

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Nagy Orsolya

**Patogenetikai jelentőségű kópiaszám eltérések vizsgálata
veleszületett fejlődési rendellenességekben**

DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Patogenetikai jelentőségű kópiaszám eltérések vizsgálata veleszületett fejlődési rendellenességekben

Nagy Orsolya

Témavezető: Dr. Ujfalusi Anikó



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS	7
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
3.1. Kópiaszám eltérések a humán genomban és azok genetikai vizsgáló módszerei	9
3.2. Velezületett szívfejlődési rendellenességek (congenital heart disease, CHD) osztályozása, etiológiája és genetikája	13
3.2.1. <i>A CHD definíciója és osztályozása</i>	13
3.2.2. <i>A CHD etiológiája</i>	15
3.2.3. <i>Kromoszómális aneuploidiák okozta CHD</i>	16
3.2.4. <i>Kópiaszám eltérések okozta CHD</i>	16
3.2.5. <i>Génszintű eltérések okozta CHD</i>	17
3.3. Nemi differenciálódási zavarok (differences of sex development, DSD) osztályozása, etiológiája és genetikája	22
3.3.1. <i>A nemi differenciálódás folyamata</i>	22
3.3.2. <i>A DSD osztályozása</i>	24
3.3.3. <i>A DSD etiológiája</i>	25
3.3.4. <i>Az NR5A1 szerepe a DSD kialakításában</i>	26
3.4. A genetikai háttér tisztázásának klinikai jelentősége CHD-ban és DSD-ben.....	27
4. CÉLKITŰZÉSEK	29
5. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK.....	30
5.1. Betegek	30
5.1.1. <i>CHD-val diagnosztizált betegcsoportok</i>	30
5.1.1.1. <i>Szindrómás CHD-val diagnosztizált betegek</i>	30

5.1.1.2. <i>Izolált CHD-val diagnosztizált betegek</i>	30
5.1.1.3. <i>Abortumokból származó minták</i>	31
5.1.1.4. <i>A vizsgálatok menete</i>	31
5.1.2. <i>DSD tüneteit mutató beteg</i>	31
5.2. Módszerek	33
5.2.1. <i>Citogenetikai vizsgálat</i>	33
5.2.2. <i>Fluoreszcens in situ hibridizáció</i>	34
5.2.3. <i>DNS izolálás</i>	34
5.2.4. <i>Multiplex ligáció-függő próba amplifikáció</i>	34
5.2.5. <i>Teljes genom array komparatív genomi hibridizáció</i>	35
5.2.6. <i>Teljes exom szekvenálás</i>	38
5.2.7. <i>Az NR5A1 génben detektált CNV megerősítése QMPSF módszerrel</i>	39
6. EREDMÉNYEK	41
6.1. CHD-val diagnosztizált betegcsoportok	41
6.1.1. <i>Szindrómás CHD-val diagnosztizált betegek</i>	41
6.1.1.1. <i>Az 1. eset klinikai jellemzői és genetikai eredményei</i>	44
6.1.1.2. <i>A 2. eset klinikai jellemzői és genetikai eredményei</i>	46
6.1.1.3. <i>A 3. eset klinikai jellemzői és genetikai eredményei</i>	46
6.1.1.4. <i>A 4. eset klinikai jellemzői és genetikai eredményei</i>	49
6.1.1.5. <i>Az 5. eset klinikai jellemzői és genetikai eredményei</i>	49
6.1.1.6. <i>A 6. eset klinikai jellemzői és genetikai eredményei</i>	49
6.1.1.7. <i>A 7. eset klinikai jellemzői és genetikai eredményei</i>	50
6.1.2. <i>Diagnosztikai algoritmus szindrómás CHD esetén</i>	52
6.1.3. <i>Izolált CHD-val diagnosztizált betegek</i>	54
6.1.4. <i>Abortumokból származó minták</i>	54

6.2. DSD tüneteit mutató beteg	55
7. MEGBESZÉLÉS	58
7.1. CHD-val diagnosztizált betegcsoportok, genotípus-fenotípus összefüggések.....	58
7.1.1. Szindrómás CHD-val diagnosztizált betegek	58
7.1.2. Izolált CHD-val diagnosztizált betegek	64
7.1.3. Abortumokból származó minták.....	66
7.2. DSD tüneteit mutató beteg	67
8. ÖSSZEFOGLALÁS	72
9. SUMMARY	74
10. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSAI.....	76
11. IRODALOMJEGYZÉK	78
12. TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS	92
13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	93
14. PUBLIKÁCIÓS LISTA	95
15. FÜGGELÉK.....	97

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACFS	acro-cardio-facial syndrome, acro-cardio-facialis szindróma
aCGH	array comparative genomic hybridization, array komparatív genomi hibridizáció
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics, Amerikai Orvosi Genetikai és Genomikai Társaság
AMH	anti-Mullerian hormone, anti-Müllerian hormon
AP	arteria pulmonalis, tüdőartéria
AS	aortic stenosis, aortaszűkület
ASD	atrial septal defect, pitvari sövényhiány
AVSD	atrioventricular septal defect, pitvar-kamrai sövényhiány
BAV	bicuspid aortic valve, bicuspidalis aortabillentyű
CHD	congenital heart disease, veleszületett szívfejlődési rendellenesség
CNV	copy number variant, kópiaszám eltérés
CoA	coarctatio aortae, aortaszűkület
DBD	DNA-binding domain, DNS-kötő domén
DECIPHER	DatabasE of genomiC varIation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources
DGV	Database of Genomic Variants
DQ	dosage quotient, dózis hányados
DSD	differences of sex development, nemi differenciálódási zavar
EDTA	ethylene-diamine-tetraacetic acid, etilén-diamin-tetraecetsav
FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridization, fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció
FoA	foramen ovale apertum, nyitott foramen ovale

FoSTeS	Fork Stalling and Template Switching
FSH	follicle-stimulating hormone, folliculus stimuláló hormon
GD	gonad dysgenesis
HE	hematoxylin-eosin festés
HLH	hypoplastic left heart, hypoplasiás bal szívfél
HLHS	hypoplastic left heart syndrome, hypoplasiás bal szívfél szindróma
IAA	interrupted aortic arch, megszakított aortaív
ISCA	The International Standards for Cytogenomic Arrays
ISCN	International System for Human Cytogenomic Nomenclature
L1	long interspersed element-1
LBD	ligand-binding domain, ligandkötő domén
LCR	low copy repeat, alacsony kópiaszámú ismétlődő szekvencia
LH	luteinizing hormone, luteinizáló hormon
LOH	loss of heterozygosity, heterozigótaság-vesztés
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification, multiplex ligáció-függő próba amplifikáció
MP	mitralis prolapsus, mitrális billentyű prolapsus
NAHR	non-allelic homologues recombination, nem-allélikus homológ rekombináció
NHEJ	non-homologues end joining, nem-homológ DNS végek összekapcsolásán alapuló mechanizmus
NIPT	Non-Invasive Prenatal Testing, nem-invazív prenatális teszt
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PA	pulmonalis atresia, tüdőverőér-záródás
PCR	polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció
PDA	patent ductus arteriosus, nyitott ductus arteriosus

PS	pulmonalis stenosis, tüdőverőér-szűkület
QMPSF	Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments
SRY	sex-determining region Y, szex-determináló régió Y
sSMC	small Supernumerary Marker Chromosome, kis számfeletti marker kromoszóma
SVAS	supravalvular aortic stenosis, supravalvuláris aortaszűkület
TBE	Tris-borate-EDTA, Tris-borát-EDTA
TGA	transposition of the great arteries, nagyér-transzpozíció
TOF	tetralogy of Fallot, Fallot-tetralógia
TS	target site
TSD	duplicated target site
UCSC	University of California, Santa Cruz
UH	univentricular heart, egykamrás szív
UPD	uniparental disomy, uniparentális diszómia
VSD	ventricular septal defect, kamrai sövényhiány
WES	whole exome sequencing, teljes exom szekvenálás
WGS	whole genome sequencing, teljes genom szekvenálás

2. BEVEZETÉS

A kópiaszám eltérések (copy number variant, CNV) a humán genom intermedier méretű (50 bp – 3 Mb) struktúrális eltérései, amelyek funkcionális következményei az általuk okozott DNS többlet vagy hiány méretétől és géntartalmától függenek. Jelentős részük benignus, az egészséges populációban is előforduló polimorfizmus. A patogén CNV-k olyan a fejlődéshez nélkülözhetetlen, dózis-szenzitív géneket tartalmaznak, amelyek deléción/duplikáción révén ritka veleszületett fejlődési rendellenességek alakulhatnak ki (1).

A veleszületett szívfejlődési rendellenességek (congenital heart disease, CHD) a leggyakoribb fejlődési anomáliák, klinikai megjelenésük alapján két csoportra oszthatók: szindrómás (egyéb fejlődési rendellenességet is mutató) vagy izolált (csak a szívet érintő). A szindrómás CHD-kban gyakori extrakardiális tünet a dysmorphia, szomatikus és mentális retardáció, beszéd- és tanulási zavarok. A CHD etiológiája (genetikai és környezeti hatás) az esetek mindössze 20–30%-ában ismert (2-4). A szindrómás formák azonosítása és a genetikai háttér tisztázása nélkülözhetetlen a prognózis becsléséhez és a betegek megfelelő ellátásához. A javuló diagnosztikai és sebészeti beavatkozások következtében a vitiumos betegek több mint 90%-a eléri a felnőttkort (2, 5). Az ismétlődési kockázat megítéléséhez, a reprodukzív döntéshozatalhoz és a prenatalis diagnosztikához a genetikai diagnózis ismerete ma már elengedhetetlen.

Az értekezés 6.1. fejezetében a CHD-s betegcsoportban végzett citogenetikai microarray és MLPA vizsgálatok eredményeit mutatom be. Ezen módszerek alkalmazásával a CHD-k háttérében álló patogén CNV-k azonosítása, genotípus-fenotípus összefüggés leírása volt a célom. A postnatalis eseteket szindrómás és izolált csoportra osztva vizsgáltam, a prenatalis minták CHD-val diagnosztizált magzatok abortumainak kamrai szövetmintáiból származtak.

Az alkalmazott módszerek hatékonyságának tesztelésével eredményes diagnosztikai kivizsgálási algoritmus kidolgozására törekedtem.

A nemi differenciálódási zavarok (differences of sex development, DSD) olyan ritka veleszületett rendellenességek, amelyek nagyon változó fenotípusbeli eltérésekkel járnak, sok esetben a klinikai diagnózis felállítása is nehézségekbe ütközik. A tünetek újszülöttkorban vagy a nemi érés időszakában jelennek meg (6). A klinikai gyakorlatban az esetek kevesebb, mint 20%-ának van molekuláris genetikai diagnózisa, ami megnehezíti a megfelelő kezelési mód (sebészi, hormonterápia) kiválasztását és a betegség prognózisának megítélését (7).

Az értekezés 6.2. fejezetében egy olyan 46,XY DSD-vel diagnosztizált lány gyermek genetikai kivizsgálását mutatom be, akinél a kromoszómális nem meghatározását követően öt évre volt szükség a fenotípust magyarázó molekuláris genetikai diagnózis megszületéséhez. Ezen eset tanulmányozása kapcsán a kisméretű, intragénikus CNV-k vizsgálatának jelentőségére hívjuk fel a figyelmet.

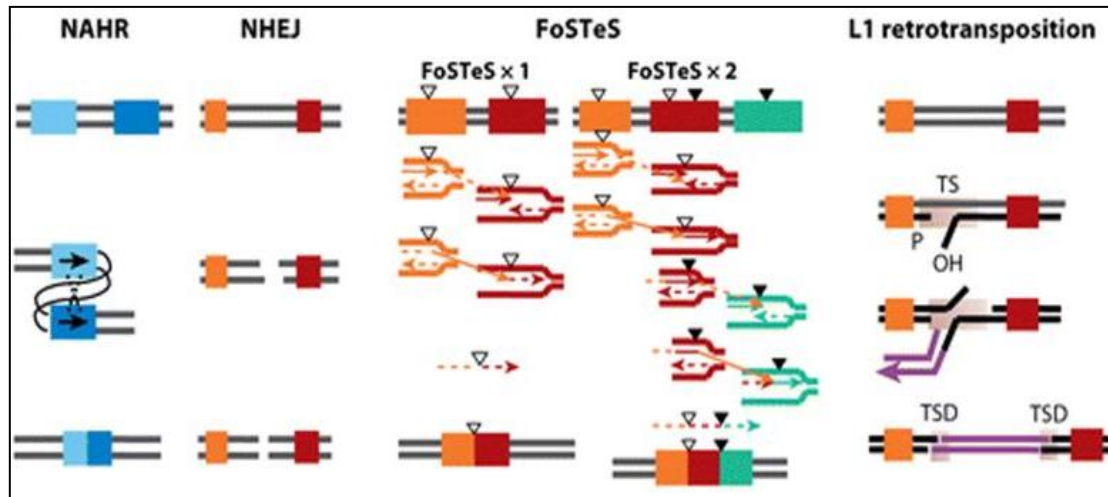
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Kópiaszám eltérések a humán genomban és azok genetikai vizsgáló módszerei

A humán genomban előforduló kópiaszám eltérések azokat a nem ismétlődő szekvenciákat érintő struktúrális eltéréseket jelentik, amelyek eredményeként DNS többlet vagy hiány alakul ki a diploid referencia genomhoz képest. A normál 2 kópiaszám helyett deléció esetén 1 vagy 0, duplikáció esetén 3 vagy 4 mutatható ki. Méretük alapján különbözőek lehetnek: kromoszómális aneuploidiók (3–5 Mb); intermediér méretű CNV-k, azaz szubmikroszkópos vagy intragénikus deléciók/duplikációk (50 bp – 3 Mb); a legkisebb méretű indel-ek (inszerciók/deléciók) (<50 bp). Az elmúlt két évtizedben intenzív kutatás folyt az intermediér méretű (50 bp – 3 Mb) CNV-k feltérképezésére (8, 9).

A CNV-k kialakulásában többféle mechanizmus játszik szerepet (1. ábra). Leggyakoribb a rekombinációs-alapú nem-allélikus homológ rekombináció (non-allelic homologous recombination, NAHR), amely során az azonos allélen elhelyezkedő ismétlődő szekvenciák (low copy repeat, LCR) között jön létre crossing over. Azonos orientációjú LCR-ek közötti NAHR deléciót és duplikációt, ellentétes irányúak közötti pedig inverziót eredményez. Az LCR-eken kívül más szekvenciák, retrotranszpozázilis L1 (long interspersed element-1) elemek, *Alu* és pseudogének is mediálhatják a NAHR-t. Kisméretű CNV-k kialakulásához vezet a nem-homológ DNS végek összekapcsolásán alapuló (non-homologues end joining, NHEJ) mechanizmus is. Fiziológias körülmények között az NHEJ a kettős szálú DNS törések javításáért felelős, ennek során a töréspontokban bekövetkező kisméretű, néhány nukleotidot érintő deléciók/duplikációk eredményezik a CNV-t. A humán genom kb. 17%-át kitevő ún. L1 az egyedüli aktív transzpozícióra képes szekvenciák. Közvetítésükkel elsősorban inszerciók jönnek létre. Az újabban leírt replikációs alapú mechanizmus, az ún. „Fork Stalling and Template Switching (FoSTeS)” deléciók, duplikációk, inverziók és komplex szerkezeti

variánsok létrehozásáért felelős. Emellett fontos szerepe van gén duplikációk/triplikációk és exon cserék létrehozásában is (1, 10).



1. ábra A humán genomban előforduló CNV-k kialakulásában szerepet játszó mechanizmusok (10) A NAHR kialakulását az ismétlődő szekvenciákon (LCR-ek) kívül más szekvenciák (pl. L1 elemek, *Alu*, pseudogének) is mediálhatják. Az NHEJ mechanizmus a kettős szálú DNS törések következtében, a törvégek hibás ligációja kapcsán alakulhat ki. A FoSTeS replikációs alapú mechanizmus egyszerű (x 1) és komplex (x 2 vagy több) szerkezeti variánsok kialakulásáért felelős. A retrotranszpozázibilis L1 szekvenciák az egyedüli aktív transzpozícióra képes elemek. Rövidítések: FoSTeS: Fork Stalling and Template Switching, L1: long interspersed element-1, NAHR: non-allelic homologous recombination, NHEJ: non-homologues end joining, TS: target site, TSD: duplicated target site. (Az ábra Zhang F. és munkatársainak 2009-es közleménye (10) alapján, annak szerkesztésével készült.)

Funkcionális következményeik az általuk okozott DNS többlet vagy hiány méretétől és géntartalmától függenek. A humán genom kb. 12–16%-át kitevő CNV-k nagy része benignus, azaz olyan polimorfizmus, amely az egészséges populáció >1%-ában fordul elő (1, 11). Ezeket foglalja magába a 2004-ben létrehozott és folyamatosan frissülő Database of Genomic Variants (DGV) nevű adatbázis (12). Az 1990-es évek eleje óta ismert, hogy a szubmikroszkópos méretű

CNV-k humán betegségeket is okozhatnak. A patogén CNV-k olyan a fejlődéshez nélkülözhetetlen, dózis-szenzitív, filogenetikailag konzervált géneket tartalmaznak, amelyek deléciója/duplikációja ritka veleszületett rendellenességeket, autizmust, pszichiátriai kórképeket (pl. Alzheimer-kór, skizofrénia), gyakori, komplex felnőttkori betegségeket (pl. elhízás) vagy szerzett tumorokat okozhat (11, 13). A teljes genomot vizsgáló genetikai technikák fejlődésével folyamatosan nőtt az újonnan felismert patogén CNV-k száma, ezért szükségessé vált azoknak az adatbázisoknak a létrehozása is (pl. DECIPHER, ISCA, ClinVar), amelyek a patogén CNV-k által okozott genetikai betegségeket tartalmazzák. Az elérhető információk bővülésével a CNV-k osztályozása is egyre bonyolultabb lett, öt szintű osztályozásuk (patogén, valószínűleg patogén, ismeretlen klinikai jelentőségű, valószínűleg benignus, benignus) nemzetközileg elfogadott szakmai protokollok iránymutatásai alapján történik (14).

A szubmikroszkópos méretű (<3 Mb) CNV-k kimutatásának egyik legrégebbi módszere a *fluoreszcens in situ hibridizáció* (FISH), amely során fluoreszcens jelölésű DNS próbákat hibridizálnak interfázisú vagy metafázisú sejtek DNS-éhez a vizsgálni kívánt régió deléciójának, duplikációjának, lokalizációjának kimutatása céljából (15). A módszer hátránya, hogy előzetes ismeretet igényel az érintett régióról, a vizsgálat célzott jellege miatt pedig egy mintán egyszerre csak egy-két lókuszt analizálható.

Ezen korlátok kiküszöbölésére kiválóan alkalmas a gold standardnak számító *array komparatív genomi hibridizáció* (array comparative genomic hybridization, aCGH), amely a teljes genom egy lépésben való vizsgálatával képes kimutatni CNV-ket. A vizsgálat során a beteg és egy referencia egyén 1:1 arányú genomi DNS-ét eltérő színű fluoreszcens festékkel jelölik, összekeverik, majd szilárd hordozóra fixált normál humán genomhoz hibridizálják. A beteg (piros) és a referencia DNS (zöld) kompetitív hibridizációja után kapott fluoreszcencia intenzitások egy analizáló szoftver segítségével kópiaszámmá konvertálhatók. A módszer

felbontóképessége annál nagyobb, minél rövidebb oligonukleotidokkal van reprezentálva a szilárd hordozóra rögzített normál humán genom. A nagy felbontású citogenetikai microarray platformok használatával jelentősen megemelkedett az újonnan felismert patogén CNV-k száma. A genom polimorf helyeire tervezett SNP próbákat tartalmazó array-k segítségével a CNV-k mellett heterozigótaság-vesztés (loss of heterozygosity, LOH), uniparentális diszómia (uniparental disomy, UPD) is kimutatható (16). Az aCGH nagy felbontása révén jelentős mértékben javította a CNV alapú betegségek diagnosztikai hatékonyságát (kb. 15–20%), ezért elsővonalbeli tesztként javasolt többszörös fejlődési rendellenességek, ismeretlen eredetű szomatikus és mentális retardációk, valamint autizmus kivizsgálása esetén (17). A postnatalis genetikai diagnosztika mellett első genetikai vizsgálatként javasolt azokban a prenatalis esetekben is, amikor a szűrővizsgálatok során a magzat fejlődési rendellenességének gyanúja merül fel (18). A módszer nem alkalmazható kópiaszám változás nélküli genomiális eltérések kimutatására, mint pl. kiegyensúlyozott transzlokáció, inverzió, valamint alacsony (<15–20%) mozaikos formában előforduló CNV.

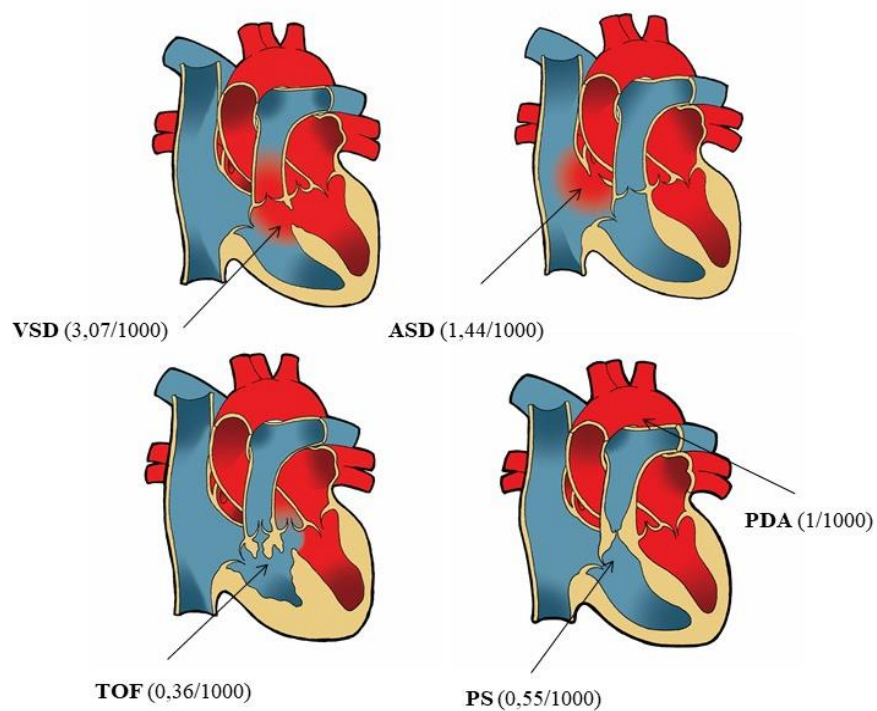
A *multiplex ligáció-függő próba amplifikáció* (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) alkalmazásával egy gént vagy csak néhány exont érintő, ún. intragénikus CNV-k detektálhatók. A rendszer előnye, hogy multiplexálható, egyszerre akár 40–50 rövidebb, előzetesen ismert génszakasz vizsgálható.

Az új generációs alapú *teljes genom szekvenálás* (whole genome sequencing, WGS) a legígéretesebb és leghatékonyabb módszer a CNV-k kimutatására. A CNV-k mellett képes kiegyensúlyozott aberrációk detektálására a töréspontok szekvencia szintű megadásával és a genomi szakaszok irányultságának identifikálásával együtt. Ezáltal a WGS képes helyettesíteni valamennyi eddig alkalmazott genomi vizsgálóeljárást. A módszer hátránya, a standardizálás hiánya mellett, hogy olyan mennyiségű információt generál, amelyek bioinformatikai és klinikai értelmezése jelenleg is nagy kihívást jelent (11).

3.2. Veleszületett szívfejlődési rendellenességek (congenital heart disease, CHD) osztályozása, etiológiája és genetikája

3.2.1. A CHD definíciója és osztályozása

A CHD-k a szív és a nagyerek funkcionális és struktúrális defektusait foglalják magukba (4). A leggyakoribb születési anomáliák, az újszülöttek perinatális megbetegedésének és halálának vezető okai. Prevalenciájuk kb. 8/1000 élve született gyermek, ez a szám azonban országonként és kontinensenként változik (2,3–9,3/1000) (19, 20). A fejlett országokban nagyobb gyakorisággal fordulnak elő. Halvaszületett magzatok esetén a gyakoriság ennek az értéknek kb. tízszerese, míg abortumokban eléri a 15%-ot is. A diagnosztikai módszerek korszerűsödésével, valamint a műtéti technikák javulásával a CHD prevalenciája folyamatosan nő, 1970 óta 5 évenként kb. 10%-kal (19, 20). Az eredményes kezelési és műtéti beavatkozásoknak köszönhetően ma már a CHD-ban szenvedő betegek kb. 90%-a eléri a felnőttkort. Ennek következtében a 18 év feletti felnőtt CHD-s betegek száma mára meghaladta a gyermekkori esetek számát (5). A CHD-k osztályozásának számos formája létezik. Megkülönböztetünk egyszerű vagy komplex (több vitium együtt); cianotikus vagy acianotikus; a szív egyes részeinek érintettsége alapján jobb oldali, bal oldali, kiáramlási pályát vagy nagyereket érintő (conotruncalis), valamint oldalisági hibaként (heterotaxia) megjelenő CHD-t. A leggyakrabban előforduló vitiumok 1000 újszülöttre vonatkoztatott prevalenciáját mutatja az 2. ábra. A komplex típusba tartozó Fallot-tetralógia (TOF), nagyér-transzpozíció (TGA), egykamrás szív (UH) és hypoplasziás bal szívfél (HLH) műtéti beavatkozást igényelnek, prognózisuk komplexitásuktól függ. A vitiumok előfordulhatnak szindrómás (egyéb szervrendszer fejlődési rendellenességét is mutató) vagy csak a szívet érintő, izolált formában. Az összes CHD 25–40%-a szindrómás, míg 60–75%-a izolált formában fordul elő (2, 21-23).



2. ábra A CHD gyakori megjelenési formái és prevalenciájuk újszülöttkorban (22) A zárójelben lévő számok a CHD-k prevalenciáját jelentik 1000 újszülöttre vonatkoztatva. Rövidítések: ASD: pitvari sövényhiány (atrial septal defect), PDA: nyitott ductus arteriosus (patent ductus arteriosus), PS: tüdőverőér-szűkület (pulmonalis stenosis), TOF: Fallot-tetralógia (tetralogy of Fallot), VSD: kamrai sövényhiány (ventricular septal defect).

3.2.2. A CHD etiológiája

Irodalmi adatok szerint a CHD etiológiája heterogén és még ma is csak részben ismert. Epidemiológiai tanulmányok adatai alapján kb. 75%-ban multifaktoriális eredetűek, azaz környezeti ágensek és sok minor gén együttes hatásának következményeként jönnek létre. Teratogén ágensek kb. 5%-ban, míg genetikai eltérések kb. 20%-ban felelősek kialakulásukért (3, 24). Környezeti teratogének lehetnek a terhes anyát ért ionizáló sugárzás, vírusfertőzések (pl. HIV, influenza, rubeola), gyógyszerhasználat (pl. thalidomid, antiepileptikumok, A-vitamin-származékok, nemi hormonok), dohányzás, alkohol- és kábítószer-fogyasztás, valamint az anya betegségei (pl. gesztációs diabetes, hypertonia, fenilketonuria, szisztémás lupus erythematosus) (2, 3, 25). A CHD-k genetikai eredetét támasztja alá a familiáris esetekben tapasztalt magasabb ismétlődési kockázat, a rokonházasságokban észlelt emelkedett incidencia, a geográfiai különbségek lehetséges magyarázatául szolgáló populáció specifikus genetikai faktorok megléte. A leggyakoribb sporadikus CHD-k háttérében álló genetikai eltérések rendszerint *de novo* eredetűek (26). Mai ismereteink szerint a CHD fenotípus kialakítását okozhatja egy nagy hatású gén mutációja, több gén együttes hatása, vagy gén(ek) és környezeti hatás közötti interakció is. Ebből adódóan a CHD-k genetikailag rendkívül heterogének. Különböző gének eltérő mutációi kialakíthatják ugyanazt a CHD-t, míg ugyanazon mutációk, különböző egyéneken eltérő CHD-t eredményezhetnek. Tovább bonyolítja a képet a változó expresszivitás és a csökkent penetrancia, amikor ugyanaz a CHD különböző súlyossággal vagy egyáltalán nem jelenik meg az azonos mutációt hordozók körében (22). A CHD-k háttérében álló genetikai eltérések nagyfokú komplexitása miatt a patomechanizmusra vonatkozó ismereteink ma még mindig nagyon hiányosak. Egér állatmodelleket alkalmazva kiderült, hogy a genetikai eltérések olyan géneket, géncsoportokat érintenek, amelyek a magzati szívfejlődésben, szöveti differenciálódásban játszanak kiemelkedő fontosságú szerepet (24). A DNS szintű genetikai eltérések felderítése mellett az elmúlt évtizedben egyre több bizonyíték

gyűlt össze az epigenetikai faktorok CHD-t indukáló hatásáról. Az embriogenezis során ugyanis a magas rátájú DNS szintézis és a normál metilációs mintázat kialakításának folyamata igen érzékenyen reagál az *in utero* környezeti hatásokra (27).

A CHD-kat okozó patogenetikai eltérések méretük alapján lehetnek kromoszómális aneuploidiák (trisómia, monoszómia), szubmikroszkópos CNV-k (mikrodeleció, mikroduplikáció) és egy vagy néhány nukleotidot érintő génmutációk. Ezek az eltérések szindrómás (kb. 20%) vagy izolált CHD-t (kb. 80%) egyaránt okozhatnak (2, 3, 24, 28, 29).

3.2.3. Kromoszómális aneuploidiák okozta CHD

A CHD-k elsőként felfedezett genetikai okai a kromoszómák számbeli aberrációi (trisómia/monoszómia) voltak, amelyek a CHD-s esetek 9–18%-ában mutathatók ki. A teljes kromoszómákat érintő eltérések nagy géntartalmuk miatt szinte kizárólag súlyos, több szervet érintő tünetegyüttest, szindrómás CHD-t okoznak. A CHD-k eltérő gyakorisággal fordulnak elő az egyes aneuploidiák okozta szindrómákban, ugyanakkor bizonyos CHD-k dominanciája figyelhető meg a különböző megbetegedésekben (1. táblázat) (2, 21, 22, 30).

3.2.4. Kópiaszám eltérések okozta CHD

Szubmikroszkópos CNV-k az izolált CHD-k esetén 3–10%-ban, míg az extrakardiális tüneteket is mutató szindrómás formákban 3–25%-ban mutathatók ki (4). A régóta ismert és a rutin diagnosztikában rendszeresen vizsgált DiGeorge/Velocardiofacialis (22q11.21 deleció) és Williams–Beuren szindróma (7q11.23 deleció) mellett a 8p23.1 deleciós szindrómában 74–94% a CHD előfordulási gyakorisága (1. táblázat) (2-4, 31). A CNV-k méretüket és géntartalmukat tekintve nagyon heterogének. A deleciók fenotípusos következményei súlyosabbak, mint a duplikációké, az érintett gének haploinsufficienciájának kevésbé tolerálható volta miatt. Egy CNV-n belül rendszerint több, egymás melletti gén kópiaszáma

változik meg egyszerre, összetett fenotípust eredményezve. A CHD-hoz társuló tünetek felismerése újszülöttkorban vagy kisgyermekkorban nehézséget jelenthet, ezért a szindrómás CHD-k gyakran aluldiagnosztizáltak. Ennek elkerülésére javasolják a CHD-val született gyermek esetében az aCGH alkalmazását a genetikai kivizsgálás során (4). A CNV pontos mérete betegenként eltérő lehet, de mindig van egy közös, ún. minimálisan deletálódott/duplikálódott régió, amely szükséges a szindróma legjellemzőbb tüneteinek kialakításáért. Az esetek zömében ezen régióon belül sikerül azonosítani a CHD kialakításáért felelős, funkcionálisan releváns gént (pl. *TBX1* gén DiGeorge szindrómában) (2, 24). Az elmúlt évtizedben a nagy felbontású aCGH széleskörű elterjedésével számos új, CHD-val társuló *de novo* patogén CNV került felismerésre (1q21.1, 2p13.3, 3p25.1, 7q11.13, 11q24–25, 15q11.2, 16p13.11) (26, 32, 33). Ezek géntartalmának részletes analízise elősegítheti új CHD gének azonosítását, tovább bővítve ismereteinket a CHD patogenezisééről.

3.2.5. Génszintű eltérések okozta CHD

A CHD-t okozó, mendeli öröklődésű, kisméretű génmutációk felismerése a familiáris esetek kapcsoltági analízisével, a jelölt gének célzott szekvenálásával kezdődött (24). A patogén mutációk funkcionális tanulmányozása során kiderült, hogy az esetek zömében az érintett gének haploinsufficienciáját/funkcióvesztését eredményezve vezetnek vitiumok kialakulásához (2). A szívfejlődés, a különböző funkciójú sejtek proliferációja és differenciációja komplex jelátviteli útvonalakon keresztül, térben és időben összehangolva zajlik. A jelenleg ismert, CHD-t okozó génmutációk valamennyi elemét érinthetik ennek a komplex szignalizációs útvonalnak. A legismertebb génmutáció okozta szindrómás CHD-k az alábbiak: Alagille (*JAG1*, *NOTCH1*), Holt–Oram (*TBX5*) és Noonan (*PTPN11*, *SOS1*) (1. táblázat) (2, 4, 22). Az izolált CHD-k hátterében álló mutációk olyan géneket érintenek, amelyek fehérje termékei funkciójuk szerint három fő csoportba sorolhatók: transzkripció

faktorok, szignáltranszdukcióban résztvevő fehérjék és struktúrális fehérjék. A normál szívfejlődésért felelős génexpressziót szabályozó transzkripciós faktorokon belül legtöbbet tanulmányozott az alábbi három csoport: a *GATA* (pl. *GATA4*, *GATA6*, *ZIC3*), a Homeobox (pl. *NKX2-5*, *NKX2-6*) és a T-box (pl. *TBX1*, *TBX5*, *TBX20*) faktorok. Elsősorban funkcióvesztő mutációk jellemzőek a Notch, a WNT/BMP, a NODAL és a RAS/MAPK szignáltranszdukciós útvonalak faktorainak génjei esetén (24, 34). A sarcomer és az extracelluláris mátrix felépítésében résztvevő fehérjék génjeinek mutációi (pl. *MYH6*, *MYH7*, *MYH11*, *ACTC1*, *ELN*) nemcsak cardiomyopathiákat, hanem CHD-kat is eredményezhetnek. A felsorolt géncsoportokon kívül epigenetikai tényezők (DNS- és hisztonmetiláció, -acetiláció, miRNS) is módosíthatják a kardiogenezisben szerepet játszó fehérjék expresszióját. Az elmúlt évek legújabb kutatási eredményei szerint az embriogenezis során a bal-jobb oldaliság kialakításában esszenciális szerepe van a csillóknak, amelyek felépítéséhez és működéséhez szükséges fehérjék génjeinek mutációi autoszómális recesszív öröklődésű izolált vagy szindrómás CHD-t eredményezhetnek (pl. *GDF1*, *GALNT11*). Ezek közül az egyik legsúlyosabb a heterotaxia szindróma (4).

1. táblázat CHD-val járó genetikai szindrómák (2-4, 22, 31)

Szindróma	Kariotípus / Kromoszómarégió / Gének	CHD	CHD gyakoriság (%)	Jellemző klinikai tünetek
Kromoszómális aneuploidiák				
Edwards szindróma	47,XX,+18	ASD, VSD, PDA	80–100	Intrauterin növekedési retardáció, jellemző kéztartás, felcsapott sarok, micrognathia, polyhydramnion
Patau szindróma	47,XX,+13	ASD, VSD, PDA	80–100	Ajak- és szápadhasadék, holoprosencephalia, hypotelorismus, micro-anophthalmia, omphalocele, polydactylia
Down szindróma	47,XX,+21	AVSD, VSD, ASD	40–50	Brachycephalia, lapos arcél, felfelé ívelő szemrések, epicanthus, hypertelorismus, nagy nyelv, hypotonia, mentális retardáció, brachydactylia
Turner szindróma	45,X	CoA, BAV, AS	25–35	Alacsony termet, nyaki redő, alacsony nyaki hajvonal, pajzs alakú mellkas távol ülő mellbimbókkal, csíkgonád, primer amenorrhoea
Klinefelter szindróma	47,XXY	ASD, PDA, MP	50	Hypogonadismus, hosszú végtagok, magas termet, nőies elhízás, késői pubertás
Mikrodeléciós szindrómák				
DiGeorge szindróma	22q11.21	TOF, VSD, IAA	74–85	Thymus aplasia, parathyreoidea hypoplasia, mélyen ülő fülek, hypertelorismus, micrognathia, beszédkéés

Williams–Beuren szindróma	7q11.23	SVAS, PS, VSD	80	Szomatikus retardáció, „kobold arc”, kitöltött periorbitális régió, nagy, nyitott száj kifelé forduló vaskos ajakkal, csont- és vese rendellenességek, hypercalcaemia, barátságos viselkedés
8p23.1 deléció szindróma	8p23.1	TOF, HLHS, AVSD	94	Pre- és postnatalis szomatikus retardáció, beszédzavar, arcdysmorphia, microcephalia, hiperaktivitás, epilepszia
Génszintű eltérések				
Alagille szindróma	<i>JAG1, NOTCH1</i>	PS, TOF, PA	>90	Epeút hypoplasia, cholestasis, hepatomegalia, magas, elődomborodó homlok, mélyen ülő szemek, alacsonyan ülő, deformált fülkagylók, csigolyaív rendellenesség („pillangó csigolyák”)
Noonan szindróma	<i>PTPN11, SOS1</i>	PS, ASD, TOF	75	Alacsonynövés, csontdeformitások, magas, széles homlok, alacsonyan ülő fülkagylók, lefelé ívelő szemrések, laza nyaki bőrredők, táplálási nehezítettség, súlygyarapodás elmaradása
Holt–Oram szindróma	<i>TBX5</i>	VSD, ASD, AVSD	50	Felső végtag csontnövekedési zavara, hiányzó vagy túl hosszú hüvelykujj

Rövidítések: AS: aortaszűkület (aortic stenosis), ASD: pitvari sөvényhiány (atrial septal defect), AVSD: pitvar-kamrai sөvényhiány (atrioventricular septal defect), BAV: bicuspidalis aortabillentyű (bicuspid aortic valve), CHD: veleszületett szívfejlődési rendellenesség (congenital heart disease), CoA: aortaszűkület (coarctatio aortae), HLHS: hypoplasiás bal szívfél szindróma (hypoplastic left heart syndrome), IAA: megszakított aortaív (interrupted aortic arch), *JAG1*: Jagged canonical Notch ligand 1, MP: mitrális billentyű prolapsus (mitralis prolapsus), *NOTCH1*: Notch receptor 1, PA: tüdőverőér-záródás (pulmonalis atresia),

PDA: nyitott ductus arteriosus (patent ductus arteriosus), PS: tüdőverőér-szűkület (pulmonalis stenosis), *PTPN11*: Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11, *SOS1*: SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1, SVAS: supra-*valvul*áris aortaszűkület (supra-*valvular* aortic stenosis), *TBX5*: T-box transcription factor 5, TOF: Fallot-tetralógia (tetralogy of Fallot), VSD: kamrai sövényhiány (ventricular septal defect).

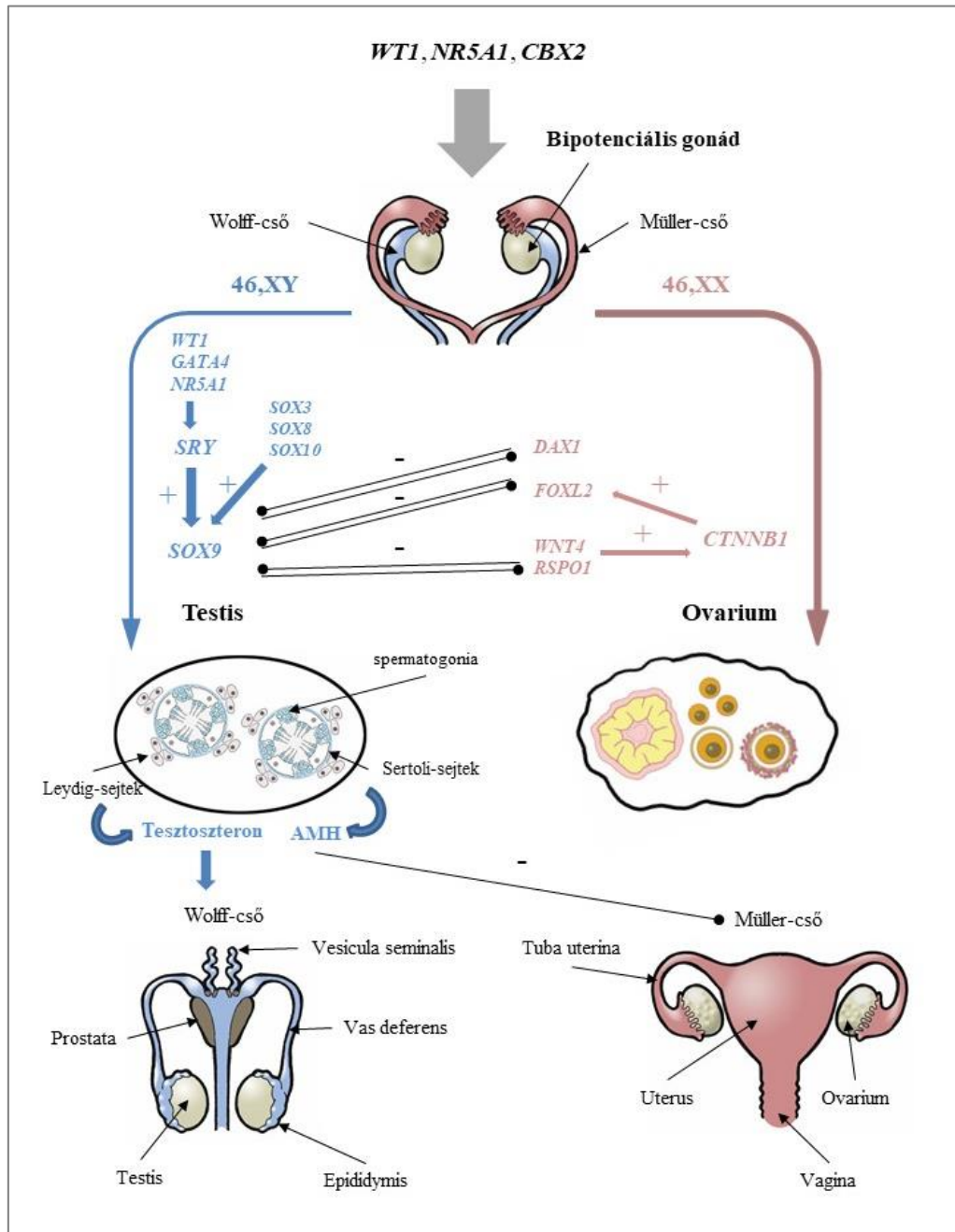
3.3. Nemi differenciálódási zavarok (differences of sex development, DSD) osztályozása, etiológiája és genetikája

3.3.1. A nemi differenciálódás folyamata

A nemi differenciálódás a 6. gesztációs héten indul és pubertáskorban nemi éréssel, valamint a reprodukív működés kialakulásával fejeződik be. Az embrió nemi kromoszóma összetétele (XY vagy XX) határozza meg a bipotenciális gonád testis vagy ovárium irányú differenciálódását, a kialakult gonád által termelt nemi hormonok pedig a belső és külső nemi szervek fejlődését (35).

A nemi differenciálódás komplex folyamat, a normál irányú fejlődéshez számos gén megfelelő időben és helyen történő koordinált expressziója szükséges. Ez a folyamat sok ponton szabályozott, még ma sem ismert teljes egészében, hogy ezek a gének hogyan hatnak egymásra. A 6. gesztációs hétig az embrió gonádja bipotenciális. A férfi irányú differenciálódás elindításához Y kromoszóma szükséges, azon belül is a rövid karon (Yp11.2) elhelyezkedő szex-determináló gén (sex-determining region Y, *SRY*). Ennek hiányában (XX kariotípus) női irányú differenciálódás indul el, amelyet nagyon sokáig a „passzív vagy default” elnevezéssel illették. Azóta számos bizonyíték cáfolta ezt a hipotézist. A női és férfi irányú differenciálódást ugyanis eltérő gének expressziói eredményezik, amelyek ezen felül antagonisztikus hatást fejtenek ki az ellentétes útvonal génjeire (36). Az *SRY* gén egyik legfontosabb feladata a *SOX9* gén expressziójának elindítása, amely a here Sertoli-sejtjeinek fejlődéséért és rajtuk keresztül az anti-Müllerian hormon (AMH) termeléséért felelős. Ennek hatására a Müller-cső visszafejlődik és a Wolff-csőből elindul a belső és külső férfi nemi szervek kialakulása. Ezt a folyamatot támogatják a here Leydig-sejtjei által termelt androgének is. A here fejlődésében számos egyéb génnek is fontos szerepe van (pl. *GATA4*, *NR5A1*, *SOX3*, *SOX8*, *SOX10*, *WT1*), amelyek mutációi a here fejlődési zavarát és társuló veleszületett eltéréseket okozhatnak. Az

ovárium irányú differenciálódásért felelős gének (pl. *DAX1*, *FOXL2*, *RSPO1*, *WNT4*) a folliculusok megfelelő differenciálódása mellett gátolják a férfi irányú *SOX9*-es útvonal kifejeződését is (3. ábra) (36, 37).



3. ábra A nemi differenciálódás folyamata 46,XY kariotípusú embrióban az SRY gén kifejeződésének hatására a bipotenciális jellegű embrionális gonádból here alakul ki. A here Leydig-sejtjei által termelt androgének hatására a Wolff-csőből férfi belső és a külső nemi szervek differenciálódnak, míg a Sertoli-

sejtek által szekretált AMH a Müller-cső visszafejlődését eredményezi. 46,XX kariotípusú embrióban a bipotenciális gonádból ovárium, a Müller-csőből női belső nemi szervek differenciálódnak (36, 37). Rövidítések: AMH: anti-Müllerian hormon (anti-Mullerian hormone), *CBX2*: Chromobox 2, *CTNNB1*: Catenin beta 1, *DAX1*: Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1, *FOXL2*: Forkhead box L2, *GATA4*: GATA binding protein 4, *NR5A1*: Nuclear receptor subfamily 5 group A member 1, *RSPO1*: R-spondin 1, *SOX3*: SRY-box transcription factor 3, *SOX8*: SRY-box transcription factor 8, *SOX9*: SRY-box transcription factor 9, *SOX10*: SRY-box transcription factor 10, *SRY*: Sex-determining region Y, *WNT4*: Wnt family member 4, *WT1*: WT1 transcription factor.

3.3.2. A DSD osztályozása

A DSD a kromoszómális, gonadális vagy fenotípusos nem veleszületett eltéréseit jelenti (38). Klinikailag nagyon heterogén betegcsoport, incidenciája a fenotípus súlyosságának megfelelően változik. A klinikai kép spektruma a legenyhébb hypospadiasistól (1:250 fiúgyermek), a bizonytalan külső nemi szerveken át (1:4500) a teljes nemváltásig terjed (1:20 000). A tünetek leggyakrabban már újszülöttkorban láthatók, ritkán a nemi érés időszakában, pubertáskorban jelennek meg (6, 7). 2006-ban új nomenklatúra és osztályozás került bevezetésre (39). Az új irányelvek kidolgozásának célja a korai diagnózis, a betegek megfelelő ellátásához szükséges kezelési stratégiák időben történő kialakítása volt, hangsúlyozva az ellátás multidiszciplináris jellegét, amely gyermekgyógyász-endokrinológus, sebész, urológus, nőgyógyász, klinikai és laboratóriumi genetikus és pszichológus szoros együttműködését jelenti. Az új osztályozás alapja a nemi kromoszóma összetétel, amely alapján a DSD-k három csoportja különíthető el: (i) a nemi kromoszómák eltérései által okozott DSD-k: 45,X; 47,XXY; 45,X/46,XY; 46,XX/46,XY; (ii) 46,XY DSD és (iii) 46,XX DSD. Ez utóbbi két csoporton belül további alcsoportok képezhetők a gonád fenotípusa és az androgén termelés/hatás zavara alapján (39).

3.3.3. A DSD etiológiája

A DSD kialakulásáért genetikai tényezők, környezeti káros hatások, hormonális eltérések és epigenetikai változások egyaránt felelősek (40-42). Anyai eredetű káros hatások közé tartoznak a terhesség alatt szedett különböző gyógyszerek (pl. androgének, szintetikus progesztagenek), nemi hormon termelődésével járó kórállapotok (pl. androgénszekretáló tumorok, hyperandrogenismus, virilizáló gesztációs luteoma), valamint a környezetből származó ösztrogénszerű kémiai anyagok (6, 43, 44).

A DSD háttérében álló genetikai eltérések közül a nemi kromoszómák számbeli és szerkezeti eltéréseit ismerték fel legkorábban, amelyek méretüknél fogva a DSD-n kívül egyéb tüneteket is mutató szindrómás formát eredményeznek (pl. Turner, Klinefelter) (3).

Az *SRY* gén 1990-es első leírása után intenzív kutatás kezdődött a nemi fejlődést és differenciálódást befolyásoló gének felfedezése és mutációik patogenitásának bizonyítása céljából (45). Szekvenciaanalízis segítségével a „46,XY DSD” és a „46,XX DSD” csoporton belül számos kisskálájú mutáció került leírásra, ezek az esetek zömében forrópontok nélküli, egyedi mutációk voltak (46). A nemi differenciálódást koordináló génekben leginkább funkcióvesztéssel járó kisméretű deléciók, inszerciók, missense, nonsense és splicing mutációk kerültek azonosításra. A genetikai heterogenitás mellett nehezítette az esetek felderítését a mutációk okozta fenotípus nagyfokú változatossága, a változó expresszivitás és csökkent penetrancia (7, 47-49). Az új generációs szekvenálási technikák bevezetését követően a gének egyenkénti vizsgálatát felváltotta az ún. DSD-specifikus génpanelek alkalmazása, amelyek segítségével lehetővé vált az ismert funkciójú gének mutációinak szűrése egyetlen lépésben. Az ilyen módon nyert jelentős mennyiségű új információ ellenére a DSD esetek nagy részében (kb. 80%) továbbra sincs molekuláris genetikai diagnózis (7).

A CNV-k DSD-ben betöltött patogenetikai szerepéről – a szekvenciaszintű mutációkhoz képest – viszonylag kevés információval rendelkezünk. Ugyanakkor egyre több irodalmi adat

utal a CNV-k vizsgálatának szükségességére DSD-ben aCGH módszer alkalmazásával, ami a kódoló és nem kódoló genomi régiók kópiaszám eltéréseit egyaránt képes kimutatni. Az eddig leírt kódoló szakaszokat érintő nagy méretű CNV-k az ismert DSD gének közül leggyakrabban az *NR5A1*, az *NR0B1* és a *DMRT1* géneket tartalmazták (50-52). A csak néhány exont érintő, parciális géndeléciót okozó kisméretű CNV-k ritkábbak, a *WWOX* és *DMRT1* gének esetében kerültek leírásra (53, 54). A nem kódoló genomi szakaszokat érintő CNV-k a DSD-k esetében különösen nagy jelentőséggel bírnak, mivel az itt található ismert szabályozó elemek deléciója/duplikációja megváltoztatja a DSD gének expresszióját (52, 55, 56). A legjobban tanulmányozott, nem kódoló szabályozó régió a *SOX9* gén előtti kb. 2 Mb-os szakasz, amelyen belüli CNV-k 46,XX és 46,XY DSD-t egyaránt okozhatnak (57, 58).

Az általunk vizsgált DSD-vel diagnosztizált lány gyermek esetében a nemi differenciálódási zavarokért felelős gének közül az *NR5A1* gént érintő patogén CNV kerül bemutatásra.

3.3.4. Az *NR5A1* szerepe a DSD kialakításában

Az *NR5A1* (korábbi neve Steroidogenic factor 1, *SF-1*) gén által kódolt fehérje egy magreceptor, amely kulcsfontosságú a reproduktív szervek és a mellékvese fejlődésében, valamint a szteroid hormonok szintézisében. A bipotenciális gonádban termelődve a férfi irányú differenciálódást segíti elő az *SRY* és *SOX9* gének expressziójának fokozása révén, a kialakult herében pedig stimulálja a Sertoli-sejtek AMH termelését és a Leydig-sejtek tesztoszteron szintézisét. A 9q33.3 kromoszómaregióba lokalizálódó *NR5A1* gén 7 exonból épül fel, amelyekből az első exon nem kódoló (59). A DSD-ben szerepet játszó gének közül az *NR5A1* gén heterozigóta mutációi a leggyakoribbak, 46,XY DSD esetén kb. 10–20%-ban fordulnak elő (49, 60). Az *NR5A1* mutációkat olyan 46,XY DSD esetekben írták le először, amelyekhez mellékvese elégtelenség is társult (61), későbbi tanulmányok azonban a két elváltozás állandó

társulását nem erősítették meg (62, 63). A mutáció okozta haploinsufficiencia autoszómális domináns öröklődésű, leginkább 46,XY DSD-t eredményez, de leírták 46,XX DSD-ben is. A mutációk okozta klinikai kép nagyon heterogén, a hypospadiastól a bizonytalan külső nemi szerveken át a teljes nemváltásig terjed. A gonadotropin, tesztoszteron és AMH koncentrációk is nagyon különbözőek lehetnek az egyes betegekben, emellett a gonádok hisztológiai képe sem egységes (64). Mindezek a tényezők nagyon megnehezítik az *NR5A1* mutációs esetek felismerését, diagnosztizálását.

3.4. A genetikai háttér tisztázásának klinikai jelentősége CHD-ban és DSD-ben

Az általunk vizsgált két betegcsoport közös vonása, a nagyfokú genetikai és klinikai heterogenitás, valamint az etiológiai háttér korlátozott ismerete. A genotípus-fenotípus összefüggések meghatározását nagymértékben nehezíti, hogy ugyanaz a fenotípus különböző genetikai eltérések eredményeként is kialakulhat, vagy fordítva, ugyanaz a mutáció a CHD vagy DSD többféle fenotípusú formáját is eredményezheti. A csökkent penetrancia miatt egy mutáció hordozó akár teljesen tünetmentes is lehet, a változó expresszivitás következtében a mutációt hordozók között eltérő súlyosságú CHD-k vagy DSD-k jelenhetnek meg.

Az elmúlt évtizedben a genomi vizsgáló módszerek (aCGH, WES, WGS) széleskörű alkalmazásával számos új, patológiás jelentőségű genetikai eltérést azonosítottak mindkét betegcsoportban (3, 65).

Ismereteink rohamos bővülése ellenére nagyon alacsony (20–30%) a genetikai diagnózissal rendelkező CHD-s betegek aránya (66). A diagnosztikai módszerek fejlődésével és a betegek műtėti ellátásának javulásával ugyanakkor folyamatosan emelkedik a CHD prevalenciája és a reprodukív kort elérő felnőttek száma. 1998 és 2007 között 35%-kal nőtt azoknak a szülő nőknek a száma, akiket valamilyen CHD-val diagnosztizáltak (67). Az érintett szülők utódainál a CHD ismétlődési kockázata 3–8%, egyenesági rokon érintettségekor 1–6%

(3, 68). A CHD-s betegek megfelelő klinikai ellátásához ezért egyre inkább szükséges a genetikai kivizsgálás, amely eredményének birtokában az alábbi kérdésekre keresünk választ: (i) mi a CHD ismétlődési kockázata, (ii) hordozzák-e a genetikai eltérést egyenesági rokonok, (iii) vannak-e (addig fel nem ismert) extrakardiális tünetek, (iv) társuló tünetként előfordul-e az idegrendszer fejlődési zavara, (v) milyen az adott CHD prognózisa, milyenek lesznek a beteg életkilátásai (4).

A DSD gyakran társul bizonytalan külső nemi szervekkel, későbbi életkorban infertilitással, nemi identitászavarral, késői következményként a gonádok malignus átalakulásával. A pontos diagnózis megadásához, a betegek megfelelő nemi fejlődésének kialakításához, a korrekciós műtétek megtervezéséhez, illetve a prognózis megítéléséhez elengedhetetlen a genetikai háttér ismerete, ami ma még csak a betegek kb. 20%-ában valósul meg (7).

4. CÉLKITŰZÉSEK

Tudományos munkám során patogenetikai szereppel bíró CNV-k kimutatását tűztem ki célul olyan fejlődési rendellenességekben, amelyek genetikai háttere napjainkban is nagymértékben tisztázatlan. Az eredmények birtokában genotípus-fenotípus összefüggések meghatározásával arra kerestem választ, hogy a kimutatott CNV milyen módon járul hozzá a betegség kialakulásához, milyen összefüggést mutat a klinikai képpel.

- 1.) Céлом volt szindrómás CHD-val diagnosztizált betegek esetében patogén szubmikroszkópos CNV-k azonosítása aCGH és MLPA módszer alkalmazásával. Eredményeim alapján célul tűztem ki olyan kivizsgálási algoritmus kialakítását, amelynek segítségével nagy diagnosztikai hatékonysággal igazolhatók patogenetikai jelentőségű CNV-k ezen betegek genetikai kivizsgálása során, figyelembe véve a hazai lehetőségeket.
- 2.) Vizsgálataim során célul tűztem ki extrakardiális tüneteket nem mutató, izolált CHD-val diagnosztizált betegek CNV irányú genetikai vizsgálatát.
- 3.) Munkám során céлом volt prenatalisan diagnosztizált, izolált és komplex CHD-t mutató abortumok kamrai szövetmintáiból patogén CNV-k azonosítása.
- 4.) DSD-ben a kisméretű, egy vagy néhány exont érintő CNV-k nagyon ritkán vizsgált mutációtípusok. Egy 46,XY DSD-vel diagnosztizált lány gyermek esetében célul tűztem ki a kórkép kialakításáért felelős genetikai eltérés azonosítását a nemi differenciálódásban szerepet játszó gének intragénikus kópiaszám eltéréseinek vizsgálata révén.

5. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Betegek

A genetikai vizsgálatokra a páciensek vagy szüleik tájékozott írásbeli beleegyezését követően került sor a Helsinkai Nyilatkozat alapelveinek, illetve a genetikai kutatásokra vonatkozó hazai törvényi szabályozásnak a figyelembe vételével.

5.1.1. *CHD-val diagnosztizált betegcsoportok*

5.1.1.1. *Szindrómás CHD-val diagnosztizált betegek*

A szindrómás CHD-ban szenvedő betegek (n=33) vizsgálati mintái a Debreceni Egyetem, Klinikai Központ, Gyermekgyógyászati Klinika, a Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Genetikai Intézet és a zalaegerszegi Zala Megyei Szent Rafael Kórház Klinikai Genetika szakrendeléséről érkeztek. A betegek fenotípusra vonatkozó adatait az őket gondozó klinikai genetikus szakorvosok bocsátották rendelkezésünkre. A betegek életkora 2–18 év között volt, a nemek eloszlása: fiú:lány 16:17.

5.1.1.2. *Izolált CHD-val diagnosztizált betegek*

Az izolált CHD-s esetek (n=16) a Debreceni Egyetem, Klinikai Központ, Gyermekgyógyászati Klinika Kardiológia szakrendelésének beteganyagából és a Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Genetikai Intézetből származtak. A betegek életkora 10 hónap és 46 év között volt, a nemek aránya: fiú:lány 9:7.

5.1.1.3. Abortumokból származó minták

A Semmelweis Egyetem I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján képző eljárásokkal (ultrahang, echocardiographia) CHD-val diagnosztizált magzatok esetében mesterséges terhességmegszakításra került sor. Az abortumok patológiai vizsgálata minden esetben igazolta a CHD-t. Az abortumok átlagos gesztációs kora 20,85 (19–23) hét volt. A genetikai vizsgálatok az abortumok kamrai szövetmintáiból (n=18) történtek.

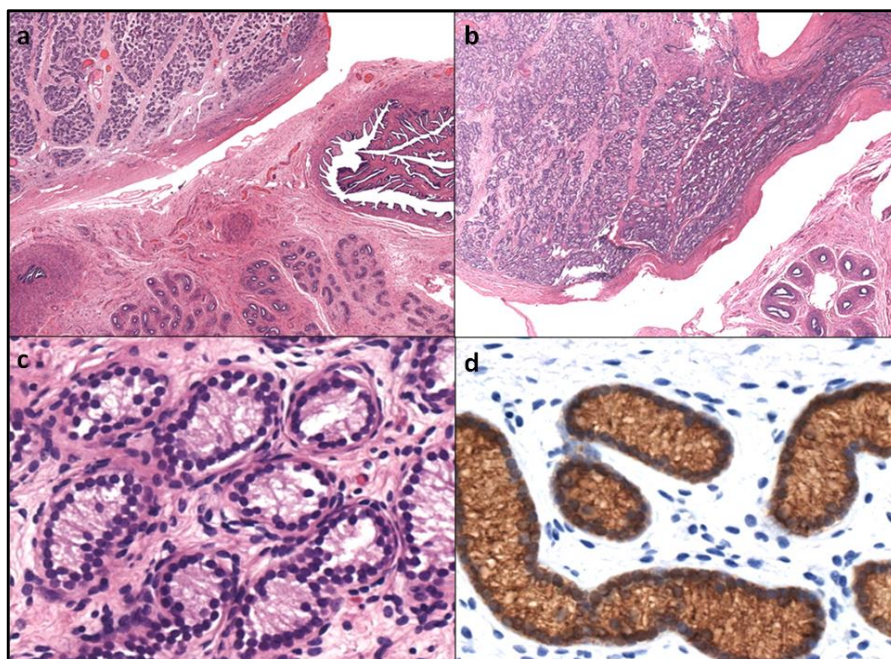
5.1.1.4. A vizsgálatok menete

A genetikai tesztek sorrendjét a betegek részletes klinikai kivizsgálása során leírt fenotípusos jegyek és a CHD jellege határozta meg. A szindrómás csoport betegeinél a rutin diagnosztikai kivizsgálás hagyományos G-sávós citogenetikai analízissel kezdődött a nagy méretű kromoszómaeltérések kimutatása/kizárása céljából. Ennek negativitása vagy a talált eltérés pontosításának szükségessége esetén, valamint azokban az esetekben, amikor a tünetek alapján egy konkrét mikrodéléción vagy mikroduplikáción szindróma gyanúja merült fel, általam végzett célzott FISH vagy MLPA vizsgálatokra került sor. Amennyiben ezek a tesztek is negatív eredménnyel zárultak, aCGH vizsgálatot végeztünk. Az izoláltnak tekintett CHD-s csoport esetén, extrakardiális tünetek hiányában célzott MLPA vizsgálatokra került sor.

5.1.2. DSD tüneteit mutató beteg

Az általunk vizsgált lány gyermek fiatal szülőpár első gyermekeként született spontán módon a 36. gesztációs héten, 3200 grammal, 9/9 Apgar státuszban. Megszületését követően fizikális vizsgálattal női külső nemi szerveket és clitoris hypertrophiát (Prader I.), minor rendellenességként a kezek 5. ujjainak clinodactyliáját és a 2-3. lábujjak bőrt érintő syndactyliáját írták le. A családi anamnézis negatív volt genetikai betegségek, DSD, fertilitási zavar és korai petefészek elégtelenség tekintetében. Kilenc hónapos korában akut hasi fájdalom

és hányás miatt kórházi felvétele történt, ekkor észlelték kétoldali lágyéksérvét, amelyet az ultrahangvizsgálat gonádként azonosított. Laparoszópos vizsgálattal kevert belső nemi szerveket, kis uterust, bal oldalon tuba uterinát, jobb oldalon mellékherének tűnő képletet írtak le. A gonádokat a hasüregbe helyezték, a belőlük vett biopsziás minta szövettani vizsgálata heréket igazolt spermatogóniumok nélkül, kevés Leydig-sejttel. A veleszületett kariotípus meghatározás SRY-pozitív 46,XY kariotípust igazolt. A komplett androgén inszenzitivitási szindróma diagnózisa kizárásra került, mivel a beteg laboratóriumi vizsgálata során alacsony tesztoszteron értéket ($<0,15$ nmol/L) mértek. A gonadotropin hormonok értékei az alábbiak voltak: folliculus stimuláló hormon (FSH) 6,4 mIU/L (ref.: 0,1–6 mIU/L), luteinizáló hormon (LH) 1,5 mIU/L (ref.: 0,1–4 mIU/L). Kizárásra került a mellékvesekéreg elégtelenség is, mivel a kortizol és adrenocorticotropin értékek a normál tartományba estek. A szülők lányként nevelték gyermeküket. Endokrinológushoz csak 5 és fél éves korában került a gyermek. Az akkor indikált MRI- és hasi ultrahangvizsgálat során uterus nem volt azonosítható és egyéb Müller-cső eredetű belső női nemi szerv sem. Az ebben az időben végzett AMH meghatározás értéke (87,3 pmol/L) a női referencia tartomány fölé (2–32 pmol/L), a férfi referencia tartomány alá (400–1300 pmol/L) esett. Ez alapján 46,XY DSD parciális gonad dysgenesissel (GD) diagnózis született, amit alátámasztott a gonádok korábbi szövettani képe is. Ebben az életkorban laparoszóphia során eltávolították a dysgenetikus gonádokat, hogy megelőzzék azok malignus átalakulását. Az urethro-cysto-vaginoscopia során uterus nélküli, vakon végződő vaginát írtak le. Az eltávolított gonádokból újabb szövettani vizsgálat történt. A jobb oldali gonádban here, mellékhere, ductus deferens és tuba átmetszetre emlékeztető terület volt látható. A bal oldali gonádban here és mellékhere részleteket írtak le. A seminiferosus tubulusok mindkét gonádban csak Sertoli-sejteket tartalmaztak spermatogóniumok nélkül (4. ábra).



4. ábra A gonádok szövettani vizsgálatának eredménye **a.)** A jobb oldali gonád szövettani képe (hematoxylin-eosin (HE) festés, 20x nagyítás), **b.)** A bal oldali gonád szövettani képe (HE festés, 20x nagyítás), **c.)** Seminiferosus tubulusok Sertoli-sejtekkel (HE festés, 400x nagyítás), **d.)** Seminiferosus tubulusok Sertoli-sejtekkel (inhibin-alpha immunhisztokémia, 400x nagyítás).

5.2. Módszerek

5.2.1. Citogenetikai vizsgálat

A veleszületett kariotípus meghatározása Na-heparinnal antikoagulált perifériás vérből történt. A phytohemagglutininval stimulált vizsgálati minták 72 órán át történő tenyésztését, a kromoszómapreparálást és a Giemsa festéssel (Merck, Darmstadt, Germany) történő sávozást standard protokoll alkalmazásával végezték. Betegenként 15 metafázisú sejtet analizáltak LUCIA kariotipizáló szoftver (LUCIA Cytogenetics, Czech Republic) segítségével. A kariotípus leírása az aktuális nemzetközi nomenklatúrának (ISCN) megfelelően történt.

5.2.2. *Fluoreszcens in situ hibridizáció*

A FISH vizsgálatokhoz a kromoszómapreparálás során nyert sejtszuspenziót használtuk. A CHD-ban szenvedő betegek mintáin az alábbi FISH próbák kerültek alkalmazásra: DiGeorge/VCFS TUPLE1, Subtelomer (4p/4q, 6p/6q), Cri-du-chat és SOTOS (Cytocell, Rainbow Scientific Inc., Windsor, CT), 24X-Cyte (MetaSystems, Altlussheim, Germany). A DSD-s beteg esetében az *SRY* génre és az X kromoszóma centromerikus régiójára specifikus próbát (Cytocell, Rainbow Scientific Inc., Windsor, CT) használtuk. Minden esetben a gyártó által megadott protokollnak megfelelően történt a vizsgálat kivitelezése. A szignálmintázatok értékelését Zeiss Axioplan 2 fluoreszcens mikroszkóppal (Carl Zeiss, Jena, Germany) és ISIS szoftver (MetaSystems, Altlussheim, Germany) használatával végeztük.

5.2.3. *DNS izolálás*

A DNS alapú genetikai vizsgálatok kivitelezéséhez a betegek K₃-EDTA-val (etiléndiamin-tetraecetsav) vagy Na-citráttal alvadásgátolt perifériás vérmintáiból és az abortumok kamrai szövetmintáiból a genomiális DNS izolálás QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) alkalmazásával történt, a gyártó ajánlásainak megfelelően. Az izolált DNS minták koncentrációjának és tisztaságának ellenőrzésére a NanoDrop 2000/2000c UV-Vis spektrofotométert (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) használtuk.

5.2.4. *Multiplex ligáció-függő próba amplifikáció*

Az MLPA vizsgálat egy szemi-kvantitatív módszer, amely során a vizsgálandó minta rövid DNS szekvenciáinak relatív kópiaszám meghatározása történik. A vizsgálat során DNS templáthoz hibridizált, ligációval összekapcsolt oligonukleotidok amplifikálását végezzük. A különböző lókuszokhoz/génekhez kapcsolódó próbapárok töltelékszekvenciái eltérő hosszúságúak, így lehetővé teszik a próbapárok amplifikálása során keletkezett PCR termékek

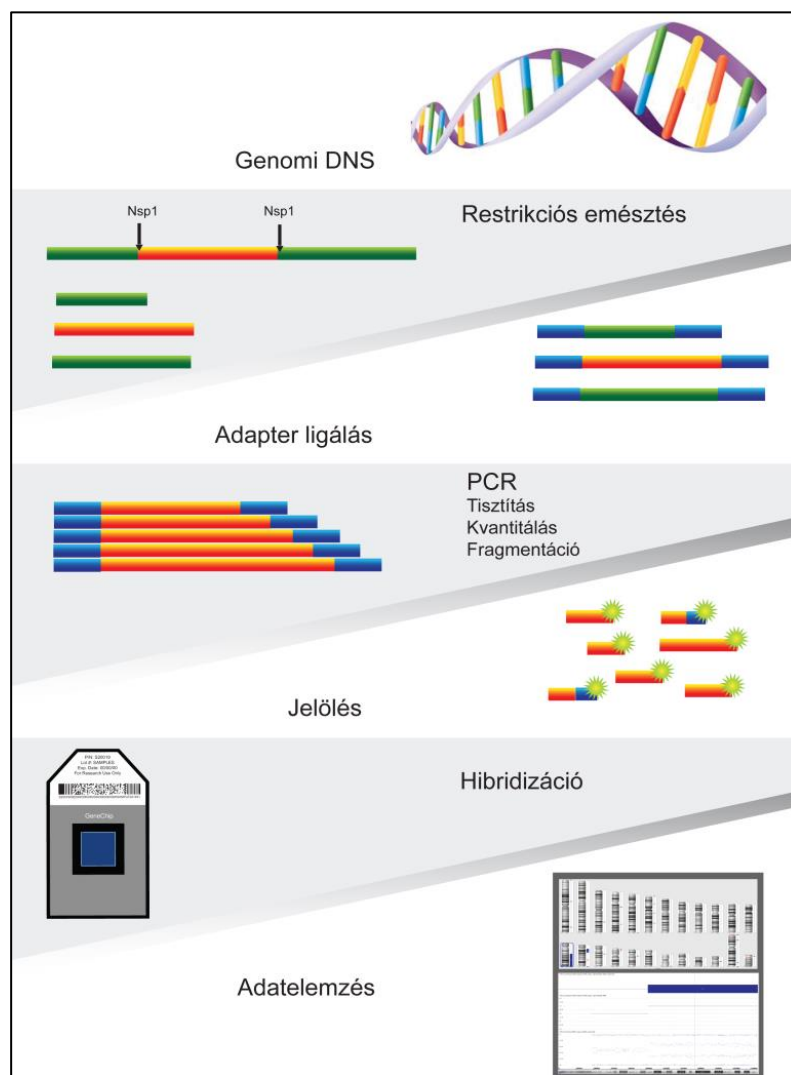
méret szerinti elválasztását kapilláris elektroforézissel. A beteg mintáinak kópiaszámát a párhuzamosan futtatott normál minták kópiaszámához viszonyítjuk. Vizsgálataink során a PCR termékek szeparálása ABI-3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA) készüléken történt, a relatív kópiaszámok meghatározása pedig Coffalyser szoftver (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) segítségével. Mintán belüli és minták közötti normalizációt követően a vizsgált régiók kópiaszámát a kapott hányadosok alapján az alábbiak szerint határoztuk meg: 0,65 és 1,30 közötti érték normál kópiaszámnak felelt meg, 0,65 alatti deléciót, 1,30 feletti pedig duplikációt jelölt.

Szívfejlődési rendellenességek MLPA vizsgálatakor két kitet alkalmaztunk. A SALSA MLPA P250-B2 DiGeorge kit 48 régióra specifikus próbát tartalmaz: 29 próba a 22q11.2-es kromoszómarégióhoz bekötődve alkalmas a DiGeorge szindróma (DGS) és ugyanezen régió mikroduplikációjának következtében kialakuló Cat eye szindróma különböző töréspontú variánsainak azonosítására; 19 próba fedi le a DGS II. lókuszt (10p14) és a DGS-hez hasonló fenotípussal járó mikrodeléciós régiókat (4q35, 8p23, 9q34.3, 17p13.3, 22q13). A SALSA MLPA P311-B1 CHD kit olyan gének kópiaszám eltéréseit vizsgálja, amelyek mutációi CHD kialakulásához vezethetnek: *GATA4* (8p23), *TBX5* (12q24), *NKX2.5* (5q35), *BMP4* (14q22), *CRELD1* (3p25) és a 22q11.2 régió. A DSD-vel diagnosztizált beteg esetén a SALSA MLPA P185-C2 Intersex próbamixet alkalmaztuk, amely az alábbi génekre specifikus próbákat tartalmazza: *NR0B1/DAX1*, *CXorf21*, *SOX9*, *SRY*, *ZFY*, *WNT4*, *NR5A1* (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands).

5.2.5. Teljes genom array komparatív genomi hibridizáció

Az aCGH vizsgálatokat CytoScan 750K Array (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) alkalmazásával végeztük. Ez a típusú citogenetikai microarray 750 436 oligonukleotid próbát tartalmaz (550 000 egyedi, nem polimorf CNV próba és 200 436 SNP

próba). A citogenetikai microarray által lefedett géneken belül (ISCA, OMIM, RefSeq, X kromoszómán lévő és tumorgének) az átlagos felbontóképesség 1737 bp, a teljes, intra- és intergénikus átlagos felbontóképesség 4125 bp. A módszer kivitelezése, az egyes reakciók paramétereinek beállítása és alkalmazása a gyártó által megadott protokoll alapján történt. A vizsgálat lépései a következők (5. ábra):



5. ábra Az aCGH folyamatábrája

A vizsgálati protokoll lépései:

- 1.) Restrikciós emésztés: 250 ng genomi DNS emésztése NspI restrikciós endonukleázal, amely során 200–1100 bp hosszúságú DNS fragmentek képződnek.
- 2.) Ligálás: az emésztés során keletkezett DNS fragmentek két végéhez primerek bekötődéséhez szükséges ún. adapter szekvenciák kapcsolása DNS ligáz enzim segítségével.
- 3.) PCR: az adapter szekvenciákat tartalmazó DNS darabok amplifikálása a gyártó által definiált paraméterekkel.
- 4.) A PCR termékek méreteloszlásának és minőségének ellenőrzése 2%-os TBE gélen.
- 5.) Az amplifikált PCR termékek tisztítása a gyártó által biztosított mágneses alapú tisztító gyöngyökkel.
- 6.) A PCR termékek koncentrációjának és tisztaságának meghatározása NanoDrop 2000/2000c UV-Vis spektrofotométeren. Az optimális koncentráció $>3,0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.
- 7.) A PCR termékek fragmentálása. Mivel az általunk használt DNS chip-en rögzített oligonukleotidok 25 nt hosszúságúak, ahhoz, hogy az amplifikált PCR termékek hatékonyan tudjanak hozzájuk hibridizálni, azok további fragmentálása szükséges. Ennek során 25–125 bp hosszúságú DNS fragmentek keletkeznek, amelyek hibridizációja már optimális.
- 8.) A fragmentálás hatékonyságának ellenőrzése 4%-os TBE gélen.
- 9.) A DNS fragmentek jelölése fluoreszcens festékkel (Phycoerythrin).
- 10.) A jelölt termékek felvitele DNS-chipre, majd hibridizáció Affymetrix GeneChip Hybridization Oven 645 típusú kamrában 16–18 órán keresztül.
- 11.) A hibridizáció során nem bekötődött, jelölt DNS fragmentek lemosása Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450 típusú mosóegységen.

12.) A DNS-chip fluoreszcencia intenzitásának beolvasása Affymetrix GeneChip Scanner segítségével.

A kapott eredmények analíziséhez a Chromosome Analysis Suite (ChAS) v2.0 szoftvert használtuk, az adatokat a GRCh37 (hg19) humán referencia genomhoz hasonlítottuk. Első lépésként ellenőriztük a minták minőségét jellemző paramétereket ($MAPD \leq 0,25$; $SNPQC \geq 15$; $Waviness-SD \leq 0,12$). Az elemzéskor valós delécióknak azokat a CNV-ket tekintettük, amelyek legalább 10, duplikációnak pedig, amelyek legalább 20 egymás után elhelyezkedő próbát tartalmaztak. A CNV-k osztályozása (patogén, valószínűleg patogén, ismeretlen klinikai jelentőségű, valószínűleg benignus, benignus) a 2011-ben leírt ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) irányelvei (69) szerint történt az alábbi adatbázisok alkalmazásával: DGV (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>), UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>), DECIPHER (<https://decipher.sanger.ac.uk/>), ISCA (<http://dbsearch.clinicalgenome.org/search/>), OMIM (<https://omim.org/>), PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). A CNV-k mellett a ≥ 10 Mb méretű heterozigótaság-vesztést tartalmazó kromoszómális régiókban vizsgáltuk a genomikus imprinting mintázat változásának lehetséges hatását.

5.2.6. Teljes exom szekvenálás

A DSD-vel diagnosztizált beteg genomi DNS mintájának teljes exom szekvenálása Hongkongban, a Beijing Genomics Institute-ban történt Complete Genomics platform alkalmazásával. Az adatok értékelésére a budapesti Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet, Klinikai Genetika és Endokrinológiai Laboratóriumában került sor a DSD-t okozó gének (*LIM1*, *CBX*, *SOX9*, *DHH*, *WT-1*, *SRY*, *AR*, *NR5A1*, *CYP17*, *HSD17B3*, *DMRT1*, *DAX*, *AMH*, *WNT4*, *RSPO1*, *CTNNB1*, *MAP3K1*, *NR0B1*, *AMHR2*, *LHCGR*, *FGF9*) célzott mutáció analízisével (Genome Analysis Toolkit, GATK szoftver).

5.2.7. Az *NR5A1* génben detektált CNV megerősítése QMPSF módszerrel

Az *NR5A1* gén 5-ös és 6-os exonjának MLPA módszerrel kimutatott delécióját, egy kvantitatív, multiplex PCR technika, QMPSF (Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments) segítségével validáltuk (70, 71). A vizsgálathoz az *NR5A1* génre és 2 kontroll génre (*HSD17B3*, *USH2A*) tervezett primereket (0,2 $\mu\text{mol/L}$) (2. táblázat), és egy univerzális 5' fluoreszcens festékkel jelölt primert (6FAM-M13: 6FAM-5'-TGTAACGACGGCCAGT-3', 0,8 $\mu\text{mol/L}$) (71) és MyTaq HS Mixet (Bioline, London, UK) használtunk. A módszer optimalizálása után alkalmazott PCR hőmérsékleti paraméterei a következők voltak: denaturálás (95°C – 2 min), 29 ciklusos amplifikáció (95°C – 15 sec, 60°C – 20 sec, 72°C – 15 sec), végső elongáció (72°C – 5 min). A különböző hosszúságú fragmentek ABI-310 (Applied Biosystems, Foster City, CA) szekvenáló készüléken kerültek elválasztásra. A CNV meghatározásához első lépésként a vizsgált exonok fluoreszcencia intenzitását a kontroll gének amplifikált exonjainak fluoreszcencia intenzitásához viszonyítottuk (mintán belüli normalizáció), majd minták közötti normalizációt végeztünk, párhuzamosan futtatott egészséges kontroll minták ugyanezen exonjainak fluoreszcencia intenzitását figyelembe véve.

2. táblázat A QMPSE reakcióhoz alkalmazott primerpárok

Gén	Exon	Primer szekvencia	PCR termék hosszúság (bp)
<i>NR5A1</i>	5	Forward: 5'-GCGTGCCTCTTCCTTCCA-3'	143
		Reverz: 5'-GATGCTGCCCTCCTTGCC-3'	
	6	Forward: 5'-GGAGTTTGTCTGCCTCAAGT-3'	210
		Reverz: 5'-AATGAGTAAGGGAGGGGTCC-3'	
<i>HSD17B3</i>	11	Forward: 5'-AAGGCTGCTCCTGACACACT-3'	191
		Reverz: 5'-CCTCCATCTTCAGCGGACTA-3'	
<i>USH2A</i>	41	Forward: 5'-CCTTTCACCAGAGTCCCAGA-3'	278
		Reverz: 5'-CCATGGGCTAAGAGCAGAAG-3'	

Rövidítések: bp: bázispár (base pair), *HSD17B3*: Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 3, *NR5A1*: Nuclear receptor subfamily 5 group A member 1, PCR: polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction), *USH2A*: Usherin.

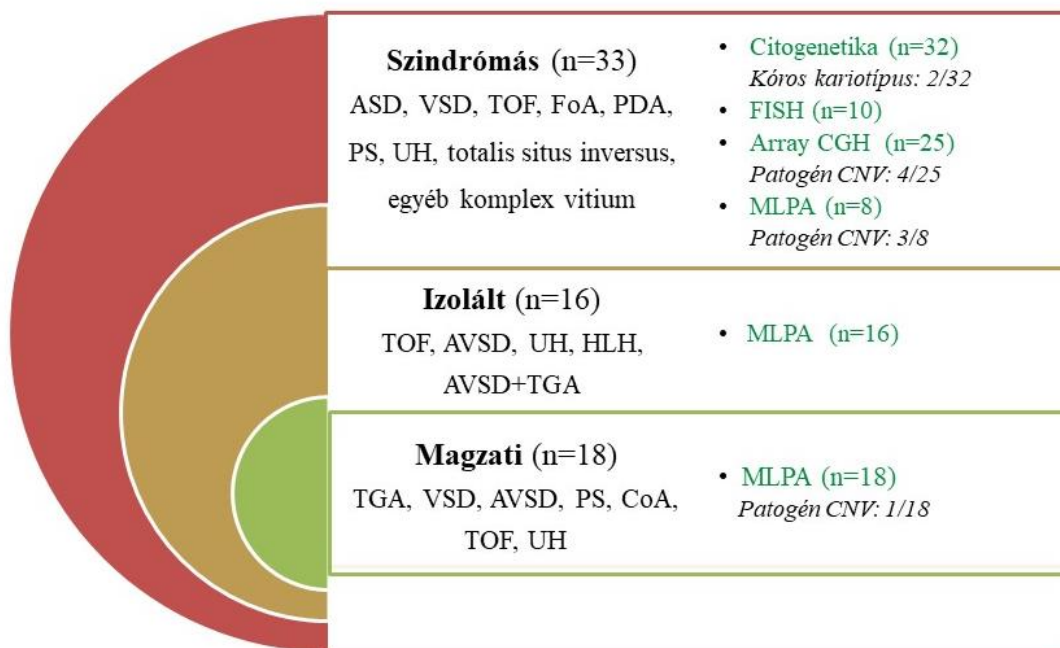
6. EREDMÉNYEK

6.1. CHD-val diagnosztizált betegcsoportok

6.1.1. Szindrómás CHD-val diagnosztizált betegek

A CHD mellett szomatikus és/vagy mentális retardációt, dysmorphiás tüneteket is mutató betegek (n=33) esetében különböző súlyosságú szívfejlődési rendellenességek fordultak elő önállóan vagy egymással kombinálódva: ASD és/vagy VSD (n=12), TOF (n=8), FoA (n=3), PDA (n=1), PS (n=1), UH (n=1), totalis situs inversus (n=1), egyéb komplex vitium (n=6).

Valamennyi szindrómás vitiummal diagnosztizált betegnél történt valamilyen genetikai vizsgálat. A rutin diagnosztikai kivizsgálás részeként 32 betegnél végeztek hagyományos kromoszóma analízist, amely során 30/32 esetben (94%) normál kariotípus igazolódott. Két beteg mintájában számbeli és szerkezeti kromoszómaaberrációkat mutattak ki (1. és 2. eset). DGS-specifikus FISH analízisre 10/33 esetben került sor, egyik mintában sem igazolódott a 22q11.2 régió deléciója. Citogenetikai microarray vizsgálatot 25/33 beteg mintáján végeztünk, amelyek közül 21 esetben nem volt kimutatható patogenetikai jelentőségű CNV. Négy beteg (1-4. eset) mintájában kódoló OMIM géneket tartalmazó patogén CNV-t azonosítottunk, ami 16%-os (4/25) detekciós rátát jelent. Nyolc (8/33) beteg mintáján kizárólag MLPA vizsgálatot végeztünk, közülük három esetben (5-7. eset) patogén CNV-t mutattunk ki (6. ábra). A szindrómás CHD-val diagnosztizált betegek genetikai vizsgálatainak eredményeit a 3. táblázat foglalja össze.



6. ábra Szindrómás és izolált CHD-val diagnosztizált betegek, valamint abortumokból származó minták genetikai vizsgálatai Rövidítések: array CGH: array komparatív genomi hibridizáció (array comparative genomic hybridization), ASD: pitvari sövényhiány (atrial septal defect), AVSD: pitvar-kamrai sövényhiány (atrioventricular septal defect), CNV: kópiaszám eltérés (copy number variant), CoA: aortaszűkület (coarctatio aortae), FISH: fluoreszcens *in situ* hibridizáció (fluorescence *in situ* hybridization), FoA: nyitott foramen ovale (foramen ovale apertum), HLH: hypoplasiás bal szívfél (hypoplastic left heart), MLPA: multiplex ligáció-függő próba amplifikáció (multiplex ligation-dependent probe amplification), PDA: nyitott ductus arteriosus (patent ductus arteriosus), PS: tüdőverőér-szűkület (pulmonalis stenosis), TGA: nagyér-transzpozíció (transposition of the great arteries), TOF: Fallot-tetralógia (tetralogy of Fallot), UH: egykamrás szív (univentricular heart), VSD: kamrai sövényhiány (ventricular septal defect).

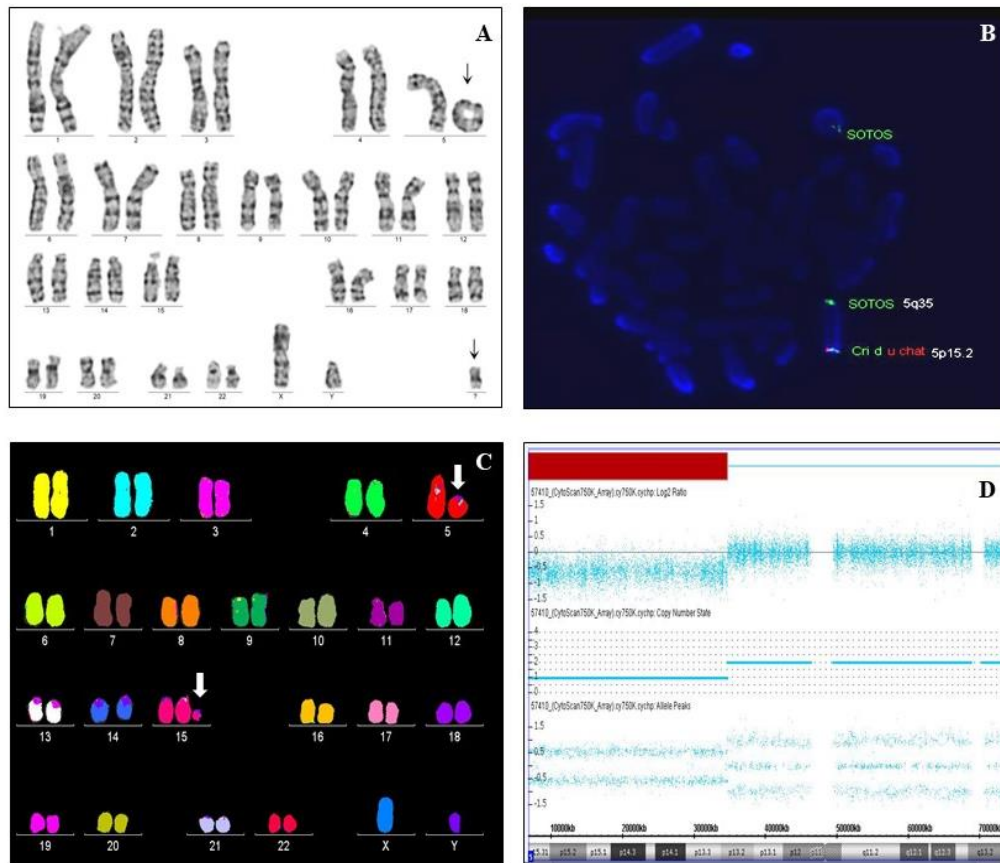
3. táblázat Szindrómás CHD-val diagnosztizált betegek genetikai vizsgálatainak eredményei és fenotípusa

Eset	Kor*/Nem	CHD	Citogenetika	Array CGH (méret)	MLPA	CNV	Fenotípus (OMIM)
1.	3 év/Fiú	ASD, PDA	47,XY,r(5),+sSMC	arr[hg19]5p15.33p13.2(113,576-34,700,951)x1 (34,58 Mb)	nem vizsgált	delécio	Cri-du-chat szindróma (MIM # 123450)
2.	9 hó/Fiú	TOF	46,XY,del(6)(q23q2?5)	arr[hg19]6q21q23.2(113,913,946-132,667,254)x1 (18,753 kb)	nem vizsgált	delécio	6q21q22 delécio szindróma
3.	3,5 év/Lány	ASD, totalis situs inversus	46,XX Végleges kariotípus: 46,XX,der(4)t(4;6)(q34.3;q25.1)mat	arr[hg19]4q34.3q35.2(178,807,365-190,957,460)x1 (12,15 Mb) 6q25.1q27(150,485,038-167,439,226)x3 (16,95 Mb)	nem vizsgált	delécio és duplikáció	4q delécio/6q duplikáció szindróma
4.	4,5 év/Fiú	CoA	46,XY	arr[hg19]8p23.1(8,093,065-11,935,465)x3 (3,842 kb)	nem vizsgált	duplikáció	8p23.1 duplikáció szindróma
5.	22 hó/Lány	FoA	46,XX	nem vizsgált	8p23.1 duplikáció	duplikáció	8p23.1 duplikáció szindróma
6.	16 év/Fiú	TOF	nem vizsgált	nem vizsgált	22q11.21 delécio	delécio	DiGeorge szindróma (MIM # 188400)
7.	6 hó/Lány	TOF	46,XX	nem vizsgált	22q11.21 delécio	delécio	DiGeorge szindróma (MIM # 188400)

Rövidítések: array CGH: array komparatív genomi hibridizáció (array comparative genomic hybridization), ASD: pitvari sövényhiány (atrial septal defect), CHD: veleszületett szívfejlődési rendellenesség (congenital heart disease), CNV: kópiaszám eltérés (copy number variant), CoA: aortaszűkület (coarctatio aortae), FoA: nyitott foramen ovale (foramen ovale apertum), MLPA: multiplex ligáció-függő próba amplifikáció (multiplex ligation-dependent probe amplification), OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man, PDA: nyitott ductus arteriosus (patent ductus arteriosus), sSMC: kis számfeletti marker kromoszóma (small Supernumerary Marker Chromosome), TOF: Fallot-tetralógia (tetralogy of Fallot). * Az aCGH vizsgálat időpontjában.

6.1.1.1. Az 1. eset klinikai jellemzői és genetikai eredményei

Anamnesztikus adatok alapján a prenatalisan végzett ultrahangvizsgálat nem igazolt morfológiai eltérést a magzatban, az anyai vérből történt, magzati kromoszóma rendellenességeket vizsgáló genetikai teszt (nem-invazív prenatalis teszt, NIPT) eredménye is negatív lett. Szülést követően az újszülöttnél ASD és PDA igazolódott. Két hetes korában látta klinikai genetikus, aki többszörös fejlődési rendellenességet írt le: alacsonyan ülő fülek, hypertelorismus, hypotonia, kis száj, laryngealis hypoplasia, microcephalia, retrognathia, syndactylia II-III, spasztikus végtagok. A gyermek jellegzetes, macskanyávogásra emlékeztető sírási hangja miatt Cri-du-chat szindróma gyanúja merült fel, amelyet az 5-ös kromoszóma rövid karjának deléciója okoz. Hagyományos kromoszóma analízissel kóros kariotípus igazolódott, 5-ös eredetű gyűrűkromoszómával és egy kis számfeletti marker kromoszómával (sSMC): 47,XY,r(5),+sSMC (7A. ábra). Az 5-ös kromoszóma szerkezeti eltérésének pontosítása céljából a Cri-du-chat régióra specifikus FISH vizsgálatra került sor, amivel az 5p15.2 régió deléciója igazolódott az 5q35-ös régió (SOTOS) megtartottsága mellett (7B. ábra). Az sSMC kromoszómális eredetének azonosítása multicolor FISH módszerrel történt. Ennek eredménye alapján az sSMC 15-ös eredetűnek bizonyult (7C. ábra). Ezt követően aCGH módszerrel azt vizsgáltuk, hogy milyen méretű és géntartalmú az 5-ös kromoszómát érintő CNV, amely gyűrűkromoszóma kialakulásához vezetett. Ezen kívül arra kerestünk választ, hogy az sSMC a 15-ös kromoszóma mely régióit tartalmazza parciális triszómia formájában. A vizsgálat eredménye az 5-ös rövid kar 34,58 Mb méretű, 65 OMIM gént tartalmazó terminális delécióját (5p15.33p13.2x1) igazolta (7D. ábra). A 15-ös kromoszóma esetében CNV nem volt azonosítható, ami arra utalt, hogy az sSMC kizárólag nem kódoló, 15-ös eredetű heterokromatikus régiókból épül fel (3. táblázat).



7. ábra Az 1. eset genetikai vizsgálatának eredményei **A)** A reprezentatív kariogramon nyílak jelzik a gyűrűkromoszómát és az sSMC-t. **B)** Metafázisú FISH vizsgálatnál a normál 5-ös kromoszómán mind a Cri-du-chat (5p15.2) (fúziós szignál), mind a SOTOS (5q35) (zöld szignál) régió jelen van. A gyűrűkromoszómán csak a SOTOS régiót jelölő zöld szignál látható. **C)** Multicolor FISH módszerrel igazolódott a gyűrűkromoszóma 5-ös (piros), valamint az sSMC 15-ös kromoszómából való eredete (lila). **D)** Az aCGH vizsgálat igazolta az 5p15.33p13.2 kromoszómarégió terminális delécióját az alábbi töréspontokkal: 113,576-34,700,951. A piros téglalap jelzi a deléció nagyságát, az egyes CNV próbákhoz tartozó jelintenzitás csökkenése látható a log2 skálán, alatta a deléciónak megfelelő 1-es kópiaszám. Deléciót jelző mintázatot (két sáv) mutat a B-allél frekvencia is.

6.1.1.2. A 2. eset klinikai jellemzői és genetikai eredményei

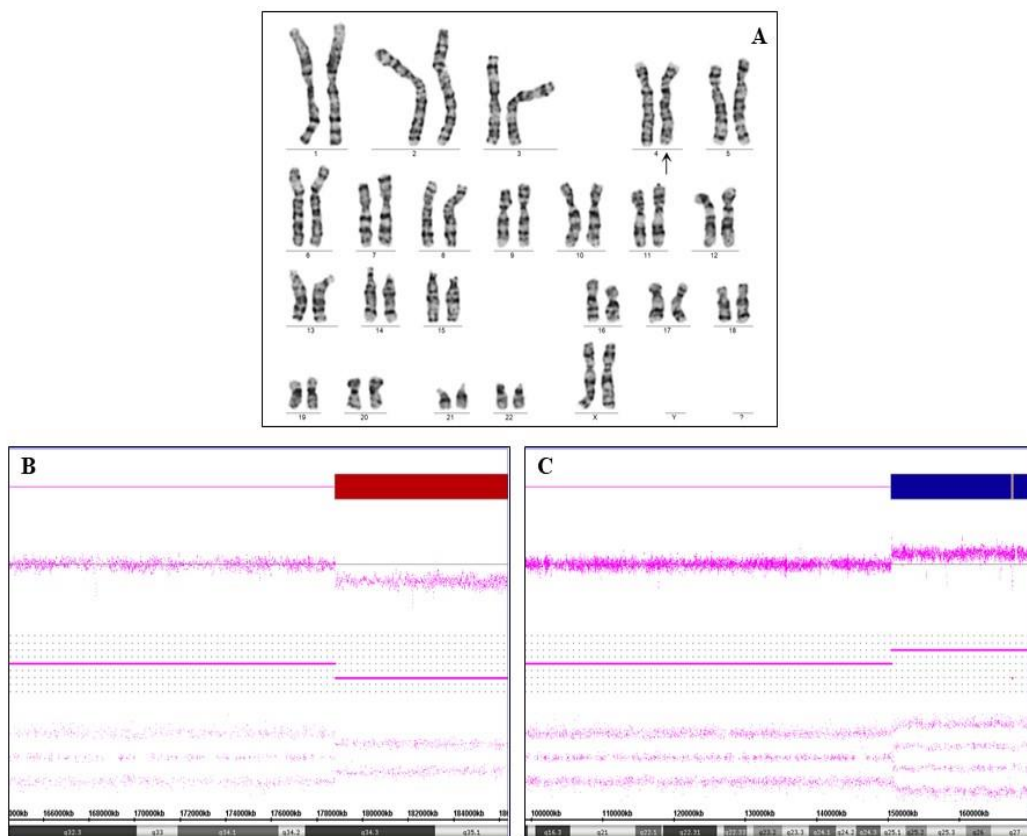
A beteg születésekor ismerték fel Fallot-tetralógiáját és szoliter veséjét, amelyhez a későbbiekben extrakardiális tünetként hypothyreosis és szomatikus retardáció társult.

A rutin diagnosztikai kivizsgálás részeként végzett G-sávok karyotipizálással a 6-os kromoszóma hosszú karján interstitialis deléciót mutattak ki 6q23 és 6q25 feltételezett töréspontokkal. A töréspontok és a hiányzó kromoszómaszakasz méretének pontos meghatározása, valamint az elveszett géntartalom megadása céljából került sor az aCGH vizsgálatra. Ennek során egy 18,753 kb méretű, 6q21q23 töréspontú és 49 OMIM gént tartalmazó deléciót azonosítottunk, amely CHD-ra hajlamosító géneket (*GJA1*, *HDAC2*, *MARCKS*) is tartalmazott.

6.1.1.3. A 3. eset klinikai jellemzői és genetikai eredményei

A lány gyermek ASD-vel és situs inversus totalisszal született. Klinikai genetikai vizsgálatok a vitium mellett az alábbi fejlődési rendellenességeket mutatta: arcdysmorphia, brachydactylia, keskeny mellkas, macrocephalia, rövid és széles nyak, syndactylia III-IV, szomatikus retardáció. Az első genetikai tesztként végzett citogenetikai vizsgálattal normál női karyotípust mutattak ki. Mivel a tünetek alapján ismert mikrodeléciós/mikroduplicációs szindróma nem merült fel, következő lépésként aCGH vizsgálatot végeztünk. Ennek során a 4-es és a 6-os kromoszómákat érintő CNV-k igazolódtak, a 4q34.3q35.2 régió 12,15 Mb méretű deléciójával és a 6q25.1q27 régió 16,95 Mb méretű duplikációjával (8B. és 8C. ábra). Az együtt előforduló deléció és duplikáció kiegyensúlyozatlan formájú transzlokációra utalt. A citogenetikai microarray technikával kimutatott CNV-k 4q és 6q subtelomer specifikus FISH vizsgálattal megerősítésre kerültek. Ezen kromoszómaszakaszon belül a CHD kialakításáért felelős OMIM gének (pl. *PDLIM3*, *SLC25A4*, *SORBS2*) találhatóak. Az aCGH-val kapott eredményeket követően a beteg karyogramjainak újraértékelése, és a karyotípus revideálása

történt (8A. ábra). A kiegyensúlyozatlan transzlokáció következtében létrejött derivált 4-es kromoszóma felismerését nehezítette, hogy a transzlokációban hasonló sávmintázatú részek cseréltek helyet. A transzlokáció familiáris eredetének tisztázására elvégezték a szülők citogenetikai vizsgálatát, amely során kiderült, hogy az édesanya kiegyensúlyozott formában hordozza a betegnél kimutatott transzlokációt. Ennek ismeretében a beteg végleges kariotípusa az alábbi lett: 46,XX,der(4)t(4;6)(q34.3;q25.1)mat. arr[hg19]4q34.3q35.2(178,807,365-190,957,460)x1, 6q25.1q27(150,485,038-167,439,226)x3. Genetikai tanácsadás keretében az édesanyát felvilágosították a kiegyensúlyozatlan transzlokáció magas ismétlődési kockázatáról és prenatalis citogenetikai vizsgálat lehetőségéről a jövőbeni terhességekben.



8. ábra A 3. eset citogenetikai és microarray vizsgálatainak eredményei **A)** A kariogramon nyíl jelzi a transzlokáció miatt szerkezetileg átrendeződött derivált 4-es kromoszómát, amelynek hosszú karja a 4q34.3-as régióig 4-es eredetű, attól terminálisan a 6-os kromoszóma hosszú kar q25q27 töréspontok közé eső sávjai láthatók. A transzlokáció kiegyensúlyozatlan volta miatt a beteg 4q parciális deléciót és 6q parciális duplikációt hordoz. **B)** Array CGH módszerrel 4q34.3q35.2 (178,807,365-190,957,460) deléció igazolódott. A piros téglalap jelzi a deléció nagyságát, az egyes CNV próbákhoz tartozó jelintenzitás csökkenése látható a log2 skálán, alatta a deléciónak megfelelő 1-es kópiaszám. Deléciót jelző 2 sávós mintázatot mutat a B-allél frekvencia is. **C)** Array CGH módszerrel kimutatott 6q25.1q27 duplikáció látható az alábbi koordinátákkal: 150,485,038-167,439,226. A kék téglalap jelzi a duplikáció nagyságát, az egyes CNV próbákhoz tartozó jelintenzitás növekedése látható a log2 skálán, alatta a duplikációt jelző 3-as kópiaszám. Duplikációt megerősítő 4 sávós mintázatot mutat a B-allél frekvencia is.

6.1.1.4. A 4. eset klinikai jellemzői és genetikai eredményei

A fiúgyermek CoA-val született, klinikai genetikai vizsgálata során plagiocephaliát, lapos occiputot, arcdysmorphiás jegyeket (epicanthus, felfelé ívelő szemrés, hosszú philtrum, mély/besüppedt orrgyök, mélyen ülő fülek, retrognathia) és hypospadiasist írtak le. A veleszületett kariotípus meghatározás normál férfi kariotípust igazolt. Az arcdysmorphia miatt célzott DiGeorge FISH vizsgálat történt, aminek eredménye negatív lett. A gyermek 4,5 éves korában került sor az aCGH vizsgálatra, amellyel a 8-as kromoszóma rövid karján, a 8p23.1-es régióban 3,842 kb méretű duplikáció igazolódott, amely MLPA módszerrel megerősítésre került. A duplikálódott régió 17 OMIM gént, köztük a CHD kialakításáért felelős géneket (kiemelt) (*CLDN23*, *MFHAS1*, *ERI1*, *PPP1R3B*, *TNKS*, *MIR124-1*, *MSRA*, *PRSS55*, *RP1L1*, ***SOX7***, *PINX1*, *MTMR9*, *SLC35G5*, *FAM167A*, *BLK*, ***GATA4***, *NEIL2*) tartalmazott.

6.1.1.5. Az 5. eset klinikai jellemzői és genetikai eredményei

A 22 hónapos korában vizsgált gyermek a 4. beteg lánytestvére. A 32. terhességi hétre született 1900 g súllyal és FoA-val. A CHD-n kívül az alábbi fejlődési rendellenességeket mutatta: elődomborodó homlok, hypotonia, epicanthus, széles orrgyök és a motoros fejlődés késése.

Mivel testvérénél korábban igazolódott a 8p23.1-es régió duplikációja, ezért nála célzott MLPA vizsgálat történt a régiót érintő CNV kimutatására. Ennek során a 8p23.1-es régióba lokalizálódó három gén (***GATA4***, *MSRA*, *PPP1R3B*) többletét mutattuk ki, ami alátámasztotta korábbi feltételezésünket, az eltérés familiáris eredetét (9A. ábra).

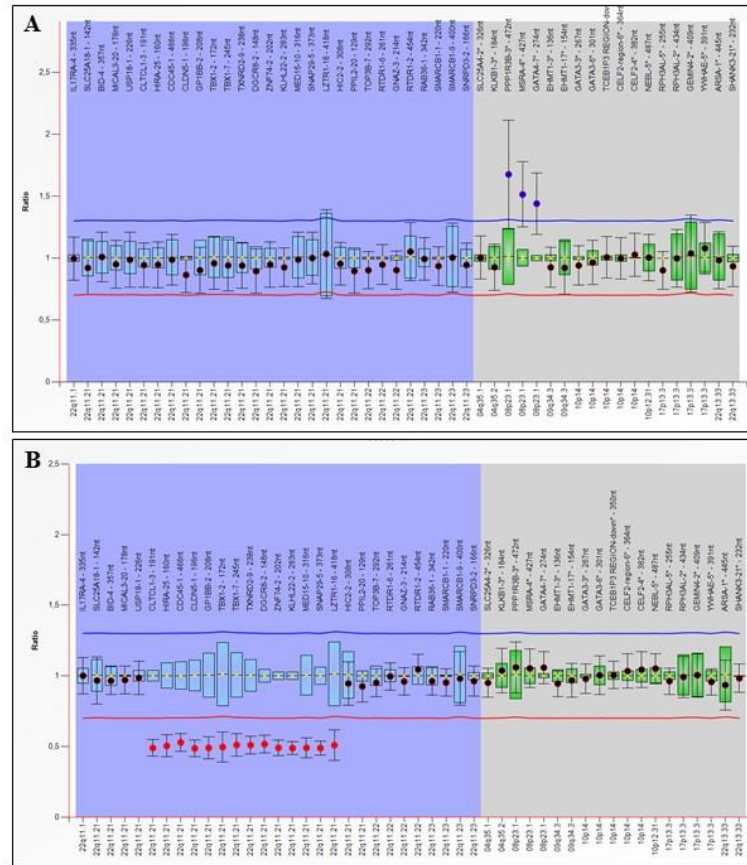
6.1.1.6. A 6. eset klinikai jellemzői és genetikai eredményei

A Fallot-tetralógiával diagnosztizált betegnél elsőként DiGeorge MLPA vizsgálatot végeztünk, ami a 22q11.21-es kromoszómarégió delécióját mutatta ki (9B. ábra). A delécia 14

gént érintett (*CLTCL1*, *HIRA*, *CDC45*, *CLDN5*, *GP1BB*, *TBX1*, *TXNRD2*, *DGCR8*, *ZNF74*, *KLHL22*, *MED15*, *SNAP29*, *LZTR1*) és DiGeorge szindrómában a leggyakrabban deletálódott régióknak felelt meg, ami az LCR22-A és LCR22-D (low copy repeat 22-A és -D) töréspontokkal jellemezhető. Az eredmény egyértelműen alátámasztotta a szindróma diagnózisát. Szülői minták vizsgálatára nem került sor, mert azok nem voltak elérhetők.

6.1.1.7. A 7. eset klinikai jellemzői és genetikai eredményei

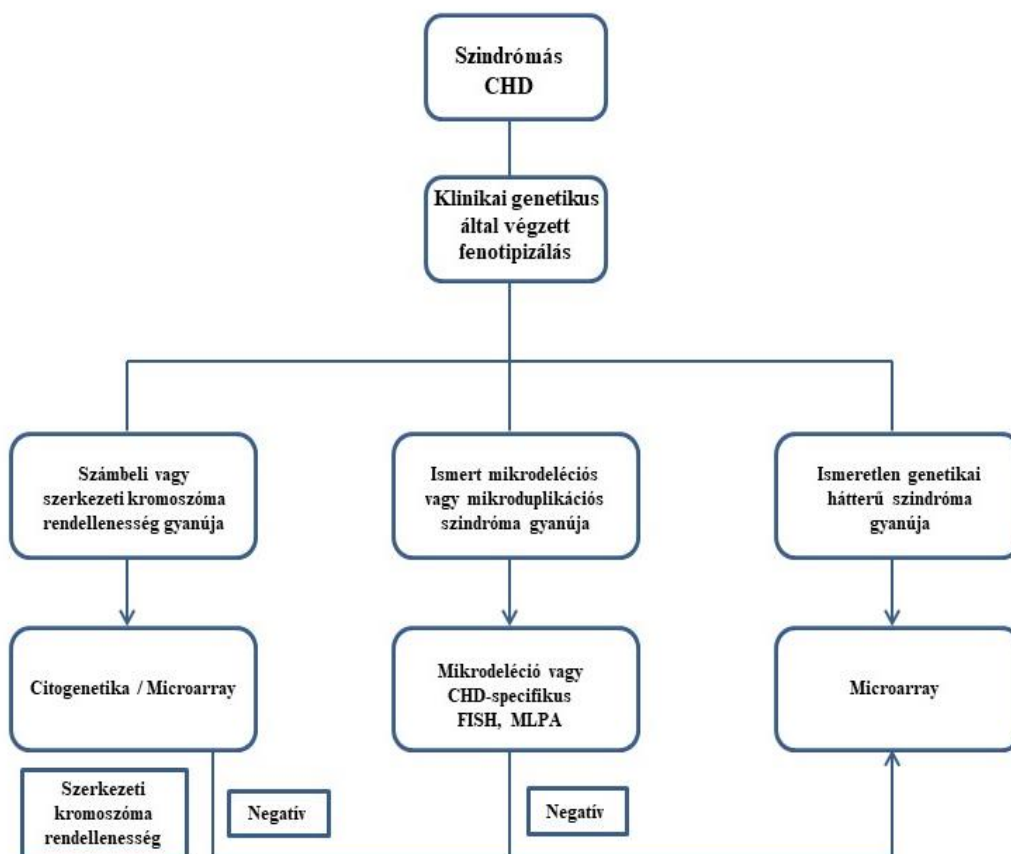
A 6 hónapos kislány Fallot-tetralógiával született, amelyhez hypoplasiás thymus társult. A citogenetikai vizsgálat eredménye normál női kariotípust mutatott. A jellemző tünettársulás miatt második genetikai vizsgálatként MLPA vizsgálatot végeztünk. Ennek eredménye a 22q11.21-es régióban az LCR22-A és LCR22-D töréspontok közé eső 14 gén delécióját igazolta, a 6. esethez hasonlóan. A szülői minták MLPA módszerrel történt vizsgálata igazolta az eltérés *de novo* eredetét.



9. ábra Az 5. eset (A) és a 6. eset (B) MLPA vizsgálatainak eredményei Az X-tengelyen a vizsgált gének kromoszómális lokalizációja van feltüntetve, az Y-tengelyen a kópiaszámot jelző normalizációs dózis hányados (DQ) látható. A kék (DQ=1,30) és piros vonal (DQ=0,65) közötti tartomány normál kópiaszámnak felel meg. Deléció esetén a $DQ < 0,65$, duplikációkor $> 1,30$. A kék háttérrel jelölt terület a 22q11.2-es régióban található géneket tünteti fel, a szürke terület az alkalmazott kit referencia próbáit reprezentálja. **A)** Az 5. eset vizsgálatakor a 8p23.1-es kromoszómarégióba lokalizálódó három gén (*PPP1R3B*, *MSRA*, *GATA4*) heterozigóta duplikációja igazolódott, amit a $> 1,30$ DQ-val rendelkező három kék pont jelöl. **B)** A 6. esetben a piros pontok ($DQ < 0,65$) a 22q11.21-es régióban lévő tizennégy gén (*CLTCL1*, *HIRA*, *CDC45*, *CLDN5*, *GP1BB*, *TBX1*, *TXNRD2*, *DGCR8*, *ZNF74*, *KLHL22*, *MED15*, *SNAP29*, *LZTR1*) összefüggő heterozigóta delécióját reprezentálják.

6.1.2. Diagnosztikai algoritmus szindrómás CHD esetén

Vizsgálati eredményeink alapján kidolgoztunk egy kivizsgálási algoritmust szindrómás CHD-ban szenvedő betegek CNV eredetű patogenetikai hátterének tisztázására (10. ábra). A diagnosztikai útvonal kiindulási és egyben legfontosabb eleme a klinikai genetikus által végzett részletes fenotipizálás, amely alapvetően meghatározza a vizsgálatok sorrendjét. Amennyiben a tünetek számbeli vagy szerkezeti kromoszómaaberrációra utalnak, a rendelkezésünkre álló módszer függvényében hagyományos kromoszóma analízist vagy citogenetikai microarray vizsgálatot végzünk. A leggyakoribb, CHD-val asszociált mikrodéléción (pl. DiGeorge és Williams) szindrómák vagy egyéb, ritkábban előforduló ismert mikrodéléción vagy mikroduplicációs szindróma gyanúja esetén FISH vagy MLPA vizsgálatot végzünk (del 1p36, del 2p16.1-p15, del/dup 2q23.1, Glass szindróma, del/dup 3q29, Wolf–Hirschhorn szindróma, Cri-du-chat szindróma, Sotos szindróma, Williams–Beuren szindróma, Langer–Giedion szindróma, del 9q22.3, DGS II szindróma, Prader–Willi szindróma, Angelman szindróma, del 15q24, Rubinstein–Taybi szindróma, Miller–Dieker szindróma, Lissencephaly-1 szindróma, Smith–Magenis szindróma, Potocki–Lupski szindróma, del NF1, Koolen–de Vries szindróma, dup 17q21.31, DGS szindróma, dup/del 22q11.2, Phelan–McDermid szindróma, Rett szindróma, dup MECP2). Ismeretlen genetikai hátterű szindróma gyanúja esetén citogenetikai microarray az elsőként választandó módszer. Ha a citogenetikai analízis, a célzott FISH és az MLPA vizsgálatok negatív eredménnyel zárulnak, aCGH módszer alkalmazása javasolt a patogén CNV-k igazolására vagy kizárására.



10. ábra Diagnosztikai algoritmus szindrómás CHD esetén Első lépés a beteg tünetegyüttesének pontos leírása a klinikai genetikus által, ami alapján a nagy méretű kromoszómaeltérések G-sávok kariotipizálással vagy aCGH módszerrel igazolhatók. A leggyakrabban előforduló DiGeorge vagy Williams szindróma gyanúja esetén, valamint egyéb, ritkább, ismert mikrodeléció/mikroduplikációs szindróma gyanúja esetén célzott FISH vagy MLPA vizsgálat alkalmazásával léphetünk tovább. Ezen vizsgálatok negativitása vagy ismeretlen genetikai háttérű szindróma gyanújakor citogenetikai microarray a választandó módszer patogenetikai jelentőségű CNV-k igazolására vagy kizárására. Rövidítések: CHD: veleszületett szívfejlődési rendellenesség (congenital heart disease), FISH: fluoreszcens *in situ* hibridizáció (fluorescence *in situ* hybridization), MLPA: multiplex ligáció-függő próba amplifikáció (multiplex ligation-dependent probe amplification).

6.1.3. *Izolált CHD-val diagnosztizált betegek*

A kardiológusok által izolált CHD-val gondozott 16 betegnél az alábbi súlyos, komplex szívfejlődési rendellenességek fordultak elő: TOF (n=12), AVSD (n=1), UH (n=1), HLH (n=1), AVSD + TGA (n=1).

Mivel ezekben az esetekben társuló extrakardiális tünetek nem szerepeltek a betegek anamnesztikus adatai között, ezért CHD-ra specifikus MLPA módszert alkalmaztunk az ismert CHD gének kópiaszám eltéréseinek kimutatására. A vizsgálatok során patogenetikai jelentőségű CNV nem igazolódott ebben a betegcsoportban (6. ábra).

6.1.4. *Abortumokból származó minták*

Terhességi ultrahangszűrések során a magzatokban a CHD különböző megjelenésű és súlyosságú formáit mutatták ki, amelyeket a terhességmegszakítást követő foetopathológiai vizsgálatok megerősítettek és pontosítottak. Az általunk vizsgált 18 esetből egyszerű VSD-t két esetben azonosítottak. A VSD egyéb vitiummal való társulását 13/18 esetben mutatták ki. Két magzatban TOF, egy magzatban pedig egykamrás szív került leírásra. A vizsgált abortumok klinikai adatait és a CHD-k leírását a 4. táblázat foglalja össze.

Mindkét típusú MLPA kittel megvizsgáltuk az abortumok szívének kamraszövetéből izolált genomi DNS mintákat. Az analizált 18 eset közül 17-ben nem mutattunk ki patogén CNV-t. Egy mintában (12. eset) a 14q22.2-es kromoszómarégióba lokalizálódó *BMP4* génre tervezett próbákkal az exon 1, intron 1, exon 3 és 4 duplikációja igazolódott (6. ábra). A DNS minták korlátozott mennyisége és minősége nem tette lehetővé további aCGH vizsgálat végzését.

4. táblázat Abortumok gesztációs kora, neme és a képző eljárásokkal igazolt CHD típusa

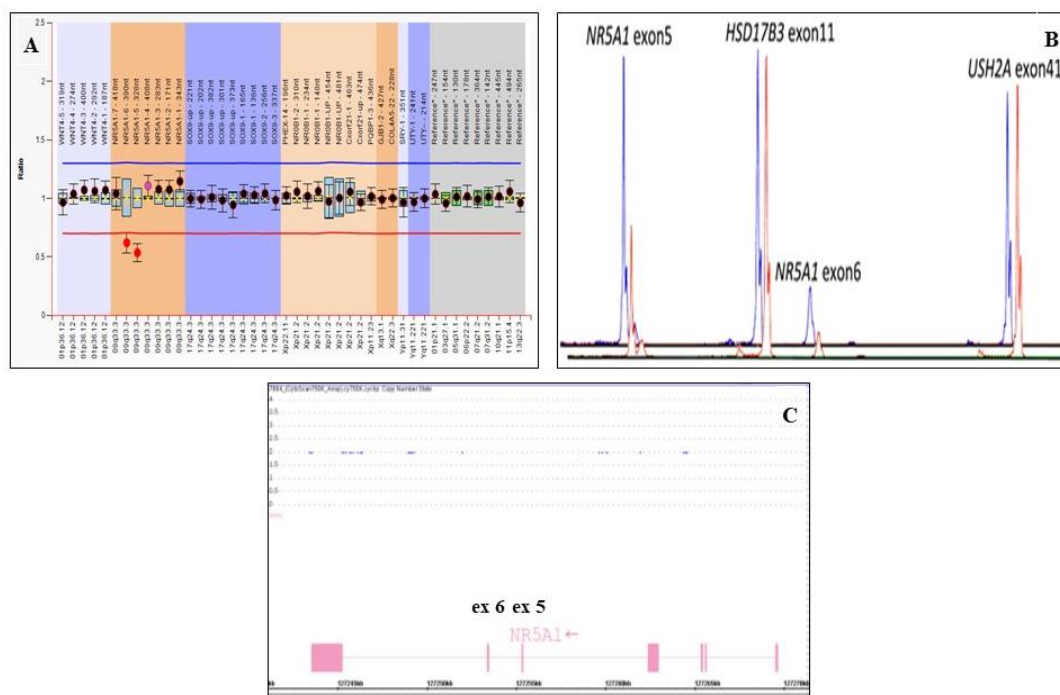
Eset	Gesztációs kor (hét)	Nem	CHD
1.	21	Fiú	TGA, VSD
2.	22	Lány	AVSD, PS, dextropositio aortae
3.	23	Lány	VSD, hydropericardium, endomyocardialis fibrosis, arteria pulmonalis dextri
4.	20 + 3	Lány	VSD, CoA
5.	20	Fiú	TOF
6.	19	Fiú	VSD
7.	22	Fiú	TGA, VSD
8.	19	Lány	VSD, hypoplasia ventriculi sinistri cordis, dilatatio cavorum dextri cordis
9.	21	Fiú	UH, aorta a közös kamrából elől ered, mögötte AP
10.	22 + 4	Lány	VSD, atresia aortae ascendens
11.	19 + 4	Fiú	AVSD
12.	20 + 3	Lány	VSD, CoA
13.	20	Fiú	TOF
14.	21	Fiú	Hypoplasia ventriculi dextri cordis, hypoplasia arteriae pulmonalis
15.	21	Lány	Hypoplasia aortae, hypoplasia ventriculi sinistri cordis
16.	21	Lány	Hypoplasia aortae, hypoplasia sinistri cordis, dextropositio cordis
17.	22	Fiú	Dilatatio cavorum cordis
18.	19	Fiú	VSD

Rövidítések: AP: tüdőartéria (arteria pulmonalis), AVSD: pitvar-kamrai sövényhiány (atrioventricular septal defect), CHD: veleszületett szívfejlődési rendellenesség (congenital heart disease), CoA: aortaszűkület (coarctatio aortae), PS: tüdőverőér-szűkület (pulmonalis stenosis), TGA: nagyér-transzpozíció (transposition of the great arteries), TOF: Fallot-tetralógia (tetralogy of Fallot), UH: egykamrás szív (univentricular heart), VSD: kamrai sövényhiány (ventricular septal defect).

6.2. DSD tüneteit mutató beteg

Az általunk vizsgált lány gyermek megszületését követően clitoris hypertrophia miatt kromoszómális nem meghatározása történt, ami SRY-pozitív 46,XY kariotípust igazolt. A DSD háttérben álló genetikai eltérés azonosítása céljából a rutin diagnosztikai kivizsgálás részeként WES történt, a DSD-vel összefüggésbe hozható gének célzott analízisével. Ennek eredménye negatív lett. Ezt követően aCGH vizsgálatot végeztünk, amely során patogenetikai jelentőségű

CNV nem igazolódott. Pontmutációk és szubmikroszkópos méretű CNV-k kizárása után olyan intragénikus CNV-t feltételeztünk, amely a gonadális dysgenesis kialakításáért felelős géneket érintheti. Ennek igazolására MLPA vizsgálatot végeztünk ismert, nemi differenciálódást meghatározó gének (*NR0B1/DAX1*, *SOX9*, *SRY*, *WNT4*, *NR5A1*) intragénikus kópiaszám változásának detektálása céljából. Ezzel a módszerrel az *NR5A1* gén 5-ös és 6-os exonjának heterozigóta delécióját mutattuk ki, a többi exon érintettsége nélkül (11A. ábra). A két exont érintő deléciót QMPSF módszerrel megerősítettük (11B. ábra). A kisméretű, intragénikus deléció a korábbi aCGH vizsgálattal azért nem volt kimutatható, mert az *NR5A1* gén ezen exonjai nincsenek lefedve CNV próbákkal az alkalmazott citogenetikai microarray platformban (11C. ábra). A deléciótól proximálisan és disztálisan elhelyezkedő legközelebbi CNV próbák a 4-es és 6-os intronban találhatók, ezek normál kópiaszámot mutattak. A szülők MLPA vizsgálatakor az *NR5A1* génben nem igazolódott CNV, ami megerősítette a kislánynál kimutatott eltérés *de novo* eredetét. Az *NR5A1* gén parciális deléciójának igazolásával 46,XY DSD részleges GD-vel diagnózis került leírásra.



11. ábra DSD-t mutató beteg MLPA, QMPSF és citogenetikai microarray vizsgálatának eredményei **A)** MLPA vizsgálat eredménye. Az X-tengelyen a vizsgált gének kromoszómális lokalizációja van feltüntetve, az Y-tengelyen a kópiaszámot jelző normalizációs dózis hányados (DQ) látható. A kék vonal (DQ=1,30) és piros vonal (DQ=0,65) közötti tartomány normál kópiaszámnak felel meg. Deléciónál a DQ<0,65, duplikációkor DQ>1,30. Az eltérő színű háttér a különböző kromoszómaregiókba lokalizálódó géneket jelöli, a szürke terület az alkalmazott kit referencia próbáit reprezentálja. Az ábrán látható két piros pont a 9q33.3-as kromoszómaregióban található *NR5A1* gén 5-ös és 6-os exonjának heterozigóta delécióját (DQ<0,65) mutatja. **B)** QMPSF vizsgálat eredménye. Az elektroferogramon kék színnel a kontroll minták (n=2), piros színnel a beteg mintájának amplifikációs termékei láthatók. A *HSD17B3* és *USH2A* kontroll gének azonos csúcsmagasságúak a kontroll mintákban és a beteg mintájában. Az *NR5A1* gén 5-ös és 6-os exonjának heterozigóta deléciója miatt a két exon amplifikálásával nyert PCR termékek csúcsmagassága a beteg mintájában felére csökkent a kontrollokéhoz képest. **C)** Az *NR5A1* gén citogenetikai microarray CNV próbákkal való lefedettsége. A gén exonjainak számozása (exon 1–7) jobbról balra történik. Az ábra felső részén látható pontozott vonalak a kópiaszámot jelölik, amely valamennyi CNV próba esetén 2, azaz normál. A deletálódott 5-ös exon előtti utolsó CNV próba a 4-es intronban helyezkedik el, genomi koordinátája: 127,259,618. A deletálódott 6-os exon után következő első CNV próba a 6-os intronban található, genomi pozíciója: 127,251,976 (GRCh37). Rövidítés: ex: exon, *HSD17B3*: Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 3, *NR5A1*: Nuclear receptor subfamily 5 group A member 1, *USH2A*: Usherin.

7. MEGBESZÉLÉS

7.1. CHD-val diagnosztizált betegcsoportok, genotípus-fenotípus összefüggések

Az extrakardiális tüneteket is mutató szindrómás CHD-k 3–25%-ában, míg az izolált formák 3–10%-ában mutathatók ki patogenetikai jelentőségű CNV-k (4). A CNV-k nemcsak a CHD és a társuló fejlődési rendellenességek kialakításáért felelősek, hanem olyan, a kórlefolyás során megjelenő kórállapotokért is, mint pl. szívelégtelenség, arrhythmia, neurokognitív és légzőszervi zavarok. Feltehetően ez magyarázza a CNV okozta CHD-k kedvezőtlenebb kimenetelét, a műtéti beavatkozások nagyobb arányú sikertelenségét és a szívtranszplantáció gyakoribb szükségességét (72-74). Ezen klinikai következmények miatt kimutatásuk kiemelkedő jelentőségű a CHD prognózisának megítélése szempontjából (74). Tudományos munkám során szindrómás és izolált CHD-val diagnosztizált betegek és abortumok mintáit vizsgáltam aCGH és MLPA módszer alkalmazásával patogén CNV-k kimutatása céljából.

7.1.1. Szindrómás CHD-val diagnosztizált betegek

Harminchárom szindrómás CHD-val diagnosztizált beteg közül hét esetben sikerült patogén CNV-t azonosítani, ami 21%-os detekciós arányt jelent. Ez a diagnosztikai hatékonyság megfelel a szakirodalomban közölt adatoknak. Klinikai és tudományos célú tanulmányok eredményei alapján a CHD-s esetek 3–25%-ában mutathatók ki patogenetikai szereppel bíró CNV-k (4). A közölt adatokban való nagymértékű eltérés azzal magyarázható, hogy a vizsgálatok során különböző típusú, szenzitivitású citogenetikai microarray platformokat alkalmaztak, eltérő módon definiálták a CNV-ket és változó volt a vizsgált betegpopulációk mérete, összetétele is. Ugyanazt az 1 Mb felbontású BAC/PAC array platformot alkalmazva Thienpont és mtsai (75), valamint Breckpot és mtsai (32) nagyon hasonló arányban, 16,7% és 17,3% igazoltak patogén vagy valószínűleg patogén CNV-ket

szindrómás CHD-s esetekben. Oligonukleotid microarray-k alkalmazásával nagyobb diagnosztikai hatékonyságot, 20,7% (76) és 18,5% (77) sikerült elérni. Richards és mtsai 20 szindrómás és 20 izolált CHD-val diagnosztizált gyermek esetében alkalmazott nagy felbontású (385 000 próba) aCGH módszert. A szindrómás csoportban 25%-os volt a detektálási ráta, míg az izolált esetekben nem azonosítottak patogén CNV-t (78).

Array CGH módszerrel az általunk igazolt patogén CNV-k mérete 3,8 és 34,58 Mb között változott. Jól ismert tény, hogy a veleszületett betegségek kialakításáért felelős CNV-k méretüket, ezáltal géntartalmukat tekintve nagyon heterogének, az általuk okozott klinikai kép ebből adódóan nagyon változó. Ennek lehetséges magyarázata, hogy mivel egyszerre több gén érintett, ezek egyedi hatása összeadódik vagy egy-egy gén fejt ki pleiotróp hatást az eltérő fenotípusú betegeknél. A veleszületett szívhibák hátterében igazolt CNV-k esetén tovább nehezíti a genotípus-fenotípus összefüggés megadását a CHD fenotípus inkomplett penetranciája. Ennek oka még ma sem ismert pontosan, többféle feltételezés létezik: a CNV interakciója (i) a másik allél genetikai faktoraival, (ii) a CNV-vel azonos allélen (*cis*), (iii) vagy más kromoszómán (*trans*) elhelyezkedő genetikai eltérésekkel, (iv) nem genetikai eredetű faktorokkal (4).

Az első szindrómás betegnél az aCGH tisztázta és pontosította a diagnosztikai kivizsgálás során végzett citogenetika, FISH és multicolor FISH vizsgálatok eredményeit. Az 5-ös kromoszóma rövid karján igazolt 34,58 Mb méretű terminális deléció megerősítette a Cri-du-chat szindróma (MIM # 123450) diagnózisát, amely a gyakoribb mikrodeléciós szindrómák közé tartozik, 1:20 000 – 1:50 000 incidenciával. A betegnél kimutatott deléciós 5-ös kromoszóma gyűrű formában történő előfordulása igen ritka, eddig mindössze néhány esetet írtak le ebben a szindrómában (79). A szindróma az esetek 85%-ában *de novo* eredetű, az 5-ös rövid kart érintő deléciók mérete 560 kb és 40 Mb között változik. A betegek heterogén fenotípusát egyértelműen magyarázza a deléciók méretében mutatkozó különbözőség. Egy, a

genotípus-fenotípus korrelációt vizsgáló összefoglaló tanulmány szerint a legjellemzőbb tünetek az alábbi kromoszómarégiók elvesztéséhez köthetők: macskanyávogásra emlékeztető sírási hang 5p15.31, beszédkésés 5p15.32–15.33, arcdysmorphia 5p15.2–15.31. A mentális retardáció annál súlyosabb, minél proximálisabb régiók (5p14.1–14.2) érintettek a delécióban. Az általunk vizsgált betegnél az azonosított deléció töréspontja alapján súlyos mentális retardáció várható későbbi életkorban (80). A szindrómában érintettek 15–20%-ának van szívfejlődési rendellenessége, amelyek közül leggyakoribb a betegnél is kimutatott PDA és ASD. A vitiumok kialakításáért felelős gént vagy géneket még nem sikerült azonosítani (81). A gyűrűkromoszóma mellett egy 15-ös eredetű sSMC is látható volt a beteg analizált sejtjeiben. Array CGH vizsgálattal az sSMC kromoszómális összetételét vizsgálva arra kerestünk választ, hogy milyen mértékben járul hozzá ez a számfeletti kromoszóma a fenotípus kialakításához. A citogenetikai microarray analízis nem igazolta a DNS kópiaszámának duplikációját a 15-ös kromoszómán, amiből arra a következtetésre jutottunk, hogy a teljes sSMC nem kódoló heterokromatinból épül fel, ezáltal nem befolyásolja a klinikai képet.

A 2. esetben a citogenetikai analízissel feltételezett 6q deléció pontosítása és a töréspontok meghatározása céljából végeztünk citogenetikai microarray vizsgálatot. Ennek során a 6-os kromoszóma hosszú karján interstitialis deléció igazolódott a 6q21 és 6q23.2 töréspontok között. A kimutatott 18,753 kb méretű deléció 49 OMIM gént tartalmaz. Ez a CNV tartalmazza a ritka „6q21–q22 deléciós szindróma”-ként ismert kórkép kialakulásáért felelős kromoszómarégiót, mely igen változatos veleszületett fejlődési rendellenességekkel, arcdysmorphiával, szomatikus és mentális retardációval jár (82, 83). A 6-os kromoszóma hosszú karját érintő deléciók a jellemző töréspontok alapján 3 csoportba sorolhatók: „A” vagy proximális (6q11–q16); „B” vagy középső (6q15–q25); „C” vagy terminális (6q25–qter) (83). Az általunk azonosított CNV a „B” deléciós csoportba tartozik. Toschi és mtsainak (82) vizsgálatai szerint a 6q15–q25 típusú deléciós betegek klinikai tünetei nagy átfedést mutatnak

az acro-cardio-facialis szindrómás (ACFS, MIM # 600460) betegek fenotípusával (CHD, kéz- és lábmalformációk, ajak- és/vagy szájpadhasadék, arcdysmorphia, a külső nemi szervek eltérései, mentális retardáció). Az általunk vizsgált betegnél azonban hiányoznak az ACFS legjellemzőbb malformációs tünetei, kivéve a CHD-t, ami TOF formájában van jelen. Ehhez hasonló eredményre jutottak egy esettanulmányban, amelyben összehasonlították az eddig közölt valamennyi 6q21–q22 mikrodélíciós eset (n=16) fenotípusos jegyeit és megállapították, hogy a betegek többségében nincsenek meg az ACFS-specifikus malformációs tünetek (84). Az interstitialis 6q deléciós esetek genotípus-fenotípus összefüggéseit elemző irodalmi adatok szerint a CHD-val diagnosztizált esetekben egy 113–114,5 kb-os méretű közös deléciós szegmens mutatható ki, amely a kardiális morfogenezisben kritikus szereppel bíró géneket (*GJA1*, *HDAC2*, *MARCKS*) tartalmazza (82, 83). A betegnél igazolt deléció is magába foglalja ezeket a géneket és magyarázza a beteg kardiális fenotípusát.

A 3. esetben aCGH vizsgálattal sikerült igazolni a betegség hátterében álló parciális 4q34.3q35 monoszómiát és 6q25.1q27 parciális triszómiát, amelyek kiegyensúlyozatlan transzlokáció következtében jöttek létre. A 4-es kromoszóma hosszú karjának terminális deléciója egy ritka aberráció, az esetek kb. 10–20%-ában szülői kiegyensúlyozott transzlokáció kiegyensúlyozatlan formában való öröklésének eredménye és együtt jár a transzlokációban részt vevő partnerkromoszóma parciális duplikációjával. Az általunk vizsgált beteg klinikai tünetei nagymértékben átfednek a terminális 4q deléciós esetek fenotípusos jegyeivel: mentális retardáció, fejlődésbeli elmaradás, CHD, szájpadhasadék, craniofacialis dysmorphia és vázrendszeri eltérések. A 4q terminális részén belül két, CHD-val szoros összefüggést mutató kromoszómarégió is leírásra került. A 4q32.2–q34.3-ban a *TLL1*, *HPGD* és *HAND2* gének deléciója tehető felelőssé a CHD létrejöttéért (77, 85). Egy másik tanulmányban öt beteg egymást átfedő CNV-je alapján a legkisebb deletálódott régiónak a 4q35.1–q35.2 kromoszómasávot jelölték meg, amelyben a CHD jelölt gének az alábbiak voltak: *SORBS2*,

PDLIM3, *SLC25A4*. Egér állatmodellekben igazolták a *SORBS2* és *SLC25A4* gének magas expresszióját szívizomban és szerepüket a kardiogenezisben, a *PDLIM3* mutációja esetén a jobb kamra és a trabekuláris hálózat fejlődési zavarát (77). A beteg mintájában kimutatott 4q34.3q35.2 deléció során ezek a gének is elvesztek. A kiegyensúlyozatlan transzlokáció hordozás következtében a beteg fenotípusának kialakításához hozzájárul a terminális 6q duplikáció (6q25–q27) is, amelynek következményei nagyon heterogének. A betegek nagy részében CHD, craniofacialis dysmorphia, rövid, széles nyak és ízületi kontraktúra látható. A CHD jelölt gének ebben a régióban a *DLL1*, *QKI*, *RPS6KA2* (77, 86). A kiegyensúlyozott transzlokáció hordozás miatt a szülőket genetikai tanácsadás keretében tájékoztatták a magas ismétlődési kockázatról és a prenatalis genetikai diagnosztika lehetőségéről egy következő terhességben.

Két, familiáris etiológiájú beteg (4. és 5. eset) mintájában a 8p23.1-es kromoszómarégió duplikációját mutattuk ki. A 4-es számú betegben aCGH módszerrel, testvérénél (5. eset) célzott MLPA-val. A 8p23.1 duplikációs szindróma ultra ritkának számít, becsült prevalenciája 1:58 000. Huszonnégy, molekulárisan is karakterizált esetet írtak le eddig, amelyek nagy része sporadikus (87). A szindróma tüneteinek kialakításáért felelős ún. kritikus régió 3,68 Mb méretű, telomerikus, középső és centromerikus régiókra osztható. A régiót határoló két végpontban ismétlődő szekvenciák találhatók, az olfactory receptor/defensin repeat proximal (REPeat Proximal) és distal (REPeat Distal). Ezen ismétlődő szekvenciák hajlamossá teszik a 8p23.1-es régiót nem-allélikus homológ rekombinációra (NAHR) és ezáltal visszatérő *de novo* delécióra és duplikációra (87, 88). A 8p23.1 duplikációs szindrómás betegek fenotípusa igen heterogén, leggyakoribb tünetek a CHD, fejlődésbeli elmaradás, tanulási nehézségek (>90%), viselkedészavarok és enyhe dysmorphia (87-89). A CHD különböző súlyosságú formái az esetek 25%-ában fordulnak elő. A 8p23.1 kromoszómarégióban számos gént (n=27) és mikroRNS-t (n=5) azonosítottak, melyek közül a *GATA4*, *TNKS1*, *SOX7* és *XKR6* dózis-

szenzitív gének, fokozott expressziójuk felelős a szindróma tüneteinek kialakulásáért. A *GATA4* és *SOX7* gének együttes hatására alakul ki CHD, a *TNKS* a viselkedési zavarokért, a *SOX7* a fejlődésbeli elmaradásért tehető felelőssé (87, 89). A betegnél azonosított 3842 bp méretű duplikáció teljes mértékben lefedi a szindrómaért felelős kritikus régiót, ennek megfelelően a beteg fenotípusa is átfed az irodalomban leírt tünetekkel: aszimmetrikus arc és koponya, epicanthus, benyomott orrgyök, hosszú philtrum, retrognathia, alacsonyan ülő fülek. Egyedi jellemzőként szegényes mimikát és hypospadiasist írtak le. A születéskor észlelt CoA kéthetes korban műtéti korrekciót igényelt, a gyermek fejlődése azóta normál ütemű.

Az ötödik beteg az előző lánytestvére, aki a pozitív familiáris anamnézis, a congenitalis vitium és enyhe dysmorphia miatt 22 hónapos korában került klinikai genetikushoz. Célzott MLPA vizsgálattal a 8p23.1-es régióban lévő gének (*GATA4*, *MSRA*, *PPP1R3B*) duplikációját mutattuk ki, amelyek a 8p23.1 kritikus régiójának telomerikus, középső és centromerikus részébe lokalizálódnak. Ebből arra következtettünk, hogy a duplikálódott régió mérete azonos a testvérénél azonosítottal. A kislánynál jelentkező enyhébb CHD (FoA) és fenotípusbeli eltérések lehetséges magyarázata a CNV szindrómákra jellemző csökkent penetrancia és változó expresszivitás lehet (90).

A 6. és 7. esetben célzott MLPA vizsgálattal igazoltuk a DiGeorge szindróma (MIM # 188400) diagnózisát, 14 egymás melletti gén folytonos deléciójának kimutatásával. Mindkét betegnél Fallot-tetralógiát diagnosztizáltak születéskor, amely a leggyakoribb vitium ebben a szindrómában. Mivel azonban az immundeficiencia (a betegség egyik legjellemzőbb tünete) hiányzott a 6. betegnél, 16 éves koráig izolált CHD-val tartották nyilván. A 7. betegnél a thymus hypoplasia és TOF alapján már 1 hónapos korban felmerült a DGS diagnózisa. A 22q11.2 lókuszt deléciója által okozott DGS a legrégebben ismert és leggyakoribb mikrodeléciós szindróma, prevalenciája 1:3000 – 6000 (91). A kórkép főbb tünetei: CHD, thymus hypoplasia, fejlődésbeli elmaradás, tanulási nehézségek, beszédkéés, hypoparathyreosis okozta

hypocalcaemia, arcdysmorphia, szápadhasadék és a szápad funkciózavara, a vese és a szem fejlődési rendellenességei, felnőttkorban pszichiátriai betegségek. A 22q11.2-es kromoszómarégióban több alacsony kópiaszámú ismétlődő szekvencia (low copy repeat, LCR) található, amelyek NAHR-ra hajlamosítva eredményezik a régióban előforduló gyakori szubmikroszkópos deléciót és duplikációt. Az esetek nagy része *de novo* eredetű, a deletálódott régió 1,5 és 3 Mb közötti méretű. Familiáris forma 5–10%-ban fordul elő (92). A DGS-re jellemző klinikai kép nagyon heterogén, a CHD-t is érintő változó expresszivitást és csökkent penetranciát az alábbi tényezőkkel magyarázzák: (i) a genomban előforduló egyéb genetikai eltérések, amelyek módosíthatják az egyforma méretű deléciók fenotípusra gyakorolt hatását, (ii) az embriogenezist befolyásoló véletlenszerű hatások, (iii) környezeti káros hatások a terhesség során (93). A csökkent expresszivitás, a szindrómák jellegzetes tüneteinek hiánya megnehezítheti a szindrómás formák felismerését, ezért az izoláltnak tűnő esetekben klinikailag nagyon hasznos lehet a CNV-ket kimutató aCGH vagy MLPA alkalmazása (94). Az elmúlt években több olyan tanulmány is született, amelyek elsővonalbeli tesztként javasolják alkalmazni ezeket a módszereket CHD-val diagnosztizált újszülöttek esetén, amikor a társuló tünetek felismerése és ezáltal az izolált és szindrómás CHD formák elkülönítése különösen nehéz (95).

7.1.2. Izolált CHD-val diagnosztizált betegek

Az izolált CHD-val diagnosztizált csoportban főleg komplex szívfejlődési rendellenességek fordultak elő: TOF (n=12), UH (n=1), HLH (n=1), AVSD (n=1), AVSD + TGA (n=1). Ezeknél a betegeknél célzott MLPA vizsgálatokat végeztünk az ismert, szívfejlődési rendellenességet okozó gének (*GATA4*, *TBX5*, *NKX2.5*, *BMP4*, *CRELD1*) és kromoszómarégiók (4q35, 8p23, 9q34.3, 10p14, 17p13.3, 22q11.2, 22q13) kópiaszám eltéréseinek kimutatására. Az általunk alkalmazott MLPA kitekkel nem igazolódott patogén

delécio vagy duplikáció egyik beteg mintájában sem. A kapott eredmény lehetséges magyarázata a vizsgált esetek alacsony száma és/vagy az analízis célzott jellege lehetett. Eredményeinkkel azonos vagy alacsony detektálási hatékonyságot közöltek több olyan tanulmányban, amelyben célzott CHD-specifikus MLPA alkalmazására került sor. Guida és mtsai 161 izolált CHD-s beteget vizsgáltak P234 MLPA kit felhasználásával és nem mutattak ki patogén CNV-t a *GATA4* és *GATA3* génekben (96). Egy másik vizsgálatban szeptumdefektusokkal diagnosztizált betegeknél (n=45) alkalmazták az általunk is használt MLPA P311 típusú CHD kitet és mindössze három esetben (6,66%) igazoltak patogén CNV-t a 22q11.21-es kromoszómarégióban, ami alátámasztotta a DiGeorge szindróma diagnózist (97).

Azokban a kutatásokban, amelyekben az izolált CHD-s betegeknél a CNV szűrést kiterjesztették a teljes genomra, 3–10%-os arányban sikerült patogén CNV-ket kimutatni (4). Kim és mtsai egy prospektív tanulmány keretében hasonlították össze 422 izolált CHD-s beteg és egészséges kontroll egyén mintájában a CNV előfordulási gyakoriságát. Eredményeik azt mutatták, hogy a CHD-s kohorszban nagyobb arányban fordultak elő valószínűleg patogén CNV-k a kontroll populációhoz képest (12,1% vs. 5,0%, $P=0,00016$) (73). Az izolált CHD-s betegcsoportban legnagyobb diagnosztikai hatékonyságot Wu és mtsai közöltek 17,9%-os (7/39) gyakorisággal (98).

7.1.3. Abortumokból származó minták

A prenatalisan diagnosztizált CHD mindig nagy kihívást jelent a genetikai tanácsadó számára, mivel a magzati ultrahangvizsgálat során társuló rendellenességre utaló jelek nem minden esetben mutathatók ki, ezért a szindrómás és izolált formák prenatalis elkülönítése nagy nehézséget jelent. A prenatalisan felismert vitiumok háttérében 18–22%-ban mutatható ki kromoszómális aneuploidia és DiGeorge szindróma, a magzatok jelentős hányadában egyéb genetikai eltérések (CNV, pontmutációk) feltételezhetők. Az ismert, CHD-val társuló mikrodeléció/mikroduplikációs szindrómák szűrésére CHD-specifikus MLPA alkalmazható, az aCGH módszer azonban nemcsak ezek, hanem egyéb, ritka CNV-k felismerését is lehetővé teszi. Ezért a citogenetikai microarray ma már elsővonalbeli genetikai tesztként javasolt eljárás magzati rendellenességek esetén (99). Vizsgálataink során különböző súlyosságú és komplexitású vitiummal diagnosztizált magzatok (n=18) mintáit teszteltük MLPA módszerrel. Ezzel az eljárással a DGS- (22q11.2) és más CHD-specifikus kromoszómarégiókban (4q35, 8p23, 9q34.3, 10p14, 17p13.3, 22q13) nem azonosítottunk deléciót vagy duplikációt. A CHD-kban patogén szereppel bíró gének (*GATA4*, *TBX5*, *NKX2.5*, *BMP4*, *CRELD1*) CNV szűrése során egy mintában (12. eset) a 14q22.2-es kromoszómarégióba lokalizálódó *BMP4* gén duplikációját mutattuk ki. Ennél a magzatnál VSD és CoA volt látható ultrahangvizsgálattal. Állatmodellekben igazolták, hogy a BMP4 fehérje fontos szerepet játszik a kardiogenezisben, a szeptumok és az ingerületvezetés kialakításában. A gén funkcióvesztő mutációja súlyos veleszületett szívhibákat eredményez (100). A gén duplikációjának szívfejlődésre gyakorolt funkcionális következményeiről nincsenek irodalmi adatok. A rendelkezésünkre álló korlátozott minőségű és mennyiségű magzati DNS miatt aCGH vizsgálatot nem tudtunk végezni.

Eredményeink alapján a citogenetikai microarray módszer hatékony eljárásnak bizonyult patogenetikai jelentőségű CNV-k kimutatására szindrómás CHD-ban. A kórállapot hátterében álló mutációk azonosításával genetikai diagnózis állítható fel, ami lehetővé teszi pontos genotípus-fenotípus összefüggés megadását, elősegíti a betegek prognosztikai besorolását, az érintettek korai, személyre szabott megelőző és terápiás ellátását. A genetikai eltérések ismerete segítséget nyújt a klinikai genetikusnak a társuló tünetek korai felismerésében, az ismétlődési kockázat becslésében, az elsőfokú rokonok szűrésében. Amikor az érintett egyén eléri a felnőttkort, a genetikai diagnózis birtokában lehetővé válik prenatális genetikai diagnosztika is.

7.2. DSD tüneteit mutató beteg

Az általunk vizsgált beteg női külső nemi szervekkel, clitoromegaliával és enyhe dysmorfhiás jegyekkel született. A kromoszóma analízis *SRY*-pozitív 46,XY kariotípust igazolt. A későbbiekben végzett képalkotó vizsgálatok hiányzó uterus, vakon végződő vaginát és kétoldali inguinalis sérvet mutattak ki. Ez utóbbiak szövettani vizsgálata dysgenetikus gonádokat írt le, testis, epididymis, tuba uterina és ductus deferens részletekkel. A DSD genetikai kivizsgálása a DSD gének mutáció analízisével és a beteg teljes genomját vizsgáló aCGH módszerrel folytatódott. Mindkét vizsgálat eredménye negatív lett. Ezt követően a DSD kialakításában szerepet játszó gének (*DAX1/NR0B1*, *CXorf21*, *SOX9*, *SRY*, *ZFY*, *WNT4*, *NR5A1*) kópiaszám változásának vizsgálatára MLPA módszert alkalmaztunk. Ennek során az *NR5A1* gén 5-ös és 6-os exonjának heterozigóta delécióját azonosítottuk, melyet QMPFS technika segítségével megerősítettünk. Az általunk kimutatott CNV új mutáció, DSD-vel diagnosztizált beteg esetében ilyen genetikai eltérést még nem írtak le. A szülők genetikai vizsgálata igazolta a mutáció *de novo* eredetét.

Az *NR5A1* fehérje egy magreceptor szupercsalád tagja. Felépítését tekintve két cinkujj szerkezetű DNS-kötő doménből (DNA-binding domain, DBD), hinge régióból, a

magreceptorokra jellemző, 12 alfa-hélixből álló ligandkötő doménből (ligand-binding domain, LBD) és két aktivációs funkcióval rendelkező doménből épül fel (101). Az LBD felépítésében a gén 4-es exonjának egy része, az 5-ös, 6-os és 7-es exon vesz részt. Az általunk vizsgált esetben az *NR5A1* gén 5-ös és 6-os exonjának deléciója egy out-of-frame mutáció, amely stop kodont eredményez közvetlenül a 4-es exon kódoló szekvenciája után. Ennek következményeként vagy funkcióképtelen, trunkált NR5A1 fehérje szintetizálódik erről az allélról vagy a nonszensz-mediálta mRNS lebomlás miatt egyáltalán nem képződik fehérje. A másik allél mutációja kizárható, mivel az exom szekvenálás során ebben a génben nem igazolódott szekvenciabeli eltérés. Ezek alapján az *NR5A1* gén parciális deléciója okozta haploinsufficiencia tehető felelőssé a beteg nemi differenciálódási zavaráért.

A 46,XY DSD komplett vagy parciális GD-vel járó formáiban a testis differenciálódási zavara vagy az androgén hatás elmaradása miatti maszkulinizációs/virilizációs zavar figyelhető meg. A 46,XY DSD hátterében álló mutációk az alábbi géneket érintik leggyakrabban: *ARX*, *ATRX*, *CBX2*, *DAX1*, *DHH*, *DMRT1*, *EMX2*, *ESR2*, *FGFR2*, *GATA4*, *HHAT*, *MAP3K1*, *NR5A1*, *SOX8*, *SOX9*, *SRY*, *TSPYL1*, *WNT4*, *WT1*, *ZFPM2* és *ZNRF3* (40, 102). Közülük az egyik legtöbbet vizsgált gén az *NR5A1*. Az általa kódolt NR5A1 fehérje egy transzkripció faktor, a férfi irányú nemi differenciálódásban kulcsfontosságú szerepet játszó gének (pl. *SRY*, *SOX9*) expressziójának szabályozásában vesz részt a WT1 fehérjével együtt. A bipotenciális gonádból kialakult herékben fokozza a Sertoli-sejtek AMH termelését, ami a Müller-cső visszafejlődéséhez vezet. A here Leydig-sejtjeiben a tesztoszteronszintézisért felelős enzimek expressziójának fokozása révén a Wolff-cső differenciálódását, a belső és külső férfi nemi szervek kialakulását segíti elő (49). Egér kísérletekben (XY) az *Nr5a1* gén deléciója mellékvesekéreg elégtelenséget és GD-t eredményezett teljes nemváltással, női külső nemi szervekkel és a Müller-cső visszafejlődésével (103).

Humán vizsgálatok eredményei alapján az *NR5A1* gén funkcióvesztéssel járó mutációi nagyfokú fenotípusbeli variabilitással járnak: férfi infertilitás, hypospadiasis, rejtettheréjűség, bilaterális anorchia, primer ovárium elégtelenség (46,XX kariotípusú nőknél), GD és ritkán mellékvesekéreg elégtelenség. Napjainkig az *NR5A1* génben kb. 40 heterozigóta mutációt azonosítottak 46,XY DSD-vel diagnosztizált betegekben, ezek nagy része egy vagy néhány nukleotidot érintő pontmutáció volt (49). A kisszámú génmutációkkal szemben nagyon kevés irodalmi adat áll rendelkezésre a 46,XY DSD-vel összefüggésbe hozható gének, illetve ezen géneket tartalmazó lókuszok kópiaszám eltéréseiről. Kon és Fukami 2015-ben megjelent közleményükben foglalták össze azokat az eseteket, amelyekben citogenetikai microarray vagy MLPA módszert alkalmaztak szubmikroszkópos CNV-k kimutatására 46,XY DSD-s betegpopuláción (104). Valamennyi addig közölt deléció vagy duplikáció heterozigóta formában fordult elő és az érintett gének haploinsufficienciája révén eredményezte a DSD-t. A kimutatott CNV-k legnagyobb része *de novo* eredetű volt, csak néhány esetben dokumentálták a mutáció hordozását az anyában, akinél tünetként korai ováriumelégtelenség jelentkezett.

NR5A1 gént érintő CNV-t csak néhány esetben írtak le, ezek mind méretük, mind fenotípusbeli következményeik tekintetében nagyon heterogének voltak (50, 52, 56, 105-108). Az eddig közölt esetek és betegünk klinikai és genetikai adatait az 5. táblázat foglalja össze.

5. táblázat *NR5A1* gént érintő CNV-k 46,XY DSD betegekből

Deléción mérete	Nemi szervek fenotípusa	Egyéb tünetek	Genetikai vizsgálat	Öröklődés	Referencia
3,07 Mb	Clitoromegalia, ovotestis, hiányzó uterus	Genitopatellaris szindróma	aCGH	nem vizsgált	(105)
1,54 Mb	Női külső nemi szervek	Enyhe mentális retardáció, minor dysmorphia	aCGH	<i>de novo</i>	(108)
0,97 Mb	Clitoromegalia, hiányzó uterus vagy Müller-cső képlet, nagyajkak fúziója, keskeny vaginabemenet, gonád a bal oldali nagyajkakban	Bal oldali szemhéj ptosis	aCGH	<i>de novo</i>	(106)
0,24 Mb	Bizonytalan nemi szervek hypospadiasissal, gonádok a labioscrotalis redőkben	-	aCGH	maternális	(52, 107)
3,1–4,8 kb	Leydig-sejt hyperplasia, kevés csírasejt, gonádok <i>in situ</i> carcinómája	-	custom MLPA	nem vizsgált	(50)
Max. 7,642 kb	Clitoromegalia, hiányzó uterus, vakon végződő vagina, dysgenetikus gonádok	-	MLPA	<i>de novo</i>	Saját eredmény

Rövidítések: aCGH: array komparatív genomi hibridizáció (array comparative genomic hybridization),

MLPA: multiplex ligáció-függő próba amplifikáció (multiplex ligation-dependent probe amplification).

Összefoglalva, vizsgálataink során egy új, az *NR5A1* génben két exont érintő deléciót azonosítottunk egy 46,XY parciális GD-vel diagnosztizált lány gyermek esetén, amely egy eddig még nem leírt genetikai eltérés 46,XY DSD-ben. Eredményeink újabb bizonyítékot szolgáltatottak az intragenikus CNV-k patogenetikai szerepéről a DSD-k kialakulásában és

hangsúlyozták azok kimutatásának klinikai jelentőségét. Ezeknek a mutációtípusoknak a vizsgálata ma még nem része a DSD-s betegek rutin diagnosztikai kivizsgálásának, eredményeink alapján azonban egyértelműen javasolt a tisztázatlan genetikai hátterű esetek felderítésében. Az MLPA módszer alkalmasnak bizonyult a DSD-vel összefüggésbe hozható gének exonális kópiaszám eltéréseinek szűrésére, alkalmazása javíthatja a kórkép nagyon alacsony diagnosztikai hatékonyságát. A patogén mutációk azonosításával nemcsak a betegség biológiai hátterének megismeréséhez kerülünk közelebb, hanem lehetővé válik pontos genotípus-fenotípus összefüggés leírása, az adrenális és gonadális funkciók karakterizálása, a gonádok malignizálódási kockázatának felmérése, genetikai tanácsadás keretében az ismétlődési kockázat és prognózis megítélése, a személyre szabott ellátás megtervezése. A molekuláris genetikai diagnózis legnagyobb nyertesei maguk a betegek és szüleik, akik a kórállapot okának és a várható következményeknek az ismeretében, szükség esetén pszichés támogatás igénybevételével, tervezhetik a jövőt.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Tudományos munkám során aCGH és MLPA módszerek alkalmazásával vizsgáltuk patogén CNV-k előfordulását CHD-ban és egy DSD-vel diagnosztizált beteg esetében.

Az első tanulmányban a CHD-s betegpopulációt három alcsoportra osztva vizsgáltuk.

A szindrómás CHD-val diagnosztizált betegcsoportban (n=33) 21%-os (7/33) diagnosztikai hatékonysággal azonosítottunk patogén CNV-t, ami megfelel az irodalomban közölt adatoknak. A genotípus-fenotípus összefüggés vizsgálatakor valamennyi pozitív esetben igazolható volt a CNV patogenetikai szerepe. Három betegnél ismert mikrodélíciós szindróma (2 DiGeorge, 1 Cri-du-chat), egy testvérpárnál ultra ritka familiáris 8p23.1 duplikációs szindróma, egy betegnél nagyon ritka 6q21–q22 deléciós szindróma, egy beteg esetében pedig egy eddig még nem leírt kiegyensúlyozatlan transzlokáció került kimutatásra. Eredményeink alapján kialakítottunk egy kivizsgálási algoritmust a CNV-k hatékony kimutatására szindrómás CHD-k esetén.

Az izolált CHD-s csoportban (n=16) a betegek súlyos, komplex CHD-val rendelkeztek extrakardiális tünetek nélkül. CHD-specifikus MLPA vizsgálatokkal nem igazolódott etiológiai szereppel bíró patogén CNV. Ennek egyik lehetséges magyarázata az alacsony mintaszám, a másik pedig a vizsgálat célzott jellege.

A CHD-val diagnosztizált abortumok kamrai szövetmintáiból (n=18) MLPA módszerrel egy esetben mutattunk ki CNV-t, amely a 14q22.2-es kromoszómarégióba lokalizálódó *BMP4* gén duplikációját jelentette. A kardiogenezisben szerepet játszó gén kópiaszám növekedésének patogenetikai jelentősége nem bizonyított.

A második tanulmányban egy tisztázatlan etiológiájú DSD-vel diagnosztizált beteg genetikai kivizsgálását végeztük el. Az *SRY*-pozitív, 46,XY kariotípusú, lányként nevelt gyermeknél női külső genitalia, hiányzó uterus és GD került leírásra. A DSD-specifikus

génekben új generációs szekvenálással mutáció nem volt kimutatható, teljes genom citogenetikai microarray vizsgálattal patogén CNV nem igazolódott. DSD-specifikus MLPA módszer alkalmazásával egy eddig még nem leírt mutációt, az *NR5A1* gén 5-ös és 6-os exonjának heterozigóta delécióját azonosítottuk, amely a dózis-szenzitív *NR5A1* gén haploinsufficienciáját eredményezve vezet DSD-hez. A mutáció megerősítette a 46,XY parciális GD diagnózist. Eredményeink megerősítették az intragénikus CNV-k patogenetikai szerepét a DSD-k kialakulásában és hangsúlyozták azok kimutatásának klinikai jelentőségét. Az MLPA módszer alkalmasnak bizonyult a DSD-vel összefüggésbe hozható gének exonális kópiaszám eltéréseinek szűrésére, alkalmazása javíthatja a kórkép nagyon alacsony diagnosztikai hatékonyságát.

9. SUMMARY

In my scientific work, we investigated the occurrence of pathogenic CNVs in CHD and in a patient diagnosed with DSD using aCGH and MLPA methods.

In the first study, we examined a CHD patient population divided into three subgroups.

In the group of patients with syndromic CHD (n=33), we identified pathogenic CNV with 21% (7/33) diagnostic efficiency, which corresponds to data reported in the literature. Determining the genotype-phenotype relationship, we were able to confirm the pathogenetic role of CNV in all positive cases. Three patients had known microdeletion syndrome (2 DiGeorge, 1 Cri-du-chat), two siblings had an ultra-rare familial 8p23.1 duplication syndrome, one patient had a very rare 6q21–q22 deletion syndrome, and one patient had a previously not reported unbalanced translocation. Based on our results, we worked-out a diagnostic algorithm for the effective detection of CNVs in syndromic CHDs.

In the isolated CHD group (n=16), patients had severe, complex CHDs without extracardiac symptoms. No pathogenic CNV with an etiological role was confirmed by CHD-specific MLPA studies. Possible explanation of our results can be the low number of investigated samples or targeted nature of the study.

In ventricular tissue samples from abortions diagnosed with CHD (n=18) were examined by MLPA method. In this cohort we detected a CNV in one case, a duplication of the *BMP4* gene localized to the 14q22.2 chromosome region. The pathogenetic significance of the increased gene copy number involved in cardiogenesis has not been demonstrated.

In the second study, we performed a genetic examination of a patient diagnosed with DSD of unknown etiology. Female external genitalia, missing uterus and GD have been reported in an *SRY* positive, 46,XY karyotype child raised as a girl. No mutation was detected in DSD-specific genes by next-generation sequencing, and no pathogenic CNV was revealed by whole

genome cytogenetic microarray analysis. Using DSD-specific MLPA method, we identified a novel mutation, a heterozygous deletion of exons 5 and 6 of the *NR5A1* gene, which resulted in the haploinsufficiency of the dosage sensitive *NR5A1* gene and explained the DSD of the patient. The mutation confirmed the diagnosis of 46,XY partial GD. Our results confirmed the pathogenetic role of intragenic CNVs in the development of DSDs and emphasize the clinical significance of their detection. The MLPA method has been shown to be suitable for screening for exonal copy number variants of genes associated with DSDs, and its application may improve the very low diagnostic efficiency of the disease.

10. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSAI

- 1.) Elsőként végeztünk Magyarországon olyan tanulmányt, amelyben patogén CNV-k előfordulását vizsgáltuk CHD-ban aCGH és MLPA módszerek alkalmazásával. Vizsgálataink során 21%-os diagnosztikai hatékonysággal azonosítottunk patogén CNV-eket a CHD szindrómás formáinak hátterében. A leggyakoribb DiGeorge szindróma mellett olyan ritka (prevalencia <1:2000) vagy ultra ritka (prevalencia <1:50 000) CNV okozta szindrómák genetikai diagnózisát állítottuk fel, mint a Cri-du-chat, 6q21–q22 deléció vagy 8p23.1 duplikációs szindróma. Egy esetben egy eddig még nem leírt, familiáris eredetű kiegyensúlyozatlan transzlokációt azonosítottunk. Mivel valamennyi mikrodeléció/mikroduplikációs szindróma autoszóm domináns módon öröklődik, amennyiben az érintettek elérik a felnőttkort, a genetikai diagnózis birtokában lehetőség nyílik prenatális genetikai vizsgálatra a betegség ismétlődésének megelőzése céljából.
- 2.) Megállapítottuk, hogy az általunk alkalmazott aCGH és MLPA technikák hatékony diagnosztikai eljárások a szindrómás CHD-k hátterében álló CNV-k azonosításában. Eredményeink alapján egy olyan, a CNV-k kimutatására alkalmas diagnosztikai algoritmust dolgoztunk ki, mellyel a genetikai tesztek eredményesen és költségkímélően alkalmazhatóak.
- 3.) Az izolált CHD-s esetek és a prenatálisan CHD-val diagnosztizált magzati minták esetében kapott eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a célzott MLPA vizsgálatok nem elegendőek patogén CNV-k azonosítására. A teljes genomra kiterjedő CNV szűrés citogenetikai microarray módszerrel nagyobb hatékonysággal azonosíthat patogenetikai jelentőségű CNV-eket.
- 4.) Egy tisztázatlan genetikai hátterű DSD-vel diagnosztizált betegben új, eddig nem közölt mutációt azonosítottunk az *NR5A1* génben MLPA módszerrel. A gén 5-ös és 6-os exonját

érintő heterozigóta deléción a DSD-t okozó mutációk egy nagyon ritka típusa. Eredményeink alapján felhívtuk a figyelmet a DSD kialakításában szerepet játszó gének intragénikus parciális kópiaszám eltéréseinek vizsgálatára. Hangsúlyoztuk az MLPA módszer alkalmazásának jelentőségét ezen CNV-k azonosításában, amely révén jelentős mértékben javítható a DSD-k nagyon alacsony diagnosztikai hatékonysága.

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Lupski JR, Stankiewicz P. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet.* 2005;1(6):e49.
2. Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG, Seidman CE. Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. *Circ Res.* 2013;112(4):707-20.
3. Blue GM, Kirk EP, Sholler GF, Harvey RP, Winlaw DS. Congenital heart disease: current knowledge about causes and inheritance. *Med J Aust.* 2012;197(3):155-9.
4. Pierpont ME, Brueckner M, Chung WK, Garg V, Lacro RV, McGuire AL, et al. Genetic Basis for Congenital Heart Disease: Revisited: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation.* 2018;138(21):e653-e711.
5. Ntiloudi D, Giannakoulas G, Parcharidou D, Panagiotidis T, Gatzoulis MA, Karvounis H. Adult congenital heart disease: A paradigm of epidemiological change. *Int J Cardiol.* 2016;218:269-74.
6. Witchel SF. Disorders of sex development. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018;48:90-102.
7. Eggers S, Sadedin S, van den Bergen JA, Robevska G, Ohnesorg T, Hewitt J, et al. Disorders of sex development: insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort. *Genome Biol.* 2016;17(1):243.
8. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet.* 2015;16(3):172-83.
9. Itsara A, Cooper GM, Baker C, Girirajan S, Li J, Absher D, et al. Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. *Am J Hum Genet.* 2009;84(2):148-61.

10. Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2009;10:451-81.
11. Harel T, Lupski JR. Genomic disorders 20 years on-mechanisms for clinical manifestations. *Clin Genet.* 2018;93(3):439-49.
12. MacDonald JR, Ziman R, Yuen RK, Feuk L, Scherer SW. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D986-92.
13. Yang L, Luquette LJ, Gehlenborg N, Xi R, Haseley PS, Hsieh CH, et al. Diverse mechanisms of somatic structural variations in human cancer genomes. *Cell.* 2013;153(4):919-29.
14. Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genet Med.* 2020;22(2):245-57.
15. Ligon AH, Beaudet AL, Shaffer LG. Simultaneous, multilocus FISH analysis for detection of microdeletions in the diagnostic evaluation of developmental delay and mental retardation. *Am J Hum Genet.* 1997;61(1):51-9.
16. Wiszniewska J, Bi W, Shaw C, Stankiewicz P, Kang SH, Pursley AN, et al. Combined array CGH plus SNP genome analyses in a single assay for optimized clinical testing. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(1):79-87.
17. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010;86(5):749-64.

18. Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N Engl J Med*. 2012;367(23):2175-84.
19. van der Linde D, Konings EE, Slager MA, Witsenburg M, Helbing WA, Takkenberg JJ, et al. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(21):2241-7.
20. Liu Y, Chen S, Zuhlke L, Black GC, Choy MK, Li N, et al. Global birth prevalence of congenital heart defects 1970-2017: updated systematic review and meta-analysis of 260 studies. *Int J Epidemiol*. 2019;48(2):455-63.
21. Richards AA, Garg V. Genetics of congenital heart disease. *Curr Cardiol Rev*. 2010;6(2):91-7.
22. Jerves T, Beaton A, Kruszka P. The genetic workup for structural congenital heart disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2020;184(1):178-86.
23. Nagy D, Széll M. [Genetic heterogeneity and complexity of congenital heart defects]. *Orv Hetil*. 2018;159(17):661-70.
24. Andersen TA, Troelsen Kde L, Larsen LA. Of mice and men: molecular genetics of congenital heart disease. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(8):1327-52.
25. Jenkins KJ, Correa A, Feinstein JA, Botto L, Britt AE, Daniels SR, et al. Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation*. 2007;115(23):2995-3014.
26. Zaidi S, Brueckner M. Genetics and Genomics of Congenital Heart Disease. *Circ Res*. 2017;120(6):923-40.

27. Ordovas JM, Smith CE. Epigenetics and cardiovascular disease. *Nature reviews Cardiology*. 2010;7(9):510-9.
28. Yuan S, Zaidi S, Brueckner M. Congenital heart disease: emerging themes linking genetics and development. *Curr Opin Genet Dev*. 2013;23(3):352-9.
29. Marian AJ. Copy number variants and the genetic enigma of congenital heart disease. *Circ Res*. 2014;115(10):821-3.
30. Hartman RJ, Rasmussen SA, Botto LD, Riehle-Colarusso T, Martin CL, Cragan JD, et al. The contribution of chromosomal abnormalities to congenital heart defects: a population-based study. *Pediatr Cardiol*. 2011;32(8):1147-57.
31. Saliba A, Figueiredo ACV, Baroneza JE, Afiune JY, Pic-Taylor A, Oliveira SF, et al. Genetic and genomics in congenital heart disease: a clinical review. *J Pediatr (Rio J)*. 2019.
32. Breckpot J, Thienpont B, Peeters H, de Ravel T, Singer A, Rayyan M, et al. Array comparative genomic hybridization as a diagnostic tool for syndromic heart defects. *J Pediatr*. 2010;156(5):810-7, 7.e1-7.e4.
33. Glessner JT, Bick AG, Ito K, Homsy J, Rodriguez-Murillo L, Fromer M, et al. Increased frequency of de novo copy number variants in congenital heart disease by integrative analysis of single nucleotide polymorphism array and exome sequence data. *Circ Res*. 2014;115(10):884-96.
34. Prendiville T, Jay PY, Pu WT. Insights into the genetic structure of congenital heart disease from human and murine studies on monogenic disorders. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(10).
35. Migeon CJ, Wisniewski AB. Sexual differentiation: from genes to gender. *Horm Res*. 1998;50(5):245-51.

36. Ohnesorg T, Vilain E, Sinclair AH. The genetics of disorders of sex development in humans. *Sex Dev.* 2014;8(5):262-72.
37. Grinspon RP, Rey RA. Disorders of Sex Development with Testicular Differentiation in SRY-Negative 46,XX Individuals: Clinical and Genetic Aspects. *Sex Dev.* 2016;10(1):1-11.
38. Hughes IA. Disorders of sex development: a new definition and classification. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism.* 2008;22(1):119-34.
39. Lee PA, Houk CP, Ahmed SF, Hughes IA. Consensus statement on management of intersex disorders. *International Consensus Conference on Intersex. Pediatrics.* 2006;118(2):e488-500.
40. Audi L, Ahmed SF, Krone N, Cools M, McElreavey K, Holterhus PM, et al. GENETICS IN ENDOCRINOLOGY: Approaches to molecular genetic diagnosis in the management of differences/disorders of sex development (DSD): position paper of EU COST Action BM 1303 'DSDnet'. *Eur J Endocrinol.* 2018;179(4):R197-r206.
41. Lee PA, Nordenstrom A, Houk CP, Ahmed SF, Auchus R, Baratz A, et al. Global Disorders of Sex Development Update since 2006: Perceptions, Approach and Care. *Horm Res Paediatr.* 2016;85(3):158-80.
42. Piferrer F. Epigenetics of sex determination and gonadogenesis. *Dev Dyn.* 2013;242(4):360-70.
43. Guerrero-Fernandez J, Azcona San Julian C, Barreiro Conde J, Bermudez de la Vega JA, Carcavilla Urqui A, Castano Gonzalez LA, et al. [Management guidelines for disorders / different sex development (DSD)]. *An Pediatr (Barc).* 2018;89(5):315.e1-.e19.
44. Palanza P, Nagel SC, Parmigiani S, Vom Saal FS. Perinatal exposure to endocrine disruptors: sex, timing and behavioral endpoints. *Curr Opin Behav Sci.* 2016;7:69-75.

45. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 1990;346(6281):240-4.
46. Yatsenko SA, Witchel SF. Genetic approach to ambiguous genitalia and disorders of sex development: What clinicians need to know. *Semin Perinatol*. 2017;41(4):232-43.
47. Ostrer H. Disorders of sex development (DSDs): an update. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(5):1503-9.
48. de Calais FL, Smith LD, Raponi M, Maciel-Guerra AT, Guerra-Junior G, de Mello MP, et al. A study of splicing mutations in disorders of sex development. *Sci Rep*. 2017;7(1):16202.
49. Suntharalingham JP, Buonocore F, Duncan AJ, Achermann JC. DAX-1 (NR0B1) and steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) in human disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015;29(4):607-19.
50. Barbaro M, Cools M, Looijenga LH, Drop SL, Wedell A. Partial deletion of the NR5A1 (SF1) gene detected by synthetic probe MLPA in a patient with XY gonadal disorder of sex development. *Sex Dev*. 2011;5(4):181-7.
51. Tannour-Louet M, Han S, Corbett ST, Louet JF, Yatsenko S, Meyers L, et al. Identification of de novo copy number variants associated with human disorders of sexual development. *PLoS One*. 2010;5(10):e15392.
52. Harrison SM, Granberg CF, Keays M, Hill M, Grimsby GM, Baker LA. DNA copy number variations in patients with 46,XY disorders of sex development. *J Urol*. 2014;192(6):1801-6.
53. White S, Hewitt J, Turbitt E, van der Zwan Y, Hersmus R, Drop S, et al. A multi-exon deletion within WWOX is associated with a 46,XY disorder of sex development. *Eur J Hum Genet*. 2012;20(3):348-51.

54. Ledig S, Hiort O, Wunsch L, Wieacker P. Partial deletion of DMRT1 causes 46,XY ovotesticular disorder of sexual development. *Eur J Endocrinol.* 2012;167(1):119-24.
55. Sutton E, Hughes J, White S, Sekido R, Tan J, Arboleda V, et al. Identification of SOX3 as an XX male sex reversal gene in mice and humans. *The Journal of clinical investigation.* 2011;121(1):328-41.
56. Croft B, Ohnesorg T, Sinclair AH. The Role of Copy Number Variants in Disorders of Sex Development. *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation.* 2018;12(1-3):19-29.
57. Ohnesorg T, van den Bergen JA, Belluoccio D, Shankara-Narayana N, Kean AM, Vasilaras A, et al. A duplication in a patient with 46,XX ovo-testicular disorder of sex development refines the SOX9 testis-specific regulatory region to 24 kb. *Clinical genetics.* 2017;92(3):347-9.
58. Hyon C, Chantot-Bastaraud S, Harbuz R, Bhourri R, Perrot N, Peycelon M, et al. Refining the regulatory region upstream of SOX9 associated with 46,XX testicular disorders of Sex Development (DSD). *American journal of medical genetics Part A.* 2015;167a(8):1851-8.
59. Oba K, Yanase T, Nomura M, Morohashi K, Takayanagi R, Nawata H. Structural characterization of human Ad4bp (SF-1) gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;226(1):261-7.
60. Domenice S, Machado AZ, Ferreira FM, Ferraz-de-Souza B, Lerario AM, Lin L, et al. Wide spectrum of NR5A1-related phenotypes in 46,XY and 46,XX individuals. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2016;108(4):309-20.

61. Achermann JC, Ito M, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet.* 1999;22(2):125-6.
62. Kohler B, Lin L, Mazen I, Cetindag C, Biebermann H, Akkurt I, et al. The spectrum of phenotypes associated with mutations in steroidogenic factor 1 (SF-1, NR5A1, Ad4BP) includes severe penoscrotal hypospadias in 46,XY males without adrenal insufficiency. *Eur J Endocrinol.* 2009;161(2):237-42.
63. Lin L, Philibert P, Ferraz-de-Souza B, Kelberman D, Homfray T, Albanese A, et al. Heterozygous missense mutations in steroidogenic factor 1 (SF1/Ad4BP, NR5A1) are associated with 46,XY disorders of sex development with normal adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(3):991-9.
64. Werner R, Monig I, Lunstedt R, Wunsch L, Thorns C, Reiz B, et al. New NR5A1 mutations and phenotypic variations of gonadal dysgenesis. *PloS one.* 2017;12(5):e0176720.
65. Bashamboo A, Ledig S, Wieacker P, Achermann JC, McElreavey K. New technologies for the identification of novel genetic markers of disorders of sex development (DSD). *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation.* 2010;4(4-5):213-24.
66. Cowan JR, Ware SM. Genetics and genetic testing in congenital heart disease. *Clin Perinatol.* 2015;42(2):373-93, ix.
67. Opatowsky AR, Siddiqi OK, D'Souza B, Webb GD, Fernandes SM, Landzberg MJ. Maternal cardiovascular events during childbirth among women with congenital heart disease. *Heart (British Cardiac Society).* 2012;98(2):145-51.
68. Oyen N, Poulsen G, Boyd HA, Wohlfahrt J, Jensen PK, Melbye M. Recurrence of congenital heart defects in families. *Circulation.* 2009;120(4):295-301.

69. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med*. 2011;13(7):680-5.
70. Javorszky E, Moriniere V, Kerti A, Balogh E, Piko H, Saunier S, et al. QMPSF is sensitive and specific in the detection of NPHP1 heterozygous deletions. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55(6):809-16.
71. Carrington B, Varshney GK, Burgess SM, Sood R. CRISPR-STAT: an easy and reliable PCR-based method to evaluate target-specific sgRNA activity. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(22):e157.
72. Carey AS, Liang L, Edwards J, Brandt T, Mei H, Sharp AJ, et al. Effect of copy number variants on outcomes for infants with single ventricle heart defects. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013;6(5):444-51.
73. Kim DS, Kim JH, Burt AA, Crosslin DR, Burnham N, Kim CE, et al. Burden of potentially pathologic copy number variants is higher in children with isolated congenital heart disease and significantly impairs covariate-adjusted transplant-free survival. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2016;151(4):1147-51.e4.
74. Russell MW, Chung WK, Kaltman JR, Miller TA. Advances in the Understanding of the Genetic Determinants of Congenital Heart Disease and Their Impact on Clinical Outcomes. *J Am Heart Assoc*. 2018;7(6).
75. Thienpont B, Mertens L, de Ravel T, Eyskens B, Boshoff D, Maas N, et al. Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients. *European heart journal*. 2007;28(22):2778-84.

76. Goldmuntz E, Paluru P, Glessner J, Hakonarson H, Biegel JA, White PS, et al. Microdeletions and microduplications in patients with congenital heart disease and multiple congenital anomalies. *Congenit Heart Dis*. 2011;6(6):592-602.
77. Geng J, Picker J, Zheng Z, Zhang X, Wang J, Hisama F, et al. Chromosome microarray testing for patients with congenital heart defects reveals novel disease causing loci and high diagnostic yield. *BMC Genomics*. 2014;15:1127.
78. Richards AA, Santos LJ, Nichols HA, Crider BP, Elder FF, Hauser NS, et al. Cryptic chromosomal abnormalities identified in children with congenital heart disease. *Pediatr Res*. 2008;64(4):358-63.
79. Basinko A, Giovannucci Uzielli ML, Scarselli G, Priolo M, Timpani G, De Braekeleer M. Clinical and molecular cytogenetic studies in ring chromosome 5: report of a child with congenital abnormalities. *Eur J Med Genet*. 2012;55(2):112-6.
80. Zhang X, Snijders A, Segraves R, Zhang X, Niebuhr A, Albertson D, et al. High-resolution mapping of genotype-phenotype relationships in cri du chat syndrome using array comparative genomic hybridization. *American journal of human genetics*. 2005;76(2):312-26.
81. Hills C, Moller JH, Finkelstein M, Lohr J, Schimmenti L. Cri du chat syndrome and congenital heart disease: a review of previously reported cases and presentation of an additional 21 cases from the Pediatric Cardiac Care Consortium. *Pediatrics*. 2006;117(5):e924-7.
82. Toschi B, Valetto A, Bertini V, Congregati C, Cantinotti M, Assanta N, et al. Acro-cardio-facial syndrome: a microdeletion syndrome? *Am J Med Genet A*. 2012;158a(8):1994-9.
83. Rosenfeld JA, Amrom D, Andermann E, Andermann F, Veilleux M, Curry C, et al. Genotype-phenotype correlation in interstitial 6q deletions: a report of 12 new cases. *Neurogenetics*. 2012;13(1):31-47.

84. Shukla A, Hebbar M, Harms FL, Kadavigere R, Girisha KM, Kutsche K. Phenotypic variability in patients with interstitial 6q21-q22 microdeletion and Acro-Cardio-Facial syndrome. *American journal of medical genetics Part A*. 2016;170(11):2998-3003.
85. Vona B, Nanda I, Neuner C, Schroder J, Kalscheuer VM, Shehata-Dieler W, et al. Terminal chromosome 4q deletion syndrome in an infant with hearing impairment and moderate syndromic features: review of literature. *BMC Med Genet*. 2014;15:72.
86. Pivnick EK, Qumsiyeh MB, Tharapel AT, Summitt JB, Wilroy RS. Partial duplication of the long arm of chromosome 6: a clinically recognisable syndrome. *J Med Genet*. 1990;27(8):523-6.
87. Barber JC, Rosenfeld JA, Graham JM, Kramer N, Lachlan KL, Bateman MS, et al. Inside the 8p23.1 duplication syndrome; eight microduplications of likely or uncertain clinical significance. *Am J Med Genet A*. 2015;167a(9):2052-64.
88. Yu S, Zhou XG, Fiedler SD, Brawner SJ, Joyce JM, Liu HY. Cardiac defects are infrequent findings in individuals with 8p23.1 genomic duplications containing GATA4. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4(6):620-5.
89. Weber A, Kohler A, Hahn A, Muller U. 8p23.1 duplication syndrome: narrowing of critical interval to 1.80 Mbp. *Mol Cytogenet*. 2014;7(1):94.
90. Weischenfeldt J, Symmons O, Spitz F, Korbel JO. Phenotypic impact of genomic structural variation: insights from and for human disease. *Nat Rev Genet*. 2013;14(2):125-38.
91. Oskarsdottir S, Vujic M, Fasth A. Incidence and prevalence of the 22q11 deletion syndrome: a population-based study in Western Sweden. *Arch Dis Child*. 2004;89(2):148-51.

92. McDonald-McGinn DM, Tonnesen MK, Laufer-Cahana A, Finucane B, Driscoll DA, Emanuel BS, et al. Phenotype of the 22q11.2 deletion in individuals identified through an affected relative: cast a wide FISHing net! *Genet Med*. 2001;3(1):23-9.
93. Morrow BE, McDonald-McGinn DM, Emanuel BS, Vermeesch JR, Scambler PJ. Molecular genetics of 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A*. 2018;176(10):2070-81.
94. Erdogan F, Larsen LA, Zhang L, Tumer Z, Tommerup N, Chen W, et al. High frequency of submicroscopic genomic aberrations detected by tiling path array comparative genome hybridisation in patients with isolated congenital heart disease. *J Med Genet*. 2008;45(11):704-9.
95. Monteiro RAC, de Freitas ML, Vianna GS, de Oliveira VT, Pietra RX, Ferreira LCA, et al. Major Contribution of Genomic Copy Number Variation in Syndromic Congenital Heart Disease: The Use of MLPA as the First Genetic Test. *Mol Syndromol*. 2017;8(5):227-35.
96. Guida V, Lepri F, Vijzelaar R, De Zorzi A, Versacci P, Digilio MC, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification analysis of GATA4 gene copy number variations in patients with isolated congenital heart disease. *Dis Markers*. 2010;28(5):287-92.
97. Mutlu ET, Aykan HH, Karagoz T. Analysis of gene copy number variations in patients with congenital heart disease using multiplex ligation-dependent probe amplification. *Anatol J Cardiol*. 2018;20(1):9-15.
98. Wu XL, Li R, Fu F, Pan M, Han J, Yang X, et al. Chromosome microarray analysis in the investigation of children with congenital heart disease. *BMC pediatrics*. 2017;17(1):117.
99. Committee Opinion No. 581: the use of chromosomal microarray analysis in prenatal diagnosis. *Obstet Gynecol*. 2013;122(6):1374-7.

100. Qian B, Mo R, Da M, Peng W, Hu Y, Mo X. Common variations in BMP4 confer genetic susceptibility to sporadic congenital heart disease in a Han Chinese population. *Pediatr Cardiol.* 2014;35(8):1442-7.
101. Lin L, Achermann JC. Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. *Sex Dev.* 2008;2(4-5):200-9.
102. Portnoi MF, Dumargne MC, Rojo S, Witchel SF, Duncan AJ, Eozenou C, et al. Mutations involving the SRY-related gene SOX8 are associated with a spectrum of human reproductive anomalies. *Human molecular genetics.* 2018;27(7):1228-40.
103. Luo X, Ikeda Y, Parker KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell.* 1994;77(4):481-90.
104. Kon M, Fukami M. Submicroscopic copy-number variations associated with 46,XY disorders of sex development. *Mol Cell Pediatr.* 2015;2(1):7.
105. Schlaubitz S, Yatsenko SA, Smith LD, Keller KL, Vissers LE, Scott DA, et al. Ovotestes and XY sex reversal in a female with an interstitial 9q33.3-q34.1 deletion encompassing NR5A1 and LMX1B causing features of Genitopatellar syndrome. *Am J Med Genet A.* 2007;143a(10):1071-81.
106. van Silfhout A, Boot AM, Dijkhuizen T, Hoek A, Nijman R, Sikkema-Raddatz B, et al. A unique 970kb microdeletion in 9q33.3, including the NR5A1 gene in a 46,XY female. *Eur J Med Genet.* 2009;52(2-3):157-60.
107. Harrison SM, Campbell IM, Keays M, Granberg CF, Villanueva C, Tannin G, et al. Screening and familial characterization of copy-number variations in NR5A1 in 46,XY disorders of sex development and premature ovarian failure. *Am J Med Genet A.* 2013;161a(10):2487-94.

108. Brandt T, Blanchard L, Desai K, Nimkarn S, Cohen N, Edelmann L, et al. 46,XY disorder of sex development and developmental delay associated with a novel 9q33.3 microdeletion encompassing NR5A1. *Eur J Med Genet.* 2013;56(11):619-23.

12. TÁRGYSZAVAK/KEYWORDS

Tárgyszavak: kópiaszám eltérések, veleszületett szívfejlődési rendellenesség, MLPA, citogenetikai microarray, *NR5A1*, új parciális deléción, 46,XY DSD

Keywords: copy number variants, congenital heart disease, MLPA, cytogenetic microarray, *NR5A1*, new partial deletion, 46,XY DSD

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik segítséget nyújtottak a PhD dolgozatom elkészítése során.

Elsősorban szeretném hálásan megköszönni témavezetőmnek, **Dr. Ujfalusi Anikó** adjunktusnak az elmúlt évek során végzett önzetlen és áldozatos munkáját, kitartó türelmét, aki sokoldalú, iránymutató tanácsokkal látott el mind elméleti, mind gyakorlati kérdésekben. Ötleteivel és kritikáival jelentősen hozzájárult a PhD értekezés alapjául szolgáló publikációk, illetve az értekezésem elkészítéséhez. Köszönöm a segítségét a **Citogenetikai Részleg asszisztenseinek** a citogenetikai vizsgálatok kivitelezésében.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Balogh István** egyetemi docensnek, a Klinikai Genetikai Tanszék vezetőjének, aki biztosította számomra a kutatómunkámhoz és a dolgozatom elkészítéséhez szükséges szakmai feltételeket. Köszönöm továbbá a **Klinikai Genetikai Tanszék valamennyi dolgozójának**.

Hálás köszönettel tartozom **Dr. Kappelmayer János** Professzor úrnak, a Laboratóriumi Medicina Intézet igazgatójának, aki az elmúlt években figyelemmel kísérte és folyamatosan támogatta tudományos munkámat, biztosította az azokhoz szükséges feltételeket. Köszönöm neki, hogy ebben az Intézetben végezhettem a PhD munkámat.

Köszönet illeti a **szerzőtársaimat** is, akik értékes munkájukkal hozzájárultak az értekezés alapjául szolgáló közlemények elkészítéséhez és elfogadásához.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Baráth Sándornak**, a Laboratóriumi Medicina Intézet adjunktusának a publikációkban és az értekezésben szereplő kiváló ábrák elkészítésében nyújtott önzetlen segítségéért.

A kutatómunka a **GINOP-2.3.2-15-2016-00039** számú, a „*Ritka betegségek pathogenezisének kutatása, új diagnosztikai és terápiás eljárásokat megalapozó fejlesztések*” című pályázat támogatásával jött létre.

14. PUBLIKÁCIÓS LISTA



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/240/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Nagy Orsolya
Neptun kód: BVGBTN
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10057382

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Nagy, O.**, Szakszon, K., Biró, B. O., Mogyorósy, G., Nagy, D., Nagy, B., Balogh, I., Ujfalusi, A.:
Copy number variants detection by microarray and multiplex ligation-dependent probe
amplification in congenital heart diseases.
J. Biotechnol. 299, 86-95, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.04.025>
IF: 3.503
2. **Nagy, O.**, Kárteszi, J., Hartwig, M., Bertalan, R., Jávorszky, E., Erhardt, É., Patócs, A., Tornóczky,
T., Balogh, I., Ujfalusi, A.: The importance of the multiplex ligation-dependent probe
amplification in the identification of a novel two-exon deletion of the NR5A1 gene in a patient
with 46,XY differences of sex development.
Mol. Biol. Rep. 46 (5), 5595-5601, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-019-04980-8>
IF: 1.402





További közlemények

3. Ujfalusi, A., **Nagy, O.**, Bessenyei, B., Lente, G., Kántor, I., Borbély, Á. J., Szakszon, K.: 22q13 microduplication syndrome in siblings with mild clinical phenotype: broadening the clinical and behavioral spectrum.
Mol Syndromol. 11 (3), 146-152, 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1159/000507103>
IF: 1.198 (2019)
4. **Nagy, O.**, Baráth, S., Ujfalusi, A.: The role of microRNAs in congenital heart disease.
EJIFCC. 30 (2), 165-178, 2019.
5. Tóth, N. K., Székely, E. G., Czuriga-Kovács, K. R., Sarkady, F., **Nagy, O.**, Lánczi, L., Berényi, E., Fekete, K., Fekete, I., Csiba, L., Bagoly, Z.: Elevated factor VIII and von Willebrand factor levels predict unfavorable outcome in stroke patients treated with intravenous thrombolysis.
Front. Neurol. 8, 1-10, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2017.00721>
IF: 2.635

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8,738

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
4,905**

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, 2020.08.19.



15. FÜGGELÉK

A függelék a doktori (PhD) értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények különlenyomatait tartalmazza.