hibridizáció (arrayCGH) módszerrel változatos szubmikroszkópos eltérések figyelhetők meg [Jehee és mtsai, 2008]. A kromoszóma eltérések a genetikailag igazolt esetek kb. 15%-át teszik ki [Wilkie és mtsai, 2010].

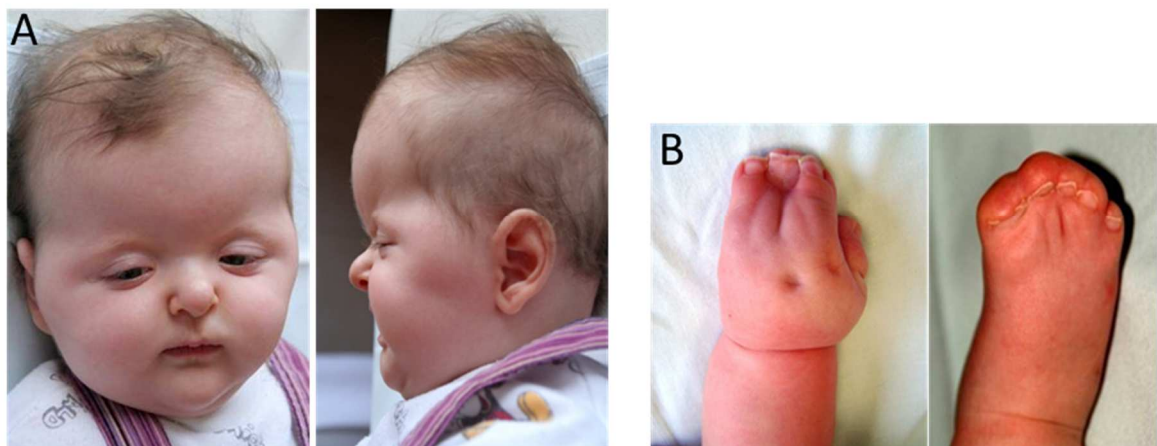
2.4. Craniosynostosis szindrómák

Több mint száz craniosynostosisal társuló szindróma létezik, melyek közül az öt leggyakoribb, az *FGFR1*, 2, 3 és *TWIST1* gének mutációival járó kórképet ismertetem.

2.4.1. Apert szindróma

Az Apert szindróma (I-es típusú acrocephalosyndactylia, OMIM#101200) az egyik legsúlyosabb craniosynostosis szindróma, amelyet Apert írt le 1906-ban [Apert, 1906]. Incidenciája: 1:100 000-160 000. Vezető tünete a koronavarrat kétoldali elcsontosodása következtében kialakuló brachycephalia és a súlyos syndactylia, amely a kezeken és a lábakon egyaránt megfigyelhető. A koponyadeformitás mellett az arcdysmorphia is jellemző sajátja ennek a kórképnek: előboltosuló, magas homlok, lapos arcközép és

nyakszirt, hypoplasiás maxilla, lefelé tekintő szemrések, hypertelorismus, besüppedt orrgyök és gyakran csak nehezen átjárható kicsiny orr figyelhető meg (3. ábra, A). Kísérő tünet lehet a kemény- és lágyszájpad hasadék. A végtagokon súlyos syndactylia észlelhető, amely bőr vagy csontos eredetű (3. ábra, B).



3. ábra Apert szindrómás beteg. A) Craniofacialis eltérések: brachycephalia, előboltosuló homlok, besüppedt orrgyök, hypertelorismus. B) Súlyos syndactylia a kézen és lábon. (Forrás: Kovács és mtsai, 2008)

Apert szindrómában a három középső ujj mindig összenőtt. Ha a hüvelykujj különáll, ún. „szülészkéz”, ha az összes ujj teljesen vagy részlegesen fúzióál, ún. „kanálkéz” alakul ki. Széles disztális phalanxok, rövid ujjak jellemzik. A betegség autoszomális domináns módon öröklődik, a legtöbb eset új mutációként jelentkezik. A szindróma hátterében az *FGFR2* gén IIIa exonjában bekövetkező heterozigóta mutációk állnak. A betegek 99%-ában a c.755C>G (p.Ser252Trp) vagy a c.758C>G (p.Pro253Arg) mutáció azonosítható [Wilkie és mtsai, 1995]. Az idős apai életkor bizonyítottan növeli a szindróma kialakulásának esélyét [Glaser és mtsai, 2003]. Czeizel és munkatársainak 1980 és 1989 között végzett vizsgálatai szerint az Apert szindróma születéskori incidenciája Magyarországon 9,9/1 000 000 újszülött [Czeizel és mtsai, 1993].

2.4.2. Crouzon szindróma

A szindrómát (1-es típusú craniofacialis dysostosis, OMIM#123500) Crouzon írta le 1912-ben [Crouzon, 1912]. Ez a legenyhébb fenotípussal járó, *FGFR2* génhez köthető kórkép, melynek incidenciája 1,6:100 000. Jellemző tünetei a craniosynostosis mellett megfigyelhető hypertelorismus, exophthalmus, hypoplasiás maxilla és a prognathia (4. ábra, A). Leggyakrabban a koronavarrat kétoldali elcsontosodása (brachycephalia) jellemzi, a későbbiekben azonban pansynostosis is kialakulhat. Végtagdeformitás nincs, ami differenciáldiagnosztikai jelentőséggel bír. Autoszomális domináns kórkép, melynek hátterében az *FGFR2* gén eltérései állnak. A betegség külön formáját képviseli az acanthosis nigricanssal társuló Crouzon szindróma (4. ábra, B), amelyet az *FGFR3* gén c.1172C>A (p.Ala391Glu) mutációja okoz [Meyers és mtsai, 1995].



4. ábra Crouzon szindrómás beteg. A) Craniofacialis eltérések: oxycephalia, exophthalmus, hypertelorismus. B) Acanthosis nigricans a nyakon. (Forrás: Oláh és mtsai, 2015)

2.4.3. Pfeiffer szindróma

A Pfeiffer szindróma (V-ös típusú acrocephalosyndactylia, OMIM#101600) először 1964-ben került leírásra [Pfeiffer, 1964]. A benyomott orrgyök, exophthalmus, hypertelorismus ebben a kórképben is előfordul. Jellemzősége továbbá a széles, kifelé görbülő hüvelyk- és nagylábujj, melyhez bőreredetű teljes vagy részleges syndactylia társulhat. A szindrómának három típusát különböztetjük meg. A szindróma 1-es típusára enyhe fenotípusos jegyek, normális mentális fejlődés jellemző, míg a 2-es és 3-as típusban súlyos koponyadeformitás, nagyfokú proptosis, fejlődésbeli késés és neurológiai tünetek

jelentkeznek. A szindróma klinikai tüneteit az 5. ábra szemlélteti. Külön figyelmet érdemel a szindróma 2-es típusára jellemző, több varratot érintő, súlyos koponyadeformitás, az ún. „Kleeblattschädel” forma (lóhere alakú koponya), melynek korrigálása rendkívül nehéz, így ez a típus jelentős mortalitással jár. A 3-as típus fenotípusban és súlyosságban nagyon hasonlít a 2-es típusra, azonban az előbb említett koponyadeformitás csak a 2-es típusban fordul elő. A Pfeiffer szindróma autoszomális domináns kórkép, melyet az *FGFR1* és az *FGFR2* gének mutációi okoznak. A Pfeiffer szindróma ritka betegség, incidenciája: 1:100 000. Az *FGFR1* gén c.755C>G (p.Pro252Arg) mutációja a Pfeiffer szindróma enyhe fenotípussal járó 1-es típusában mutatható ki [Muenke és mtsai, 1994]. Az *FGFR2* gén eltérései a szindróma mindhárom típusában előfordulhatnak.



5. ábra Pfeiffer szindrómás beteg (2-es típus). Brachycephalia, széles és magas homlok, súlyos exophthalmus, hypertelorismus, széles nagylábujjak (saját beteg).

2.4.4. Muenke szindróma

A szindrómát (OMIM#602849) Muenke és mtsai írták le 1997-ben [Muenke és mtsai, 1997]. A betegség incidenciája 1:30 000. Fő tünete a koronavarrat egy- vagy kétoldali elcsontosodásával járó plagio- vagy brachycephalia, azonban az esetek kb. 20%-ában a craniosynostosis klinikailag nem jelentős, így a kórkép nem mindig kerül felismerésre. Az arc lehet normális, de megjelenhetnek a Saethre-Chotzen szindrómára emlékeztető dysmorfhiás tünetek is. Jellemző kézeltérések a brachydactyly, a röntgenfelvételen látható gyűszűszerű középső ujjperccsontok, a kúp alakú epiphysisek, valamint a kéz- és

lábtőcsontok összenövése (6. ábra). A kórképre jellemző specifikus genetikai eltérés az *FGFR3* gén c.749C>G (p.Pro250Arg) mutációja [Muenke és mtsai, 1997].



6. ábra Kéztőcsontok összenövése és 5. ujj clinodactyly Muenke szindrómában.

2.4.5. Saethre-Chotzen szindróma

A szindrómát (III-as típusú acrocephalosyndactylyia, OMIM#101400) Saethre és Chotzen írták le 1931-ben és 1932-ben [Saethre, 1931; Chotzen, 1932]. A betegség incidenciája: 1:25 000-50 000. A szindróma jellegzetessége a koronavarrat egy vagy kétoldali elcsontosodása (plagio- vagy brachycephalia), arc-aszimmetria, hypertelorismus, ptosis, alacsony hajvonal, kis, deformált fülkagylók, brachydactylyia, a 2-es és 3-as ujjak syndactyliája a kezeken és lábakon, széles egyes ujjak, distálisan dupla nagylábujj (7. ábra). A szindróma hátterében a *TWIST1* gén mutációi állnak [Howard és mtsai, 1997]. A teljes gént, ill. a szomszédos géneket is érintő mikrodeléciós formákban tanulási nehézségek, mentális retardáció előfordulhat [Busche és mtsai, 2011]. A szindróma tünetei átfedést mutatnak a Muenke szindrómával.



7. ábra A Saethre-Chotzen szindróma jellemző tünetei két betegben. A) plagiocephalia, széles és magas homlok, arc-aszimmetria, ptosis, hypertelorismus (Forrás: Johnson és Wilkie, 2011). B) Distálisan dupla nagylábujjak (saját beteg).

3. CÉLKITŰZÉSEK

1. Munkám során célom volt a Debreceni Egyetem Gyermekgyógyászati Intézetében és Idegsebészeti Klinikáján gondozott, a klinikai tünetek és képalkotó eljárások segítségével igazolt szindrómás koponyacsontosodási zavarban szenvedő betegek klinikai és genetikai vizsgálata és a genotípus-fenotípus jellemzők összefüggésének tanulmányozása.
2. A genetikai eltérések kimutatására citogenetikai, molekuláris citogenetikai és molekuláris genetikai módszereket kívántam alkalmazni.
3. Figyelmet fordítottam a craniostenosissal járó eddig le nem írt új mutációk kimutatására és kiegészítő vizsgálatokkal azok patogenitásának alátámasztására.
4. A genetikai eltérés és a pontos fenotípusos jegyek ismeretében vizsgálni kívántam, hogy van-e összefüggés a genetikai eltérés és a fenotípus, a betegség súlyossága, valamint a műtéti beavatkozás sikeressége között.
5. Családi előfordulás esetén a proband vizsgálatát a családtagok geno- és fenotípus vizsgálatával kívántam kiegészíteni, hozzájárulva ezzel a ritkább kórképek jobb megismeréséhez.
6. Tanulmányozni kívántam, mennyiben nyújt segítséget a genetikai eltérés ismerete a betegség súlyosságának meghatározásában, ezáltal prenatális vizsgálat esetén a heterozigóta magzatot hordozó terhességek sorsának eldöntésében.
7. Saját tapasztalatainkat felhasználva egy olyan genetikai algoritmus kidolgozására törekedtem, amely hatékonyan használható a craniosynostosisok mindennapi diagnosztikájában.

8. A szindrómás formák mellett vizsgálni kívántam az izolált formák különböző típusainak gyakoriságát, valamint egyes perinatális faktorok szerepét a betegség kialakulásában.

4. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Betegek

A Debreceni Egyetem Idegsebészeti Klinikáján és Gyermekgyógyászati Intézetében a 2006. január 1 és 2012. december 31 közötti időszakban kétszáz craniosynostosisban szenvedő beteg kivizsgálására került sor. A korai varratzáródás igazolása képalkotó eljárásokkal történt (röntgen vagy CT), a betegek részletes klinikai vizsgálatát gyermekgyógyász és klinikai genetikus szakemberek végezték. A kétszáz beteg többsége tíz év alatti gyermek, illetve csecsemő volt, medián életkoruk hat hónap (1 hónap-10 év). Két beteg a felnőtt korosztályhoz tartozott (18 és 28 év). A fenotípusos jegyek alapján 24 betegben a kórkép szindrómásnak bizonyult, a további 176 esetet izolált formának tartottuk. A hét év alatt a klinikai tünetek alapján az alábbi craniosynostosis szindrómákat diagnosztizáltuk: Apert (n=5), Pfeiffer (n=5), Muenke (n=4), Crouzon (n=2) és Saethre-Chotzen (n=1) szindrómák. Egy betegben a több varratot érintő koponyacsontosodási zavar az achondroplasia klinikai tüneteivel társult. Hat beteg esetén a fenotípusos jegyek nem voltak típusosak egy adott szindrómára. Koponyarekonstrukciós műtétre 195 betegben került sor.

4.2. Módszerek

Az etiológia tisztázása céljából genetikai vizsgálatokat végeztünk azokban a betegekben, ahol a klinikai tünetek egy adott specifikus szindrómára utaltak vagy felvetették a craniosynostosis szindrómás jellegét. A genetikai kivizsgálás, a szindrómától függően, az

FGFR1, 2, 3 és *TWIST1* gének mutációs forrópont régióinak analízisét, a *TWIST1* gén fluoreszcens in situ hibridizációval (FISH) történő vizsgálatát és hagyományos citogenetikai analízist foglalt magába. Meghatározott szindróma gyanúja esetén (18 beteg) célzott genetikai vizsgálat történt, míg a többi esetben (6 beteg) az előbb említett vizsgálatok mindegyikét elvégeztük. Egy esetben arrayCGH vizsgálatra is sor került. Beleegyező nyilatkozat aláírása után 24 betegtől és 8 tüneteket mutató családtagtól (összesen 32 esetben) történt perifériás vérmintavétel. Az új mutáció patogenitásának alátámasztására 50 egészséges kontroll személy DNS mintáját dolgoztuk fel.

4.2.1. DNS izolálás

A mutációs forrópontok vizsgálatához a betegek EDTA-val alvadásgátolt perifériás vérből genomi DNS-t izoláltunk QiaAmp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével, a gyártó által ajánlott protokollt követve.

4.2.2. Az *FGFR1*, 2, 3 és *TWIST1* gének mutáció analízise

A vizsgálat során az *FGFR1* gén 7-es (IIIa), az *FGFR2* gén 8-as és 10-es (IIIa és IIIC), az *FGFR3* gén 7-es (IIIa) és 10-es exonjait és a *TWIST1* gén teljes kódoló régióját (1-es exon) polimeráz láncreakció (PCR) módszerrel amplifikáltuk az irodalomban leírt primerpárok alkalmazásával [Kan és mtsai, 2002; Seto és mtsai, 2007; Baroni és mtsai, 2005; Paznekas és mtsai, 1998]. A PCR reakciók paraméterei a következők voltak: 200 ng DNS, 0,2 mM dNTP (Roche, Basel, Switzerland), 0,2-0,2 μ M forward és reverz primer (IDT, Leuven, Belgium), 2,5 U DreamTaq DNS polimeráz (Fermentas, Ontario, Kanada), 10X PCR puffer (Fermentas, Ontario, Kanada). A PCR kivitelezéséhez Veriti thermal cycler PCR készüléket (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) használtunk. A reakció hőmérsékleti paraméterei a következők voltak: kezdő denaturációs lépés (95 °C, 5 perc), 35 PCR ciklus (95 °C, 30 másodperc; a primerpároknak megfelelő hibridizációs hőmérséklet (1. táblázat), 30 másodperc; 72 °C, 30 másodperc), végső láncszintézis (72 °C, 7 perc). A

PCR termékeket MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) segítségével tisztítottuk meg a szekvenálás előtt. A szekvenáláshoz Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit-et (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) használtunk, a reakciótermékeket ABI 3100-as szekvenálón futtattuk meg (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Az értékelés során a nukleotid szekvenciákat referencia szekvenciákhoz viszonyítottuk (*FGFR1*, NG_007729; *FGFR2*, NG_012449; *FGFR3*, NG_012632; *TWIST1*, NG_008114).

1.táblázat A PCR reakciókhoz használt primerek és hibridizációs hőmérsékleteik

Gén	Exon	Primer szekvenciák	Hibridizációs hőmérséklet (°C)
<i>FGFR1</i>	IIIa	Forward: 5'-TCCCCATGACAAGTGCCTCC-3'	59
		Reverz: 5'-ACCTCTGTTACTAGTCCTGG-3'	
<i>FGFR2</i>	IIIa	Forward: 5'-GGTCTCTCATTCTCCCATCCC-3'	60
		Reverz: 5'-CCAACAGGAAATCAAAGAACC-3'	
	IIIc	Forward: 5'-CCACAATCATTCCTGTGTCG-3'	60
		Reverz: 5'-AAAAGGGGCCATTTCTGATAA-3'	
<i>FGFR3</i>	IIIa	Forward: 5'-CGGCAGTGCGGTGGTGGTGAG-3'	60
		Reverz: 5'-CCAAATCCTCACGCAACCC-3'	
	10	Forward: 5'-AGGAGCTGGTGGAGGCTGA-3'	67
		Reverz: 5'-GGAGATCTTGTGCACGGTGG-3'	
<i>TWIST1</i>	1A	Forward: 5'-GAGGCGCCCCGCTCTTCTCC-3'	62
		Reverz: 5'-AGTCCTCGTAAGACTGCGGAC-3'	
	1B	Forward: 5'-CAAGAAGTCTGCGGGCTGTG-3'	62
		Reverz: 5'-AATCGAGGTGGACTGGGAACCG-3'	

4.2.3. Az új mutáció patogenitásának vizsgálata

A *TWIST1* gén 1-es exonjában kimutatott új mutáció c.528C>G (p.Ser176Arg) patogenitásának megítéléséhez SIFT (<http://sift.jcvi.org>) és Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) predikciós szoftvereket használtunk [Ng és Henikoff, 2001; Adzhubei és mtsai, 2010]. E szoftverek alkalmazásával egy adott

aminosavcsere fehérjeszerkezetre és funkcióra gyakorolt lehetséges hatását lehet megítélni homológ szekvenciák összehasonlító vizsgálata valamint a szerkezeti jellemzők alapján. A fehérje filogenetikai (alignment) analízist Clustal Omega szoftver (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) segítségével végeztük [Sievers és mtsai, 2011]. Az új mutáció előfordulását restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (RFLP) módszerrel BspMI restrikciós enzim (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) felhasználásával vizsgáltuk 50 egészséges kontroll DNS mintában. A mutáns allél esetén az enzim az 512 bp-os PCR terméket egy 295 bp-os és egy 217 bp-os fragmentre hasítja.

4.2.4. Citogenetikai vizsgálat

A betegek konstitucionális kariotípusának meghatározására hagyományos citogenetikai analízist végeztünk, melyhez 3-5 ml Na-heparinnal alvadásgátolt vért használtunk. A tenyésztőedénybe 5 ml tenyésztőoldatot (Lymphochrome Medium, Lonza, Belgium) és 0,5 ml alvadásgátolt vért mértünk, majd a mintát 72 órán át 37 °C-on, CO₂ (5%) termosztátban tenyésztettük. Az osztódás metafázisban történő leállításához colchicint (0,5 µg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) adtunk a tenyészethez, majd 1 óra inkubáció után hipotonizálás és fixálás következett. A hipotonizálás 0,075 M KCl oldattal, a fixálás metanol és ecetsav 3:1 arányú keverékével történt. A kromoszómák sávozásához Giemsa festéket (Merck, Darmstadt, Germany) használtunk tripszines (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) előkezelés után.

A metafázisok értékeléséhez Lucia Karyo szoftvert (Lucia Cytogenetics, Csehország) alkalmaztunk. Minden beteg esetén 10 kariogram alapján történt a kariotípus megadása az International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) 2005-ös vagy 2009-es nevezéktanának megfelelően (Shaffer, 2005 és 2009).

4.2.5. A TWIST1 gén FISH vizsgálata

FISH vizsgálat során fluoreszcens molekulával jelölt, leggyakrabban centromer- vagy régióspecifikus DNS próbá(ka)t hibridizálunk inter- és metafázisú sejtmagokhoz. A szignálok számát és helyzetét vizsgálva következtetünk az adott régió kópiaszámbeli változására és szerkezeti átrendeződésére. A TWIST1 gén deléciójának vizsgálatára alkalmazott próbamix két különböző színnel jelölt próbát tartalmaz: a TWIST1 génre specifikus próba piros színű, míg a belső kontrollként szolgáló 7q11 régióra specifikus próba zöld színű.

A FISH vizsgálatához a kromoszóma vizsgálat során nyert sejtszuspenziót használtuk. Hideg, vizes tárgylemezre történő kicseppentés után a lemezeket 37 °C-on érleltük minimum egy órát, vagy szobahőmérsékleten egy éjszakán át. Érlelés után a lemezeket 37 °C-os 2xSSC/0,5% NP40 (Nonidet P-40 Substitute, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oldatba helyeztük 15 percre. Ezt pepszines (Pepsin lyophilized powder, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) emésztés követte 37 °C-on 5 percig, majd szobahőmérsékletű 1x PBS oldatba tettük át a lemezeket 5 percre. Alkoholos dehidráció (70%-85%-100% etanol 2-2 perc) és száradás után 1,5 ul próbát (Williams-Beuren/Saethre-Chotzen próba, Cytocell, Cambridge, UK) mértünk a lemezre, melyet 10 mm-es kör alakú fedőlemezzel fedtünk le. A minta és a próba kodenaturációja 76 °C-on 3 percig zajlott, a hibridizáció pedig 37 °C-on történt egy éjszakán át hibridizációs készülékben (Hybrite, Abbott/Vysis, Des Plaines, IL, USA). A nem kötődött próba lemosása 50% formamid/2XSSC oldatban történt 42 °C-on 15 percig. A lemezeket ezután 2XSSC oldatban 10 percig, majd 2XSSC/0,1% NP-40 oldatban 5 percig mostuk szobahőn. A sejtmagokat 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Abbott/Vysis, Des Plaines, IL, USA) oldattal festettük. A sejteket Zeiss Axioplan2 mikroszkóppal (Carl Zeiss, Jena, Germany) ISIS szoftver (Metasystems, Altlußheim, Germany) alkalmazásával értékeltük. Minden beteg esetén legalább 15 metafázis

értékelésére került sor. Normál esetben két, a 7p21-es régióra specifikus piros szignál és két, a 7q11-es régióra specifikus zöld szignál látható az interfázisú vagy metafázisú sejtmagokban. A 7p21-es régióban bekövetkező deléciót egy piros és két zöld szignál jelezné.

4.2.6. ArrayCGH analízis

Az achondroplasia és a több varratot érintő craniosynostosis társulását mutató betegünkben a kópiaszámbeli változások kimutatására arrayCGH vizsgálatra került sor Hollandiában (Department of Clinical Genetics, Academic Medical Centrum, Amsterdam) Agilent 180K oligo-array, Amadid 023363 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) felhasználásával. A jelölési és hibridzációs lépések során a standard metodikát, az arrayCGH profilok elemzéséhez az Agilent szoftvert használták.

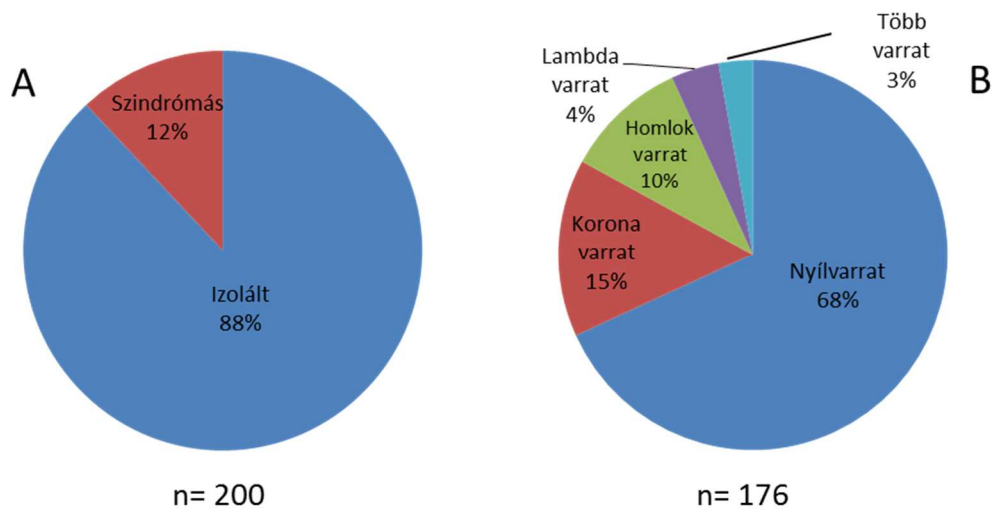
4.2.7. Statisztikai analízis

A nem-szindrómás betegek esetén megvizsgáltuk, hogy bizonyos perinatális tényezők, mint a magzat neme, születési súlya, a terhességi hét a szüléskor, valamint az ikerterhesség kockázatot jelentenek-e a craniosynostosis kialakulására, ill. azon belül valamely varrat érintettségére. Az analízist 142 beteg esetén végeztük el, a betegek adatait a Központi Statisztikai Hivatal populációs adataihoz (2005-2010-es átlag adatok) viszonyítottuk [Vukovich, 2011]. A statisztikai analízis során Chi négyzet és Fisher exact tesztekkel használtunk IBM SPSS 20 program alkalmazásával (IBM Corporation, Armonk, New York, USA). Az eltéréseket $P < 0,05$ szignifikancia szint esetén tekintettük szignifikánsnak.

5. EREDMÉNYEK

A 2006. január 1 és 2012. december 31 közötti időszakban kétszáz craniosynostosisban szenvedő beteg kivizsgálására került sor. A részletes fizikális és képalkotó eljárásokkal

történő vizsgálat során a kórkép 176 betegben (88%) izoláltnak, míg 24 betegben (12%) szindrómásnak bizonyult. A koponyacsontosodási zavar a fiúknál gyakrabban fordult elő, a fiú:lány arány 2,1:1 volt. Az izolált csoportban leggyakrabban a nyílvarrat korai záródása volt megfigyelhető (120/176; 68%), amelyet gyakoriságban a koronavarrat (26/176; 15%), a homlokvarrat (18/176; 10%) és a lambdavarrat korai záródása (7/176; 4%) követett (8. ábra). Öt betegben (3%) egynél több varrat érintettsége volt megfigyelhető.



8. ábra A craniosynostosis különböző típusainak megoszlása a 2006 és 2012 között diagnosztizált betegekben. A) Izolált és szindrómás betegek megoszlása. B) Az egyes varratok érintettsége az izolált csoportban.

5.1. A klinikai vizsgálat eredményei szindrómás betegekben

Az egyes szindrómákban észlelt jellemző fenotípusos jegyeket a 2. táblázatban mutatom be.

A vizsgált öt *Apert szindrómás* beteg klinikai tünetei a következők voltak: kétoldali koronavarrat záródás miatt kialakuló brachycephalia, széles és magas homlok, arcközép hypoplasia, benyomott orrgyök, papagájcsőrszerű görbült orr, hypertelorismus, syndactylia a kezeken és lábakon. Négy betegben a lábujjak teljes összenövése, a kezeken pedig a 2/3/4/5 ujjak syndactyliája volt megfigyelhető (1-4. betegek). Egy betegben az ujjak

összenövése teljes volt mind a kezeken, mind a lábakon (5. beteg). Szájpadhasadék egy esetben volt megfigyelhető (1. beteg).

A két vizsgált *Crouzon szindrómás* beteget oxycephalia, proptosis, lapos orrnyereg, előugró mandibula és alacsonyan ülő fülek jellemezték (6. és 7. beteg). Az egyik betegben a jellemző klinikai tünetekhez acanthosis nigricans társult (7. beteg).

Három *Pfeiffer szindrómás* beteg esetében súlyos koponya deformitást, ún. lóhere alakú koponyát láttunk. Ehhez hydrocephalus, extrém proptosis, alacsonyan ülő fülek és kicsi, rövid orr társult (8-10. betegek). Mindegyikük nagylábujja kiszélesedett, de széles hüvelykujjakat csak két betegben észleltünk (9. és 10. beteg). A 9. betegben kifelé görbülő nagylábujjak és a lábakon részleges 2/3 syndactylia volt megfigyelhető. A 8. és 10. betegben a könyök korlátozott extenzióját észleltük. Az ismertetett három beteg klinikai tünetei a Pfeiffer szindróma 2-es típusára jellemzőek. További két betegben az enyhe craniofaciális eltérések a szindróma 1-es típusára utaltak. A 11. betegre brachycephalia, széles magas homlok, exophthalmus, széles hüvelyk- és nagylábujjak, a 3/4 kézujjak és a 2/3/4 lábujjak összenövése volt jellemző. A 12. beteg és családjának esetét később részletesen ismertetem.

A vizsgált négy *Muenke szindrómás* betegben acro- és brachycephalia, magas és lapos homlok, hypertelorismus és mandulavágású szemek voltak megfigyelhetők. Gótikus szájpad két betegre volt jellemző (13. és 14. beteg). A változatos végtageltérések a széles hüvelyk- és nagylábujjak (14. és 16. beteg), az 5. ujj clinodactyliája (13. beteg), a kéztő csontok fúziója (15. beteg) voltak. A 13. 15. és 16. beteg esetén az édesanyáknál a gyermekeikhez hasonló tüneteket láttuk. A 14. beteg szüleinek klinikai vizsgálata nem volt megoldható.

A *Saethre-Chotzen szindróma* klinikai tünetei egy esetben voltak megfigyelhetőek (17. beteg): acro- és brachycephalia, lapos és aszimmetrikus arc, hosszú ferde orr, vékony

ajkak, jobb oldali ptosis, széles, disztálisan dupla nagylábujjak. A beteg édesanyja a gyermekéhez hasonló tüneteket hordozta: brachycephalia, hosszú orr, vékony ajkak, disztálisan dupla nagylábujjak. Gyermekétől eltérően az édesanyjánál széles hüvelykujjak voltak megfigyelhetők.

A 18. betegben a több varratot érintő koponyacsontosodási zavar az achondroplasia jellegzetes klinikai tüneteivel társult. Az esetet később részletesen ismertetem.

Hat beteg esetében a craniosynostosishez társuló tünetek a kórkép szindrómás formáját vetették fel, azonban a fenotípus alapján konkrét szindróma nem volt megállapítható.

5.2. Genetikai eltérések szindrómás betegekben

A szindrómás formák között leggyakrabban az Apert és Pfeiffer szindrómák fordultak elő. A szindrómás csoportban elvégzett genetikai vizsgálatok során a betegek 75%-ában (18/24) patogén mutáció igazolódott, melyeket a 2. táblázatban foglaltam össze a jellemző klinikai tünetekkel együtt. Genetikai vizsgálat elvégzésére 8, tüneteket mutató családtag esetében is sor került, náluk a probandra jellemző mutáció igazolódott. A mutációk mindegyike heterozigóta formában jelentkezett.

Az öt *Apert* szindrómás beteg közül négyben a c.758C>G (p.Pro253Arg), egy betegben a c.755C>G (p.Ser252Trp) mutációt azonosítottuk az *FGFR2* génben. Mindkét mutáció a szindrómára jellemző, specifikus eltérés.

Négy *Pfeiffer* szindrómás betegben az *FGFR2* gén volt érintve: három esetben a 342. aminosav cseréjével járó mutációkat azonosítottuk (c.1024T>C, p.Cys342Arg és c.1025G>C, p.Cys342Ser), míg egy betegben egy splicing mutációra (c.940-1G>A) derült fény. Az *FGFR1* gén ritka c.755C>G p.Pro252Arg mutációja egy enyhe tüneteket mutató 1-es típusú *Pfeiffer* szindrómás betegben volt kimutatható. A mutáció további négy családtagban is azonosítható volt. A családvizsgálatot később részletesen ismertetem.

A *Crouzon* szindrómás betegek egyikében az *FGFR2* gén c.833G>T (p.Cys278Phe) mutációja, a másik betegben, akinél a szindrómához *acanthosis nigricans* is társult, az *FGFR3* gén c.1172C>A (p.Ala391Glu) mutációja igazolódott.

A *Muenke* szindróma specifikus eltérését, az *FGFR3* gén c.749C>G (p.Pro250Arg) mutációját négy betegben azonosítottuk. Három beteg a mutációt édesanyjától örökölte.

Az achondroplasia és a több varratot érintő craniosynostosis társulását mutató betegben az achondroplasiára jellemző c.1138G>A (p.Gly380Arg) mutáció igazolódott. A beteg kivizsgálását a későbbiekben részletesen ismertetem.

A vizsgált betegekben azonosított tíz különböző *FGFR1*, 2 és 3 génekben előforduló mutáció mellett egy eddig le nem írt eltérést, a c.528C>G (p.Ser176Arg) mutációt mutattunk ki a *TWIST1* génben egy Saethre-Chotzen szindrómás betegben (17. beteg).

2. táblázat A szindrómás craniosynostosisos betegek klinikai és genetikai jellemzői

Beteg	Szindróma	Gén	Nukleotid csere	Hatás	Érintett családtagok száma	Koponyaforma	Dysmorphiás tünetek	Végtageltérések a kezeken	Végtageltérések a lábakon	Egyéb
1.	Apert	FGFR2	c.755C>G	p.Ser252Trp		brachycephalia	széles magas homlok, arcközép hypoplasia, benyomott orrgyök, papagájcsőrszerű görbült orr, hypertelorismus	2/3/4/5 ujjak összenövése	lábujjak teljes összenövése	szájpadhasadék
2.	Apert	FGFR2	c.758C>G	p.Pro253Arg		brachycephalia	széles magas homlok, arcközép hypoplasia, benyomott orrgyök, papagájcsőrszerű görbült orr, hypertelorismus	2/3/4/5 ujjak összenövése	lábujjak teljes összenövése	
3.	Apert	FGFR2	c.758C>G	p.Pro253Arg		brachycephalia	széles magas homlok, arcközép hypoplasia, benyomott orrgyök, papagájcsőrszerű görbült orr, hypertelorismus	2/3/4/5 ujjak összenövése	lábujjak teljes összenövése	
4.	Apert	FGFR2	c.758C>G	p.Pro253Arg		brachycephalia	széles magas homlok, arcközép hypoplasia, benyomott orrgyök, papagájcsőrszerű görbült orr, hypertelorismus	2/3/4/5 ujjak összenövése	lábujjak teljes összenövése	
5.	Apert	FGFR2	c.758C>G	p.Pro253Arg		brachycephalia	széles magas homlok, arcközép hypoplasia, benyomott orrgyök, papagájcsőrszerű görbült orr, hypertelorismus	kézujjak teljes összenövése	lábujjak teljes összenövése	
6.	Crouzon	FGFR2	c.833G>T	p.Cys278Phe		oxycephalia	proptosis, lapos ornyereg, előugró mandibula és alacsonyan ülő fülek			
7.	Crouzon	FGFR3	c.1172C>A	p.Ala391Glu		oxycephalia	proptosis, lapos ornyereg, előugró mandibula és alacsonyan ülő fülek			acanthosis nigricans
8.	Pfeiffer	FGFR2	c.1024T>C	p.Cys342Arg		lóhere forma	hydrocephalus, extrém proptosis, alacsonyan ülő fülek és kicsi, rövid orr		széles nagylábujjak	hydrocephalus, könnyök korlátozott extenziója

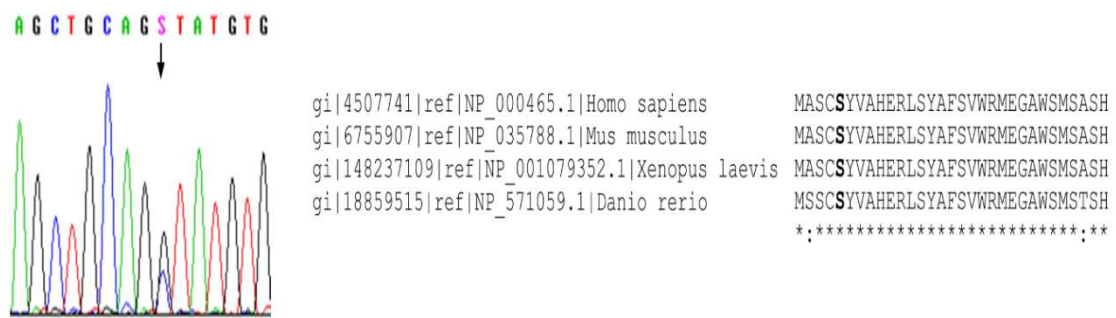
2. táblázat folytatása

Beteg	Szindróma	Gén	Nukleotid csere	Hatás	Érintett családtagok száma	Koponyaforma	Dysmorphiás tünetek	Végtageltérések a kezeken	Végtageltérések a lábakon	Egyéb
9.	Pfeiffer	FGFR2	c.1024T>C	p.Cys342Arg		lóhere forma	hydrocephalus, extrém proptosis, alacsonyan ülő fülek és kicsi, rövid orr	széles hüvelykujjak	széles, kifelé görbülő nagylábujj, 2/3 ujjak részleges összenövése	hydrocephalus
10.	Pfeiffer	FGFR2	c.1025G>C	p.Cys342Ser		lóhere forma	extrém proptosis, alacsonyan ülő fülek, és kicsi, rövid orr	széles hüvelykujjak	széles nagylábujj	hydrocephalus, könyök korlátozott extenziója
11.	Pfeiffer	FGFR2	c.940-1G>A	splicing defektus		brachycephalia	széles magas homlok, exophthalmus	széles hüvelykujjak, 3/4 ujjak összenövése	széles nagylábujj, 2/3/4 lábujjak összenövése	
12.	Pfeiffer	FGFR1	c.755C>G	p.Pro252Arg	4	acro- és brachycephalia	magas homlok, széles és benyomott orrgyök, hypertelorismus, hosszú philtrum, vékony ajkak, horizontális árok az alsó ajak alatt, alacsonyan ülő fülek	széles hüvelykujjak	széles kifelé görbülő nagylábujjak, jobb 3/4 ujjak teljes összenövése, bal 2/3/4 ujjak részleges összenövése	corpus callosum dysgenesis
13.	Muenke	FGFR3	c.749C>G	p.Pro250Arg	1	acro- és brachycephalia	magas és lapos homlok, hypertelorismus és mandulavágású szemek	5. ujj clinodactyliája		gótikus száypad
14.	Muenke	FGFR3	c.749C>G	p.Pro250Arg		acro- és brachycephalia	magas és lapos homlok, hypertelorismus és mandulavágású szemek	széles hüvelykujjak	széles nagylábujjak	gótikus száypad
15.	Muenke	FGFR3	c.749C>G	p.Pro250Arg	1	acro- és brachycephalia	magas és lapos homlok, hypertelorismus és mandulavágású szemek	kéztő csontok fúziója		
16.	Muenke	FGFR3	c.749C>G	p.Pro250Arg	1	acro- és brachycephalia	magas és lapos homlok, hypertelorismus és mandulavágású szemek	széles hüvelykujjak	széles nagylábujjak	
17.	Saethre-Chotzen	TWIST1	c.528C>G	p.Ser176Arg	1	acro- és brachycephalia	lapos és aszimmetrikus arc, hosszú ferde orr, vékony ajkak, jobb oldali ptosis		széles, disztálisan dupla nagylábujjak	
18.	Achondroplasia	FGFR3	c.1138G>A	p.Gly380Arg		macrocephalia, acrocephalia és hátsó bal oldali plagiocephalia	arcközép hypoplasia, benyomott orrgyök	rövid karok, szigonykéz	rövid lábak	hydrocephalus, foramen magnum stenosis, genu valgum, scoliosis, strabismus

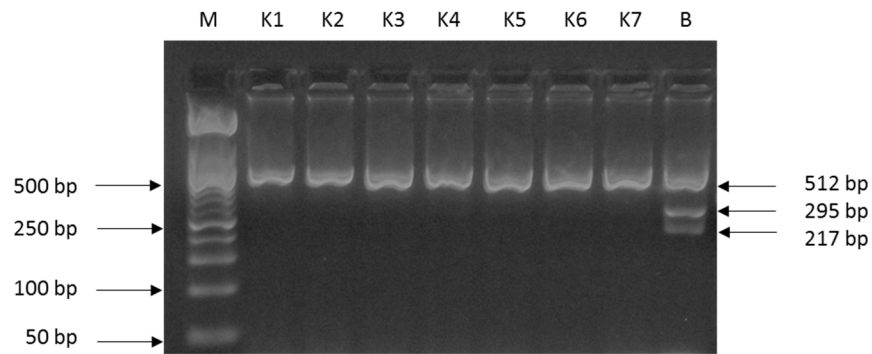
Azokban a betegekben, akiknél a klinikai tünetek nem utaltak egy adott szindrómára, genetikai eltérést nem tudtunk kimutatni az *FGFR1*, 2, 3 és *TWIST1* génekben, FISH vizsgálattal nem volt igazolható a *TWIST1* gén deléciója vagy átrendeződése, és a hagyományos citogenetikai vizsgálat sem mutatott eltérést.

5.3. Az új mutáció (p.Ser176Arg) patogenitását alátámasztó vizsgálati eredmények

1. A humán, egér, *Danio rerio* (zebradánió) valamint *Xenopus laevis* (dél-afrikai karmosbéka) *TWIST* fehérjéinek összehasonlító vizsgálata alapján, a humán *TWIST1* fehérje 176-os pozíciójában található szerin filogenetikailag konzervált aminosavnak tekinthető (9. ábra).
2. A p.Ser176Arg aminosavcserét a SIFT predikció „káros” (damaging), a Polyphen-2 szoftver „valószínűleg káros” (probably damaging) eltérésnek azonosította.
3. Az RFLP analízis során a mutáció nem volt kimutatható 50 egészséges kontroll DNS (100 allél) mintában (10. ábra).
4. A mutáció a hasonló tüneteket mutató anyában is azonosítható volt.



9. ábra A *TWIST1* gén c.528C>G (p.Ser176Arg) mutációját tartalmazó nukleotid szekvencia egy részlete, valamint a *TWIST1* fehérje érintett részének összehasonlító analízise. A nyíl a mutáció helyét jelöli, az érintett szerin vastaggal van kiemelve. A filogenetikai analízis alapján a mutációs hely konzervatívnak tekinthető.

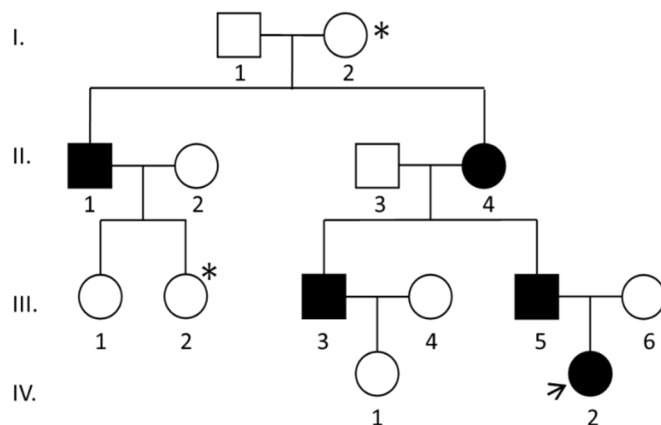


10. ábra Az RFLP analízis eredményét bemutató gélelektroforézis kép. A *TWIST1* gén c.528C>G mutációja esetén a BspMI restrikciós enzim egy 295 és egy 217 bp nagyságú termékekre hasítja a PCR terméket. Heterozigóta formában a teljes méretű 512 bp-os fragment is azonosítható (B minta). A normál kontroll mintákban (K1-7) hasítási fragmentek nem azonosíthatók, ami a mutáció hiányára utal. M: molekula méret marker (DNA Molecular Weight Marker XIII, 50 bp ladder, Roche)

5.4. Esetismertetések

5.4.1. Változó expresszivitás Pfeiffer szindrómában szenvedő probandban és családtagjaiban

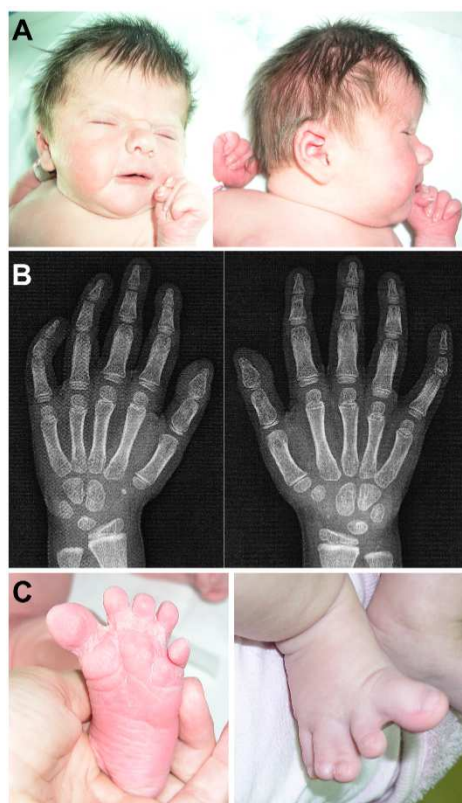
A probandot és a családtagokat a 11. ábra mutatja.



11. ábra A Pfeiffer szindrómás beteg családfája. A nyíl a probandot jelöli, a csillagok azokat a családtagokat jelzik, akiknél valószínűsíthető a szindróma, de esetükben klinikai genetikai kivizsgálásra nem került sor.

A proband (2. táblázat, 12. beteg és 11. ábra, IV/2.) az anyja második terhességéből, második élő leánygyermekként, terminusra spontán született, 3200 g (50 percentil) súllyal, 48 cm (10-25 percentil) hosszal és 32 cm (10-25 percentil) fejkörfogattal. Az apa 33, az

édesanya 26 éves volt a fogamzás idején. Az édesanya első egészséges gyermeke előző párkapcsolatából született. A terhességi anamnézisben izom szakadás miatti gipsz felhelyezés, fraxiparin kezelés, majd endocarditis talaján kialakuló aorta insuficiencia miatti szív műtét szerepel. A koponyadeformitás és az arcdysmorphismás tünetek miatt az újszülöttet a Zala Megyei Kórház Genetikai Tanácsadó-jába utalták. A klinikai genetikus a vizsgálat során az alábbi tüneteket észlelte: acro- és brachycephalia, magas homlok, széles és benyomott orrgyök, hypertelorismus, hosszú philtrum, vékony ajkak, horizontális árok az alsó ajak alatt, alacsonyan ülő fülek (12. ábra, A). A végtagokat érintő eltérések a következők voltak: széles hüvelykujjak, széles kifelé görbülő nagylábujjak, a jobb lábon a 3/4 ujjak teljes syndactyliája, a bal lábon a 2/3/4 ujjak részleges összenövése (12. ábra, B és C). A koponya röntgen és ultrahang vizsgálata során a koronavarrat kétoldali synostosisa, valamint corpus callosum dysgenesis igazolódott. A proband 4 hónapos korában a koponya és az agy megfelelő növekedésének biztosítására koponyarekonstrukciós műtéten esett át a Debreceni Egyetem OEC Idegsebészeti Klinikáján. A fenotípusos tünetek alapján a probandnál a Saethre-Chotzen szindróma gyanúja merült fel, azonban molekuláris genetikai vizsgálatokkal a *TWIST1* és *FGFR3* gének érintettsége nem igazolódott, így e szindróma nagy valószínűséggel kizárható volt. A proband 4 éves korában újabb, részletes, a családtagokra is kiterjedő klinikai genetikai kivizsgálásra került sor. A beteg súlya ekkor 16 kg (50 percentil), magassága 105 cm (75 percentil) és fejkörfogata 47 cm (3-10 percentil) volt. Szomatikus és mentális fejlődése normális volt, a koponyaforma enyhén brachycephal jelleget mutatott, amely további műtéti korrekciót nem igényelt. A kezekről készült röntgenfelvételen a kisujjak clinodactyliája volt megfigyelhető (12. ábra, B).



12. ábra Craniofacialis és végtag eltérések a 12. számú Pfeiffer szindrómás betegben. A) A fej elől- és oldalnézetben: brachycephalia, magas homlok, benyomott orrgyök, hosszú philtrum, alacsonyan ülő fülek és széles hüvelykujj. B) A kéz röntgen felvétele 4 éves korban: kisujjak clinodactyliája. C) A lábujjak eltérései: kifelé görbülő nagylábujjak, jobb lábon a 3/4 lábujjak, bal lábon a 2/3/4 lábujjak összenövése látható.

Családvizsgálat során az apa (11. ábra, III/5.), az apai nagybácsi (11. ábra, III/3.), az apai nagymama (11. ábra, II/4.) és férfi testvére (11. ábra, II/1.) vizsgálatára került sor.

Az *édesapa* (11. ábra, III/5. és 13. ábra, A-D) 37 éves volt a vizsgálat idején, fenotípusos jegyei az alábbiak voltak: aszimmetrikus koponya és arc (plagiocephalia), a bal oldali felső szemhéj enyhe ptosis, hosszú orr, széles orrcsúcs, hosszú philtrum, lefelé álló szájzugok. A kezeken a 2. ujjak enyhe clinodactyliája volt megfigyelhető. A széles nagylábujjakon a körmök háromszög alakúak, a többi lábujjon kör formájúak voltak. Ujjösszenövés sem a kezeken, sem a lábakon nem volt észlelhető

Az *édesapa* 34 éves testvérénél (11. ábra, III/3. és 13. ábra, E-H) a következő enyhe dysmorphicus jelek voltak megfigyelhetők: enyhe acrocephalia, hosszú philtrum, hosszú

fülek. A kezeken eltérés nem volt látható. A lábfej és a nagylábujjak kiszélesedtek, mindkét lábon a 2/3 ujjak részleges összenövése volt látható. A nagybácsinak egy egészséges leánygyermek van.

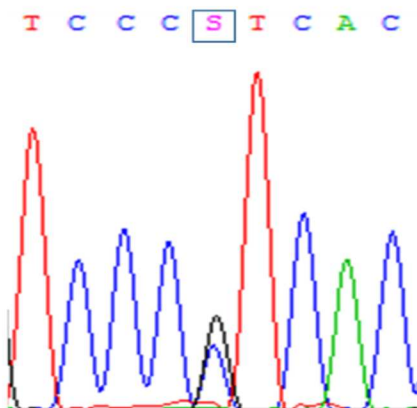
A proband 58 éves *apai nagymamájára* (11. ábra, II/4. és 13. ábra, I-L) enyhe brachycephalia, laterálisan kiszélesedő (legyezőszerű) szemöldök, a bal oldali felső szemhéjak enyhe ptosis, konvergens strabismus, kiugró orr duzzadt orrcsúccsal, prognath mandibula és hosszú fülek voltak jellemzőek. A 2. ujjak clinodactyliája nála kifejezettebb volt, mint a proband édesapjánál. A széles nagylábujjakon a körmök háromszög alakúak voltak, a metatarsusok rövidebbnek tűntek. Syndactylia nem volt észlelhető. Elmondása szerint édesanyjának (11. ábra, I/2) lábujj összenövései voltak.

A *nagymama 60 éves férfi testvérénél* (11. ábra, II/1. és 13. ábra, M-P) a következő tüneteket észleltük: laterálisan gyér, "mephisto"-szerű szemöldök, mély nasolabiális redő, magas orrnyereg, előugró áll, hosszú fül, nagy fülcimpa. A kezeken a 2. és 5. ujjak clinodactyliája és a disztális phalanxok kiszélesedése volt megfigyelhető. A lábakon látható eltérések: széles lábfej és nagylábujjak, rövid metatarsusok, rövid nem szabályosan elhelyezkedő lábujjak, a bal láb 2/3 ujjainak részleges összenövése. Két lánya közül az idősebbiknek mindkét lábán syndactylia észlelhető, azonban nála genetikai kivizsgálásra nem került sor. A családtagok esetében képalkotó vizsgálatok nem történtek, mivel az enyhe tünetek háttérében egyikük esetében sem merült fel koponyacsontosodási zavar. A részletes családvizsgálat a Pfeiffer szindróma gyanúját vetette fel. A tünetek azonos, de változó súlyosságú megjelenése a kórkép változó expresszivitását igazolja.

A molekuláris genetikai vizsgálat az *FGFR1* gén p.Pro252Arg mutációját azonosította a probandban és a négy vizsgált családtagban (14. ábra).



13. ábra Craniofacialis és végtag eltérések a 12-es Pfeiffer szindrómás beteg családtagjaiban. A-D) Apa: plagiocephalia, arc-aszimmetria, enyhe dysmorphiás jegyek, a mutatóujjak clinodactyliája és széles nagylábujjak. E-H) Apai nagybácsi: enyhe acrocephalia, a 2/3 lábujjak részleges összenövése. I-L) Apai nagymama: enyhe brachycephalia és dysmorphiás jegyek, mutatóujjak clinodactyliája, széles nagylábujjak. M-P) Apai nagymama testvére: enyhe brachycephalia és dysmorphiás jegyek, a mutatóujjak és a kisujjak clinodactyliája, széles nagylábujjak és 3/4 lábujjak részleges összenövése a bal lábon.



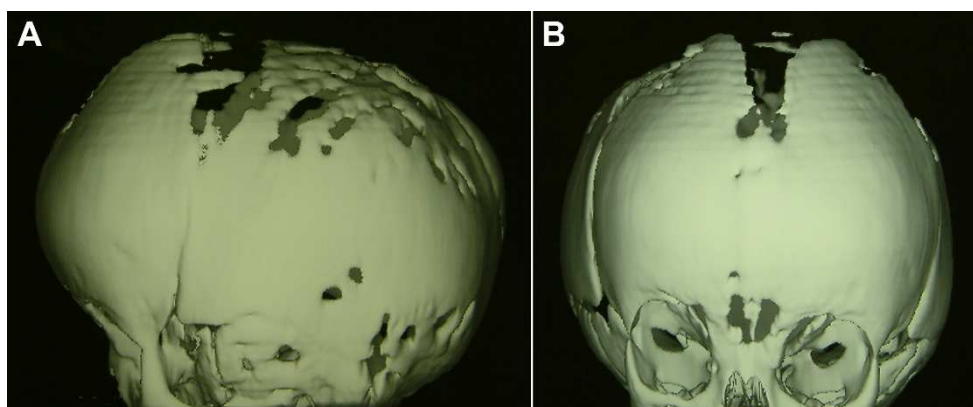
14. ábra Az *FGFR1* gén c.755C>G (p.Pro252Arg) mutációját szemléltető elektroferogram részlet.

5.4.2. Achondroplasia társulása több varratot érintő craniosynostosisal

A proband (2. táblázat, 18. beteg) az anya második terhességéből, második élő leánygyermekként, császármetszéssel született a terhesség 33. hetében. A terhesség korai befejezését az ultrahang vizsgálattal normálisnál rövidebbnek észlelt csöves csontok indokolták. Az apa 31, az anya 36 éves volt a fogamzás idején. Az újszülött születéskori paraméterei a következők voltak: 1630g (10-25 percentil) súly, 36 cm (-3 SD) hossz és 33 cm (97 percentil) fejkörfogat. A fizikális vizsgálat során az achondroplasia jellemző klinikai tünetei voltak megfigyelhetők: macrocephalia, arcközép hypoplasia, benyomott orrgyök, rövid karok és lábak (15. ábra, A és C). A röntgen vizsgálat a felkarcsont és a combcsont megrövidülését, valamint a kórképre jellemző un. "szigony kéz" konfigurációt igazolta (15. ábra, D-F). A fenti tünetek mellett, az achondroplasiára egyébként nem jellemző koponyadeformitás, acrocephalia és hátsó bal oldali plagiocephalia volt megfigyelhető (15. ábra, A és B). A két hónapos korban elvégzett 3D-CT vizsgálat több varratot érintő craniosynostosiszt igazolt, mely a homlokvarrat, a lambdavarrat és a pikkelyvarrat teljes összenövését, valamint a koronavarrat kétoldali részleges összenövését jelentette (16. ábra). A koponyaforma műtéti korrigálására több alkalommal, a proband 3, 8, 16 és 26 hónapos, valamint 4 és 5 éves életkorában került sor. Öt hónapos korban hydrocephalus miatt VP shunt-öt ültettek be, majd két évesen foramen magnum stenosis miatt occipitális craniotomiát végeztek. Három éves korban a proband súlya 8000 g (-3,5 SD), hossza 69 cm (-6.5 SD), és fejkörfogata 46 cm (3 percentil) volt. A súlyos növekedési elmaradás mellett genu valgum, scoliosis és strabismus volt megfigyelhető, a gyermek mentális fejlődése korának megfelelő volt.

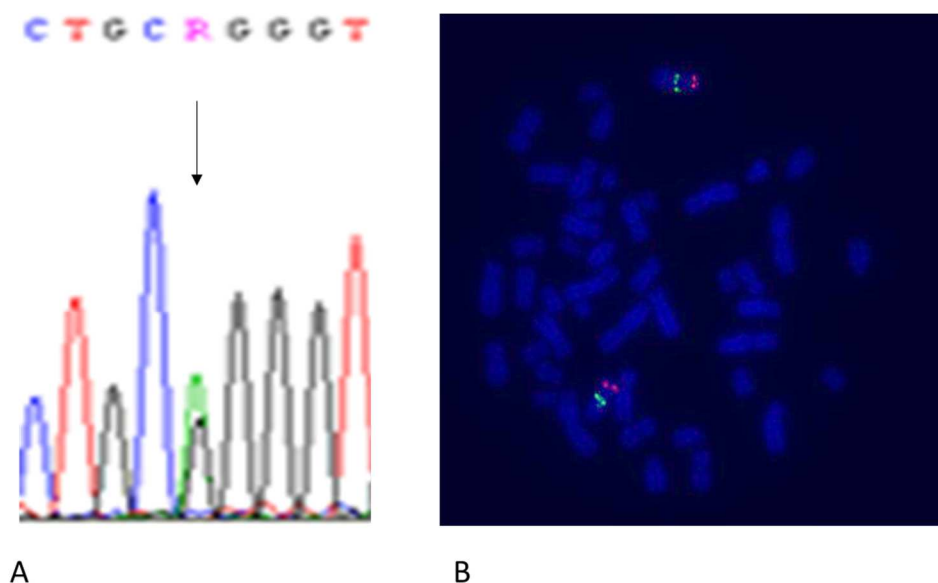


15. ábra Achondroplasia és több varratot érintő craniosynostosis társulása (18. beteg). A) A beteg 3 hónapos korában: macrocephalia, arcközép hypoplasia, benyomott orrgyök, acrocephalia. B) Baloldali hátsó plagiocephalia. C) A beteg 3 éves korában: rhizomeliás törpenövekedés, rövid végtagok, normális méretű törzs, szűk mellkas, elődomborodó has. D) A jobb kar röntgen felvétele: rövid, széles felkarcsont, a metaphysisek kiszélesedésével. E) A bal kézfej röntgen felvétele: brachydactylia, klasszikus szigony kéz konfiguráció. F) A lábak röntgen felvétele: rövid és széles csöves csontok a metaphysisek kiszélesedésével.



16. ábra A koponya 3D-CT rekonstrukciós képe. A) A bal lambda- és pikkelyvarrat teljes és a koronavarrat részleges záródása. B) A homlokvarrat teljes záródása

Az achondroplasia és a több varratot érintő craniosynostosis társulását mutató betegben az achondroplasiára jellemző c.1138G>A (p.Gly380Arg) mutáció igazolódott (17. ábra, A). Mivel a craniosynostosis nem jellemző tünete az achondroplasiának, ezért további vizsgálatokat végeztünk annak kiderítésére, hogy a koponyacsontosodási zavar hátterében állhat-e egy másik genetikai eltérés. Az *FGFR1*, 2, 3 és *TWIST1* gének mutációanalízise, a kromoszóma vizsgálat, a *TWIST1* gén FISH analízise, valamint az arrayCGH vizsgálat során azonban további genetikai eltérést nem tudtunk azonosítani. A *TWIST1* gén FISH analízisének eredményét a 17. B. ábra szemlélteti.



17. ábra Az achondroplasia és a több varratot érintő craniosynostosis társulását mutató beteg szekvenálási (A) és FISH (B) eredménye. Az elektroferogrammon az *FGFR3* gén c.1138G>A mutációja látható. A FISH kép a *TWIST1* gén jelenlétét igazolja a 7-es kromoszóma p21 régiójában (piros színnel jelölt a *TWIST1* génre specifikus próba, a zöld szín a 7q11 régiót jelöli).

5.5. Perinatális tényezők szerepe a nem-szindrómás csoportban

A nem-szindrómás betegek (n=142) perinatális adatainak elemzése azt mutatta, hogy ebben a betegcsoportban az átlagpopulációhoz képest szignifikánsan gyakoribb a férfi nem ($P < 0,001$), az ikerterhességből való születés ($P < 0,001$) és a nagyon alacsony (<1500g) születési súly ($P < 0,001$) (3. táblázat). A kockázati tényezőket az egyes varratokra lebontva vizsgálva megállapítottuk, hogy a férfi nem ($P < 0,001$) és az ikerterhesség ($P=0,001$) a nyílvarrat korai fúziójára jelent kockázatot, míg az alacsony születési súly ($P < 0,001$) a koronavarat idő előtti elcsontosodásának kockázati tényezője (3. táblázat). A homlokvarrat érintettsége nem mutatott szignifikáns összefüggést egyik faktoral sem. Mivel a lambdavarat záródása csak kevés (n=7) betegben volt megfigyelhető, ezért statisztikai analízist ezekben az esetekben nem végeztünk.

3. táblázat Egyes perinatális faktorok szerepe nem-szindrómás craniosynostosisban

	Összes nem-szindrómás beteg (n= 142)					Nyílvarrat (n=100)			Homlokvarrat (n=18)			Koronavarrat (n=17)		
Tényezők	Esetszám	Populációs kontroll	Odds ratio	95%-os CI	P	Odds ratio	95%-os CI	P	Odds ratio	95%-os CI	P	Odds ratio	95%-os CI	P
Nem														
Fiú	99 (69.7%)	51.3%	2.18	1.53-3.12	<0.001	3.36	2.09-5.39	<0.001	2.47	0.88-6.92	0.078	0.13	0.03-0.55	0.005
Lány	43 (30.3%)	48.7%												
Magzatok száma														
Kettő (ikerterhesség)	14 (9.9%)	3.5%	3.01	1.73-5.23	<0.001	3.06	1.59-5.88	0.001	3.44	0.79-14.98	0.266	0.79	0.05-13.09	0.899
Egy	128 (90.1%)	96.5%												
Terhességi hét														
<37 hét	18 (12.7%)	8.7%	1.52	0.93-2.50	0.125	1.16	0.61-2.24	0.078	2.10	0.61-7.24	0.436	2.25	0.65-7.82	0.381
37-41 hét	124 (87.3%)	91.3%												
Születési súly														
Nagyon alacsony	8 (5.6%)	1.4%	4.12	2.01-8.45	<0.001	2.79	1.02-7.61	0.094	4.94	0.64-37.99	0.537	13.67	3.89-48.02	<0.001
Alacsony (1500-2499 g)	9 (6.3%)	6.9%	0.93	0.47-1.84	0.978	0.70	0.29-1.73	0.566	1.99	0.45-8.89	0.676	0.44	0.06-7.44	0.600
Normál (2500-3999 g)	115 (81.0%)	83.0%												
Macrosomia ($\geq$ 4000 g)	10 (7.1%)	8.7%	0.83	0.43-1.58	0.677	0.67	0.29-1.54	0.445	2.38	0.67-8.45	0.343	0.73	0.09-5.61	0.764

6. MEGBESZÉLÉS

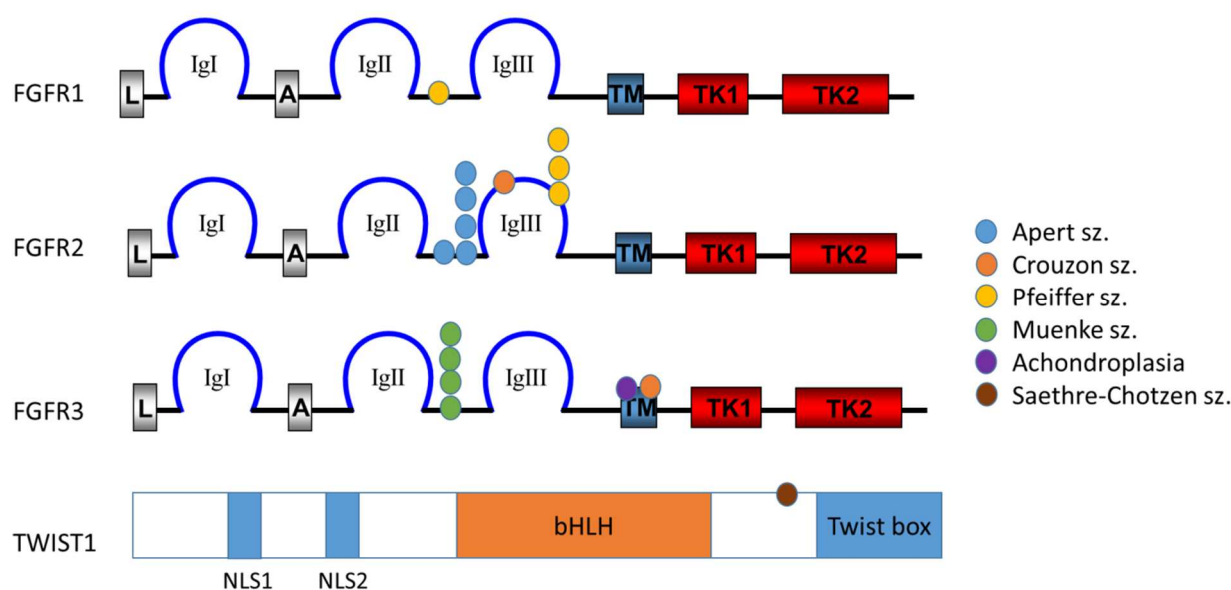
A koponyacsontosodási zavarok klinikailag és genetikailag heterogén betegségcsoportot képviselnek. A craniosynostosisok diagnosztikája, az egyes formák elkülönítése, a pontos szindróma megállapítása a klinikai tünetek és a genetikai eltérés azonosítása alapján lehetséges. Megnehezíti a felismerést, hogy a szindrómás formák incidenciája alacsony, a klinikai tünetek az egyes szindrómák között jelentős átfedést mutatnak és számolnunk kell a változó expresszivitással vagy a csökkent penetranciával is (l. 2. táblázat 12. beteg és családja). A szindróma pontos azonosítása - a klinikai és genetikai eltérések alapján - nagyon fontos, mivel így a társuló tünetek időben felismerhetők, és a mutáció ismeretében a prognosis esetenként előre jelezhető. A genetikai diagnózis további jelentősége, hogy a mutáció ismeretében az érintett családtagok számára újabb terhesség esetén lehetőség nyílik prenatális vizsgálatra, ezáltal ismételten beteg gyermek születésének megelőzésére. A magyarországi craniosynostosisos betegek klinikai és genetikai sajátosságairól ismereteink hiányosak. Ennek egyik oka az lehet, hogy a hazai betegek adott központban történő centralizált ellátása korábban nem volt megoldott hazánkban. A kórkép genetikai vizsgálata is az utóbbi időben került az érdeklődés középpontjába. Munkám célja a Debreceni Egyetem Idegsebészeti Klinikáján és Gyermekgyógyászati Intézetében 2006 és 2012 között diagnosztizált koponyacsontosodási zavarban szenvedő gyermekek klinikai és genetikai jellemzőinek tanulmányozása, az egyes formák gyakoriságára, a klinikai tünetek, a fenotípus és a genotípus összefüggésére, a prognózisra vonatkozó tapasztalataink összegzése volt, segítve ezáltal az adekvát genetikai tanácsadást, és a prenatális diagnózis lehetőségének megteremtését.

A betegség hazai incidenciájáról – a fent említett okok miatt – nincsenek pontos adataink. Az általunk vizsgált 200 beteg a koponyacsontosodási rendellenességben szenvedők első olyan hazai populációját képviseli, amelynek klinikai és genetikai adatai értékelhető információt

szolgáltathatnak számunkra. A vizsgált hazai populációban, a nemzetközi adatokhoz hasonlóan, a koponyacsontosodási zavarokon belül az izolált formák domináltak, a szindrómás betegek a betegcsoport mindössze 12%-át tették ki.

6.1. Genetikai eltérések szindrómás craniosynostosisban

A szindrómás betegek genetikai vizsgálatai során 75%-ban tudtunk patogén mutációt kimutatni, azokban az esetekben, ahol a fenotípus egy meghatározott szindrómára utalt. Leggyakrabban az Apert és Pfeiffer szindrómákat láttuk, ezeket gyakoriságban a Muenke, Crouzon és Saethre-Chotzen szindrómák követték (18.ábra).



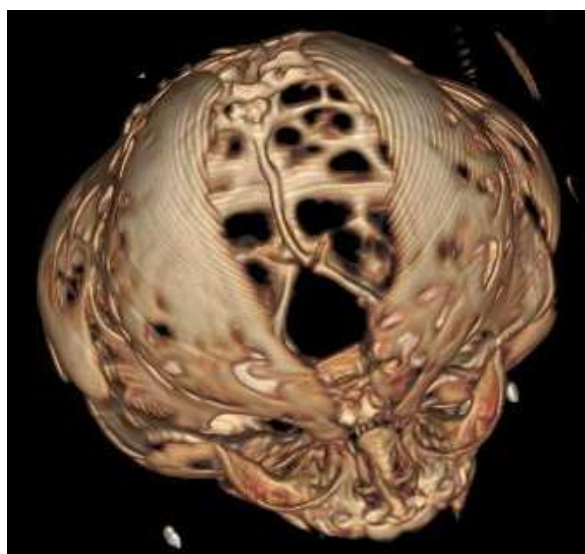
18. ábra A szindrómás betegekben azonosított aminosav cserével járó mutációk előfordulása és lokalizációja az FGFR1, 2, 3 és TWIST1 fehérjékben. A színes pöttyök egy-egy beteget jelölnek. Jól látható, hogy a mutációk többsége az FGFR2-ben fordul elő változatos pozíciókban. Ezzel szemben az *FGFR1* és 3 génekben a mutációs helyek specifikusak. L: leader szekvencia; A: acid box; IgI, II, III: immunoglobulin-szerű domének; TM: transzmembrán domén; TK1, 2: tirozin kináz domén; NLS 1, 2: nukleáris lokalizációs szignál; bHLH: bázikus hélix-hurok-hélix domén.

6.1.1. Genotípus-fenotípus összefüggések

Az *Apert szindróma* az egyik legsúlyosabb tünetekkel jellemezhető craniosynostosis szindróma. A jellegzetes fenotípus miatt a kórkép klinikailag jól felismerhető, és ugyanez igaz a genetikai háttérre is, hiszen a betegek kb. 99%-ában az *FGFR2* két specifikus mutációjának (p.Ser252Trp, p.Pro253Arg) egyike felelős a tünetek kialakulásáért (l. 18. ábra). Ritka esetben az *FGFR2* génben bekövetkező Alu-szekvenciák beépülése áll a szindróma hátterében [Oldridge és mtsai, 1999]. Betegeinkben a szindrómára specifikus eltéréseket azonosítottuk. A p.Ser252Trp mutáció csak egy betegben volt kimutatható, holott irodalmi adatok szerint a két mutáció közül ez a gyakoribb, az *Apert* szindrómás betegek kb. kétharmadában fordul elő [Oldridge és mtsai, 1999; Park és mtsai, 1995]. A két mutáció összefüggést mutat a fenotípussal: p.Ser252Trp mutációhoz gyakrabban társul szájpadhasadék, míg ap.Pro253Arg mutáció esetén súlyosabb a syndactylia [Slaney és mtsai, 1996]. Vizsgálataink az első összefüggést támasztják alá: az egyetlen beteg akinek szájpadhasadéka volt a p.Ser252Trp mutációval rendelkezett.

A *Pfeiffer szindróma* klinikailag és genetikailag is heterogén. A fenotípus spektrum két végén a nagyon enyhe, szinte észrevehetetlen koponyadeformitás és a súlyos lóhere alakú koponyaforma áll. Bizonyos mutációk súlyos tünetekkel járnak (pl. *FGFR2* p.Tyr340Cys vagy p.Cys342Arg), míg mások enyhe fenotípust eredményeznek (*FGFR1* p.Pro252Arg). Leírtak olyan eseteket is, amikor egy adott mutáció esetében a craniosynostosis ténylegesen nem is volt igazolható [Jay és mtsai, 2013; Ettinger és mtsai, 2013]. Az *FGFR2* fehérje 342., cisztein aminosavának más aminosavra történő kicserélődése a cserében szereplő aminosavtól függően eltérő fenotípusbeli következménnyel járhat. Fenilalaninra vagy tirozinra történő kicserélődése elsősorban Crouzon szindróma kialakulásához vezet, míg a cisztein-arginin csere a Pfeiffer szindróma súlyos koponyadeformitással és rossz prognózissal járó 2-es vagy 3-as típusát eredményezi [Lajeunie és mtsai, 2006]. Mindkét p.Cys342Arg mutációval

rendelkező betegünkben lóhere alakú koponyaforma volt látható, amely csak több műtéti beavatkozással volt korrigálható (19. ábra). Emellett mindkét betegben súlyos exophthalmus, hydrocephalus, légzési és hallásproblémák jellemezték a kórképet. Egy további betegben a cisztein szerinre való cseréje hasonló tüneteket okozott. A Pfeiffer szindróma enyhe 1-es típusa két betegben volt megfigyelhető. Az egyik esetben az *FGFR2* génben bekövetkező splicing mutációt (c.940-1G>A), míg a másik esetben az *FGFR1* gén p.Pro252Arg mutációját azonosítottuk. A IIIc exon splicing mutációi, a teljes exon kiesése valamint az exonban bekövetkező Alu inzerciók ún. *exon skipping* révén a IIIb alternatív *FGFR2* variáns kialakulását eredményezik, amelynek ligandspecifitása eltér a IIIc formától [Oldridge és mtsai, 1999; Bochukova és mtsai, 2009]. A ligandspecifitás megváltozása funkciónyerésként értelmezhető.



19. ábra Súlyos koponyadeformitás a p.Cys342Arg mutációt hordozó betegben (3D-CT felvétel)

Az *FGFR1* gén érintettségét Muenke és mtsai írták le elsőként Pfeiffer szindrómában 1994-ben [Muenke és mtsai, 1994]. A gén egyetlen craniosynostosisban előforduló eltérése a p.Pro252Arg mutáció, amely az *FGFR1* receptor extracelluláris IgII és IgIII doménje közötti összekötő régióban található. Ez a ritka mutáció, amely az 1-es típusú Pfeiffer szindrómás

betegek kb. 5%-ában fordul elő, enyhe tünetekkel jár, két esetben a craniosynostosis hiányáról is beszámoltak [Rossi és mtsai, 2003; Hackett és Rowe, 2006]. Az itt bemutatott *FGFR1* p.Pro252Arg mutációt hordozó családban csak a probandnál voltak megfigyelhetők a Pfeiffer szindróma jellegzetes tünetei, míg a négy családtagban a tünetek nagyon enyhe és változatos formában jelentkeztek, így esetükben a kórkép korábban nem is került felismerésre. Az *FGFR1* p.Pro252Arg mutáció esetén tehát számolnunk kell a változó expresszivitással, amely az enyhe tünetek miatt különösen megnehezíti a klinikai diagnózist. A család példája arra figyelmeztet, hogy a klasszikus fenotípusos jegyek csak több generáció után jelennek meg, és egy enyhe tüneteket mutató egyed utódjában a betegség súlyosabb formában jelentkezhet. Nagy jelentőséggel bír tehát a részletes, minden apró eltérésre, különösen a végtagokra kiterjedő fizikális vizsgálat nemcsak a probandban, hanem a család többi tagjában is.

A *Crouzon szindróma* hátterében elsősorban az *FGFR2* gén mutációi állnak. Ritka asszociációnak tekinthető a Crouzon szindróma acanthosis nigricanssal való társulása, amelyet ma már külön entitásnak, un. *Crouzonodermoskeletalis szindrómának* tekintenek nemcsak a fenotípusbeli, hanem a genetikai különbség miatt is, hiszen erre a kórképre az *FGFR3* gén c.1172C>A (p.Ala391Glu) mutációja tekinthető specifikus eltérésnek [Cohen, 1999]. Ellentétben a gyakori *FGFR1* és 2 mutációkkal, amelyek a receptor extracelluláris ligandkötő részén helyezkednek el, ez a specifikus mutáció a receptor transzmembrán régiójában található és a receptor dimerek stabilizálása révén váltja ki a szignalizációs folyamat felerősödését [Mudumbi és mtsai, 2013]. A két Crouzon szindrómás betegünk egyikében a szindróma egyik gyakori mutációját azonosítottuk (*FGFR2* gén c.833G>T, p.Cys278Phe), míg a másik betegben a kórkép acanthosis nigricanssal társult és a fentebb említett specifikus eltérés volt kimutatható (l. 18.ábra). Ebben a szindrómában tehát figyelnünk kell a koponyadeformitás és az arcdysmophiás tünetek mellett a bőrtünetekre is, ugyanakkor végtageltéréssel nem kell számolnunk.

A *Muenke szindrómára* a koronavarrat kizárólagos synostosisa, nagyon enyhe arcdysmophiás tünetek, esetenként csak röntgen felvételen látható végtageltérések, valamint az erre a kórképre specifikus *FGFR3* p.Pro250Arg mutáció jelenléte a jellemző. Ezt a szindrómát négy betegben azonosítottuk, három esetben a betegek az édesanyjától örökölték a mutációt. A nagyon enyhe, szinte észrevehetetlen társuló tünetek miatt az újabb nemzetközi ajánlások a mutációanalízis elvégzését ajánlják minden izolált, koronavarratot érintő craniosynostosis esetén.

A *Saethre-Chotzen* szindróma tüneteit mutató felnőtt férfi betegben egy új, még le nem írt mutációt (c.528C>G, p.Ser176Arg) azonosítottunk a *TWIST1* génben. A *TWIST1* molekula egy helix-hurok-helix családba tartozó transzkripció faktor, amely - elsősorban a mesodermális eredetű szövetekben - számos jelátviteli útvonal szabályozásában vesz részt. A mutáció a konzervatív bHLH és Twist box domének között helyezkedik el (l. 18. ábra). Ennek a régióknak nem ismert a specifikus funkciója, azonban a gerinces fajokban nagyfokú homológiát mutat. A mutáció patogenitását támasztja alá a humán *TWIST1* fehérje 176-os pozíciójában található szerin filogenetikai konzerváltsága, a szerin-arginin csere várhatóan káros hatása, a mutáció hiánya az általunk vizsgált egészséges kontroll populációban, valamint a mutáció megléte a tüneteket mutató anyában.

6.1.2. Craniosynostosis és achondroplasia együttes előfordulása

A craniosynostosis és a vázrendszeri dysplasiák etiológiailag és klinikai megjelenésükben is különböző betegségek, a két típusú csontosodási zavar együttes előfordulása azonban bizonyos kórképek, mint például az *FGFR3* gén mutációjával járó thanatophor dysplasia esetén megfigyelhető. Az *FGFR3* gén eltérései elsősorban a chondrodysplasiák kialakulásáért felelősek, azonban két craniosynostosis szindróma (*Muenke* és *acanthosis nigricans*sal társuló *Crouzon* szindróma) esetén is megfigyelhetők, jelezve, hogy az *FGFR3* molekula nemcsak az enchondralis, hanem a desmalis csontosodásban is szerepet játszik. Az *FGFR3* génhez

köthető chondrodysplasiák esetén funkcionyerő mutációk állnak a háttérben, amelyek felerősítik a receptor negatív reguláló hatását a chondrocyták differenciációjára és proliferációjára. Az achondroplasia, mint az egyik leggyakoribb chondrodysplasia, craniosynostosis-sal való társulása rendkívül ritka, a saját esetünket feldolgozó cikk megjelenése előtt összesen három esetet publikáltak. Karadimas és mtsai egy 32 hetes magzat vizsgálatáról számoltak be, akinél az UH vizsgálattal rövidebb csöves csontokat és több varratot érintő craniosynostosis-t sejtető lóhere alakú koponyaformát észleltek [Karadimas és mtsai, 2006]. A prenatális genetikai vizsgálat során az achondroplasiára jellemző p.Gly380Arg mutációt mutatták ki. A terhesség megszakításra került, további genetikai vizsgálatra nem került sor. Hubbard és mtsai az achondroplasia és bal oldali elülső plagiocephalia társulásáról számoltak be [Hubbard és mtsai, 2011]. A két éves korban elvégzett 3D-CT vizsgálat a bal oldali frontosphenoidális varrat, valamint a homlovarrat korai záródását igazolta. Nemrégiben Georgoulis és mtsai az achondroplasia több varratot érintő craniosynostosis-sal való együttes előfordulását írták le [Georgoulis és mtsai, 2011]. Ez az eset nagyon hasonló az általunk vizsgált beteghez, mivel ugyanazon varratok voltak érintve, de ebben az esetben további genetikai vizsgálatra nem került sor. Betegünkben a több varratot érintő craniosynostosis következtében acrocephalia és hátsó, bal oldali plagiocephalia volt megfigyelhető. Az achondroplasia-specifikus mutáció igazolható volt, de az *FGFR1*, 2, 3 és *TWIST1* gének vizsgálata, valamint a citogenetikai, a *TWIST1* FISH és arrayCGH analízis során további genetikai eltérést nem tudtunk kimutatni. A saját és a közölt esetek alapján úgy gondoljuk, hogy a craniosynostosis és az achondroplasia együttes előfordulása a specifikus mutáció következménye és a kórkép változó expresszivitását tükrözi, melynek háttérben módosító gének, környezeti vagy epigenetikai faktorok játszhatnak szerepet. Az elmúlt másfél évben sorozatban megjelenő újabb tanulmányok alátámasztják feltételezéseinket (Di Rocco és mtsai, 2014; Albino és mtsai, 2015; Accogli és mtsai, 2015).

6.2. Perinatális tényezők szerepe izolált craniosynostosisban

Az *izolált csoportban* a leggyakrabban előforduló koponyaforma a nyílvarrat korai záródásának következtében kialakuló scaphocephalia volt, ezt gyakoriságban a koronavarrat (brachycephalia és elülső plagiocephalia), a homlok varrat (trigonocephalia) és a lambda varrat (hátsó plagiocephalia) érintettsége követte. Figyelemreméltó, hogy a nyílvarrat érintettsége az általunk vizsgált betegpopulációban 68%-nak bizonyult, mely meghaladja a nemzetközi irodalomban található kevesebb, mint 50%-os értéket [Wilkie és mtsai, 2010; Boulet és mtsai 2008]. A nemzetközi adatokkal összhangban azt találtuk, hogy a férfi nem és az ikerterhesség kockázatot jelent a nyílvarrat synostosisára [Boulet és mtsai, 2008; Lee és mtsai, 2012]. Számos tanulmány bizonyította az anyai dohányzás szerepét a craniosynostosis kialakulásában [Carmichael és mtsai, 2008; Hackshaw és mtsai, 2011; Honein és Rasmussen, 2000]. A WHO 2011-es adatai alapján a magyar nők 26%-a dohányzik napi rendszerességgel, ami jelentősen meghaladja más országok becsült adatait (Egyesült Királyság, 14%; Egyesült Államok, 13%; Ausztrália, 15%). Bár a munkánk során nem vizsgáltuk az édesanyák dohányzási szokását, elképzelhetőnek tartjuk, hogy a dohányzásnak, mint kockázati faktornak szerepe lehet a nyílvarrat nagyobb arányú érintettségében.

6.3. Diagnosztikai szempontok és kivizsgálási algoritmus

Bár a klinikai tünetek heterogének és az egyes szindrómák között átfedést mutatnak, a vezető fenotípusos jegyek alapján célzottan indikálható a genetikai vizsgálat elvégzése a szindrómás csoportban. Ehhez azonban a fenotípus pontos leírása szükséges. A koponyadeformitás és az érintett varratok pontos azonosítása után az arcdysmophiás tünetekre kell figyelnünk. Fontosabb dysmophiás tünetek: hyper- és hypotelorismus, exophthalmus, arcközép hypoplasia, fontos a fülek mérete, alakja és helyzete. A klinikai vizsgálat során a koponya és az arcdysmophiás tünetek értékelése mellett nagy figyelmet kell szentelnünk a végtagok tüzetes vizsgálatának, hiszen a jellegzetes ujjeltérések (pl. széles kifelé görbülő első ujjak

Pfeiffer szindrómában, súlyos syndactylia Apert szindrómában) felismerése megkönnyíti a szindróma azonosítását. Az enyhébb tünetekkel járó szindrómás formákban előfordulhat, hogy a koponyadeformitás nem látható (vagy azért, mert annyira enyhe, vagy azért, mert nincs craniosynostosis), de a jellegzetes végtageltérés felkelti a craniosynostosis szindróma gyanúját (Pl. Pfeiffer szindróma 1-es típusa). Ezekben az esetekben a beteg a végtageltérés megoldása céljából rendszerint ortopéd orvoshoz kerül. A végtageltérés műtéti megoldása mellett ezekben az esetekben fontos odafigyelni az enyhe koponya deformitásra és érdemes genetikai vizsgálatra irányítani a beteget. Ez fordítva is igaz, hiszen pl. Muenke szindrómában a végtageltérés gyakran csak röntgenfelvételen látható. Koponyadeformitás esetén tehát keresnünk kell a végtagdeformitást, és a végtagok, elsősorban az ujjak eltérése esetén érdemes megnézni a fej és az arc formáját. A klinikai tünetek helyes értékelése lehetővé teszi a legvalószínűbb genetikai eltérésre irányuló teszt elvégzését, ami növeli a vizsgálat találati arányát és a további felesleges vizsgálatok elkerülése révén időt és költséget takarít meg.

A molekulárisan igazolt enyhe tüneteket mutató betegek esetén mindenképpen szükségesnek tartjuk a szülők genetikai vizsgálatát, még akkor is, ha nem mutatnak tüneteket. Pfeiffer szindrómás családunk jól példázza a tünetek változó súlyosságban és formában való megjelenését, ami kihangsúlyozza a részletes családvizsgálat jelentőségét.

A fenotípust és a genotípust felölelő részletes klinikai genetikai kivizsgálásnak nem csak a betegek osztályozásában, az egyes formák elkülönítésében van fontos szerepe, hanem prognosztikai értékkel is bír, valamint lehetővé teszi a korai sebészeti beavatkozást. Ha például a koronavarrat synostosisa esetén igazolható a Muenke szindrómára jellemző mutáció, akkor rosszabb prognózisra számíthatunk: magasabb lesz a kockázata az ismételt műtéti beavatkozásoknak és a deformitás fennmaradásának; a *TWIST1* mutációval rendelkező betegek esetében nagyobb a kockázata a másodlagosan kialakuló intracraniális nyomásfokozódásnak; a *TWIST1* gén deléciója esetén gyakrabban fordul elő tanulási

nehézség, és mentális retardáció [Thomas és mtsai, 2005; Woods és mtsai, 2009; de Heer és mtsai, 2005]. Tapasztalataink és a nemzetközi ajánlások alapján molekuláris diagnosztikai algoritmust dolgoztunk ki a craniosynostosisok hazai vizsgálatára (4. táblázat).

Ha a fenotípusos tünetek egyértelműen egy adott szindrómára utalnak, akkor a táblázatnak megfelelően célzottan, adott sorrendben érdemes a molekuláris vizsgálatokat elvégezni a diagnosztikai hatékonyság és a gazdaságosság érdekében. Ha a tünetek felvetik a craniosynostosis szindrómás jellegét, de egyértelműen nem tudjuk besorolni a beteget egy adott szindrómába, akkor célszerű citogenetikai vizsgálattal kezdeni, majd tovább léphetünk a forrópontok molekuláris vizsgálata irányába.

4. táblázat A craniosynostosisok genetikai kivizsgálásának ajánlott algoritmus

Szindróma	Első vonalbeli vizsgálat	Második vonalbeli vizsgálat
Apert	FGFR2 p.Ser252Trp, p.Pro253Arg	FGFR2 IIIc exon
Crouzon	FGFR2 IIIa, IIIc exonok	FGFR3 p.Pro250Arg, p.Ala391Glu
Pfeiffer	FGFR2 IIIa, IIIc exonok	FGFR1 p.Pro252Arg FGFR3 p.Pro250Arg
Muenke	FGFR3 p.Pro250Arg	TWIST1, citogenetikai vizsgálat FGFR2 IIIa, IIIc exonok
Saethre-Chotzen	TWIST1 FGFR3 p.Pro250Arg	citogenetikai vizsgálat FGFR2 IIIa, IIIc exonok
Nem azonosítható szindrómás	Citogenetikai vizsgálat FGFR3 p.Pro250Arg	FGFR2 IIIa, IIIc exonok TWIST1 arrayCGH
Izolált forma		
Koronavarrat synostosisa	FGFR3 p.Pro250Arg	TWIST1 citogenetikai vizsgálat FGFR2 IIIa, IIIc exonok
Több varratot érintő synostosis v. familiáris izolált	citogenetikai vizsgálat FGFR3 p.Pro250Arg	FGFR2 IIIa, IIIc exonok TWIST1 arrayCGH

Az *izolált* csoportban diagnosztikai vizsgálatokat csak bizonyos esetekben érdemes végezni, hiszen ez a csoport etiológiáját tekintve nagyon heterogén, többnyire multifaktoriális eredetűnek tekinthető. A koronavarrat kizárólagos érintettsége, több varrat érintettsége, vagy családi halmozódás esetén érdemes fontolóra venni a genetika vizsgálatot (4. táblázat).

Klinikai gyakorlati szempontból fontos, hogy a háttérben álló genetikai eltérés azonosítása előre jelezheti a társuló tünetek megjelenését, a műtéti beavatkozások várható számát, amely egyértelmű összefüggést mutat a craniofaciális eltérések súlyosságával. Ezek figyelembevétele a szükséges ellenőrzések számát és gyakoriságát is befolyásolhatja. Genetikai eltérés esetén nagyobb az esély a felszabadított varratok visszacsontosodására is, valamint további varratok fúziójára, azaz a progresszióra. Apert szindrómában a lóhere alakú koponya korrekciója betegeink esetén 2-3 műtéti beavatkozást igényelt, és a súlyos syndactylia korrekciója is számos sebészeti beavatkozást tett szükségessé. A *Pfeiffer* szindróma súlyos tünetekkel járó 2-es és 3-as típusában a craniofaciális eltérések kezelése mellett az intracraniális nyomásfokozódás (hydrocephalus), az extrém exorbitismus és a légzési nehezítettség jelentették a fő, műtéti beavatkozást is igénylő tüneteket. A *Crouzon* és *Muenke* szindróma, valamint a *Pfeiffer* szindróma 1-es típusa rendszerint enyhe koponyadeformitással jár, így három általunk vizsgált Muenke szindrómás betegben nem is volt szükség rekonstrukciós beavatkozásra.

A genetikai diagnózis további jelentősége, hogy az érintett családokban lehetőség nyílik prenatális vizsgálat elvégzésére, melynek eredménye alapján a házaspár dönthet a terhesség sorsáról.

6.4. Új eredmények és gyakorlati jelentőség

A PhD értekezés új eredményei

1. Elsőként végeztük hazai craniosynostosisos populáció átfogó klinikai és genetikai vizsgálatát. Kihasználva az Idegsebészeti Klinika központi szerepét a craniosynostosisos betegek ellátásában, országos centrumot hoztunk létre a koponyacsontosodási betegek klinikai és genetikai vizsgálatának biztosítására.
2. Megvalósítottuk a szindrómás koponyacsontosodási zavarok többféle metodikán alapuló genetikai kivizsgálását, és diagnosztikai algoritmust dolgoztunk ki a minél eredményesebb és költségkímélő diagnosztikai tesztek alkalmazására.
3. A szindrómás betegek 75%-ában specifikus mutációt azonosítottunk az *FGFR1-3* és *TWIST1* génekben.
4. Új, eddig nem közölt mutációt mutattunk ki a *TWIST1* génben egy Saethre-Chotzen szindrómás betegben; kiegészítő vizsgálatokkal a mutáció patogenitását támasztottuk alá.
5. A genotípus-fenotípus összefüggések tanulmányozása során a következő megállapításokat tettük:
 - Megerősítettük a mutáció típusa és a klinikai tünetek közötti összefüggést Apert, Crouzon és Pfeiffer szindrómában.
 - Az *FGFR1* gén ritka p.Pro252Arg mutációjával járó 1-es típusú Pfeiffer szindrómában szenvedő beteg családjában végzett genotípus-fenotípus elemzés kapcsán megállapítottuk, hogy a fenti mutáció változó expresszivitással jellemezhető;

- Megfigyeltük továbbá, hogy a betegség klasszikus tünetei csak több generáció után jelennek meg, ami felhívja a figyelmet a részletes családvizsgálat szükségességére.
6. Megerősítettük azt a korábbi irodalmi feltételezést, hogy az achondroplasia és a több varratot érintő craniosynostosis ritka társulása az *FGFR3* gén p.Gly380Arg mutációjának következménye, újabb adatot szolgáltatva ahhoz a megfigyeléshez, hogy ez a mutáció nem csak az enchondralis, hanem a desmalis csontosodási folyamatra is hatással van.
 7. A kimutatott mutáció ismeretében végzett prenatális vizsgálattal három egészséges gyermek megszületéséhez járultunk hozzá.
 8. A hazai nem-szindrómás betegek esetén végzett statisztikai elemzések alapján megállapítottuk, hogy a férfi nem, az ikerterhesség és az alacsony születési súly kockázati faktor a betegség kialakulásában.
 9. Az izolált craniosynostosisos betegek klinikai elemzése során a nemzetközi adatokkal szemben szignifikánsan magasabb arányban észleltük a nyílvarrat összezsugorodását, amely a háttérben álló kockázati faktorok tanulmányozásának szükségességére hívja fel a figyelmet.

A munka gyakorlati jelentősége

1. A genotípus-fenotípus összefüggések megállapítása segíti a beteget ellátó neonatológusok, gyermekgyógyászok, klinikai genetikusok és idegsebészek munkáját.
2. A mutáció ismeretében célzottan kereshetjük a társuló tüneteket. Korai felismerésük eredményesebb kezelést és a beteg életminőségének javítását szolgálja.

3. A mutáció tisztázása jelezheti a betegség súlyosságát és ezáltal az idegsebészeti műtét sikerességét, az ismételt műtétek és ellenőrző vizsgálatok szükségességét.
4. A genetikai eltérés ismeretében mód nyílik az érintett családokban prenatális teszt elvégzésére, ezáltal újabb beteg gyermek születésének megelőzésére.
5. A végtagrendellenességgel járó, enyhe koponyadeformitással társuló eseteket ellátó szakemberek figyelmét felhívjuk az arc és a koponya alapos vizsgálatának és a genetikai teszt elvégzésének szükségességére.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A koponyavarratok idő előtti fúziójának következtében kialakuló craniosynostosis klinikailag és etiológiailag heterogén betegségcsoport. A betegek többségére jellemző izolált (nem-szindrómás) forma kialakulásában a környezeti és a genetikai faktorok egyaránt fontos szerepet játszanak, míg a szindrómák esetén gén-, vagy ritkábban, kromoszómaszintű eltérések felelősek a betegség kialakulásáért. Munkám célja: a craniosynostosis szindrómák klinikai tüneteinek és genetikai hátterének vizsgálata, genotípus-fenotípus összefüggések megállapítása, segítve ezzel a betegellátásban szerepet játszó neonatológusok, gyermekgyógyászok, klinikai genetikusok és idegsebészek munkáját. Retrospektív módon vizsgáltuk, hogy a magzat neme, az újszülött születési súlya, a szülés ideje valamint az ikerterhesség kockázatot jelent-e az izolált craniosynostosis kialakulásában.

Különböző vizsgálómódszerek alkalmazásával a szindrómás betegek 75%-ában azonosítottunk genetikai eltérést, öt esetben a mutáció familiárisnak bizonyult. A **tizenegy különböző mutáció** az *FGFR1*, 2, 3 és *TWIST1* génekben fordult elő, kromoszóma szintű eltérést nem mutattunk ki. Egy Saethre-Chotzen szindrómás betegben egy új, eddig nem közölt, patogén mutációt (**p.Ser176Arg**) azonosítottunk a *TWIST1* génben. Az *FGFR1* gén **p.Pro252Arg** mutációjával járó Pfeiffer szindrómás beteg és családjának részletes vizsgálata során a kórkép változó expresszivitását igazoltuk, valamint megállapítottuk, hogy a klasszikus tünetek csak több generáció után jelennek meg. Az achondroplasia és a több varratot érintő craniosynostosis ritka társulásának hátterében az achondroplasia jellemző mutációját (**p.Gly380Arg**) igazoltuk az *FGFR3* génben, más genetikai eltérést, amely a craniosynostosis kialakulását külön indokolná, azonban nem tudtunk kimutatni. Eredményeink megerősítik, hogy ez a mutáció nem csak az enchondralis csontosodásra fejt ki hatását, hanem a desmális csontosodásban is szerepet játszik. Tapasztalatainkat felhasználva diagnosztikai algoritmust dolgoztunk ki a szindrómás betegek genetikai kivizsgálására. Egyes perinatális faktorok

elemzése során azt találtuk, hogy a **férfi nem, az ikerterhesség, valamint az alacsony születési súly** kockázatot jelent az izolált craniosynostosis kialakulására.

A koponyacsontosodási zavarok kialakulásában szerepet játszó genetikai eltérések azonosítása és a genotípus-fenotípus összefüggések megállapítása jelentős diagnosztikai és prognosztikai értékkel bír, valamint lehetőséget teremt célzott prenatális vizsgálat elvégzésére.

SUMMARY

Craniosynostosis, the premature fusion of cranial sutures, is a clinically and etiologically heterogeneous group of disorders. Both environmental and genetic factors play an important role in the development of isolated (non-syndromic) forms found in the majority of patients, while syndromic cases are frequently caused by gene mutations or more rarely chromosomal aberrations. The aim of our work was to study the clinical and genetic characteristics of patients with craniosynostosis syndromes and to assess the genotype-phenotype correlations. In isolated craniosynostoses, the pathogenetic role of infant sex, birth weight, gestational age and plurality was retrospectively studied.

Using various methods, pathogenic mutations were identified in 75% of syndromic patients. In five cases, the mutations proved to be familial. In the *FGFR1*, 2, 3 and *TWIST1* genes, **11 different mutations** were detected. No chromosomal aberrations could be identified. In a patient with Saethre-Chotzen syndrome, a novel pathogenic mutation, **p.Ser176Arg**, in the *TWIST1* gene was found. In a family with Pfeiffer syndrome due to *FGFR1* **p.Pro252Arg** mutation, we observed a variable expressivity with specific signs of the syndrome appearing only in successive generations. In a patient with simultaneous achondroplasia and multiple-suture craniosynostosis, the achondroplasia-specific mutation, **p.Gly380Arg**, was confirmed without any further genetic abnormality suggesting that this mutation has an influence on both endochondral and intramembranous bone formation. Based on our experiments, we developed an algorithm for genetic diagnosis of syndromic craniosynostosis. A relationship between selected perinatal risk factors (**male sex, twin gestation and low birth weight**) and isolated craniosynostosis was found. Clarification of the genetic background of craniosynostosis and establishment of genotype-phenotype correlations are of important diagnostic and prognostic significance offering the possibility for targeted prenatal testing.

8. IRODALOMJEGYZÉK

Accogli A, Pacetti M, Fiaschi P, Pavanello M, Piatelli G, Nuzzi D, Baldi M, Tassano E, Severino MS, Allegri A, Capra V. 2015. Association of achondroplasia with sagittal synostosis and scaphocephaly in two patients, an underestimated condition? *Am J Med Genet A* 167:646-652.

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7:248-249.

Albino FP, Wood BC, Oluigbo CO, Lee AC, Oh AK, Rogers GF. 2015. Achondroplasia and multiple-suture craniosynostosis. *J Craniofac Surg* 26:222-225.

Alderman BW, Lammer EJ, Joshua SC, Cordero JF, Ouimette DR, Wilson MJ, Ferguson SW. 1988. An epidemiologic study of craniosynostosis: Risk indicators for the occurrence of craniosynostosis in Colorado. *Am J Epidemiol* 128: 431-438.

Apert ME. 1906. De l'acrocephalosyndactylie. *Bull Mem Soc Med Hop* 23: 1310-1330.

Baroni T, Carinci P, Lilli C, Bellucci C, Aisa MC, Scapoli L, Volinia S, Carinci F, Pezzetti F, Calvitti M, Farina A, Conte C, Bodo M. 2005. P253R fibroblast growth factor receptor-2 mutation induces RUNX2 transcript variants and calvarial osteoblast differentiation. *J Cell Physiol* 202:524-535.

Bochukova EG, Roscioli T, Hedges DJ, Taylor IB, Johnson D, David DJ, Deininger PL, Wilkie AO. 2009. Rare mutations of FGFR2 causing Apert syndrome: identification of the first partial gene deletion and an Alu element insertion from a new subfamily. *Hum Mut* 30:204-211.

Boulet SL, Rasmussen SA, Honein MA. 2008. A population-based study of craniosynostosis in metropolitan Atlanta, 1989–2003. *Am J Med Genet* 146:984–991.

Boyadjiev SA; International Craniosynostosis Consortium. 2007. Genetic analysis of non-syndromic craniosynostosis. *Orthod Craniofac Res* 10:129-137.

Busche A, Graul-Neumann LM, Zweier C, Rauch A, Klopocki E, Horn D. 2011. Microdeletions of chromosome 7p21, including TWIST1, associated with significant microcephaly, facial dysmorphism, and short stature. *Eur J Med Genet* 54:256-261.

Carmichael SL, Ma C, Rasmussen SA, Honein MA, Lammer EJ, Shaw GM; National Birth Defects Prevention Study. 2008. Craniosynostosis and maternal smoking. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 82:78-85.

Cho E, Yang TH, Shin ES, Byeon JH, Kim GH, Eun BL. 2013. Saethre–Chotzen syndrome with an atypical phenotype: identification of TWIST microdeletion by array CGH. *Childs Nerv Syst* 29:2101-2104.

Chotzen F. 1932. Eine eigenartige familiaere Entwicklungsstoerung (Akrocephalosyndaktylie, Dysostosis craniofacialis und Hypertelorismus). *M Schr Kinderheilk* 55: 97-122.

Cohen MM Jr. 1999. Let's call it "Crouzonodermoskeletal syndrome" so we won't be prisoners of our own conventional terminology. *Am J Med Genet* 84:74.

Cohen MM Jr. 2000. Epidemiology of craniosynostosis. In: *Craniosynostosis*. Cohen MM Jr., MacLean RE. Oxford University Press, New York, 112-118.

Cohen MM Jr. 2005. Perspectives on craniosynostosis. *Am J Med Genet* 136: 313-326.

Crouzon O. 1912. Dysostose cranio-faciale hereditaire. *Bull Mem Soc Med Hop* 33: 545-555.

Czeizel AE, Elek C, Susánszky E. 1993. Birth prevalence study of the Apert syndrome. *Am J Med Genet* 45:392.

deHeer IM, de Klein A, van den Ouweland AM, Vermeij-Keers C, Wouters CH, Vaandrager JM, Hovius SE, Hoogeboom JM. 2005. Clinical and genetic analysis of patients with Saethre-Chotzen syndrome. *Plast Reconstr Surg* 115:1894-1902.

Dell KR, Williams LT. 1992. A novel form of fibroblast growth factor receptor 2: alternative splicing of the third immunoglobulin like domain confers ligand binding specificity. *J Biol Chem* 267: 21225-21229.

Di Rocco F, Biosse Duplan M, Heuzé Y, Kaci N, Komla-Ebri D, Munnich A, Mugniery E, Benoist-Lasselin C, Legeai-Mallet L. 2014. FGFR3 mutation causes abnormal membranous ossification in achondroplasia. *Hum Mol Genet* 2014 23:2914-2925.

Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. 2005. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 139-149.

Ettinger N, Williams M, Philips JA. 2013. Variable expressivity and clinical heterogeneity can complicate the diagnosis and management of Pfeiffer syndrome. *J Craniofac Surg* 24:1829-1832.

Fanganiello RD, Sertié AL, Reis EM, Yeh E, Oliveira NA, Bueno DF, Kerkis I, Alonso N, Cavaleiro S, Matsushita H, Freitas R, Verjovski-Almeida S, Passos-Bueno MR. 2007. Apert p.Ser252Trp mutation in FGFR2 alters osteogenic potential and gene expression of cranial periosteal cells. *Mol Med* 13:422-442.

Gajecka M, Yu W, Ballif BC, Glotzbach CD, Bailey KA, Shaw CA, Kashork CD, Heilstedt HA, Ansel DA, Theisen A, Rice R, Rice DP, Shaffer LG. 2005. Delineation of mechanisms and regions of dosage imbalance in complex rearrangements of 1p36 leads to a putative gene for regulation of cranial suture closure. *Eur J Hum Genet* 13: 139–149.

Georgoulis G, Alexiou G, Prodromou N. 2011. Achondroplasia with synostosis of multiple sutures. *Am J Med Genet A* 155:1969-1971.

Gill SK, Broussard C, Devino O, Green RF, Rasmussen SA, Reefhuis; National Birth Defects Prevention Study. 2012. Association between maternal age and birth defects of unknown etiology: United States, 1997-2007. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 94: 1010-1018.

Glaser RL, Broman KW, Schulman RL, Eskenazi B, Wyrobek AJ, Jabs EW. 2003. The paternal-age effect in Apert syndrome is due, in part, to the increased frequency of mutations in sperm. *Am J Hum Genet* 73: 939-47.

Hackett A, Rowe L. 2006. FGFR1 Pfeiffer syndrome without craniosynostosis: an additional case report. *Clin Dysmorphol* 15:207-210.

Hackshaw A, Rodeck C, Boniface S. 2011. Maternal smoking in pregnancy and birth defects: a systematic review based on 173 687 malformed cases and 11.7 million controls. *Hum Reprod Update* 17: 589-604.

Honein MA and Rasmussen SA. 2000. Further evidence for an association between maternal smoking and craniosynostosis. *Teratology* 62:145-146.

Howard TD, Paznekas WA, Green ED, Chiang LC, Ma N, Ortiz De Luna RI, Delgado CG, Gonzales-Ramos M, Kline AD, Jabs EW. 1997. Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nature Genet* 15:36-41.

Hubbard BA, Gorski JL, Muzaffar AR. 2011. Unilateral frontosphenoidal craniosynostosis with achondroplasia: a case report. *Cleft Palate Craniofac J* 48:631-635.

Ibrahimi OA, Zhang F, Eliseenkova AV, Linhardt RJ, Mohammadi M. 2004. Proline to arginine mutations in FGF receptors 1 and 3 result in Pfeiffer and Muenke craniosynostosis syndromes through enhancement of FGF binding affinity. *Hum Mol Genet* 13: 69-78.

Jabs EW, Muller U, Li X, Ma L, Luo W, Haworth IS, Klisak I, Sparkes R, Warman ML, Mulliken JB. 1993. A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell* 75: 443-450.

Jay S, Wiberg A, Swan M, Lester T, Williams LJ, Taylor IB, Johnson D, Wilkie AOM. 2013. The fibroblast growth factor receptor 2 p.Ala172Phe Mutation in Pfeiffer syndrome- History repeating itself. *Am J Med Genet* 161:1158-1163.

Jehee FS, Krepischi-Santos AC, Rocha KM, Cavalcanti DP, Kim CA, Bertola DR, Alonso LG, D'Angelo CS, Mazzeu JF, Froyen G, Lugtenberg D, Vianna-Morgante AM, Rosenberg C, Passos-Bueno MR. 2008. High frequency of submicroscopic chromosomal imbalances in patients with syndromic craniosynostosis detected by a combined approach of microsatellite segregation analysis, multiplex ligation-dependent probe amplification and array-based comparative genome hybridisation. *J Med Genet* 45: 447-450.

Johnson D, Horsley SW, Moloney DM, Oldridge M, Twigg SR, Walsh S, Barrow M, Njølstad PR, Kunz J, Ashworth GJ, Wall SA, Kearney L, Wilkie AO. 1998. A comprehensive screen for TWIST mutations in patients with craniosynostosis identifies a new microdeletion syndrome of chromosome band 7p21.1. *Am J Hum Genet* 63: 1282–1293.

Johnson D, Wilkie AOM. 2011. Craniosynostosis. *Eur J Hum Genet* 19:369-376.

Källen B, Robert-Gnansia E. 2005. Maternal drug use, fertility problems, and infant craniostenosis. *Cleft Palate Craniofac J* 42: 589-593.

Kan SH, Elanko N, Johnson D, Cornejo-Roldan L, Cook J, Reich EW, Tomkins S, Verloes A, Twigg SR, Rannan-Eliya S, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Wall SA, Muenke M, Wilkie AO. 2002. Genomic screening of fibroblast growth-factor receptor 2 reveals a wide spectrum of mutations in patients with syndromic craniosynostosis. *Am J Hum Genet* 70:472-486.

Karadimas C, Trouvas D, Haritatos G, Makatsoris C, Dedoulis E, Velissariou V, Antoniadis T, Hatzaki A, Petersen MB. 2006. Prenatal diagnosis of achondroplasia presenting with multiple-suture synostosis: a novel association. *Prenat Diagn* 26:258-261.

Kariminejad A, Kariminejad R, Tzschach A, Ullmann R, Ahmed A, Asghari-Roodsari A, Salehpour S, Afroozan F, Ropers HH, Kariminejad MH. 2009. Craniosynostosis in a patient with 2q37.3 deletion 5q34 duplication: association of extra copy of MSX2 with craniosynostosis. *Am J Med Genet* 149:1544-1549.

Kartesz J, Kress W, Szasz M, Czako M, Melegh B, Kosztolanyi Gy, Morava E. 2004. Partial craniosynostosis in a patient with deletion 22q11. *Genet Couns* 15:481-483.

Kimonis V, Gold JA, Hoffman TL, Panchal J, Boyadjiev SA. 2007. Genetics of craniosynostosis. *Semin Pediatr Neurol* 14: 150–161.

Kovács M, Alexy M, Kováts-Szabó E, Anghelyi A, Vaszari Zs, Halmen M, Bessenyei B, Bognár L. 2008. Apert-szindróma háttérében igazolt FGFR2 gén mutáció. Gyermekgyógyászat 2:104-108.

Lajeunie E, Le Merrer M, Bonaiti-Pellie C, Marchac D, Renier D. 1995. Genetic study of nonsyndromic coronal craniosynostosis. Am J Med Genet 55: 500-504.

Lajeunie E, Le Merrer M, Bonaïti-Pellie C, Marchac D, Renier D. 1996. Genetic study of scaphocephaly. Am J Med Genet 62:282-285.

Lajeunie E, Crimmins DW, Arnaud E, Renier D. 2005. Genetic considerations in nonsyndromic midline craniosynostoses: a study of twins and their families. J Neurosurg 103:353-356.

Lajeunie E, Heuertz S, El Ghouzzi V, Martinovic J, Renier D, Le Merrer M, Bonaventure J. 2006. Mutation screening in patients with syndromic craniosynostoses indicates that a limited number of recurrent FGFR2 mutations accounts for severe forms of Pfeiffer syndrome. Eur J Hum Genet 14:289-298.

LaVallee TM, Prudovsky IA, McMahon GA, Hu X, Maciag T. 1998. Activation of the MAP kinase pathway by FGF-1 correlates with cell proliferation induction while activation of the Src pathway correlates with migration. J Cell Biol 141:1647-1658.

Lee HQ, Hutson JM, Wray AC, Lo PA, Chong DK, Holmes AD, Greensmith AL. 2012. Changing epidemiology of nonsyndromic craniosynostosis and revisiting the risk factors. *J Craniofac Surg* 23:1245-1251.

Lonic A, Powell JA, Kong Y, Thomas D, Holien JK, Truong N, Parker MW, Guthridge MA. 2013. Phosphorylation of Serine 779 in fibroblast growth factor receptor 1 and 2 by Protein Kinase C (epsilon) regulates Ras/mitogen-activated protein kinase signaling and neuronal differentiation. *J Biol Chem* 288: 14874-14885.

Mansukhani A, Bellosta P, Sahni M, Basilico C. 2000. Signaling by fibroblast growth factors (FGF) and fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-activating mutations blocks mineralization and induces apoptosis in osteoblasts. *J Cell Biol* 149:1297-1308.

Marie PJ. 2012. Fibroblast growth factor signaling controlling bone formation: an update. *Gene* 498:1-4.

McDonald-McGinn DM, Gripp KW, Kirschner RE, Maisenbacher MK, Hustead V, Schauer GM, Keppler-Noreuil KM, Cipraro KL, Pasquariello P Jr, LaRossa D, Bartlett SP, Whitaker LA, Zackai EH. 2005. Craniosynostosis: another feature of the 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet* 136:358–362.

Meyers GA, Orlow SJ, Munro IR, Przylepa KA, Jabs EW. 1995. Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) transmembrane mutation in Crouzon syndrome with acanthosis nigricans. *Nature Genet* 11: 462-464.

Miraoui H, Marie PJ. 2010. Pivotal role of Twist in skeletal biology and pathology. *Gene* 468: 1-7.

Mudumbi KC, Julius A, Herrmann J, Li E. 2013. The pathogenic A391E mutation in FGFR3 induces a structural change in the transmembrane domain dimer. *J Membr Biol* 246:487-493.

Muenke M, Schell U, Hehr A, Robin NH, Losken HW, Schinzel A, Pulleyn LJ, Rutland P, Reardon W, Malcolm S, et al. 1994. A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. *Nature Genet* 8: 269-274.

Muenke M, Gripp KW, McDonald-McGinn DM, Gaudenz K, Whitaker LA, Bartlett SP, Markowitz RI, Robin NH, Nwokoro N, Mulvihill JJ, Losken HW, Mulliken JB, Guttmacher AE, Wilroy RS, Clarke LA, Hollway G, Adès LC, Haan EA, Mulley JC, Cohen MM Jr, Bellus GA, Francomano CA, Moloney DM, Wall SA, Wilkie AO. 1997. A unique point mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR3) defines a new craniosynostosis syndrome. *Am J Hum Genet* 60: 555-564.

Neilson KM, Friesel RE. 1995. Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor-2 by a point mutation associated with Crouzon syndrome. *J Biol Chem* 270: 26037-26040.

Ng PC, Henikoff S. 2001. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 11:863-874.

Oláh É, Bessenyei B, Kun I, Németh K. 2015. Mendeli öröklődésű kórképek. In: *Klinikai genetika*. Medicina, Budapest, 239-267.

Oldridge M, Zackai EH, McDonald-McGinn DM, Iseki S, Morriss-Kay GM, Twigg SRF, Johnson D, Wall SA, Jiang W, Theda C, Jabs EW, Wilkie AOM. 1999. De novo Alu-element insertions in FGFR2 identify a distinct pathological basis for Apert syndrome. *Am J Hum Genet* 64: 446-461.

Park J, Park OJ, Yoon WJ, Kim HJ, Choi KY, Cho TJ, Ryoo HM. 2012. Functional characterization of a novel FGFR2 mutation, E731K, in craniosynostosis. *J Cell Biochem* 113:457-64.

Park WJ, Theda C, Maestri NE, Meyers GA, Fryburg JS, Dufresne C, Cohen MM Jr, Jabs EW. 1995. Analysis of phenotypic features and FGFR2 mutations in Apert syndrome. *Am J Hum Genet* 57: 321-328.

Paznekas WA, Cunningham ML, Howard TD, Korf BR, Lipson MH, Grix AW, Feingold M, Goldberg R, Borochowitz Z, Aleck K, Mulliken J, Yin M, Jabs EW. 1998. Genetic heterogeneity of Saethre-Chotzen syndrome, due to TWIST and FGFR mutations. *Am J Hum Genet* 62:1370-1380.

Pásztor E. 2007. A koponya ízületei. Magy Tud 3: 310.

Pelegrino Kde O, Sugayama S, Lezirovitz K, Catelani AL, Kok F, Chauffaille Mde L. 2012. MSX2 copy number increase and craniosynostosis: copy number variation detected by array comparative genom hybridization. Clinics (Sao Paulo) 67: 981-985.

Pfeiffer RA. 1964. Dominant erbliche Akrocephalosyndaktylie. Z Kinderheilk 90: 301-320.

Rossi M, Jones RL, Norbury G, Bloch-Zupan A, Winter RM. 2003. The appearance of the feet in Pfeiffer syndrome caused by FGFR1 P252R mutation. Clin Dysmorphol 12: 269-274.

Saethre M. 1931. Ein Beitrag zum Turmschaedelproblem (Pathogenese, Erbllichkeit und Symptomatologie). Dtsch Z Nervenheilk 119: 533-555.

Sanchez-Lara PA, Carmichael SL, Graham JM Jr, LammerEJ, Shaw GM, Ma C, Rasmussen SA; National Birth Defects Prevention Study. 2010. Fetal constraint as a potential risk factor for craniosynostosis. Am J Med Genet 152: 394-400.

Seto ML, Hing AV, Chang J, Hu M, Kapp-Simon KA, Patel PK, Burton BK, Kane AA, Smyth MD, Hopper R, Ellenbogen RG, Stevenson K, Speltz ML, Cunningham ML. 2007. Isolated sagittal and coronal craniosynostosis associated with TWIST box mutations. Am J Med Genet A 143:678-686.

Shaffer LG, Tommerup N. 2005. ISCN 2005. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. S Karger, Basel.

Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ. 2009. ISCN 2009. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. S Karger, Basel.

Shetty S, Boycott KM, Gillan TL, Bowser K, Parboosingh JS, McInnes B, Chernos JE, Bernier FP. 2007. Cytogenetic and molecular characterization of a de-novo cryptic deletion of 7p21 associated with an apparently balanced translocation and complex craniosynostosis. Clin Dysmorphol 16:253-256.

Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Mol Syst Biol 7:539.

Singer S, Bower C, Southall P, Goldblatt J. 1999. Craniosynostosis in Western Australia, 1980-1994: A population-based study. Am J Med Genet 83: 382-387.

Slaney SF, Oldridge M, Hurst JA, Morriss-Kay GM, Hall CM, Poole MD, Wilkie AOM. 1996. Differential effects of FGFR2 mutations on syndactyly and cleft palate in Apert syndrome. Am J Hum Genet 58: 923-932.

Thomas GPL, Wilkie AOM, Richards PG, Wall SA. 2005. FGFR3 P250R mutation increases the risk of reoperation in apparent 'nonsyndromic' coronal craniosynostosis. *J Craniofac Surg* 16:347-352.

Vukovich G. 2011. Népeség, népmozgalom. In: Magyar statisztikai évkönyv, 2010. Központi Statisztikai Hivatal, Budapest, 23-54.

Wang JC, Steinraths M, Dang L, Lomax B, Eydoux P, Stockley T, Yong SL, Van Allen MI. 2007. Craniosynostosis associated with distal 5q-trisomy: further evidence that extra copy of MSX2 gene leads to craniosynostosis. *Am J Med Genet* 143: 2931–2936.

Wilkie AO, Byren JC, Hurst JA, Jayamohan J, Johnson D, Knight SJ, Lester T, Richards PG, Twigg SR, Wall SA. 2010. Prevalence and complications of single-gene and chromosomal disorders in craniosynostosis. *Pediatrics* 126: 391-400.

Wilkie AOM, Slaney SF, Oldridge M. 1995. Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and is allelic with Crouzon syndrome. *Nature Genet* 9: 165-172.

Wilkie AOM. 1997. Craniosynostosis: Genes and Mechanisms. *Hum Mol Genet* 6: 1647-1656.

Woods RH, UI-Haq E, Wilkie AOM, Jayamohan J, Richards PG, Johnson D, Lester T, Wall SA. 2009. Reoperation for intracranial hypertension in TWIST1-confirmed Saethre-Chotzen syndrome: a 15 year review. *Plast Reconstr Surg* 123: 1801-1810.

Yu K, Herr AB, Waksman G, Ornitz DM. 2000. Loss of fibroblast growth factor receptor 2 ligand-binding specificity in Apert syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 97: 14536-14541.

Zhang X, Ibrahimi OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, Ornitz DM. 2006. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family: the complete mammalian FGF family. *J Biol Chem* 281:15694-15700.



Nyilvántartási szám: DEENK/162/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bessenyei Beáta
Neptun kód: QQVOMH
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

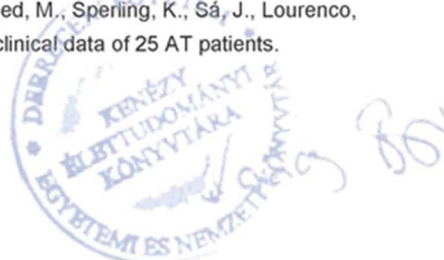
1. **Bessenyei, B.**, Nagy, A., Szakszon, K., Mokánszki, A., Balogh, E., Ujfalusi, A., Tihanyi, M., Novák, L., Bognár, L., Oláh, É.: Clinical and genetic characteristics of craniosynostosis in Hungary.
Am. J. Med. Genet. A. Epub ahead of print (2015)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.37298>
IF:2.159 (2014)
2. **Bessenyei, B.**, Tihanyi, M., Hartwig, M., Szakszon, K., Oláh, É.: Variable expressivity of Pfeiffer syndrome in a family with FGFR1 p.Pro252Arg mutation.
Am. J. Med. Genet. A. 164A (12), 3176-3179, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.36774>
IF:2.159
3. **Bessenyei, B.**, Nagy, A., Balogh, E., Novák, L., Bognár, L., Knekt, A.C., Oláh, É.: Achondroplasia with multiple-suture craniosynostosis: A report of a new case of this rare association.
Am. J. Med. Genet. A. 161 (10), 2641-2644, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.36130>
IF:2.048





További közlemények

4. Oláh É., **Bessenyei B.**, Kun I., Németh K.: Mendeli öröklődésű kórképek.
In: Klinikai genetika. Oláh Éva, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 239-265, 2015.
5. Szabó T.M., Szakszon K., P. Szabó G., Balogh E., Ujfalusi A., **Bessenyei B.**, Bálint B.L., Pólska S., Oláh É.: Genotípus-fenotípus összefüggések vizsgálata három Angelman-szindrómás betegnél.
Gyermekgyógyászat. 65 (6), 391-398, 2014.
6. **Bessenyei B.**, Oláh É.: A craniosynostosis klinikai és genetikai jellemzői.
Orv. Hetil. 155 (9), 341-347, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2014.29821>
7. Szakszon K., Balogh E., Ujfalusi A., **Bessenyei B.**, P. Szabó G., Balogh I., Oláh É.: Ritka genetikai betegségek klinikai és genetikai diagnosztikájában szerzett tapasztalataink a kelet-magyarországi régióban (2007-2013).
Orv. Hetil. 155 (9), 348-357, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2014.29690>
8. Mokánszki, A., Kórhegyi, I., Szabó, N., Bereg, E., Gergev, G., Balogh, E., **Bessenyei, B.**, Sümegi, A., Morris-Rosendahl, D.J., Sztriha, L., Oláh, É.: Lissencephaly and Band Heterotopia: LIS1, TUBA1A, and DCX Mutations in Hungary.
J. Child Neurol. 27 (12), 1534-1540, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/0883073811436326>
IF:1.385
9. Demuth, I., Dutrannoy, V., Marques, W., Neitzel, H., Schindler, D., Dimova, P.S., Chrzanowska, K.H., Bojinova, V., Gregorek, H., Graul-Neumann, L.M., Moers, A., Schulze, I., Nicke, M., Bora, E., Cankaya, T., Oláh, É., Kiss, C., **Bessenyei, B.**, Szakszon, K., Gruber-Sedlmayr, U., Kroisel, P.M., Sodja, S., Goecke, T.O., Dörk, T., Digweed, M., Sperling, K., Sá, J., Lourenco, C.M., Varon, R.: New mutations in the ATM gene and clinical data of 25 AT patients.
Neurogenetics. 12 (4), 273-282, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10048-011-0299-0>
IF:3.354





10. **Bessenyei, B.**, Ujfalusi, A., Balogh, E., Oláh, É., Szegedi, I., Kiss, C.: Jumping translocation of chromosome 1q associated with good clinical outcome in a case of Burkitt leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 204 (4), 207-210, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2010.10.005>
IF:1.389
11. Szakszon, K., Berényi, E., Jakab, A., **Bessenyei, B.**, Balogh, E., Köbling, T., Szilvassy, J., Knekt, A.C., Oláh, É.: Blepharophimosis mental retardation syndrome Say-Barber/Biesecker/Young-Simpson type - New findings with neuroimaging. *Am. J. Med. Genet. A.* 155 (3), 634-637, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.33837>
IF:2.391
12. P. Szabó G., **Bessenyei B.**, Balogh E., Ujfalusi A., Szakszon K., Oláh É.: Szubtelomerikus kromoszómaátrendeződések kimutatása idiopathiás mentális retardációban. *Orv. Hetil.* 151 (27), 1091-1098, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2010.28911>
13. Beck Z., Illés Á., Keresztes K., **Bessenyei B.**, Szöllősi Z., Kis A., Oláh É.: Az Epstein-Barr vírus ZEBRA fehérjéjének expressziója magyarországi Hodgkin lymphomás betegekben: Látens vagy lítikus ciklus? *Orv. Hetil.* 147 (33), 1539-1544, 2006.
14. Keresztes, K., Miltényi, Z., **Bessenyei, B.**, Beck, Z., Szöllősi, Z., Nemes, Z., Oláh, É., Illés, Á.: Association between the Epstein-Barr virus and Hodgkin's lymphoma in the North-Eastern part of Hungary: Effect on therapy and survival. *Acta Haematol.* 116 (2), 101-107, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000093639>
IF:1.564
15. Ujfalusi A., Balogh E., **Bessenyei B.**, Hné Lukács V., Oláh É.: Korszerű genetikai vizsgálmódszerek a veleszületett rendellenességek diagnosztikájában. *Gyermekorv. Továbbk.* 5 (5), 301-305, 2006.
16. Márka, M., **Bessenyei, B.**, Zeher, M., Semsei, I.: IL-10 Promoter - 1082 Polymorphism is Associated with Elevated IL-10 Levels in Control Subjects but Does not Explain Elevated Plasma IL-10 Observed in Sjögren's Syndrome in a Hungarian Cohort. *Scand. J. Immunol.* 62 (5), 474-480, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2005.01675.x>
IF:2.023



17. Keresztes K., **Bessenyei B.**, Szöllősi Z., Beck Z., Miltényi Z., Nemes Z., Oláh É., Illés Á.: Hodgkin-lymphomás betegek Epstein-Barr-vírus-asszociációjának vizsgálata. *Orv. Hetil.* 146 (30), 1575-1582, 2005.
18. Keresztes K., **Bessenyei B.**, Szöllősi Z., Beck Z., Miltényi Z., Nemes Z., Oláh É., Illés Á.: Epstein-Barr-vírus-asszociáció Hodgkin-lymphomában, hatása a kezelési és túlélési eredményekre. *Hematológia-transzfuziológia.* 38 (2), 65-75, 2005.
19. Márka M., **Bessenyei B.**, Urbán L., Zeher M., Semsei I.: A genetikai polimorfizmus kapcsolata az öregedéssel és a betegségekkel. *Magyar Belorv. Arch.* 57 (1), 10-19, 2004.
20. **Bessenyei B.**, Márka M., Urbán L., Zeher M., Semsei I.: Single nucleotide polymorphisms: Aging and diseases. *Biogerontology.* 5 (5), 291-303, 2004.
IF:3.11
21. Urbán L., Márka M., **Bessenyei B.**, Zeher M., Semsei I.: A t(14;18) kromoszóma transzlokáció és a bcl-2 gén Sjögren-szindrómában: Kapcsolat egyes tüdőcarcinómákkal : irodalmi áttekintés. *Med. Thorac.* 57 (1), 1-3, 2004.
22. Urbán L., **Bessenyei B.**, Márka M., Semsei I.: On the role of aging in the etiology of autoimmunity. *Gerontology.* 48 (3), 179-184, 2002.
IF:1.48
23. Szegedi A., Irinyi B., **Bessenyei B.**, Márka M., Hunyadi J., Semsei I.: UVB light and 17-beta-estradiol have different effects on the mRNA expression of Ro/SSA and La/SSB autoantigens in HaCaT cells. *Arch. Dermatol. Res.* 293 (6), 275-282, 2001.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s004030100227>
IF:1.425
24. Urbán L., **Bessenyei B.**, Takács I., Zeher M., Szegedi G., Semsei I.: A differential display az immunológiai betegségek patomechanizmusának kutatásában. *Allerg. Klin. Immun.* 3, 7-11, 2000.



25. Semsei I., **Bessenyei B.**, Urbán L., Takács I., Zeher M., Szegedi G.: A Sjögren-szindróma szisztematikus megközelítése.
Magyar Belorv. Arch. 53 (2), 131-135, 2000.
26. **Bessenyei B.**, Urbán L., Takács I., Zeher M., Szegedi G., Semsei I.: A t(14;18) transzlokáció jelenlétének kimutatása és diagnosztikus jelentősége a follicularis lymphoma minimális reziduális betegségében.
Orv. Hetil. 141 (31), 1715-1719, 2000.
27. **Bessenyei B.**, Kiss E., Zeher M., Urbán L., Szegedi G., Semsei I.: Az La autoantigén 7-es exonjában található pontmutációk: Szerepük egyes autoimmun betegségek patomechanizmusában.
Magyar Belorv. Arch. 53, 271-276, 2000.
28. Takács I., Urbán L., Radványi G., Sebők P., **Bessenyei B.**, Szegedi G., Semsei I.: A bcl-2 és Ig nehézlánc génnek fúziójának kimutatása polimeráz láncreakciós módszerrel follicularis lymphomában: Irradiációs és citosztatikus kezelések nyomonkövetése.
Magyar Belorv. Arch. 51 (2), 133-137, 1998.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 24,487

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
6,366

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2015.08.26.



9. TÁRGYSZAVAK

Tárgyszavak: craniosynostosis, varrat, dysmorphia, végtageltérés, FGFR, TWIST1, mutáció, kockázati tényező

Keywords: craniosynostosis, suture, dysmorphism, limb alteration, FGFR, TWIST1, mutation, risk factor

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Oláh Éva** professzor asszonynak, a Debreceni Egyetem, Klinikai Központ, Gyermekklinika és a Klinikai Genetikai Központ egykori igazgatójának, aki évekkkel ezelőtt felvetette a craniosynostosisos betegek genetikai vizsgálatának szükségességét, lehetővé tette a vizsgálatok kivitelezését az általa létrehozott Regionális Genetikai Laboratóriumban, valamint ötleteivel és kritikáival hozzájárult az értekezés, valamint az értekezés alapjául szolgáló publikációk elkészítéséhez.

Köszönöm a Gyermekgyógyászati Intézet klinikusainak, **Dr. Nagy Andrea** főorvosnőnek és **Dr. Szakszon Katalin** klinikai genetikusnak, valamint az Idegsebészeti Klinika igazgatójának, **Prof. Dr. Bognár Lászlónak**, hogy segítségemre voltak a betegek klinikai jellemzésében és a betegcsoportok elkülönítésében.

Köszönettel tartozom a citogenetikai részleg munkatársainak, **Dr. Ujfalusi Anikó** részlegvezető adjunktusnak, **Dr. Balogh Erzsébet** tudományos főmunkatársnak, valamint a humágenetikai szakasszisztenseknek, **Orvos Gábornénak**, **Bodnár Ferencnének** és **Nagy Évának**, akik segítségemre voltak a citogenetikai vizsgálatok elvégzésében és lelkiileg is támogattak az évek során. A molekuláris genetikai vizsgálatok kivitelezésében nyújtott segítségéért **Dr. Mokánszki Attilát** illeti köszönet.

Hálás vagyok **Dr. Kappelmayer János** professzor úrnak a Laboratóriumi Medicina Intézet vezetőjének és **Dr. Balogh István** docens úrnak a Klinikai Genetika Tanszék vezetőjének, hogy az utóbbi két és fél évben támogatták munkámat és segítették az értekezés, valamint az értekezés alapjául szolgáló publikációk elkészítését.