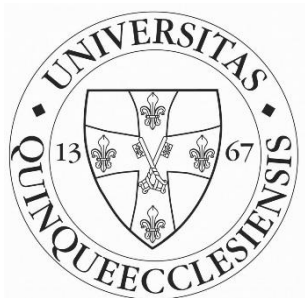


EGYETEMI DOKTORI (Ph.D) ÉRTEKEZÉS

**Hagyományos és új-generációs genetikai módszerek az epilepszia  
molekuláris diagnosztikájában**

**Dr. TILL ÁGNES**



Doktori iskola vezetője:

**Dr. Gallyas Ferenc**  
egyetemi tanár

Témavezetők:

**Dr. Hadzsiev Kinga**  
egyetemi adjunktus

és

**Dr. Melegh Béla**  
egyetemi tanár

**Pécsi Tudományegyetem**  
**Általános Orvostudományi Kar**  
**Interdiszciplináris Tudományok Doktori Iskola**  
**Klinikai Központ, Orvosi Genetikai Intézet**

**2020**

# TARTALOMJEGYZÉK

1.RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....	4
2.BEVEZETÉS.....	8
2.1.Az epilepszia betegség.....	8
2.1.1.Az epilepsziás roham és az epilepszia betegség definíciója .....	8
2.1.2.Az epilepszia epidemiológiája és pathomechanismusa .....	8
2.1.3.Az epilepsziás rohamok és az epilepszia szindrómák új klasszifikációja (ILAE 2017) .....	9
2.1.4.Az epilepszia genetika története.....	11
2.2.A fejlődési és epilepsziás encephalopathiák .....	12
2.2.1.Genetikai háttér .....	13
2.2.2.Vizsgálati módszerek: előnyök és hátrányok .....	17
2.2.3.Diagnosztikus algoritmus .....	18
2.2.4.Infantilisspasmus/West szindróma .....	21
2.2.5.Lennox-Gastaut szindróma.....	22
2.2.6.Dravet szindróma .....	22
2.2.7.Csecsemőkori epilepszia migráló fokális rohamokkal .....	23
2.3.A genetikusan generalizált epilepsziák és genetikai hátterük.....	24
2.3.1.Genetikai epilepszia lázas görcs plusz szindróma .....	25
3.CÉLKITŰZÉSEK.....	27
4.A VIZSGÁLATBAN RÉSZTVEVŐ BETEGEK.....	28
4.1.Idic (15) szindrómás betegek.....	28
4.1.1.1. beteg.....	29
4.1.2.2. beteg.....	30
4.1.3.3. beteg.....	30
4.1.4.4. beteg.....	31
4.1.5.5. beteg.....	31
4.2.DS és GEFS+ szindrómás betegek.....	32
4.3.GGE-ban szenvedő beteg .....	32
5.MÓDSZEREK.....	34
5.1.Mintavétel és tárolás.....	34
5.2.DNS izolálás .....	34
5.3.GTG sávozás.....	34
5.4.Fluorescens in situ hibridizáció .....	34
5.5.Uniparentalis disomia.....	34
5.6.Array komparatív genom hibridizáció .....	35
5.7.Automatizált Sanger-féle szekvenálás.....	36
5.8.Multiplex ligációfüggő próba amplifikáció .....	36
5.9.Új-generációs szekvenálás, teljesexom-szekvenálás.....	37

6.EREDMÉNYEK .....	38
6.1.Idic (15) szindrómás betegek fenotípusa és strukturális különbségei .....	38
6.1.1.A betegek fenotípusa .....	38
6.1.2.GTG sávozás és FISH .....	38
6.1.3.Uniparentalis disomia.....	39
6.1.4.Array CGH .....	39
6.2.Az <i>SCN1A</i> -gén mutációs spektruma a magyar epilepsziás populációban .....	43
6.3.Generalizált epilepszia háttérében azonosított ioncsatorna-génmutáció ritka formája .....	47
7.EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE .....	48
7.1.Az array komparatív genom hibridizáció szerepe az idic (15) szindrómás betegek diagnosztikájában.....	48
7.2.A Dravet szindróma és a GEFS+ szindróma fenotipikus és genotipikus heterogenitása .....	51
7.3.A teljesexom-szekvenálás szerepe a genetikusan generalizált epilepszia diagnózisában .....	53
8.ÖSSZEFOGLALÁS .....	56
9.IRODALOMJEGYZÉK .....	60
10.KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE .....	70
11.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	72
12.MELLÉKLETEK.....	73

# 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

**ACMG:** (American College of Medical Genetics and Genomics)

**ACTH:** adrenocorticotrop hormon

**AE:** antiepileptikum

**AD:** autosomalis domináns

**AR:** autosomalis recesszív

**array CGH:** array komparatív genom hibridizáció

**ARX:** (aristaless-related homeobox, X-linked)

**BP:** (breakpoint), töréspont

**CACNA1H:** T-típusú feszültségfüggő calciumcsatorna alfa-1H alegység

**CDKL5:** (cyclin-dependent kinase-like 5)

**CHRNA4:** neuronális nikotinérzékeny acetilcholin-receptor alfa-4 alegység

**CHRNA7:** neuronális nikotinérzékeny acetilcholin-receptor alfa-7 alegység

**CLCN2:** 2-es típusú kloridcsatorna

**CNV:** (copy number variant), kópiaszám-változás

**DCX:** (doublecortin)

**DECIPHER:** (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources)

**DNS:** deoxiribonucleinsav

**DS:** Dravet szindróma

**EDTA:** etilén-diamin-tetraecetsav

**EE:** epilepsziás encephalopathia

**EEG:** electroencephalographia

**EFHC1:** 1-es típusú myoclonin

**EIMFS:** (epilepsy of infancy with migrating focal seizures), korai migráló fokális epilepszia

**EPSP:** excitatoros postsynapticus potenciál

**FISH:** fluorescens in situ hibridizáció

**FLB:** felbamát

**FOXG1:** (forkhead box protein G1)

**GABA:** gamma amino-vajsav

**GABRA1:** gamma amino-vajsav receptor alfa-1 alegység

**GABRA5:** gamma amino-vajsav receptor alfa-5 alegység

**GABRB3:** gamma amino-vajsav receptor béta-3 alegység

**GABRD:** gamma amino-vajsav receptor delta alegység

**GABRG2:** gamma amino-vajsav receptor gamma-2 alegység

**GABRG3:** gamma amino-vajsav receptor gamma-3 alegység

**GEFS+:** (genetic epilepsy with febrile seizure plus), genetikus epilepszia lázgörcs plusz

**GGE:** genetikus generalizált epilepszia

**GLUT1:** 1-es típusú glükóz transporter

**GRIN1:** ionotrop glutamát receptor, NMDA 1-es alegység

**GRIN2A:** ionotrop glutamát receptor, NMDA 2A-alegység

**GTC:** generalizált tónusos-clonusos

**GTG sávozás:** Giemsa-Trypsin sávozás

**idic (15):** isodentricus kromoszóma (15)

**IGE:** idiopathiás generalizált epilepszia

**IGE-14:** idiopathiás generalizált epilepszia 14-es típus

**ILAE:** (International League Against Epilepsy), Nemzetközi Epilepszia Ellenes Liga

**IPSP:** inhibitoros postsynapticus potenciál

**IS:** infantilis spasmus

**JME:** juvenilis myoclonusos epilepszia

**KCC2:** kálium-klorid kotransporter 2-es típus

**KCNQ2:** feszültségfüggő káliumcsatorna, Q-alcsoport, 2-es tag

**KCNQ3:** feszültségfüggő káliumcsatorna, Q-alcsoport, 3-as tag

**KCNT1:** káliumcsatorna, T-alcsoport, 1-es tag

**KIR:** központi idegrendszer

**LGS:** Lennox-Gastaut szindróma

**LTG:** lamotrigin

**LVT:** levetiracetam

**MAGI2:** membrán-asszociált guanilát-kináz 2-es típus

**MEFC2:** (mads box transcription enhancer factor 2 polypeptide C)

**MLPA:** multiplex ligációfüggő próba amplifikáció

**MRI:** (magnetic resonance imaging), mágneses rezonancia képalkotó eljárás

**NGS:** (next generation sequencing), új-generációs szekvenálás

**NMDA:** N-metil-D-aszpartát

**PCDH19:** (protocadherin19)

**PCR:** polimeráz-lánreakció

**PET/CT:** pozitron emissios tomographia/computer tomographia

**PML:** (inducer of acute promyelocytic leukemia)

**PWS/AS:** Prader-Willi szindróma/Angelman szindróma

**RFN:** rufinamid

**SCN1A:** feszültségfüggő nátriumcsatorna alfa-1 alegység

**SCN1B:** feszültségfüggő nátriumcsatorna béta-1 alegység

**SCN2A:** feszültségfüggő nátriumcsatorna alfa-2 alegység

**SCN3A:** feszültségfüggő nátriumcsatorna alfa-3 alegység

**SCN9A:** feszültségfüggő nátriumcsatorna alfa-9 alegység

**SLC2A1:** (solute carrier family 2, member 1)

**SLC12A5:** (solute carrier family 12, member 5)

**SMC:** (supernumerary marker chromosome), számfeletti marker kromoszóma

**SMEI:** (severe myoclonic epilepsy of infancy), csecsemőkori súlyos myoclonusos epilepszia

**SNV:** (single nucleotide variant), egy nukleotidot érintő változás

**SPTAN1:** (non-erythrocytic alpha-spectrin-1)

**STR:** (short tandem repeat)

**STXBP1:** syntaxin-kötő 1-es típusú fehérje

**TPM:** topiramát

**TSC1:** (tuberous sclerosis 1)

**TSC2:** (tuberous sclerosis 2)

**UBE3A:** (ubiquitin protein ligase E3A)

**UCSC:** (University of California, Santa Cruz)

**UPD:** uniparentalis disomia

**VGB:** vigabatrin

**VPA:** valproát

**VUS:** (variant of unknown significance), bizonytalan jelentőségű variáns

**WES:** (whole-exome sequencing), teljesexom-szekvenálás

**WGS:** (whole-genome sequencing), teljesgenom-szekvenálás

**WS:** West szindróma

## 2. BEVEZETÉS

### 2.1. Az epilepszia betegség

#### 2.1.1. Az epilepsziás roham és az epilepszia betegség definíciója

Az epilepsziás roham az agy kóros, nagymértékű vagy szinkron neuronális aktivitása következtében kialakuló objektív vagy szubjektív tünetek megjelenését jelenti. A paroxysmalis aktivitás átmeneti, többnyire néhány másodpercig vagy percig tart, és intermittálón jelentkezik. Klinikailag a tudatban, viselkedésben, mozgásban, érzelmekben bekövetkező változás kíséri. Epilepsziás rohamot számos tényező válthat ki. Epilepszia betegségről akkor beszélünk, ha ismétlődő, spontán epilepsziás rohamok jelentkeznek. A Nemzetközi Epilepsziaellenes Liga (International League Against Epilepsy, ILAE) jelenleg érvényben lévő definíciója szerint az epilepszia betegség diagnózisa akkor állítható fel, ha a betegnek két nem provokált rohama volt 24 órás különbséggel, vagy egy meghatározott epilepszia szindróma diagnózisa felállítható, vagy a betegnek egy nem provokált rohama volt, és legalább 60%-os a valószínűsége egy további roham kialakulásának a következő 10 évben (Fisher RS, 2014).

#### 2.1.2. Az epilepszia epidemiológiája és pathomechanismusa

Az epilepszia incidenciája a legmagasabb az első életévben, majd folyamatosan csökken. Tizenöt éves életkorban a kumulatív incidencia kb. 0,8%, 20 és 60 év között stagnál, majd 60 éves kor felett újra jelentősen megemelkedik a cerebrovascularis kórképek, agyi tumorok gyakoribb előfordulása miatt. Magyarországon a gyermekpopulációban 1%, a felnőtt népességben 0,5% körüli prevalenciával számolva, hozzávetőleg 50–60 ezer epilepsziás beteg él. Gyermekekben az epilepszia a leggyakoribb idegrendszeri betegség.

Az epilepsziára a legújabb kutatások tükrében hálózati betegséggént tekintünk. Az epilepsziás hálózat olyan funkcionálisan és anatómiailag is összekapcsolt, bilateralisan reprezentált, corticalis és subcorticalis agyi struktúrák és régiók halmaza, amelyek egymással összeköttetésben állnak, és bármelyik rész aktivitása hatással van az összes többire (Spencer SS, 2002). Számos hálózat ismert, például a thalamocorticalis és a perisylvian hálózatok. A hálózatok az agy fejlődése során plasztikus változásokon mennek keresztül, a különböző agyi területek aszinkron érésével lehet összefüggésben a fejlődő agy nagyobb vulnerabilitása az epilepsziás rohamok tekintetében. Az epilepsziás roham kialakulásának feltétele a neuronok fokozott ingerelhetősége és a sejtek szinkron működése. A rohamok létrejöttéhez a serkentő és gátló neuronrendszerek kóros kölcsönhatása szükséges. Az idegsejtek membránjának külső és belső felszíne között 60-80 mV feszültségkülönbség mérhető. A nyugalmi membránpotenciál fenntartását a nagy energiaigényű  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  pumpa biztosítja, mely a  $\text{Na}^+$ -ionokat az

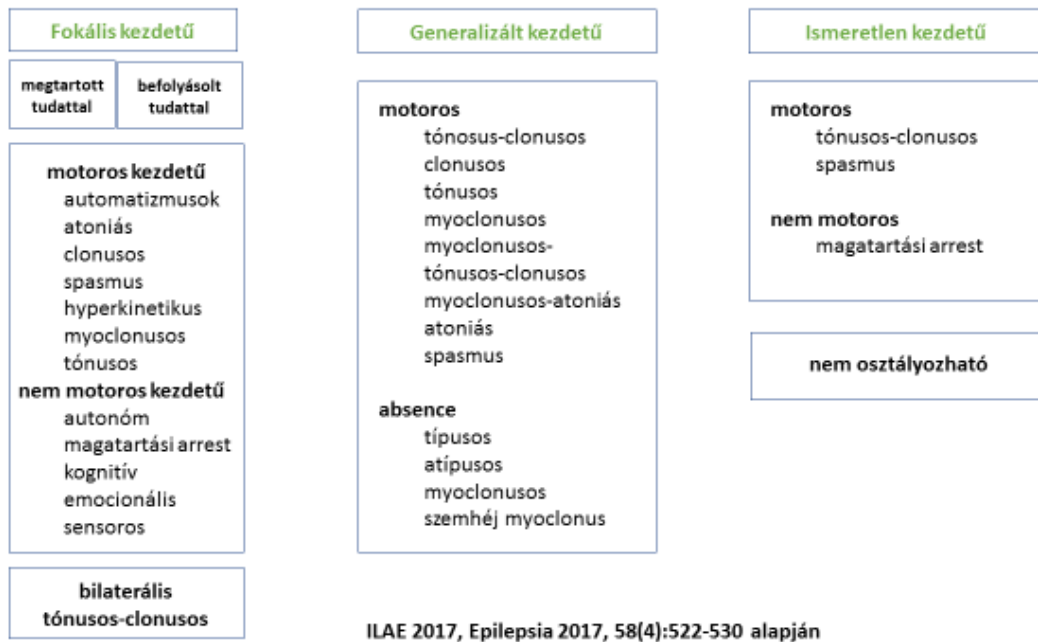


extracellularis, a  $K^+$ -ionokat az intracellularis térbe juttatja. Hasonló mechanizmussal feszültségfüggő  $Ca^{++}$ -akciós potenciálok is kialakulnak. A neuronok közötti ingerületátvitelt serkentő és gátló neurotransmitterek biztosítják. A központi idegrendszerben (KIR) a legfontosabb serkentő transzmitter a glutamát, mely postsynapticusan az NMDA (N-metil-D-aszpartát) -és a nem NMDA-receptorokhoz kapcsolódik. A gamma-aminovajsav (GABA) és a glicin a legismertebb gátló transzmitterek. A  $GABA_A$ -típusú receptorok kloridcsatornákkal, a  $GABA_B$ -típusú receptorok káliumcsatornákkal állnak kapcsolatban. A serkentő neurotransmitter hatására a postsynapticus sejtbe pozitív töltésű ionok lépnek be, így a membrán depolarizálódik, feszültsége megközelíti vagy átlépi az akciós potenciál küszöböt, ez az excitatoros postsynapticus potenciál (EPSP). Inhibitoros transzmitter hatására a sejtől pozitív ionok lépnek ki, vagy a postsynapticus sejtbe negatív ionok jutnak be, így a membrán hyperpolarizálódik, feszültsége az akciós potenciál küszöbötől távolabb kerül (inhibitoros postsynapticus potenciál, IPSP). A sejten egy időben jelentkező EPSP-k és IPSP-k aránya határozza meg, hogy akciós potenciál kialakul-e. A neuronok kóros ingerlékenységét számos cellularis folyamat okozhatja, pl. a membrán feszültségfüggő ioncsatornáinak szerkezeti vagy funkcionális károsodása, a serkentő és gátló synapsisok szerkezeti és/vagy eloszlásbeli zavara, az extracellularis ionkoncentráció szabályozásának zavara, a serkentő és a gátló neurotransmitterek egyensúlyának változása, vagy a neurotransmitter-receptorok mennyiségi, szerkezeti és funkcionális károsodása (Szirmai I, 2011).

### ***2.1.3. Az epilepsziás rohamok és az epilepszia szindrómák új klasszifikációja (ILAE 2017)***

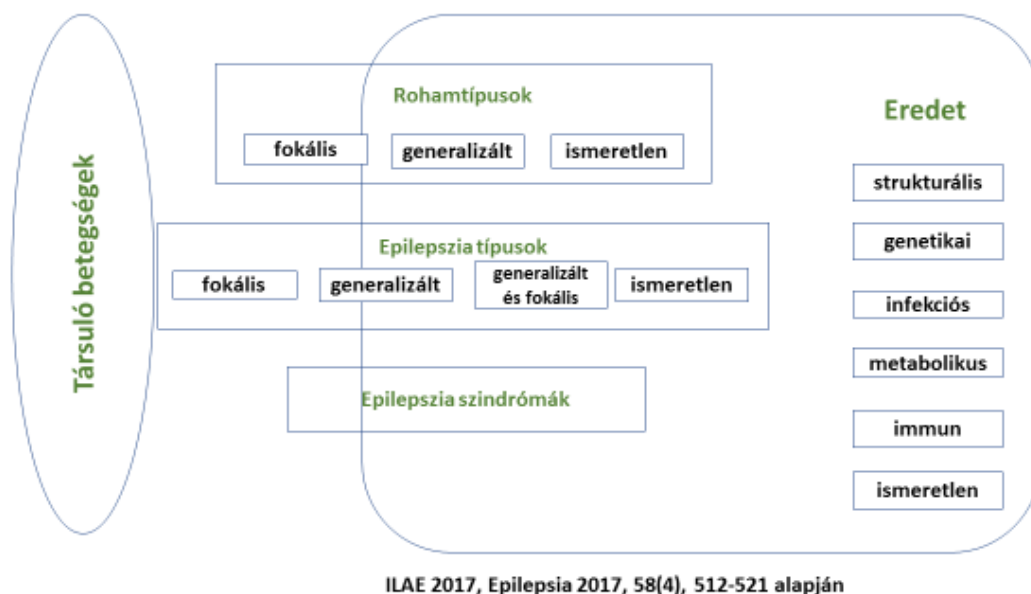
Az elmúlt két évtizedben az új-generációs molekuláris genetikai módszerek és a bioinformatika robbanásszerű fejlődésének köszönhetően olyan léptékű előrelépés történt az epilepszia genetikai hátterének feltárásában, amely lehetővé tette a betegség molekuláris mechanizmusainak pontosabb megismerését, ezek befolyásolásával pedig új terápiás lehetőségek is elérhetővé váltak (Orsini A, 2018). Az epilepsziakutatás során elért eredmények hozzájárultak az epilepsziás rohamok, az epilepsziák és az epilepsziás szindrómák új klasszifikációjának kidolgozásához (ILAE 2017). Az ILAE legújabb klasszifikációja nemcsak a betegek diagnosztizálása, hanem az epilepsziakutatás, innovatív gyógyszerek fejlesztése és a szakemberek közötti egységes kommunikáció miatt is esszenciális. Míg a klasszikus osztályozás alapján az epilepsziák 70%-a az idiopathiás etiológiájú csoportba tartozott, addig jelenleg több, mint 30%-ban igazolható a háttérben álló genetikai eltérés, ezért az idiopathiás jelző használata háttérbe szorul. A legújabb beosztás háromszintű, a rohamtípus

meghatározását követően kerülhet sor az epilepszia típusának (fokális, generalizált, kombinált fokális és generalizált és ismeretlen) kategorizálására, ezt követően pedig - amely esetekben az lehetséges - az epilepszia szindróma meghatározására. Az **1. ábra** mutatja be a rohamtípusok részletes klasszifikációját, a **2. ábra** pedig a klasszifikáció szintjeit tünteti fel.



**1. ábra: Az epilepsziás rohamok legújabb klasszifikációja (ILAE 2017)**

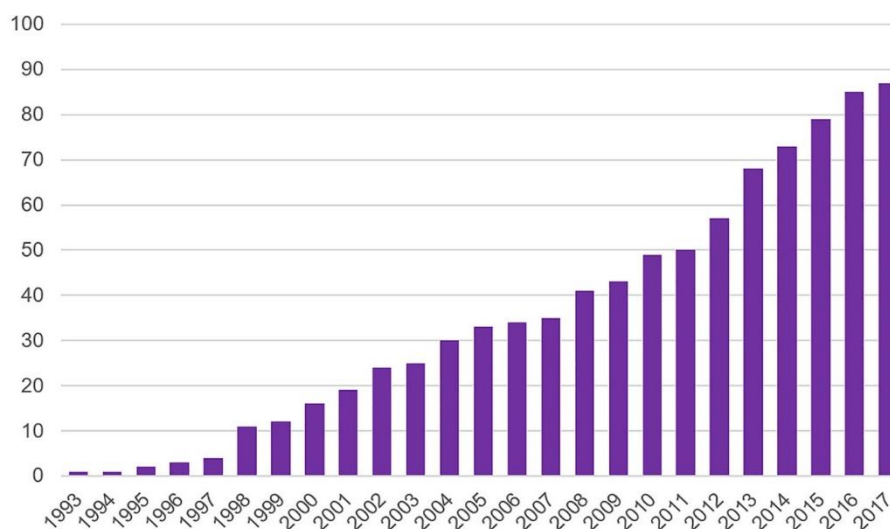
Az új osztályozás nagy jelentőséget tulajdonít az etiológiának és a társuló állapotoknak, betegségeknek is. Az etiológia meghatározásának fontosságát hangsúlyozza a diagnózis felállításának minden lépcsőjénél, hiszen az terápiás vonatkozással bír. Az etiológiát hat alcsoportra bontották, melyek természetesen átfedésben lehetnek egymással, így megkülönböztetünk strukturális, genetikai, infekciós, metabolikus, immun és ismeretlen eredetű epilepsziát. A nomenclatura is jelentősen átalakult, és új entitásként megjelent a fejlődési és epilepsziás encephalopathia (Fisher RS, 2017, Scheffer IE, 2017).



**2. ábra:** Az epilepsziák új klasszifikációja (ILAE 2017) figyelembe veszi az etiológiát és a társuló betegségeket is

### 2.1.4. Az epilepszia genetika története

Az új-generációs szekvenálás (NGS) megjelenése, elterjedése átalakította az epilepszia genetika klinikai gyakorlatát is. Két évtizede még csak 12-20 gén kóroki szerepe volt ismert különböző epilepszia betegségekben, mára ez a szám megsokszorozódott, és egyre több gén esetében kerül alátámasztásra, hogy hibája esetén epilepszia alakul ki. Wang J. és munkatársai egy közelmúltban megjelent összefoglaló közleményükben számos adatbázis felhasználásával összesen 977 epilepsziával asszociált gént azonosítottak, ezeket négy kategóriába sorolták, aszerint, hogy milyen szoros az epilepsziával való közvetlen összefüggésük. Nyolcvannégy gén esetén bizonyított, hogy mutációjuk fő tünetként epilepszia alakul ki, további 73 génről, ún. idegfejlődéssel asszociált génekről ismert, hogy KIR-i fejlődési rendellenességet és társuló epilepsziát okoznak. A harmadik kategóriába sorolták azt az 536 gént, amelyek hibája esetén szisztémás rendellenességek mellett epilepszia is kialakulhat, a negyedik csoportba pedig az a 284 gén tartozik, amelyek feltehetően kapcsolatba hozhatók epilepszia kialakulásával, de ennek bizonyítása még további vizsgálatokat igényel (Wang J, 2017). A **3. ábra** mutatja az ismert epilepsziagének exponenciális növekedését az évek előrehaladtával (Ottman R, 2010, Myers KA, 2019).



**3. ábra: Az ismert epilepszia gének száma az évek előrehaladtával**

Az anyagcsere betegségek és az értelmi akadályozottság génjei nincsenek feltüntetve (Az ábra forrása: Myers KA, Clinical Genetics 2019; 95: 95-111.).

Az epilepszia betegség genetikai hátterének lehetősége már régen felmerült. A generalizált epilepszia előfordulásának valószínűsége elsőfokú rokonok (testvér, gyermek) esetén az átlag populációhoz képest 5-10-szeresre emelkedik (Annegers JF, 1982). Ikervizsgálatok is megerősítették az örökletességet, melyet tradicionálisan multifactorialisnak vélték (Berkovic SF, 1998). Vannak azonban olyan családok, amelyekben autosomalis domináns (AD) öröklődést mutat az epilepszia, magas penetranciával és a családon belül azonos rohamtípussal. Ezeknek a nagy, többgenerációs családoknak a vizsgálata vezetett az első epilepszia gének klónozásához (*SCN1A*, *CHRNA4*, *KCNQ2*, *KCNQ3*, *SCN2A*) (Escayg A, 2000, Steinlein OK, 1995, Singh NA, 1998, Charlier C, 1998, Heron SE, 2002). A genom kapcsoltsági analízisek és a Sanger-féle szekvenálás sikeres stratégiák voltak az enyhébb lefolyású, domináns epilepsziák vonatkozásában, de nem tudtak diagnosztikus segítséget nyújtani a negatív anamnézisű, terápia-rezisztens epilepsziában szenvedő, rossz prognózisú betegeknek és családjaiknak (Myers KA, 2019).

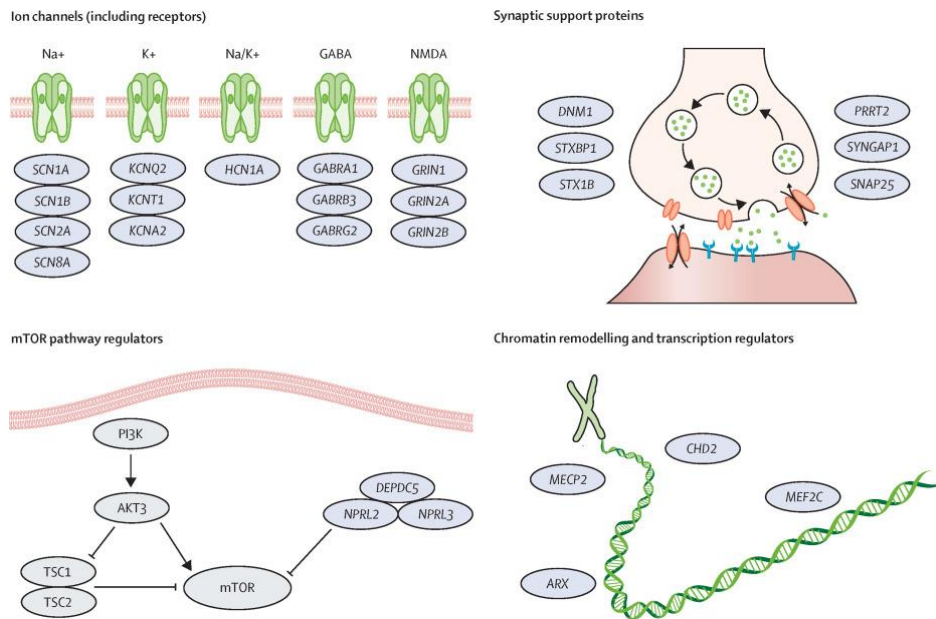
## **2.2. A fejlődési és epilepsziás encephalopathiák**

Az NGS megjelenésével és elterjedésével a legkorábbi, legegységesebb genetikai összefüggések az epilepsziás encephalopathiák (EE) vonatkozásában láttak napvilágot. Az EE definícióját Berg A.T. és munkatársai 2010-ben az alábbiakban határozták meg: az epilepsziás aktivitás önmaga olyan súlyos kognitív és magatartásbeli romlást okoz, amelyet a háttérben álló pathológiával magyarázni nem lehet (pl. corticalis malformatio) (Berg AT, 2010). A romlás bármely életkorban előfordulhat, és különböző súlyosságú lehet, számos epilepszia szindrómát

érinthet, ezért az ILAE 2017 a kifejezés szélesebb körű használatát ajánlotta. Az encephalopathiával asszociált epilepszia szindrómák nagy része genetikai hátterű, de előfordulnak szerzett okok is, úgy, mint hypoxiás-ischaemiás eredet, stroke, vagy corticalis fejlődési rendellenesség, amely lehet genetikai vagy szerzett etiológiájú is. Azoknak az eseteknek a megnevezésére, amikor a gyakori epilepsziás aktivitáson felül a genetikai eltérésnek direkt hatása is van a fejlődésre - regressziót, vagy az epilepszia megjelenése előtt a fejlődési ütem lelassulását okozva – a fejlődési és epilepsziás encephalopathia kifejezés javasolt. A klinikai gyakorlatban nem mindig egyszerű a két entitás elkülönítése az átfedések miatt, az egyszerűség kedvéért az értekezésemben a továbbiakban az EE kifejezést használom. A monogénes esetekben használatos a mutációt hordozó gén neve az encephalopathia kifejezéssel együtt pl. „*KCNQ2* encephalopathia”. Ez azokban az esetekben különösen fontos, ha az adott gén mutációi súlyos és spontán gyógyuló, gyógyszeres kezelésre reagáló epilepsziát is okozhatnak, ilyenek pl. a *KCNQ2* és az *SCN2A* gének (Scheffer IE, 2017). Az EE magába foglal számos korhoz kötött elektroklínikai szindrómát specifikus rohamtípusokkal és az electroencephalographián (EEG) észlelhető eltéréssel. A társuló betegségek, mint az autizmus spektrum zavar, mozgászavarok, viselkedési problémák gyakoriak, a prognózis gyakran igen rossz. Előfordulhat a korhoz kötött epilepszia szindrómák átalakulása egy másik szindrómává, pl. az első két hónapban manifesztálódó Ohtahara szindróma gyakran West szindrómává (WS), majd később Lennox-Gastaut szindrómává (LGS) alakul (McTague A, 2016).

### **2.2.1. Genetikai háttér**

A molekuláris forradalom megjelenésével folyamatosan nő a betegség hátterében álló ismert gének száma: leggyakrabban *de novo* domináns mutációkat azonosítanak. Több gén hibája okozhatja ugyanazt az elektroklínikai szindrómát, és fordítva, egy gén mutációi fenotípusos pleiotropiát mutathatnak. Az érintett gének sokféle funkciójú fehérjét kódolnak, lehetnek ioncsatornák, synapticus- és transcriptiót szabályozó funkciót betöltő fehérjék. A **4. ábra** mutatja be a sejtszintű funkciókat és jelátviteli utakat, amelyek érintettek epilepsziában. Az epilepszia neurobiológiai mechanizmusainak pontosabb megismerése az érintett jelátviteli utak befolyásolásával új terápiás lehetőségek kifejlesztéséhez is vezethet (Ellis CA, 2019).

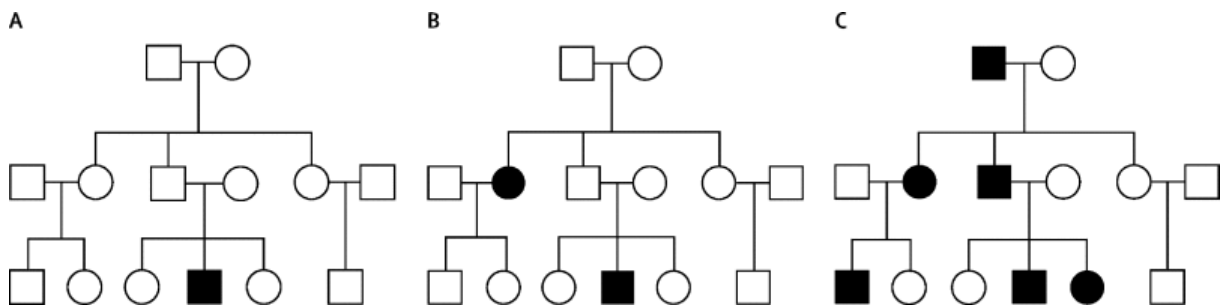


#### 4. ábra: Neurobiológiai mechanizmusok epilepsiában

Az ionszatórnákat és a neurotransmitter receptorokat kódoló gének mellett mára ismertté vált a synapticus funkciókat, a sejtnevekedést és proliferációt, valamint a transkripciót szabályozó fehérjéket kódoló gének mutációinak szerepe az epilepsziában (Az ábra forrása: Ellis CA, Lancet Neurol. 2020; 19 (1): 93-100.).

EE háttérében először 2001-ben igazolódott genetikai eltérés, amikor Claes L. és munkatársai hét Dravet szindrómás (DS) gyermek mintájában *de novo* *SCN1A*-gén mutációt igazoltak (Claes L, 2001). Az olyan molekuláris genetikai módszerek megjelenésével, mint az array komparatív genom hibridizáció (array CGH) és az NGS az elmúlt két évtizedben ugrásszerűen nőtt az EE háttérében felfedezett új gének száma is (Allen AS, 2013, Veeramah KR, 2013, Carvill GL, 2013, Lesca G, 2013). A kópiaszám-változások (CNV) fontos molekuláris okai az EE-nak, az esetek akár 8-23,5 %-ában oki vagy potenciálisan a betegséghez hozzájáruló CNV mutatható ki (Ezughu H, 2010, Mefford HC, 2011). A pathogen microdeletiók, microduplicatiók kimutatása miatt az array CGH vizsgálat EE esetén az egyik első diagnosztikus lépcső a genetikai kivizsgálás során. A módszer alkalmas lehet új gének felfedezésére is, ha a kandidáns gént érinti a deletio vagy duplicatio, és a hasonló fenotípusú betegekben a gén szekvenálása során mutáció igazolható, mint történt az pl. az *STXBP1*-gén felfedezése kapcsán (Saitu H, 2008). Az NGS technológia hatékonyságának növekedése, árának csökkenése szintén hozzájárult az EE háttérében álló gének gyors felfedezéséhez. A teljesexom-szekvenálás (WES) alkalmazása a proband és szüleinek mintáin (trio-szekvenálás) hatékony módszerek bizonyult.

Az EE-ban szenvedő betegek nagy részében ma már azonosítható a genetikai háttér, a legtöbb esetben kimutatott *de novo* domináns mutáció feltehetően az ivarsejtben vagy a korai embryogenesis során jött létre (Vadlamudi L, 2010). X-hez kötött domináns (pl. *DCX*) és recesszív (pl. *ARX*), valamint különleges ún. male-sparing (pl. *PCDH19*) öröklődésment is előfordul, autosomalis recesszív (AR) ritkán. A mitochondrialis betegségek maternalis vagy AR öröklődésmentet mutathatnak. A monogénes esetekben nagy hatású gének mutációja áll a háttérben, vannak azonban komplex öröklődést mutató esetek is, amikor több genetikai eltérés interakciója okozza a családi halmozódást mutató, de eltérő súlyosságú betegséget, pl. DS esetén (Depienne C, 2010). Az **5. ábra** mutatja be az epilepszia betegségre legjellemzőbb öröklődésmenteket (Ellis CA, 2019).

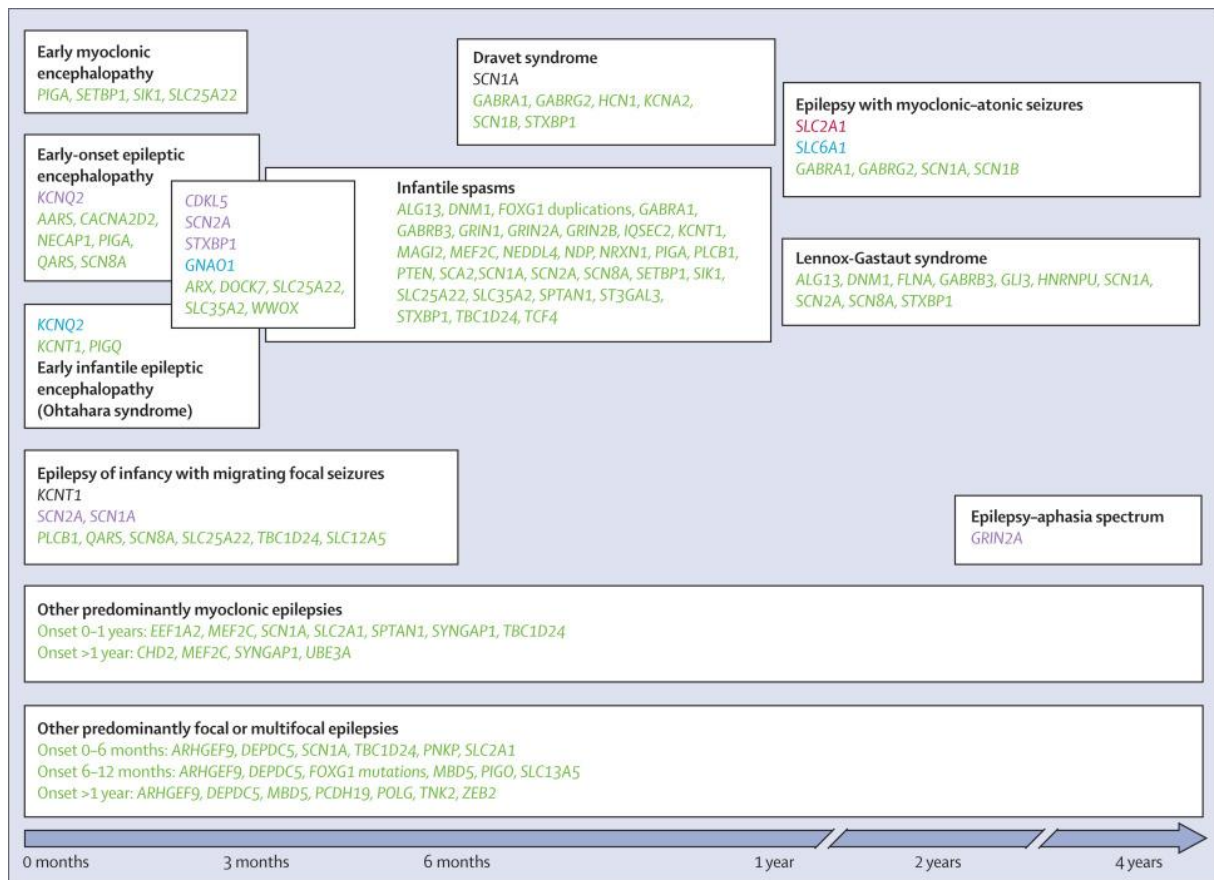


**5. ábra: Jellemző öröklődésmentek epilepsziában**

**A)** Sporadikus eset, *de novo* mutáció a probandban, a legtöbb EE esetén. **B)** Egy vagy két érintett a szélesebb családban, komplex öröklődés, pl. DS esetén. **C)** Több érintett családtag, AD öröklődésment. Ezen családok vizsgálata vezetett az első epilepszia gének felfedezéséhez (Az ábra forrása: Ellis CA, Lancet Neurol. 2020; 19 (1): 93-120.).

Egy másik molekuláris mechanizmus, mely a családon belüli fenotípusbeli különbségeket okozhatja, a mozaicizmus. A mozaicizmus azt jelenti, hogy egyazon személy két különböző sejtvonallal rendelkezik, az egyik a mutációt, a másik a vad típusú allélt hordozza. Ivarsejti mozaicizmus is előfordulhat, ami akkor lesz egyértelmű, ha a szülőnek két utóda is ugyanazt a mutációt hordozza, annak ellenére, hogy a szülő fehérvérsejtjeiből izolált DNS-ben a mutáció nem mutatható ki. DS esetében több ilyen eset is dokumentálásra került (Depienne C, 2006, Marini C, 2006). A somaticus mozaicizmus ismert fontos mechanizmusa az agyi fejlődési rendellenességeknek, és feltehetően a negatív képalkotó vizsgálatokkal

rendelkező EE-s esetek egy részében is csak a KIR-re, vagy annak egy részére korlátozódó mutáció a kiváltó ok.



6. ábra: A gyermekkori epilepszia szindrómák genetikai okai

A genomális eltérések, metabolikus eltérések nincsenek feltüntetve az ábrán. A feketével jelölt gének az esetek több, mint 50%-ában felelősek az adott szindrómáért, a lilával jelöltek 10-50%-ban, a pirossal jelölt 5-10%-ban, a kézzel jelölt gének az esetek kevesebb, mint 5%-áért felelősek. A zölddel jelölt gének egyelőre ismeretlen arányban vesznek részt az epilepszia kialakulásában (Az ábra forrása: McTague A, Lancet Neurol. 2016; 15: 304-316.).

A 6. ábra mutatja be a különböző epilepszia szindrómák genetikai heterogenitását és a gének fenotípusos pleiotropiáját (McTague, 2016). Ezen heterogenitás és pleiotropia miatt nem értelmezhető egy genetikai eltérés sem a beteg pontos fenotípusa, klinikai adatai nélkül. A fenotípusos heterogenitás kialakulásához olyan faktorok járulnak hozzá, mint a mutáció típusa és ideje a fejlődés alatt, a fiziológias génexpresszió ideje és helye, epigenetikai faktorok és módosító gének.



Az ioncsatorna gének mutációi jól példázzák, hogy ugyanazon gén mutációi spontán gyógyuló epilepsziát és súlyos lefolyású EE-t is okozhatnak. A *KCNQ2*-gén mutációi állnak a self-limited (korábbi nomenclatura szerint benignus) familiaris neonatalis epilepszia háttérében, és ugyanezen gén mutációi asszociáltak a tónusos rohamokkal jellemzett, súlyos korai infantilis EE-val, az Ohtahara szindrómával. Az első esetben haploinsuffitientia, a második esetben a domináns-negatív hatás a feltételezett mechanizmus (Miceli F, 2013). Az előzőekhez hasonlóan, az *SCN1A*-gén missense mutációi okozzák mind a genetikus generalizált epilepszia lázgörcs plusz (GEFS+) szindrómát, mind a DS-t. Az előbbi egy kezelést nem igénylő epilepszia szindróma, míg a második egy súlyos lefolyású EE (Zuberi SM, 2011).

A genetikai heterogenitás minden epilepszia szindrómára jellemző, még a genetikus EE prototípusának tartható DS-ra is, amelyben a betegek 80%-ában mutathatók ki az *SCN1A*-gén mutációi, az esetek kis hányadának háttérében más gének mutációi állnak (Steel D, 2017). A **6. ábrán** látható, hogy a klasszikus EE-kal, mint a WS, LGS szindróma, Ohtahara szindróma számos gén kapcsolatba hozható, de az esetszámok alacsonyak. Az új-generációs módszerek klinikai gyakorlatba történő rutinszerű bevezetésével várhatóan tovább bővülnek az ismereteink ezen betegségcsoportok genetikai háttérét illetően.

### **2.2.2. Vizsgálati módszerek: előnyök és hátrányok**

A humán genom kb. 3 billió bázispárt tartalmaz, melyek kb. 25.000 gént kódolnak a 23 kromoszómán elosztva. A pathogen változások két nagy csoportját a CNV-k és az egy nukleotidot érintő változások alkotják (SNV). A CNV egy DNS szakasz deletióját vagy duplicatióját jelenti, míg az SNV egy bázis pozícióban bekövetkezett változást. A változást mindig egy standard referencia genomhoz, szekvenciához viszonyítjuk, mely több ezer különböző etnikumú egyén szekvenciáján alapuló konszenzus. A variánsokat a pathogenitásuk alapján az alábbiak szerint osztályozzuk: pathogen variáns, feltehetően pathogen variáns, ismeretlen jelentőségű variáns (VUS), feltehetően benignus variáns, benignus variáns. A variánsok értékelése nagy körültekintést igényel, számos standard és irányelv áll rendelkezésre a variánsok interpretációjához pl. ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics), DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources) (Richards S, 2015, He N, 2019, MacArthur DG, 2014).

A tradicionális bázisról bázisra történő szekvenálás (Sanger-féle szekvenálás) időigényes, egy gént célzottan vizsgál, nagyon pontos és olcsóbb, mint az új-generációs alternatívák. Az NGS nagyszámú, kisebb darabokra tört DNS szegmens gyors, párhuzamos szekvenálására, majd megfelelő illesztést követően számítógépes értékelésére alkalmas. Az

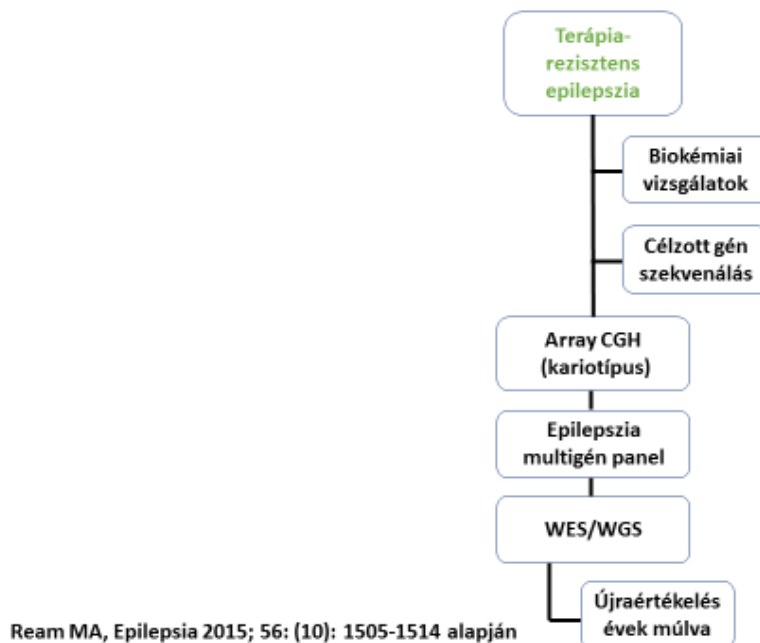
NGS lehetővé teszi génpanelek vizsgálatát, vagyis olyan gének szekvenálása történhet párhuzamosan, melyek egy jól meghatározott fenotípussal asszociáltak. Kereskedelmi forgalomban elérhető pl. az EE ismert génjeit tartalmazó 166 génes panel. Az új ismeretek bővülésével a laboratóriumok az egyes panelekhez újabb géneket listáznak. Az NGS technológiával lehetőség nyílt a teljes exom és a teljes genom szekvenálására (WGS) is. A WES az összes fehérje-kódoló exon és exon-intron határ szekvenálására alkalmas. A nagyszámú variáns interpretálása miatt időigényes és drága; de génekre lebontva olcsóbb a Sanger-féle szekvenálásnál. A klinikai gyakorlatban az elmúlt években szignifikáns mértékű árcsökkenése tapasztalható. Vannak a módszerek korlátai is: a nem-kódoló régiókat és intronokat nem fedik le, triplet expanzió kimutatására, metylyatiós zavarok kimutatására nem alkalmas, nagyobb insertiók, deletiók és duplicatiók is rejtve maradhatnak. A talált variánsok értékelése nem ér véget a laboratóriumban. A VUS-ok interpretációt igényelnek, de nem feltétlenül segítik a diagnózist. A szülők mintájának vizsgálata és a fenotípus pontosítása szükséges a VUS-ok további klasszifikációjához. A WGS kutatási célokra használt, a klinikai gyakorlatban még nem széleskörűen elérhető.

Hangsúlyozandó, hogy a technikai nehézségek mellett a WES/WGS vizsgálat számos etikai problémát is felvet, ezért mindenképpen genetikai tanácsadás szükséges a vizsgálat elvégzése előtt és az eredmények interpretálásához. Ezt Magyarországon törvény szabályozza (2008. évi XXI. törvény a humángenetikai adatok védelméről, a humángenetikai vizsgálatok és kutatások, valamint a biobankok működésének szabályairól). A neurológusok, epileptológusok és a klinikai genetikusok harmonikus, szoros együttműködése szükséges a betegek ideális gondozásához. Ha az idiopathiás epilepszia terminológiát, egy konkrét genetikai diagnózisra tudjuk cserélni, a betegek számára csak előnyökkel jár. Végét jelentheti egy hosszas diagnosztikai procedúrának, a bizonyosság a család megnyugvásával járhat, lehetővé teheti a családtagok célzott vizsgálatát, praenatalis vizsgálat elvégzését. A specifikus diagnózis megteremti a lehetőségét a betegtársakkal történő kapcsolatfelvételle, és végül, de nem utolsósorban terápiás konzekvenciával járhat, mint pl. DS esetén (Berkovic SF, 2015, Orsini A, 2018).

### ***2.2.3. Diagnosztikus algoritmus***

Bővülő ismereteink ellenére a beteg vizsgálatától a genetikai diagnózisig eljutni a mindennapi klinikai gyakorlatban esetenként még kihívásokkal teli. Az ILAE ajánlása alapján, életkortól függetlenül javasolt a beteg genetikai kivizsgálása terápia-rezisztens epilepszia

esetén (Wilmshurst JM, 2015). A 7. **ábra** mutatja be a javasolt terápiás algoritmust terápia-rezisztens epilepszia, így az EE-k esetén.



7. ábra: A kivizsgálás menete terápia-rezisztens epilepszia esetén

A strukturális eltérés nélküli és nem szindrómás esetekben részletes metabolikus kivizsgálás szükséges a potenciálisan kezelhető betegségek mielőbbi kizárása miatt pl. pyridoxin-dependens epilepszia. A metabolikus kivizsgálással párhuzamosan a genetikai kivizsgálás megkezdése array CGH vizsgálattal javasolt. Ismerünk néhány olyan esetet, ahol célzott gén szekvenálása első lépésként megfontolandó pl. DS klinikai gyanúja esetén, ahol a terápiát befolyásolja az *SCN1A*-gén mutációjának igazolása, vagy korai kezdetű absence rohamok esetén, aminek hátterében fel kell merülnie az *SLC2A*-gén mutációjának, aminek szintén terápiás konzekvenciája van. Az olyan klinikailag jól felismerhető szindrómák esetén is elég lehet egy, esetleg néhány gén célzott vizsgálata, mint a Rett szindróma, sclerosis tuberosa, Koolen de Vries szindróma, Kleefstra szindróma, Angelman szindróma vagy a Pitt-Hopkins szindróma (Myers KA, 2019). Rutin karyotypizálással detektálhatók az aneuploidiák, számfeletti marker kromoszómák és a kiegyensúlyozott translocatiók, valamint a gyűrűkromoszómák, tehát ennek a vizsgálatnak is lehet létjogosultsága a kivizsgálás menetében. Következő diagnosztikus lépcsőként az EE ismert géneinek szimultán szekvenálása, azaz egy multigén panel vizsgálat jön szóba, aminek minősége a vizsgált gének bázispár pozíciójának lefedettségétől függ. A legtöbb panel a kódoló régiók 100%-os lefedettségét képes biztosítani. Lemke J. R. és munkatársai egy 265 gént tartalmazó panel

vizsgálatával a 33 terápia-rezisztens epilepsziában szenvedő beteg közül csaknem felénél (16 beteg) igazolták a betegség genetikai eredetét (Lemke JR, 2012). Más szerzők is hasonló diagnosztikus rátáról (15-25%) számolnak be (Mercimek-Mahmutoglu S, 2015, Wang J, 2014). Számos panel tartalmazza az NGS-alapú, exon-szintű deletio-duplicatio vizsgálatát is. Ha a panel vizsgálattal sem jutunk diagnózishoz, de a genetikai eredet alaposan felmerül, fennáll a WES indikációja. A WES, főleg a trio-szekvenálás igen hasznosnak bizonyult az epilepszia diagnosztikájában, új gének felfedezésében (Allen AS, 2013, Veeramah KR, 2013). EE esetén igen eltérő diagnosztikus eredményekről számolnak be a nemzetközi irodalomban. Néhány vizsgálat adatait mutatja be az **1. táblázat**.

**1. táblázat: Néhány klinikai vizsgálat adatai WES alkalmazásával különböző EE fenotípusok esetén**

Fenotípus	Betegszám	Módszer	Diagnosztikus ráta %	Referencia
EE	10 trió	WES	70	Veeramah KR, 2013
IS	18 trió	WES	28	Michaud JL, 2014
IS és LGS	264 trió	WES	17	Epi4k konzorcium, 2013
EIEE	14 trió	WES	36	Bruun TUJ, 2018

**Rövidítések:** EE: epilepsziás encephalopathia; IS: infantilis spasmus; LGS: Lennox-Gastaut szindróma; EIEE: (early infantile epileptic encephalopathy), korai kezdetű epilepsziás encephalopathia; WES: (whole-exom sequencing), teljesexom-szekvenálás;

Számos előnye mellett limitációit is figyelembe véve (ára, etikai megfontolások, incidentalis találatok, irreleváns találatok) első vonalbeli diagnosztikus tesztként nem ajánlható. Az adatok újraértékelésére is szükség van, ahogy gyűlnek az adatok az adatbázisokban, úgy előfordulhat, hogy egy korábban VUS-ként kategorizált eltérés idővel mégis pathogennek minősül. Az ideális az epilepszia gének optimális lefedettségével az epilepsziás betegekre szabott WES vizsgálat („epilepsy panel on an exome backbone”), a panelben szereplő gének értékelését követően – azok negativitása esetén – lehetőség van a vizsgálat kiterjesztésére – a WES értékelésére, mint ahogy az már néhány laboratóriumban elérhető (Ream MA, 2015). A WES rutin alkalmazását a közeljövőben felválthatja a WGS, mely képes a CNV-k detektálására, egységesebb lefedettséget biztosít és a mozaicizmus kimutatása is lehetővé válik általa. A szabályozó régiók, mély intronikus régiók eltéréseinek kimutatásával a betegség pathomechanizmusának újabb aspektusait ismerhetjük meg (Myers KA, 2019).

A továbbiakban a kutatási területet érintő néhány fejlődési és epilepsziás encephalopathia klinikumát és genetikai hátterét foglalom össze röviden.

#### 2.2.4. *Infantilis spasmus/West szindróma*

A leggyakoribb csecsemőkorú EE a WS szindróma, gyakorisága 2,5-4/10.000 élveszületés. Az infantilis spasmusok (IS), az EEG-n látott hypersarrhythmia és a fejlődésben mutatkozó regresszió triász, a folyamatos epileptiform aktivitás miatt az EE archetípusa. Életkorhoz kötött epilepszia szindróma, a leggyakrabban 3-7 hónapos kor között kezdődnek a spasmusok, melyek a nyak, a törzs és a végtagok izmainak szinkron bekövetkező összehúzódásai, izoláltan vagy csomagokban jelentkezhetnek. Klinikai megjelenés alapján megkülönböztetünk flexor, extensor és kevert flexor-extensor spasmust. Az ébrenléti, interictalis EEG hypersarrhythmias, ez dezorganizált, kaotikus, amplitúdólabilis, de magas feszültségű 0,5-3 Hz-es tevékenységet jelent az egész convexitas felett, amelybe aszinkron, igen magas feszültségű (300-1000  $\mu$ V) lassú hullámok, multifokális independens tüske- és vagy meredek-lassú összetevők keverednek. Alvás alatt a hypersarrhythmia fragmentálódik, mely suppression-burst mintázatot utánzó képet ad. A betegség etiológiája igen változatos, lehet genetikai, strukturális, metabolikus vagy ismeretlen. A betegek kb. 40%-ában praenatalis vagy postnatalis ok igazolható: központi idegrendszeri malformációk, neurocutan szindrómák (leggyakrabban sclerosis tuberosa), anyagcsere-betegségek, hypoxiás-ischaemiás encephalopathia, KIR-i fertőzések. Az előbbi felsorolás jól tükrözi az etiológiai kategóriák közötti átfedéseket, hiszen a KIR-i malformációk egy része genetikai eredetű, csakúgy, mint a neurocutan szindrómák, és a veleszületett anyagcsere-betegségeknek is genetikai oka van. A pathophysiologia nem tisztázott, nem egyértelmű az sem, hogy corticalis vagy agytörzsi eredetűek-e a spasmusok. Genetikai okként leggyakrabban sporadikus, *do novo* mutációkat azonosítottak, leggyakrabban az *ARX*, *CDKL5*, *SPTAN1*, *STXBP1*, *FOXG1*, *MAGI2*, *MEF2C*, *GRIN1*, *GRIN2A*-génekben (McTague A, 2016). A **6. ábra** mutatja az IS/WS-val eddig kapcsolatba hozott géneket. Legalább öt jól ismert genomialis eltéréssel is összefüggést mutat a betegség: 1p36.3 deletio, Pallister-Killian szindróma (12p tetrasomia), 15q11q13 maternális duplicatio, Miller-Dieker szindróma (17p13.3 deletio) és a Down szindróma (21 trisomia). Az IS kialakulásának biológiai mechanizmusai nem ismertek ezekben a szindrómákban sem (Paciorkowski AR, 2011). Kezelésében az ACTH és a vigabatrin az elsőként választandó, de a gyakori terápia-rezisztencia miatt más antiepileptikumok adására is szükség lehet. Körülírt laesio esetén sebészi terápia is szóba jön. A prognózis igen rossz, magas a mortalitás (3-30%), a betegek nagy részénél másfajta rohamok is jelentkeznek, gyakran LGS kezdődik. A betegek csaknem 90%-ában jelentős neurológiai deficittünetek, értelmi akadályozottság, autizmus, mozgászavarok észlelhetők (Hollódy K, 2018, Janszky J-Fogarasi A, 2017).

### **2.2.5. Lennox-Gastaut szindróma**

A LGS a kisgyermekkorra jellemző EE, incidenciája 2-5/100.000 élveszületés, fiúkban gyakoribb. Leggyakrabban 3-5 éves kor között kezdődik, gyakran WS-ből vagy Ohtahara szindrómából alakul ki, de korábban jól fejlődő gyermekekben is kezdődhet. Többféle roham jellemzi: tónusos axialis, atípusos absence és atóniás rohamok gyakoriak, de lehetnek epilepsziás spasmusok, myoclonusok, fokális rohamok is. Gyakori a napokig-hetekig tartó non-convulsiv status epilepticus. Az interictalis EEG-n a háttértevékenység kezdetektől fokálisan vagy generalizáltan meglassult, ennek mértéke a betegség előrehaladtával fokozódik. Ébrenlétben gyakori a bilaterálisan, szinkron jelentkező lassú (1-2,5 Hz) túske-hullám tevékenység, mely akár percekig is tarthat, látható klinikum nélkül. Alvásban jellemzőek a 10-14 Hz-es repetitív spike-sorozatok. Az etiológia hasonlóan a WS-hoz, strukturális, metabolikus, genetikai vagy ismeretlen lehet. A betegek 70%-ában azonosítható a kiváltó ok, az esetek nagy részében encephalitis, meningitis, sclerosis tuberosa, KIR-i malformációk, hypoxiás-ischaemiás encephalopathia, trauma állnak a háttérben. Monogénes eredet a betegek kisebb hányadában bizonyítható és a LGS-val kapcsolatba hozott gének jelentős átfedést mutatnak más EE háttérben álló génekkel, ahogy ezt a **6. ábra** mutatja. A terápia-rezisztens rohamok kezelésére nincs optimális javaslat, gyakran kombinációra van szükség, néhány antiepileptikumot (pl. rufinamid, felbamát) kifejezetten ebben a szindrómában használnak az epileptológusok. Rossz prognózisú kórkép, súlyos értelmi akadályozottság, magatartásproblémák várhatók (Janszky J-Fogarasi A, 2017, Shbarou R, 2016).

### **2.2.6. Dravet szindróma**

A WS után a második leggyakoribb EE a DS szindróma, incidenciája 1/20.000-40.000 élveszületés (Wu YW, 2015). Korábbi elnevezése a súlyos csecsemőkori myoclonusos epilepszia (SMEI) volt, első leírójáról, Charlotte Dravet-ről kapta új elnevezését. A rohamok korábban teljesen jól fejlődő csecsemőben, klasszikusan 6 hónapos kor körül kezdődnek visszatérő lázas status epilepticus-szal, a fejlődés viszont 1-2 éves korig jó ütemű a gyakori, elhúzódó rohamok ellenére. A rohamok lehetnek generalizáltak vagy féloldaliak, gyakran váltott oldaliságúak, clonusos vagy tónusos-clonusos rohamok (Dravet C, 2005). Az EEG 2 éves korig általában normális, a koponya mágneses rezonancia (MRI) vizsgálat strukturalis eltérést nem mutat, évek alatt azonban hippocampalis sclerosis alakulhat ki (Siegler Z, 2005). Később (1-5 éves korban) láztalan állapotban is jelentkeznek a rohamok, és újabb rohamtípusok jelennek meg: myoclonusok, atípusos absence, fokális rohamok. Az EEG-n a 2. életévtől jelennek meg a generalizált túske-hullám burst-ök, jellemző a photoparoxysmalis reakció. A

rohamok általában terápia-rezisztensnek bizonyulnak, a kezelés gerincét a magas dózisú valproát és clobazam kombinációja képezi, kiegészítve stiripentollal és topiramáttal, míg a nátriumcsatorna-blokkoló antiepileptikumok rohamprovokálók, így kerülendők (Inoue Y, 2015). Néhány betegben a myoclonusos tünetek nem jelennek meg, nekik enyhébb lefolyású a betegségük (Guerrini R, 2011). A gyermekkoron túl az epilepszia elcsendesedik, a klinikai kép előterébe az intellektuális elmaradás, autisztikus magatartás és az ataxia kerülnek. Az esetek 80%-ában a feszültségfüggő Na-csatorna alfa-1 alegységét kódoló *SCN1A*-gén mutációi állnak a háttérben (Claes L, 2001). A mutációk többsége *de novo*, de az esetek 10%-ában komplex öröklődés menet mutatható ki. Ezekre a családokra fenotípusos heterogenitás jellemző, a DS-s csecsemő szülőjében sokkal enyhébb epilepszia szindróma (GEFS+) vagy teljes tünetmentesség lehet jelen. A familiaris fenotípusos variabilitás más gének betegségmódosító hatásával és mozaikosság előfordulásával magyarázhatók (Singh R, 2001, Marini C, 2006). Az *SCN1A*-gén missense (más aminosav beépülésével járó) és nonsense (a fehérjelánc terminálásával járó) mutációi kb. egyforma arányban fordulnak elő. Ez volt az első gén, melyet epilepszia háttérében azonosítottak, 2001-es leírását követően több, mint 1200 mutációja került leírásra, de szoros genotípus-fenotípus összefüggés feltárására eddig nem került sor (Zuberi SM, 2011, Meng H, 2015). A feszültségfüggő Na-csatorna alfa-1 alegysége egyike annak a négy alfa alegységnek, melyek az emlősök KIR-ében magas koncentrációban expresszálódnak (Goldin AL, 2002). Az *SCN1A*-gén a 2-es kromoszóma hosszú karjának 24.3 pozíciójában helyezkedik el, 26 exonból áll, és egy 2009 aminosavból álló transzmembrán fehérjét kódol, amely a KIR-ben található feszültségfüggő Na-csatornák fontos összetevője (Schutte SS, 2016). Ha az alfa-alegység nem funkcionál megfelelően, a Na-csatorna zárva marad, és ezzel megállítja a synaptikus szignál propagációját a következő neuronra (Ohmori I, 2006). Állatkísérletes modellek alapján úgy tűnik, hogy az *SCN1A*-mutációk elsődleges hatása a GABAerg inhibitoros neuronok aktivitásának csökkentése (funkcióvesztő mutáció), így az általános excitatoros aktivitás növekedése. Ezzel nemcsak a rohamprovokáció, de a cerebellaris GABAerg inhibitoros Purkinje-sejtek funkció károsodásával az ataxia és a kognitív hanyatlás is magyarázható (Kalume F, 2007).

### **2.2.7. Csecsemőkori epilepszia migráló fokális rohamokkal**

A csecsemőkori epilepszia migráló fokális rohamokkal (EIMFS) egy ritka, nagyon súlyos, korai kezdetű EE, mely általában néhány hetes korban kezdődik fokális, clonusos a szemhéjakat, karokat érintő, egyre nagyobb számban jelentkező, migráló rohamokkal. A rohamokhoz később vegetatív tünetek és tudatzavar is társul. Az ébrenléti háttéraktivitás az

EEG-n kezdetektől nem éri el az életkornak megfelelő szervezettségi fokot. Gyakran status epilepticus-szal jár, a rohamok terápia-rezisztensek. Microcephalia alakul ki súlyos globalis fejlődésbeli elmaradással, magas mortalitással. A legismertebb okai a *KCNT1*-gén *de novo*, funkciónyerő mutációi, melyek kb. az esetek 30%-ért felelősek (Barcia G, 2012). Az EIMFS genetikailag más EE-khoz hasonlóan igen heterogén, de itt a betegek nagy részénél kimutatható a háttérben álló genetikai eltérés. Burgess R. és munkatársai egy közelmúltban publikált tanulmányukban 135 EIMFS-ben szenvedő betegből 93-ban betegséget okozó variánst igazoltak (69%). A *KCNT1*-gén mutációi után az *SCN2A*-gén eltérései fordultak elő legnagyobb számban. Az irodalomban eddig 33 gén mutációit hozták összefüggésbe EIMFS-sel, ezek között vannak *de novo* domináns, X-hez kötött és recesszív öröklődésűek is. Három, *de novo KCNT1*-mutációnak tűnő esetben a proband édesanyja mozaikosnak bizonyult gyermeke eltérésére nézve (Burgess R, 2019).

### **2.3. A genetikus generalizált epilepsziák és genetikai háttérük**

A korábbi nomenclatura szerint idiopathiás generalizált epilepsziák (IGE) csoportjába négy jól meghatározott epilepszia szindróma tartozik: a gyermekkori absence epilepszia, a juvenilis absence epilepszia, a juvenilis myoclonosus epilepszia (JME) és az epilepszia csak tónusos-clonusos rohamokkal. Az ismereteink bővülése, az epilepsziák monogénes és komplex öröklődés menetének megismerése miatt az ILAE legfrissebb ajánlása szerint ezt a csoportot az idiopathiás jelző helyett, inkább a genetikus jelző illeti, így a genetikus generalizált epilepszia (GGE) a megfelelőbb elnevezés (Scheffer IE, 2017). A GGE-szindrómák közös jellemzői a generalizált, fokális vonásokat nem mutató rohamok, a pozitív családi anamnesis, a betegség életkorhoz kötött megjelenése, a kialvatlanság és a photostimulatio provokáló hatása, a jó intellektus, a negatív agyi MRI, az interictalis EEG-n 3 Hz-es generalizált tüske-hullám minta és a valproátra adott jó terápiás válasz (Janszky J-Fogarasi A, 2017). Mind az öröklődést, mind a klinikumot tekintve a GGE-val járó szindrómák kontinuumot mutatnak. Egy családon belül többféle GGE-forma megjelenhet, és sokszor előfordul, hogy a GGE-ban szenvedő beteg kezdetben az egyik, később a másik GGE szindróma tüneteit mutatja, pl. a gyermekkori absence epilepszia JME-vá fejlődhet (Medina MT, 2005). A GGE pathophysiológiájában a thalamo-corticalis rendszer nem megfelelő működésének tulajdonítanak szerepet. A T-típusú calciumcsatorna a thalamusban expresszálódik, és az aleggységeit kódoló gének pl. *CACNA1H* mutációit igazolták GGE betegekben (Heron SE, 2007). Ezen gyakoribb előfordulású, kevésbé súlyos lefolyású, későbbi életkorban manifesztálódó epilepsziák esetén az öröklődés multifactorialis vagy több, alacsony penetranciájú gén komplex öröklődése áll a háttérükben.



Kitűnő példája ennek a JME-ra hajlamosító *EFHC1*-gén esete; a kezdeti eseteírások szignifikanciája megkérdőjeleződött, mivel populációs adatbázisokban is megtalálták a közölt variánsokat (Suzuki T, 2004, Lek M, 2016). A közelmúltban megjelent szisztematikus összefoglaló közleményben viszont alátámasztásra került az *EFHC1*-gén mutációinak szerepe a JME kialakulásában (Bailey JN, 2017). Az első ritka variánsok, melyeket GGE-ás betegekben mutattak ki, három recurrens microdeletio volt (15q11.2, 15q13.3, 16p13.11), mindegyikük kb. a betegek 1-1 %-ában található meg, de egészségesekben is előfordulnak, 5-68-szorosra emelve az epilepszia kialakulásának valószínűségét (Helbig I, 2009, de Kovel CGF, 2010).

De nem minden GGE multifactorialis öröklődésű, ismertek magas penetranciájú, monogénes esetek is. Az egyik fontos példa az *SLC2A1*-gén mutációi, melyek kb. 10%-ban kimutathatóak a korai kezdetű (4 éves kor előtt jelentkező) gyermekkori absence epilepszia hátterében. A gén a GLUT1-transportert kódolja, amely a glükóz vér-agy gáton történő átjutását segíti elő. A genetikai diagnózis felállításának ebben az esetben terápiás következménye van, hiszen a ketogén diéta korai bevezetésével jobb kimenetel érhető el (Suls A, 2009, Alter AS, 2015). Kloridcsatorna-gén (*CLCN2*), nátriumcsatorna-gének (*SCN1A*, *SCN1B*) és a GABA-receptor alegységek génjeinek (*GABRG2*, *GABRA1*) mutációi is leírásra kerültek GGE hátterében.

### **2.3.1. Genetikai epilepszia lázas görcs plusz szindróma**

A korábbi terminológiával generalizált epilepszia lázas görcs plusz szindróma egy családi halmozódást mutató epilepszia szindróma. AD öröklődést mutat alacsony penetranciával. Genetikusan és fenotípusosan is igen heterogén, prevalenciája nem ismert. Spektrumbetegségként tekinthetünk rá, ahol a spektrum egyik szélén a családi halmozódást mutató egyszerű lázgörcs, a spektrum másik szélén pedig a DS áll. Az egyszerű lázgörcsre a lázas állapotban 6 hó-5-6 év között jelentkező, rövid (< 15 perc) generalizált tónusos-clonusos rohamok (GTC) jellemzőek. Lázgörcs+-ről beszélünk, ha a rohamok az előbbi jellemzőkkel, de az életkori határokon kívül jelentkeznek. GEFS+ szindrómára az 5-6 éves koron túl jelentkező, láztalan állapotban is megjelenő rohamok jellemzőek. Az epilepsziát korábban spontán gyógyulónak tartották, hiszen a betegek nagy részében 10-12 éves korra lecseng. A betegek kisebb részében a GTC rohamok mellett más generalizált rohamtípusok is megjelennek pl. myoclonusos, absence és atóniás rohamok, melyek néha nehezen kezelhetőek és áthúzódnak a felnőttkorra is. A betegek 10-15%-ában a generalizált rohamok mellett fokális rohamok is megjelennek. Az EEG 50%-ban nem mutat eltérést, egyébként a rohamokra jellemző

epileptiform aktivitás látható. A prognózis általában jó, a gyermekek psychomotoros fejlődése jó ütemű, normál intelligencia várható. A betegek kis hányada azonban a rossz prognózisú DS klinikai képét mutatja. Genetikai háttérként nátriumcsatorna gének (*SCN1B*, *SCN1A*, *SCN2A*) és GABA<sub>A</sub>-receptor gének (*GABRG2*, *GABRD*) mutációit igazolták (Wallace RH, 1998, Escayg A, 2000, Sugawara T, 2001, Harkin LA, 2002). GEFS+ szindróma diagnózisának felállítása legalább két érintett családtag esetén lehetséges. Míg a DS-ban szenvedő betegek 80%-ában, addig GEFS+ szindrómában mindössze a betegek 11%-ában mutathatók ki az *SCN1A*-gén mutációi (Marini C, 2007). DS esetén a mutáció 90%-ban *de novo*, GEFS+ szindrómában örökölt. A két epilepszia szindróma közötti átfedés egy különös jelenség az epilepszia genetikában. A 2013-as ILAE ajánlás csak DS fenotípus esetén javasolja, GEFS+ szindróma fenotípus esetén nem javasolja a genetikai vizsgálat elvégzését, tekintve, hogy utóbbi esetben ennek nincs sem terápiás, sem prognosztikai jelentősége (Hirose S, 2013). A közelmúltban azonban leírásra kerültek olyan esetek, ahol a GEFS+ fenotípus *de novo* *SCN1A*-mutáció következményeként alakult ki, és az utódra átörökítve DS klinikai képe bontakozott ki (Goldberg-Stern H, 2014, Myers KA, 2017).

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Az értekezés témája az epilepsziás betegek molekuláris diagnosztikája hagyományos és új-generációs genetikai módszerekkel. Intézetünkben több évtizedes hagyománya van a fejlődésbeli elmaradást, értelmi akadályozottságot mutató gyermekek vizsgálatának, diagnosztikájának. Tekintettel arra, hogy ebben a betegcsoportban gyakori komorbiditás az epilepszia, kutatási témámnak ezt választottam. Genetikai tanácsadónkban az ország egész területéről fordulnak meg betegek, hiszen országosan egyedül álló módszerek állnak rendelkezésre a laboratóriumunkban. Így egy-egy ritka betegséggel is viszonylag gyakran találkozunk, és lehetőségünk van pontosabb fenotípus-genotípus összefüggések feltárására. Az új-generációs genetikai módszerek megjelenésével ismereteink jelentősen bővültek ugyan az epilepszia genetikai hátterét illetően, de a hagyományos cytogenetikai és molekuláris genetikai módszereknek is megvan a helye a diagnosztikus algoritmusban. A különböző módszerek előnyeit és korlátait ismerve tudjuk a megfelelő diagnosztikus lépcsőzetességet betartani, ami költséghatékony, és nem vezet felesleges vizsgálatok elvégzéséhez. A pontosabb fenotípus-genotípus összefüggések feltárása a kutatási célokon túl, végülis a betegek és családjaik számára nyújthat részletesebb ismereteket a prognózisról, a várható társuló betegségek előfordulásáról, és esetleg terápiás konzekvenciával is járhat.

A három vizsgált epilepsziás betegcsoportban az alábbi célokat határoztuk meg:

1. Hagományos cytogenetikai módszerekkel (karyotypizálás, fluorescens in situ hibridizáció (FISH)) diagnosztizált isodicentricus (15) szindrómás (idic (15) szindróma) betegek számfeletti marker kromoszómái töréspontjainak, pontos genomialis tartalmának meghatározása array CGH módszerrel. Fenotípus-genotípus összefüggések keresése elsősorban a kialakuló epilepszia vonatkozásában. Az érintett gének, genomi régiók funkciójának elemzése szakirodalmi adatok felhasználásával.

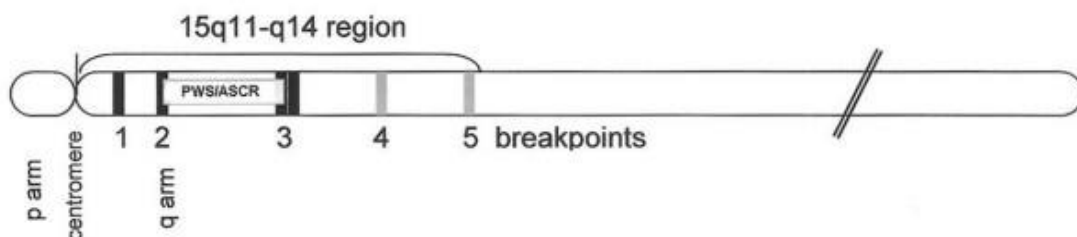
2. Az *SCN1A*-gén mutáció spektrumának vizsgálata a magyar populációban DS és GEFS+ szindróma esetén Sanger-féle szekvenálással és multiplex ligációfüggő próba amplifikációval (MLPA). Genotípus-fenotípus összefüggések feltárása. A mutációk családi szegregációjának vizsgálata.

3. A WES vizsgálat létjogosultságának igazolása a GGE betegcsoportban. VUS-ként klasszifikált eltérés interpretációja.

## 4. A VIZSGÁLATBAN RÉSZTVEVŐ BETEGEK

### 4.1. Idic (15) szindrómás betegek

A kutatás első részében öt idic (15) szindrómában szenvedő betegünk pontos fenotípus elemzését, majd kiegészítő genetikai vizsgálatát végeztük el, akiket intézetünkben hagyományos cytogenetikai módszerekkel diagnosztizáltunk. Az idic (15) szindróma a leggyakoribb genetikai betegség, melyet egy számfeletti abnormalis struktúrájú kromoszóma okoz. A számfeletti marker kromoszómák (SMC) kb. fele 15-ös eredetű a 15q11.2-q13 genomialis régió instabilitása miatt. A gyakori átrendeződés hátterében öt recurrens töréspont (BP1-BP5) áll, melyek alapját alacsony kópiaszámú ismétlődések képezik a genomban, meioticus nem-allélikus homológ rekombináció során interstitialis deletiót (Prader-Willi szindróma/Angelman szindróma), duplicatiót (15q duplicatiós szindróma), számfeletti marker kromoszómát (idic (15) szindróma vagy inv dup (15) szindróma) vagy gyűrűkromoszóma kialakulását okozva (Liehr T, 2004). Az öt rekurrens töréspont és a PWS/AS kritikus régió pozícióját a 15-ös kromoszómán a 8. ábra szemlélteti. Az U-típusú kicserélődés az egyik crossover mechanizmus, amely a strukturálisan különböző, számfeletti idic (15) kialakulásához vezet (Wang NJ, 2008). Kis idic (15)-ről beszélünk, ha a töréspont a BP1-nél, vagy a BP2-nél van, proximalisan a Prader-Willi szindróma/Angelman szindróma (PWS/AS) kritikus régiótól, ezek az esetek klinikailag irrelevánsak. Nagy idic (15) esetén a leggyakrabban azonosított töréspontok a BP4 és a BP5, ezekben az esetekben a BP2-BP3 közötti genomialis régió két extra kópiában van jelen, partialis tetrasomia jön létre, mely kóros fenotípus kialakulásához vezet (Roberts SE, 2003).



8. ábra: A 15-ös kromoszóma sematikus ábrázolása

Az 5 rekurrens töréspont (BP) és a PWS/AS kritikus régió szemléltetésével. (Az ábra forrása: Battaglia A, 2008; Orphanet J of Rare Dis, 3: 30.)

Irodalmi adat, hogy az idic (15) szindrómában szenvedő betegek nagy része terápia-rezisztens epilepsziában (általában WS-ban és/vagy LGS-ban) szenved, és a betegek gondozásában az epilepszia kezelése okozza a legnagyobb kihívást. A betegséggel asszociált

epilepszia és az autizmus spektrum zavar sokkal súlyosabb, mint interstitialis 15q duplicatio esetén, annak ellenére, hogy a kópiaszám-változás ugyanazt a genomialis régiót érinti (Battaglia A, 2008). A vizsgálatunkban részt vevő betegek részletes fenotípusát az alábbiakban ismertetem.

#### **4.1.1. 1. beteg**

Patrik az édesanya zavartalan ikergraviditásától, a 37. gestációs hétre, 2810 g (10-25 pc) születési súllyal, jó általános állapotban született. Leány ikertestvére egészséges, jól fejlődik. A családi anamnesis negatív. Megszületésétől észlelhető súlyos, generalizált izomhypotóniája, később a globalis fejlődésbeli elmaradása is nyilvánvalóvá vált. A centralis hypotonia miatt neurológiai kivizsgálása indult, anyagcsere-betegség, szemészeti, audiológiai eltérés nem igazolódott. Kardiológiai vizsgálata negatív eredményű. Koponya MRI vizsgálattal morfológiai eltérés nem mutatkozott. Egyéves korában kérték genetikai vizsgálatát. Somaticus fejlődése korának megfelelő volt, súlya 8770 g (10-25 pc), magassága 77 cm (50-75 pc), fejkörfogata 46,5 cm (50-75 pc). Aszimmetrikus koponyát láttunk ellapult occipitalis régióval, hypertelorismust, kétoldali epicanthus redőt, széles orrot, prominens philtrumot és nagy száját (**9. ábra**). Neurológiai statusából a megtartott mélyreflexek mellett észlelt generalizált izomhypotonia, a kifejező beszéd hiánya, a tárgykontaktus korától való elmaradása voltak feltűnőek. Brunet-Lezine teszttel felmérve fejlődési kvóciense 46,8 volt. Rutin karyotypizálás során egy SMC igazolódott, mely FISH vizsgálattal 15-ös eredetűnek bizonyult. Kétéves korában vizsgáltuk ismét, ekkor fel tudott ülni egyedül, oda-vissza forgott, kúszott és elkezdett gagyogni, tárgyakért marokfogással nyúlt. Szemkontaktust felvette, érzelmeit kifejezte. Sztereotip mozgásokat nem észleltünk. Az EEG vizsgálat életkorának megfelelő háttéraktivitást mutatott epileptiform jelek nélkül.



**9. ábra: Idic (15) szindrómás beteg jellegtelen arcdysmophiája (1. beteg)**

A fényképeket a szülő beleegyezésével mutatom be.

#### **4.1.2. 2. beteg**

Léna az édesanya II. graviditásától a 41. gestációs hétre, per vias naturales 3520 g (75-90 pc) súllyal született, jó általános állapotban. Idősebb testvére egészséges, a családi anamnesis negatív. A korai psychomotoros fejlődése rendben zajlott, majd 8 hónapos korában az IS-ok megjelenésével fejlődése megtorpant. Az EEG vizsgálaton hypersarrhythmia, alvásban burst suppression minta látszott. WS diagnózisának felállítását követően vigabatrin kezelés indult, mely szignifikáns rohamcsökkenést okozott. Koponya MRI vizsgálattal az extracerebralis liquorterek szimmetrikus tágulata ábrázolódott a frontális és a temporalis régiókban. Tizenhét hónapos korában került sor genetikai vizsgálatára, súlya ekkor 13 kg (90-97 pc) volt, magassága 85 cm (90-97 pc), fejkörfogata 46 cm (50 pc). Vizsgálata során ellapult occipitalis régiót, széles arcot, prominens homlokot, kicsi, pisze orrot, széles mellkast, apró lábakat észleltünk. Mérsékelt izomhypotonia mellett a globalis fejlődési elmaradása nyilvánvaló volt: csak mászni tudott önállóan, a nyelvi fejlődés is késett, csak gagyogni tudott, rágással, nyeléssel is problémák voltak. Sztereotip mozgásminták, mint tapsikolás, kezek rázogatója, ringatózás már ekkor megfigyelhetőek voltak. A rutin karyotypizálás során detektált SMC 15-ös eredetét FISH vizsgálattal támasztottuk alá. Négyéves korában vizsgáltuk újra, ekkor valproát mellett két éve tartó rohammentességről számoltak be a szülők. Önállóan még nem, de vezetve lépegetett, expresszív beszéd nem alakult ki, folyamatos sztereotip mozgásokat észleltünk.

#### **4.1.3. 3. beteg**

Kornél szülei 2. gyermekeként, a 40. gestációs hétre, per vias naturales, 3200 g (25-50 pc) súllyal született, jó általános állapotban. Testvére egészséges, a családi anamnesis negatív. Súlyos generalizált izomhypotonia, táplálási nehezítettség megszületésétől észlelhető volt, a fejlődési mérföldköveket késve teljesítette. Az első epilepsziás rohama 6 hónapos korában jelentkezett. A klinikai kép alapján a WS diagnózisa felállítható volt. Később az epilepszia változatos rohamokkal jelentkezett, terápia-rezisztens LGS képe bontakozott ki. Koponya MRI vizsgálata morfológiai eltérést nem mutatott. Huszonhét hónaposan vizsgáltuk genetikai tanácsadónkban, ekkor súlya 10.400 g (3 pc alatt), magassága 90,5 cm (50-75 pc), fejkörfogata 46 cm (3 pc) volt. Vizsgálatakor ellapult occipitalis régiót, hypertelorismust, kétoldali epicanthus redőt, kancsalságot, széles, lapos orrhátat és kétoldali fülcimpa redőt láttunk. Súlyos generalizált izomhypotoniát, globalis fejlődésbeli elmaradást és autisztikus viselkedést észleltünk. Nem tudott még önállóan járni, rágni és szavakat sem mondott. Karyotypizálás és FISH vizsgálat idic (15) szindrómát igazolt. Legutóbbi kontroll vizsgálata során 8 éves volt, a

súlyos értelmi akadályozottság, az expresszív beszéd teljes hiánya mellett autisztikus viselkedészavar jellemezte. Rufinamid-felbamát kombináció mellett naponta jelentkező, változatos epilepsziás rohamai jelentkeztek.

#### **4.1.4. 4. beteg**

Mátyás a szülei első gyermekeként, zavartalan graviditásból, a 41. gestatiós hétre, per vias naturales 4100 g (90-97 pc) súllyal, jó általános állapotban született. A családi anamnesis negatív. Psychomotoros fejlődése a kezdetektől megkésett volt. Megszületésétől szinte állandó hasmenéstől szenved, aminek okát gastroenterológiai kivizsgálás nem igazolta. Az első epilepsziás rohama 5 évesen jelentkezett GTC roham formájában, melyet változatos rohamok követtek: atoniás, myoclonusos rohamok. Az epilepsziája terápia-rezisztensnek bizonyult, számos antiepileptikum kombináció mellett sem lett rohammentes. Jelenleg lamotrigin monoterápia mellett havonta jelentkeznek rohamai. Koponya MRI vizsgálat periventricularis leucomalatiát és a corpus callosum enyhe atrophiját mutatta. Hétévesen merült fel a genetikai háttér lehetősége, ekkor került sor vizsgálatára. Kielégítő somaticus fejlődése mellett egyértelmű microcephaliát láttunk, súlya 22 kg (25-50 pc), magassága 119 cm (10-25 pc), fejkörfogata 49 cm (3 pc alatt) volt. Enyhe axialis hypotonia mellett spasticus paraplegiát észleltünk, prominens füleken, vékonyszálú hajon, alacsony hajvonalon kívül dysmorphiás eltérése nem volt. Orthesisel bizonytalanul, de járóképes. Rövid mondatokat használ, de időnként dadog. Autisztikus viselkedéssjegyek, mint bruxismus, kezek rázogatósa, pörgés folyamatosan megfigyelhetőek. Rutin karyotypizálás során számfeletti marker kromoszóma jelenléte igazolódott, FISH vizsgálat alátámasztotta a 15-ös eredetet.

#### **4.1.5. 5. beteg**

Alíz szülei 2. gyermekeként, zavartalan graviditásból, terminusra, császármetszéssel, 3050 g (25-50 pc) súllyal született. Perinatalis adaptációjá zavartalan volt. Leánytestvére egészséges, de édesapja 36 éves korában hirtelen szívhalál következtében elhunyt. Psychomotoros fejlődése vontatott volt, bár másfél évesen megtanult önállóan járni, járása mindig összerendezetlen volt. Az első szavak is időben megjelentek, de szókinccse igen szűkös, beszéde dyslaliás. Értelmi akadályozottsága kisgyermekkorra egyértelművé vált, az 1. osztályt csak speciális iskolában tudta megkezdeni. Az első epilepsziás rohama 8 éves korában atípusos absence formájában jelentkezett, később változatos rohamtípusok jelentek meg, és terápia-rezisztens LGS képe bontakozott ki. Koponya MRI vizsgálat kóros intracranialis eltérés nem igazolódott. Nyolc évesen vizsgáltuk genetikai tanácsadónkban, ekkor egy macrosom leánygyermeket láttunk, súlya 44 kg (97 pc felett), magassága 138 cm (90-97 pc), fejkörfogata

53 cm (90-97 pc) volt. Az obesitason, enyhe generalizált hypotonián kívül enyhe dysmorfhiás eltéréseket láttunk: hosszúkás arc, kétoldali epicanthus redő, hosszú philtrum, kicsi száj, vastag alsó ajak és gótikus szájpád. Hagyományos cytogenetikai módszerekkel idic (15) szindróma igazolódott.

A 15-ös eredetű marker kromoszómák pontos genomialis tartalmának és a töréspontjaiknak meghatározásához mind az öt beteg mintáján array CGH vizsgálatot végeztünk el. A kapott eredményeket, a genotípusbeli különbségeket összevetettük betegeink fenotípusával. Irodalmi adatok áttekintésével kerestük a magyarázatát elsősorban a betegeink epilepszia szindrómáinak/az epilepszia meglétének vagy hiányának különbségeire.

#### **4.2. DS és GEFS+ szindrómás betegek**

Munkánk második részében egy öt éves periódusban (2012. január és 2017. december) vizsgáltuk a láz-provokálta epilepsziás rohamokat mutató betegeket. Az ország egész területéről, elsősorban gyermekneurológusok/neurológusok által referált 183 beteg részletes fenotípus elemzése során megállapítottuk, hogy 63 beteg esetében állítható fel a DS vagy a GEFS+ szindróma diagnózisa (Guerrini R, 2011). A továbbiakban ezeknél a betegeknél az *SCN1A*-gén célzott vizsgálata történt Sanger-féle szekvenálással és MLPA módszerrel. Igazolt *SCN1A*-mutáció esetén szegregáció analízist végeztünk a mutáció *de novo* vagy örökölt eredetét alátámasztandó. A kutatás célja az *SCN1A*-gén mutáció spektrumának vizsgálata volt a magyar populációban.

#### **4.3. GGE-ban szenvedő beteg**

A kutatás harmadik részében az új terminológiával GGE-ban szenvedő, jó intellektusú fiúgyermek diagnosztikai lépcsőit jártuk végig, amelyek a gyermeket és családját végül genetikai diagnózishoz juttatták. A kiterjedt hypopigmentált folttal rendelkező fiúgyermek célzott genetikai vizsgálata neurocutan szindróma irányába nem hozott eredményt. Külföldi kollaboráció keretén belül a beteg mintájának WES vizsgálata történt meg. A laboratórium által VUS-ként interpretált eltérés szegregáció vizsgálatát és az eredmények interpretálását intézetünkben végeztük el. A beteg részletes fenotípusát az alábbiakban ismertetem.

A negatív családi anamnesisű, jelenleg 14 éves fiúbeteg, a mater I/1. graviditásából, a 41. gestatiós hétre, 2900 g születési súllyal, jó általános állapotban született. Apgar score: 10-10. Magzati ultrahang vizsgálata során ábrázolódó plexus choroideus cysta miatt a 2. trimeszterben amniocentesis történt, a kromoszóma vizsgálat normál férfi karyotypust mutatott. Cardiorespiratoricus adaptációja rendben zajlott, korai psychomotoros fejlődése jó ütemű volt.



Két és fél éves korában indult epilepsziája myoclonusos atoniás rohamokkal, majd kisiskolás korában szindróma váltás következett be, absence rohamai jelentkeztek. Kezdetben csak hármas antiepileptikum kombináció mellett volt rohammentes, jelenleg monoterápiaként lamotrigint szed és 5 éve nem volt roham. A gyógyszer dózisének csökkentése viszont görcsöt provokált, így az antiepileptikumot leépíteni nem lehetett. Alvásmegvonásos EEG vizsgálata során generalizált interictalis epileptiform jelek igazolódtak. Epileptogén fókuszaként a koponya MRI vizsgálat és a PET/CT vizsgálat alapján a jobb frontális érképletek körüli szürkeállomány szerepe merült fel. A megszületéstől észlelt bal testfélen elhelyezkedő, segmentális jellegű, Blaschko-vonalat követő, a középvonalat megtartó, kiterjedt hypopigmentált folt, a diszkrét koponya MRI eltérés és az epilepszia együttes előfordulása felvetette neurocutan szindróma lehetőségét (**10. ábra**). Intézetünkben 9 évesen vizsgáltuk először, ekkor belszervi és neurológiai státuszából a hypopigmentált folton kívül kiemelendő nem volt, lényeges dysmorphiát nem észleltünk. Bár a diagnosztikus kritérium rendszer alapján a sclerosis tuberosa klinikai diagnózisát felállítani akkor nem lehetett, genetikai vizsgálatunkat ez irányba indítottuk. Betegünk jelenleg 8. osztályos, kognitív funkciói kiválóak, kitűnő tanuló.



**10. ábra:** A GGE-ban szenvedő beteg bőrtünete

A fényképet a szülő beleegyezésével mutatom be.

## **5. MÓDSZEREK**

### **5.1. Mintavétel és tárolás**

A Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Orvosi Genetikai Intézetének genetikai tanácsadójában a vizsgálatban résztvevő betegek részletes fenotípus elemzését végeztük el, betegeinket/betegeink törvényes képviselőjét a humángenetikai törvénynek megfelelően genetikai tanácsadásban részesítettük. A beteg/a beteg törvényes képviselője írásos beleegyezését adta a genetikai vizsgálatok elvégzéséhez. A tájékoztatást és a vizsgálatba való beleegyezést követően 2 ml Na-heparináttal alvadásgátolt és/vagy 5-7 ml etilén-diamin-tetraecetsavval (EDTA) alvadásgátolt vér került levételre minden kiválasztott személytől a laboratóriumi vizsgálatok elvégzéséhez. A minták a feldolgozást követően biobanki tárolásra kerültek. A DNS minta tárolása, a vizsgált személy eredményeinek tudományos közleményben történő felhasználása az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság jóváhagyásával történt, a Helsinki Nyilatkozat (1971) irányelveit követtük.

### **5.2. DNS izolálás**

A molekuláris genetikai vizsgálatokhoz EDTA-val alvadásgátolt perifériás leucocytákból E.Z.N.A.® Blood DNA Maxiprep Kit-tel (VWR International Kft.) izolált genomialis DNS mintát használtunk.

### **5.3. GTG sávozás**

A vizsgálatához sterilén vett, Na-heparináttal alvadásgátolt perifériás vért használtunk. A karyotypizálás Giemsa-Trypszin sávozással, standard eljárással történt. A mozaicizmus kizárása érdekében minden esetben 100 sejtet értékeltünk.

### **5.4. Fluorescens in situ hibridizáció (FISH)**

A karyogramon látott SMC-k azonosításához a betegek perifériás véréből készített kromoszóma preparátumon FISH vizsgálatot végeztünk. Tekintettel az SMC-k gyakori 15-ös eredetére, az *UBE3A* lókuszt (PWS/AS kritikus régió) specifikus próbát és a 15p11.2 és 15q22-es régiókra specifikus kontroll próbákat használtunk a vizsgálatához (Vysis, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). A protokollt a gyártó előírásai szerint alkalmaztuk.

### **5.5. Uniparentalis disomia**

Uniparentalis disomia (UPD) esetén az érintett személy kromoszómaszáma normális, ugyanakkor egy adott kromoszómájának mindkét homológja ugyanattól a szülőtől származik. UPD esetén a homológok eredetétől függően, a genomialis imprinting miatt, eltérő tünetek

észlelhetők.

Az eljárás során a 15 (idic) szindrómás betegek (2. és 3.) és szüleik esetén a polymorph microsatellita (STR) markerek amplifikálásra kerültek polimeráz láncreakció (PCR) segítségével. A PCR reakciót követően az amplifikáció 2%-os agaróz gélen került ellenőrzésre, majd 8%-os poliakrilamid gélen választottuk el az egyes alléleket. Az értékelés során a vizsgált személy alléljeit a két szülő alléljeihez viszonyítottuk, azaz a kapott termékek mintázatát értékeltük. A microsatellita marker analízis szempontjából csupán azok a markerek informatívak, amelyekre nézve a családtagok heterozygoták, és a két szülő legalább az egyik allélméretben különbözik egymástól. A 15-ös kromoszómák UPD vizsgálata során a szakirodalomban közölt D15S10, D15S11, D15S97, D15S113, D15S122, D15S128, D15S165, D15S210, D15S659 és GABRB3 polymorph STR markerek kerültek alkalmazásra.

### **5.6. Array komparatív genom hibridizáció**

Az array CGH vizsgálat egy, a minta DNS-ének kópiaszám-változásait vizsgáló, hibridizáción alapuló molekuláris cytogenetikai módszer. Az eljárás célja két különböző genomialis DNS (a vizsgált minta és a referencia DNS) gyors és hatékony összehasonlítása, majd az eltérések vizsgálata. Az array CGH a tradicionális CGH egy fajtája, mely esetén a metaphasisos kromoszómák meghatározott hosszúságú (25-60 bp), a genomot lefedő oligonucleotidokkal helyettesítettek. Az oligonucleotidok egy speciális tárgylemezen helyezkednek el, genomi pozíciójuk a gyártó által meghatározott. A módszer 5-10 kilobasisos felbontóképességével egy specifikus, gyors, érzékeny technikává vált, megkönnyítve a CNV-k detektálását a teljes genomban.

Az array CGH vizsgálat céljára az Agilent Human Genome Unrestricted G3 ISCA v2 Sureprint 8x60K oligo-arrayt (Amadid 021924) használtuk, amely egy nagy felbontású microarray. A platform 18,851 db 60 nucleotid hosszúságú oligomer próbát tartalmaz a genom ISCA konzorcium által kiemelt/vizsgálatra ajánlott régióiban, emellett 40,208 db ún. backbone próbát, amelyek együttesen 60 kb átlagos próba távolságot jelentenek, a genom kódoló és nem kódoló régióit egyaránt reprezentálva (Agilent, Santa Clara, CA). A minták jelölése és hibridizációja során az Agilent által ajánlott eljárást (Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis – Enzymatic Labelling Protocol v7.5) követtük. A vizsgált személy DNS-ét és a nemből vele megegyező referencia DNS-t AluI és RsaI restrikciós endonucleasokkal fragmentáltuk (2.5 órán át 37 °C-on). Az emésztett DNS minta jelölése az ún. random priming módszer alkalmazásával történt (Agilent Genomic DNA Labelling Kit; Agilent, Santa Clara, CA), ennek során Cy5-dUTP jelölést használtunk a vizsgált személyek,

illetve Cy3-dUTP jelölést a referencia minták esetében. A fluorescensen jelölt fragmensek tisztításához Amicon Ultra AU-30 filtereket használtunk. Az így előkészített mintákat kombináltuk, a betegek és a megfelelő referencia minták mellett 50 µg Human Cot-1 DNS-t is alkalmazva végeztük a hibridizációt (65 °C-on 24 órán át). A hibridizált lemezek mosása szintén a gyártó ajánlása szerint történt (Agilent Protocol v7.2). Az elkészült slide-okat Agilent dual laser scanner G2565CA készülék segítségével scanneltük be, az elemzéshez Agilent Feature Extraction software-t (v10.10.1.1.) használtunk. Az eredmények vizuális megjelenítéséhez és értékeléséhez Agilent Cytogenomics software-t (v4.0.3) alkalmaztunk. A disszertációban bemutatott eredmények esetében a DNS szekvencia információk a publikus UCSC (University of California, Santa Cruz) adatbázisnak felelnek meg (GRCh37/hg19). A detektált CNV-ket számos, szintén szabadon felhasználható adatbázisban lévő ismert aberrációval összehasonlítva értékeltük: DECIPHER, Database of Genomic Variants, ClinGen Dosage Sensitivity Map, ClinVar és Ensembl.

### **5.7. Automatizált Sanger-féle szekvenálás**

A klasszikus Sanger-féle szekvenálás a lánctermináció elvén alapuló, 2,3-dideoxi-nucleotidokat felhasználó polimerizációs reakció. Az automata szekvenátorokban a minták szétválasztása kapilláris gélelectrophoresissel, a detektálás fluorescens detektorral történik. Az *SCN1A*, a *TSC1* és *TSC2* és az *SLC12A5*-gén exonjainak amplifikálása PCR-rel történt, intézetünkben tervezett exonspecifikus primerpárok alkalmazásával. A kapott PCR termékek elemzését bidirectionális Sanger szekvenálással végeztük ABI 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok) automata szekvenáló készüléken, BigDye terminátorreagens (Thermo Fisher Scientific) felhasználásával. A kapott szekvenciákat a megfelelő referencia szekvenciával összehasonlítva értékeltük a Winstar program (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) segítségével. Az *SCN1A*-gén vizsgálata során detektált új variánsok interpretációja a Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org>), a PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>), a PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>) és a Mutation Assessor (<http://mutationassessor.org/r3>) predikációs software-ek segítségével történt. A talált mutációkat a betegtől nyert második minta vizsgálatával validáltuk. Az új mutációk klasszifikálásakor az ACMG elveit követtük.

### **5.8. Multiplex ligációfüggő próba amplifikáció**

Az *SCN1A*, a *TSC1* és a *TSC2*-gén nagyobb átrendeződéseit MLPA módszerrel vizsgáltuk. Az MLPA analízis a kereskedelemben kapható kittel (*SCN1A*-hoz használt kit: SALSA MLPA Kit P-137 Probemix, MRC Holland, *TSC1*-hez használt kit: MLPA kit P124-

C3 Probemix, MRC Holland, *TSC2*-höz használt kit: MLPA kit P046-D1 Probemix, MRC Holland) történt, a gyártó cég által ajánlott protokoll alapján (MRC Holland, Amszterdam, Hollandia). Minden reakcióhoz 50-250 ng DNS mintát használtunk 5 µl térfogatú reakcióelegyben. A DNS-t 16 órán át hibridizáltuk a specifikus próbákkal, majd a ligációt követően fluoreszcensen jelölt primerek jelenlétében PCR amplifikációt alkalmaztunk. A kapott DNS fragmentumokat kapilláris electrophoresis segítségével választottuk el. Az eredmények értékeléséhez Coffalyser programot (MRC Holland, Amszterdam, Hollandia) használtunk. A módszer egy vagy több exon deletiójának vagy duplicatiójának detektálása mellett akár a teljes gén kópiaszám-változásának kimutatására alkalmas. Azon mintákat, amelyek valamilyen kópiaszámbeli eltérést mutattak, újból alávetettük az analízisnek, és csak akkor tekintettük a deletiót igazoltnak, amennyiben azt két független mérés eredménye alátámasztotta.

### **5.9. Új-generációs szekvenálás, teljesexom-szekvenálás**

A GGE-ben szenvedő beteg mintájának teljesexom-szekvenálása külföldi genetikai laboratóriumban (CentoGene AG, Németország) történt kutatási együttműködés keretén belül. A genomikus DNS fragmentálását követően az elemezni kívánt régiók kiemelése/dúsítása Agilent SureSelect Human All Exon Kit V6 alkalmazásával történt. A könyvtárkészítést követően a szekvenálást Illumina platformon végezték (lefedettség átlagosan 100x). A kapott nyers adatok bioinformatikai feldolgozása a CentoGene saját fejlesztésű programjai (és algoritmusai) segítségével történt, a közölt adatok a GRCh37/hg19-re vonatkoznak.

## 6. EREDMÉNYEK

### 6.1. Idic (15) szindrómás betegek fenotípusa és strukturális különbségei

#### 6.1.1. A betegek fenotípusa

Betegeink mindegyikének fenotípusa az idic (15) szindrómára jellegzetes: különböző fokú generalizált izomhypotonia, globalis fejlődésbeli elmaradás, általában középsúlyos-súlyos értelmi akadályozottság, az expresszív beszédfejlődés súlyos zavara, egy eset kivételével (1) autisztikus viselkedészavar és epilepszia jellemző rájuk. A tünetek súlyossága azonban meglepő változatosságot mutat. A somaticus fejlődésük általában kielégítő, egy esetben microcephaliát (4) észleltünk, egy másik esetben (5) pedig macrosomiát. Jellegtelen arcdysmorphia és társuló fejlődési rendellenességek hiánya szintén közös vonás a betegekben. Súlyos fokú, centralis izomhypotonia miatt a Prader-Willi szindróma kizárása céljából készült karyotypus vizsgálat adta meg a diagnózist az 1. esetben. A korán induló epilepszia társulása fejlődésbeli elmaradással szintén genetikai kivizsgálást indokolt a 2. és a 3. esetben. Az enyhébb tünetek, az epilepszia későbbi indulása miatt a 4. és 5. esetben a genetikai diagnózis felállítására csak gyermekkorban került sor. A betegek klinikai tüneteit az **2. táblázat** foglalja össze.

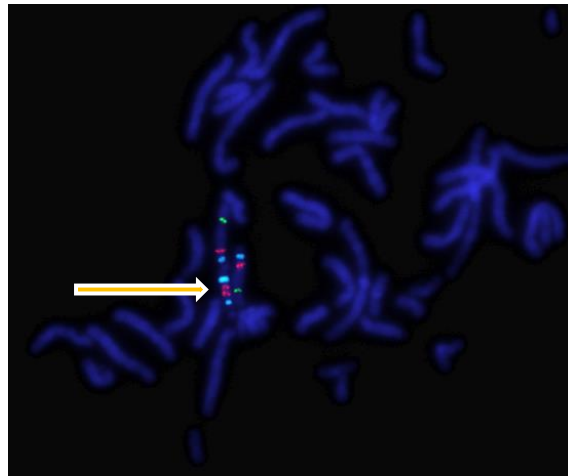
2. táblázat: Az idic (15) szindrómás betegek fő klinikai tüneteinek összefoglalása

Beteg	Nem	Életkor a diagnóziskor	Hypotonia	Értelmi akadályozottság	Expresszív beszéd	Viselkedési zavar	Epilepszia
1.	férfi	1 év	súlyos	középsúlyos	nincs	-	-
2.	nő	17 hó	közepes	súlyos	nincs	sztereotípiák	+
3.	férfi	27 hó	súlyos	súlyos	nincs	autisztikus	+
4.	férfi	7 év	enyhe	középsúlyos	mondatok	autisztikus	+
5.	nő	8 év	enyhe	enyhe	mondatok	autisztikus	+

#### 6.1.2. GTG sávozás és FISH

A betegek mintáinak GTG-sávozása 550-sáv szintű felbontással történt. A betegek mindegyikének karyotypusa egy G-csoportbeli acrocentricus számfeletti marker kromoszómát tartalmazott. Mindegyik esetben 100 sejt vizsgálata történt, így a mozaicizmus csaknem kizárható. A klinikai tünetek és az SMC jelenléte miatt metaphasis FISH vizsgálatot végeztünk *UBE3A* lókuszt specifikus próbával (PWS/AS kritikus régió), az SMC-ken mindkét próba

(*D15Z1* és *UBE3A* régió) jelet adott (a normál 15-ös kromoszómák mellett), igazolva ezzel a marker kromoszóma 15-ös eredetét (**11. ábra**).



**11. ábra:** Az 1-es beteg jellegzetes FISH vizsgálata *UBE3A* próbával (Vysis, Abbott)

A nyíl az idic (15) kromoszómára mutat. Szignálok: Kék-*D15Z1*, piros-*UBE3A*, zöld-*PML*- lókuszt (15q24). A szignálok elhelyezkedése alapján az öt beteg FISH vizsgálati eredményében nincs különbség.

A betegeink karyotypusa a következőképpen összegezhető: **47,XN,+idic(15)(pter→q13::q13→pter)[100]**. Mindegyik eltérés a 15q11q13 régió tetrasomiáját okozta a betegeknél. A szülők cytogenetika vizsgálata normál eredményt adott.

### **6.1.3. Uniparentalis disomia**

Az uniparentalis disomia kizárása csak a 2-es és a 3-as beteg esetében történt meg. A másik három beteg szülei nem egyeztek bele a vizsgálatba.

### **6.1.4. Array CGH**

A kópiaszámokat és az idic (15) kromoszóma kialakulásában résztvevő különböző genomialis régiók töréspontjait összegzi a **3. táblázat** (az ISCN 2016 alapján) (McGowan-Jordan, 2016). A feltüntetetteken kívül gyakori, benignus variánsokat detektáltunk. A genomialis eltérések bázispár pozícióit a „February 2009 Assembly” alapján jelöltük meg (GRCh37/hg19).

**3. táblázat: Az idic (15) kromoszómák array CGH vizsgálati eredményei és molekuláris altípusai**

Beteg	Molekuláris altípus	Array CGH eredmény	Ábra
1.	A	arr [GRCh37] 15q11.1q13.2(20102541_30322138)x4	12.
2.	C	arr [GRCh37] 15q11.2q13.2(22765628_31183907)x4, arr [GRCh37] 15q13.3(31261835_32861626)x3	13.
3.	C	arr [GRCh37] 15q11.2q13.3(22765628_30178222)x4, arr [GRCh37] 15q13.1q13.3(30226187_32445252)x3	14.
4.	D	arr [GRCh37] 15q11.1q13.3(20102541_30078386)x4, arr [GRCh37] 15q13.1q13.3(30251859_32510863)x3	15.
5.	B	arr [GRCh37] 15q11.1q13.2(20102541_31077833)x4, arr [GRCh37] 15q13.2q13.3(31123186_33009483)x3	16.

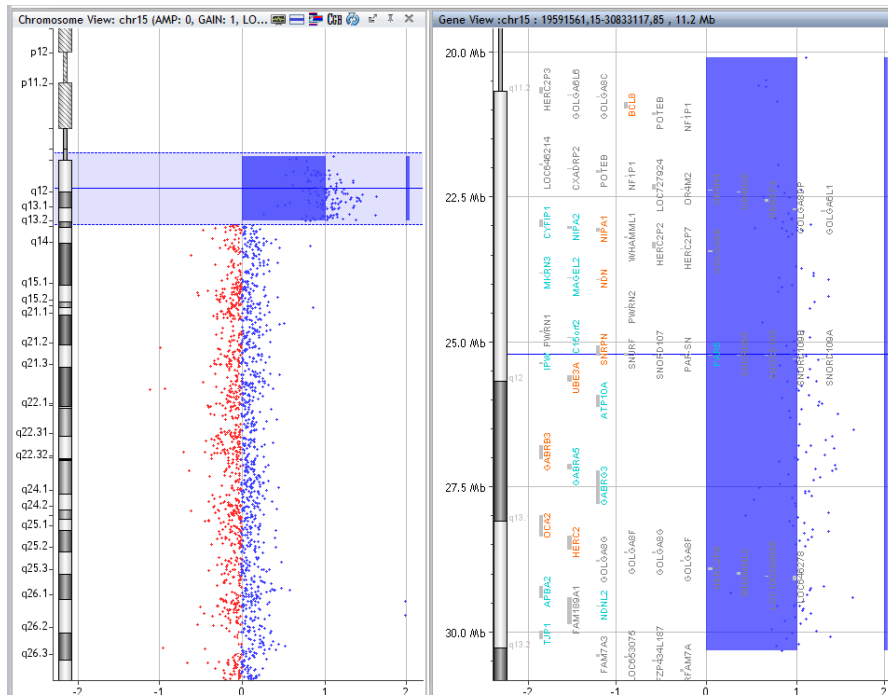
**A.** Nagy idic(15) – szimmetrikus töréspontok BP1-BP4:BP4-BP1.

**B.** Nagy idic(15) – aszimmetrikus töréspontok BP1-BP5:BP4-BP1.

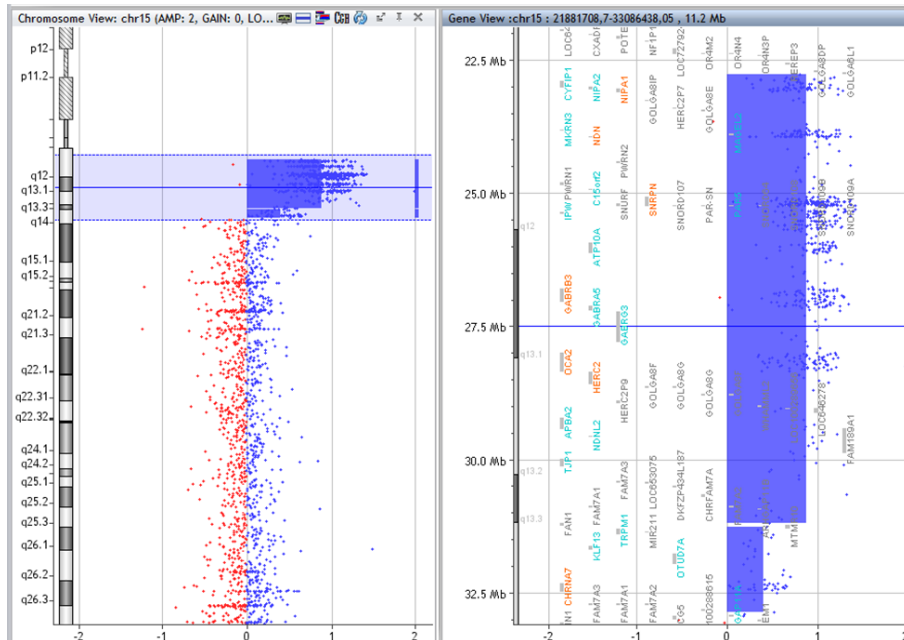
**C.** Nagy idic(15) – aszimmetrikus töréspontok BP2-BP5:BP4-BP2.

**D.** Nagy idic(15) – aszimmetrikus töréspontok BP1-BP5:BP3-BP1.

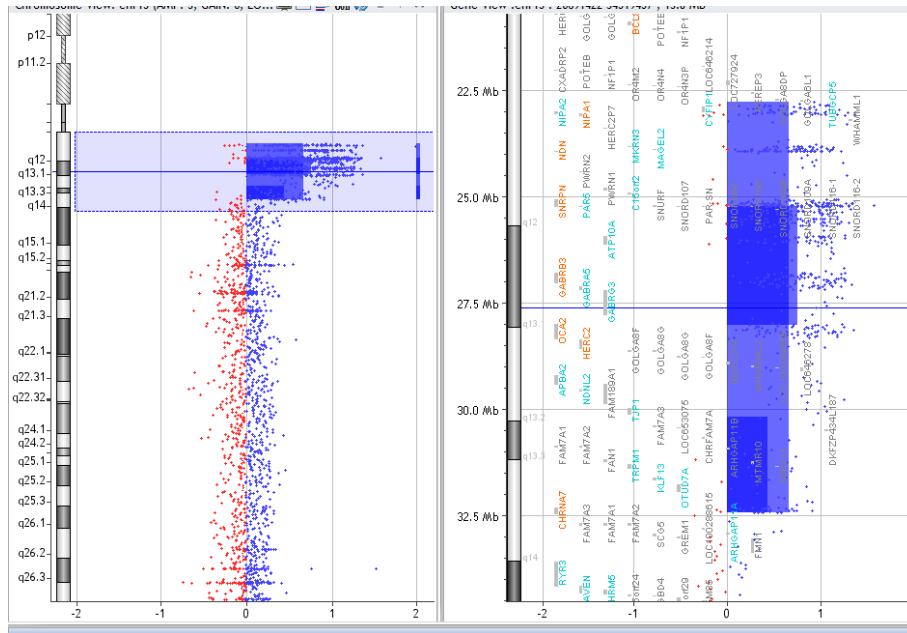




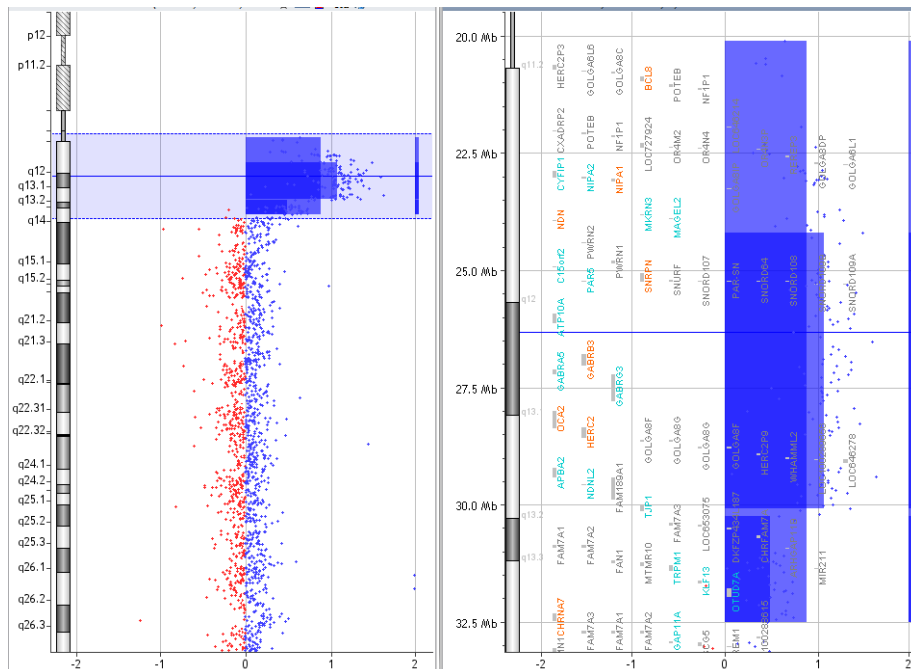
12. ábra: Az 1-es beteg array CGH eredménye



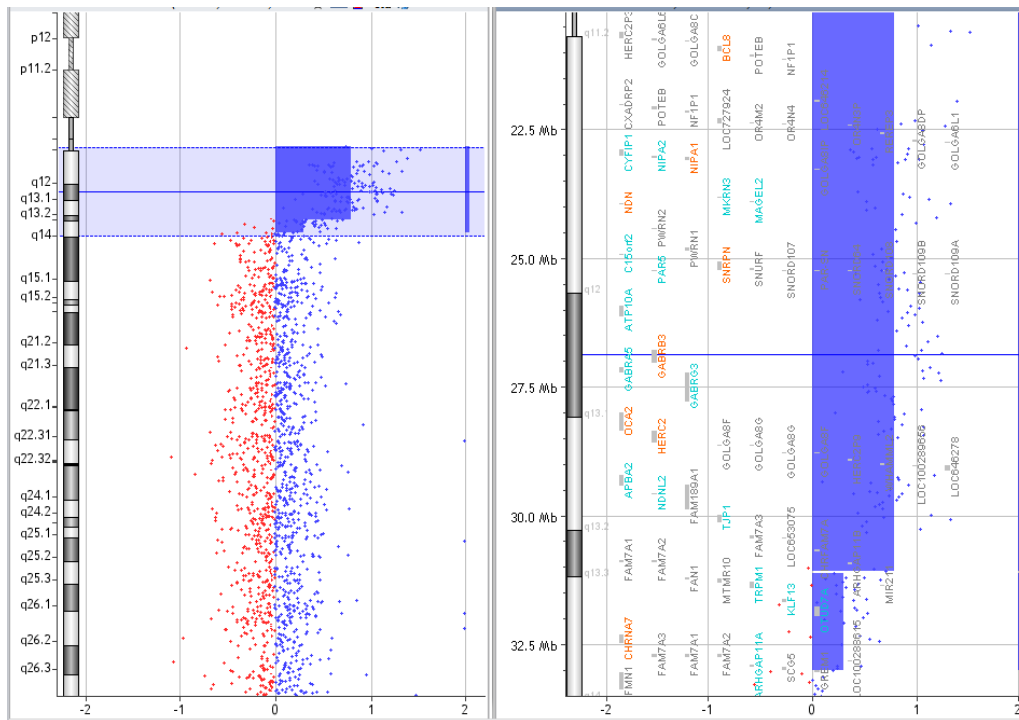
13. ábra: A 2-es beteg array CGH eredménye



14. ábra: A 3-as beteg array CGH eredménye



15. ábra: A 4-es beteg array CGH eredménye



16. ábra: Az 5-ös beteg array CGH eredménye

Az array CGH vizsgálat eredményei alapján betegeinket négy molekuláris altípusba soroltuk, a 2-es és 3-as beteg töréspontjai megegyeznek. Az 1-es beteg töréspontjai szimmetrikusak, a többieké aszimmetrikusak (12.-16. ábra).

## 6.2. Az *SCN1A*-gén mutációs spektruma a magyar epilepsziás populációban

Vizsgálatunkkal összesen 12 ismert *SCN1A*-mutációt igazoltunk (15 betegen és 3 családtagban), és 15 korábban nem ismert pathogen eltérést mutattunk ki (15 betegen és 2 családtagban) Sanger-féle szekvenálással. MLPA vizsgálattal további három betegen az *SCN1A*-gén nagy deletiója igazolódott. A 63 vizsgált betegből tehát 33 esetben tudtuk a DS vagy a GEFS+ szindróma klinikai diagnózisát genetikailag alátámasztani. Az öröklődésmentet nem minden esetben tudtuk tisztázni, csak azokban a családokban, ahol a szülőktől DNS mintavétel történt, és a vizsgálatba írásos beleegyezésüket adták. A mutáció hat esetben bizonyult örökletesnek. A szülők fenotípusa vagy a GEFS+ szindrómával leírható (1b), vagy gyermekkori lázgörcsök volt (3c, 21b, 24b), illetve két esetben teljesen tünetmentesnek bizonyultak (5b, 8b).

A korábban leírásra került mutációk közül egy recurrens missense mutációt (p.Thr1174Ser) azonosítottunk három betegen és egyikőjük tünetmentes édesanyjában (4, 5/a, b, 20). Egy recurrens nonsense mutációt (p.Arg1245\*) detektáltunk két DS fenotípusú betegen

(6, 7). Egy familiaris nonsense mutáció került leírásra egy édesapában és két kislányában (p.Arg542\*), a lányok mindketten DS-ban szenvednek, édesapjuknak gyermekkori lázgörcsei voltak (3/a, b, c). Egy GEFS+ szindróma tüneteit mutató édesanya és DS-s fiúgyermek egy splice régióra eső variánst hordoznak (1/a, b). Két további, GEFS+ szindróma fenotípusú betegben egy frameshiftet (leolvasási keret eltolódás) okozó és egy missense mutációt igazoltunk (11, 13), öt már ismert, DS fenotípust okozó missense eltérés mellett (2, 8/a, 9, 10, 12). A **4. táblázat** foglalja össze a vizsgálatunkban kimutatott, már ismert *SCN1A*-gén-mutációkat.

**4. táblázat: Ismert *SCN1A*-gén-mutációk a vizsgálatunkban**

Beteg	Pozíció	Nukleotidszintű eltérés	Proteinszintű eltérés	Mutáció típusa	Fenotípus
1/a	intron 5-6	c.473+5 het G-A	-	splice site	DS
1/b	intron 5-6	c.473+5 het G-A	-	splice site	GEFS+
2	exon 9	c.1277A>G	p.Tyr426Cys	missense	DS
3/a	exon 10	c.1624 C>T	p.Arg542*	nonsense	DS
3/b	exon 10	c.1624 C>T	p.Arg542*	nonsense	DS
3/c	exon 10	c.1624 C>T	p.Arg542*	nonsense	lázgörcs
4	exon 17	c.3521C>G	p.Thr1174Ser	missense	GEFS+
5/a	exon 17	c.3521C>G	p.Thr1174Ser	missense	DS
5/a	exon 21	c.4219C>T	p.Arg1407*	nonsense	DS
5/b	exon 17	c.3521C>G	p.Thr1174Ser	missense	sine morbo
6	exon 19	c.3733C>T	p.Arg1245*	nonsense	DS
7	exon 19	c.3733C>T	p.Arg1245*	nonsense	DS
8/a	exon 20	c.3924A>T	p.Glu1308Asp	missense	DS
8/b	exon 20	c.3924A>T	p.Glu1308Asp	missense	sine morbo
9	exon 25	c.4793A>T	p.Tyr1598Phe	missense	DS
10	exon 26	c.4934G>A	p.Arg1645Gln	missense	DS
11	exon 26	c.5189T>C	p.Leu1730Pro	missense	GEFS+
12	exon 26	c.5264A>G	p.Asp1755Gly	missense	DS
13	exon 26	c.5536-5539delAAAC	p.Lys1846SerfsX11	frameshift	GEFS+

Referencia szekvencia: NM\_001165963 NP\_001159435.

1/b az 1/a beteg édesanyja; 3/c a testvérpár 3/a és 3/b betegek édesapja; 5/b az 5/a beteg édesanyja; 8/b a 8/a beteg édesanyja.

A vizsgált betegek közül három esetben szimultán két-két mutációt mutattunk ki az *SCN1A*-génben (5/a, 15, 20). Az új, korábban még nem közölt mutációk között 12 missense variánst, két frameshiftet okozó és egy in-frame deletiót okozó mutációt azonosítottunk. Az **5. táblázat** foglalja össze a vizsgálatunkkal detektált új mutációkat.

Az *SCN1A*-gén utolsó exonjában egy missense eltérést igazoltunk DS fenotípusú monozygota ikrekben (26/a, b). Két betegünknel, akik enyhébb lefolyású DS-ban szenvednek-iskoláskorukra megfelelő rohamkontroll mellett intellektusuk csaknem átlagos-egy frameshiftet

okozó deletiót és egy missense mutációt igazoltunk (19, 20). Klasszikus DS fenotípusú betegeinkben további egy új, frameshiftet okozó deletiót és egy in-frame deletiót detektáltunk (16, 18) hét, korábban nem közölt missense variáns mellett (15, 17, 21/a, 22, 25, 27). GEFS+ fenotípusú betegeink közül három esetben új, missense eltérést igazoltunk (14, 23, 24/a). Két családtagnál, akik anamnesisében egyszerű lázgörcs szerepelt csupán, azonosítani tudtuk a gyermekükben kimutatott pathogen *SCN1A*-mutációt (21/b, 24/b). Az egyik gyermek GEFS+, a másik DS fenotípusú. A szekvencia variánsok interpretálását az ACMG ajánlása alapján végeztük el, a 15 új eltérésből kettő bizonyult “pathogénnek”, 12 “valószínűen pathogénnek”, egy eltérés pedig “ismeretlen jelentőségű variánsnak” (Richards S, 2015).

5. táblázat: Az *SCN1A*-génben azonosított új mutációk

Beteg	Pozíció	Nukleotidszintű eltérés	Fehérjeszintű eltérés	Mutáció típusa	Fenotípus	ACMG-alapú klasszifikáció és az evidencia szintek
14	exon 1	c.182T>A	p.Leu61His	missense	GEFS+	Valószínűen pathogen (PM2, PM6, PP2, PP3)
15	exon 2	c.364A>G	p.Ile122Val	missense	DS	Valószínűen pathogen (PM1, PM5, PP2, PP3)
15	exon 2	c.377T>C	p.Val126Ala	missense	DS	VUS (PM2, PP2, PP3)
16	exon 4	c.543_545delAGA	p.Glu181del	in frame del	DS	Valószínűen pathogen (PM1, PM2, PM6)
17	exon 9	c.1184C>A	p.Ala395Asp	missense	DS	Valószínűen pathogen (PM1, PM2, PM5, PM6, PP2, PP3)
18	exon 14	c.2510delG	p.Gly837ValfsX4	frameshift	DS	Pathogen (PVS1, PM1, PM2, PM6, PP3)
19	exon 15	c.2666C>T	p.Ala889Val	missense	DS <sup>#</sup>	Valószínűen pathogen (PM1, PM2, PM6, PP2, PP3)
20*	exon 18	c.3677delT	p.Phe1226SerfsX2	frameshift	DS <sup>#</sup>	Pathogen (PVS1, PM1, PM2, PM6, PP3)
21/a	exon 21	c.4223G>C	p.Trp1408Ser	missense	DS	Valószínűen pathogen (PM1, PM2, PP2, PP3)
21/b	exon 21	c.4223G>C	p.Trp1408Ser	missense	lázgörcs	Valószínűen pathogen (PM1, PM2, PP2, PP3)
22	exon 22	c.4322C>T	p.Ala1441Val	missense	DS	Valószínűen pathogen (PM2, PM6, PP2, PP3)
23	exon 22	c.4328A>C	p.Asp1443Ala	missense	GEFS+	Valószínűen pathogen (PM2, PM6, PP2, PP3)
24/a	exon 26	c.5332G>C	p.Val1778Leu	missense	GEFS+	Valószínűen pathogen (PM1, PM2, PP2, PP3)
24/b	exon 26	c.5332G>C	p.Val1778Leu	missense	lázgörcs	Valószínűen pathogen (PM1, PM2, PP2, PP3)
25	exon 26	c.5399T>G	p.Leu1800Arg	missense	DS	Valószínűen pathogen (PM1, PM2, PM6, PP2, PP3)
26/a	exon 26	c.5621G>C	p.Arg1874Pro	missense	DS	Valószínűen pathogen (PM2, PM6, PP2, PP3)
26/b	exon 26	c.5621G>C	p.Arg1874Pro	missense	DS	Valószínűen pathogen (PM2, PM6, PP2, PP3)
27	exon 26	c.5438A>C	p.Glu1813Ala	missense	DS	Valószínűen pathogen (PM1, PM2, PM6, PP2, PP3)

\*A betegnek egy már ismert missense mutációja is van az *SCN1A*-génben (c.3521C>G, p.Thr1174Ser).

Referencia szekvencia: NM\_001165963 NP\_001159435.

21/b az édesanyja a 21/a betegnek; 24/b az édesanyja a 24/a betegnek.

<sup>#</sup>A betegség enyhe típusa, iskoláskorban jó rohamkontroll mellett közel normál intellektussal.

A DS klinikai diagnózisát további három betegben sikerült alátámasztanunk MLPA-módszerrel. Két beteg fenotípusa nem különbözött jelentősen a pontmutációs betegektől (28, 30), a harmadik beteg fenotípusa viszont, aki egy nagy, heterozygota deletiót hordoz (exon 1-17), meglepően enyhe formája a betegségnek (29). Az **6. táblázat** tartalmazza az MLPA-pozitív betegek adatait.

**6. táblázat: MLPA-val igazolt CNV-k az SCN1A-génben**

Beteg	Genotípus	Fenotípus
28	heterozygota teljes gén deletio	DS
29	heterozygota exon 1-17 deletio	DS <sup>#</sup>
30	heterozygota exon 1-2 deletio	DS

<sup>#</sup> A betegség enyhe típusa, iskoláskorban jó rohamkontroll mellett közel normál intellektussal.

### **6.3. Generalizált epilepszia háttérében azonosított ioncsatorna-génmutáció ritka formája**

A kiterjedt hypopigmentált folttal rendelkező, kiseddkorban myoclonusos-atonias rohamokat mutató, gyermekkorban absence rohamokra váltó fiúgyermek DNS mintájának vizsgálata során intézetünkben a *TSC1* és *TSC2*-gének Sanger-féle szekvenálása és MLPA analízise során eltérés nem volt kimutatható. A beteg DNS mintáját kollaboráció keretében külföldi genetikai laboratóriumba küldtük WES vizsgálat elvégzése céljából. A WES során az *SLC12A5*-génben egy heterozygota c.1417G>A missense eltérést detektáltak, mely egy valin-isoleucin cserét eredményez a fehérje 473-as aminosav pozíciójában (p.Val473Ile). A detektált eltérés a szakirodalomban eddig ismeretlen, különböző predikciós software-ekkel vizsgálva eltérő megítélésű, a külföldi kollaborációs laboratórium beszámolójában VUS-ként klasszifikált. A fenotípussal összevetve, a szakirodalomban idiopathiás generalizált epilepszia 14-es típusaként ismert epilepszia szindróma diagnózisát támasztja alá. A szülők hordozósági vizsgálatára intézetünkben került sor. Az édesanya a vizsgált mutációra nézve normál genotípusúnak bizonyult, míg a tünetmentes édesapánál is kimutattuk a gyermeknél észlelt heterozygota c.1417G>A missense mutációt az *SLC12A5*-génben.

## 7. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

### 7.1. Az array komparatív genom hibridizáció szerepe az idic (15) szindrómás betegek diagnosztikájában

Vizsgálatunk során öt, különböző életkorban diagnosztizált idic (15) szindrómában szenvedő beteg esetében végeztük el az array CGH vizsgálatot megerősítve és kiegészítve ezzel genetikai diagnózisukat. Az idic (15) szindróma jellegzetes klinikai tünetei a korai centralis hypotonia, fejlődésbeli elmaradás, közepsúlyos-súlyos értelmi akadályozottság, epilepszia, autisztikus viselkedés és az expresszív beszéd hiánya. Társuló fejlődési rendellenességek ritkán kísérik a tünetegyüttest. A betegség incidenciáját 1/30.000 élveszületésre becsülik, a nemek közötti megoszlása 1:1, bár bizonyosan aluldiagnosztizált. A jellegtelen dysmorphiás jelek és a fejlődési rendellenességek hiánya miatt a karyotypizálást feltehetően egyes esetekben nem indikálják (Battaglia A, 2008). A karyotypizálással észlelt SMC azonosításának következő diagnosztikus lépése a FISH vizsgálat elvégzése a PWS/AS kritikus régióra specifikus próbával. Az array CGH módszer alkalmas az idic (15) kromoszóma pontos genomialis tartalmának, a kópiaszám-változásnak, a töréspontoknak és a géntartalomnak a meghatározására, így feltehetően korábban nem ismert genotípus-fenotípus összefüggések feltárására nyújt lehetőséget (Wang Q, 2015).

Az idic (15) szindrómás betegek klinikai tüneteinek súlyossága igen széles skálán mozog, ahogy azt a vizsgálatban résztvevő betegek fenotípusa is mutatja. Számos genetikai mechanizmust feltételeznek ennek a heterogenitásnak a hátterében, úgy, mint a genomialis struktúra különbözősége, a szülői-eredet okozta imprinting hatások és a mozaikosság. Az általunk vizsgált öt beteg közül csak egy esetben igazolódott jellegzetes szimmetrikus struktúrájú SMC egy törésponttal (**12. ábra**). Ez a mechanizmus a segmentalis aneupoidián belül négy egyforma kópia kialakulásához vezetett. Ez a beteg, eltérően a többiektől, nem epilepsziás és autisztikus tüneteket sem mutat, bár jelenleg még csak két éves, így ezek a tünetek a későbbiekben még kialakulhatnak nála. A beteg gondozásakor kiemelt figyelmet kell fordítani epilepsziás roham időbeni észlelésére és a viselkedés megfigyelésére.

A betegek közül ketten (2. és 3.) megegyező, aszimmetrikus töréspontokkal rendelkeznek (**13. és 14. ábra**), mindkettejük epilepsziája csecsemőkori kezdetű, IS-kal induló, elektroklínikailag WS-nak megfelelő. A 3. beteg esetében a későbbiekben változatos rohamok jelentkeztek, és terápia-rezisztens LGS klinikai képe bontakozott ki. Bár a 2. beteg két éves kora óta rohammentes, mégis sokkal súlyosabb fejlődésbeli és intellektuális elmaradást mutatnak ők ketten, mint a másik három molekuláris altípusba tartozó idic (15) beteg. A vizsgálatban résztvevő betegek epilepsziára vonatkozó adatait a **7. táblázat** foglalja össze.



7. táblázat: Az idic (15) szindrómás betegek epilepsziával kapcsolatos adatai

Beteg	Epilepszia				Jelen státusz
	Első roham	Roham típus	AE	Szindróma	
1.	-	-	-	-	rohammentes
2.	8 hó	IS	VGB	WS	rohammentes kétéves kora óta
3.	6 hó	IS, GTC, atóniás, fokális	FLB RFN	WS LGS	napi rohamok
4.	5 év	GTC, myoclonusos, atóniás	LVT LTG	LGS	havonta 1-1 roham
5.	8 y	atóniás, myoclonusos absence	TPM VPA	LGS	napi rohamok

**Rövidítések:** GTC: generalizált tónusos-clonusos; AE: antiepileptikum; WS: West szindróma; IS: infantilis spasmus; LGS: Lennox-Gastaut szindróma; VGB: vigabatrin; FLB: felbamát; RFN: rufinamid; LVT: levetiracetám; LTG: lamotrigin; TPM: topiramát; VPA: valproát;

Matricardi S. és munkatársai egyértelmű összefüggést találtak idic (15) szindrómás betegekben az első roham időpontja és a prognózis között, vizsgálatuk alapján a korai rohamkezdés lényegesen rosszabb kimenetellel jár (Matricardi S, 2018). Annak alátámasztására, hogy a C típusú molekuláris mechanizmus, az aszimmetrikus marker struktúra és a súlyosabb fenotípus között összefüggés van, több hasonló molekuláris mechanizmusú idic (15) szindrómás beteg vizsgálatára lenne szükség.

Az epilepszia kezelése jelenti a legnagyobb kihívást ebben a betegcsoportban, hiszen gyakran terápia-rezisztensnek bizonyul. A betegeink rohamtípusai, az első roham jelentkezésének időpontja, az elektroklínikai epilepszia szindrómájuk és a terápiás válaszuk az antiepileptikus kezelésre, nem különbözik az irodalmi adatoktól (7. táblázat). Nyolcvanhárom idic (15) szindrómás beteg közül Conant K. D. és munkatársai 64 %-ban találtak epilepsziát, a

betegek 81%-ában többféle rohamtípus fordult elő, 42%-uknak az első rohama IS volt (Conant KD, 2014). A betegeinkhez hasonlóan, az alábbi rohamtípusok fordultak még elő: GTC, atóniás, myoclonusos, atípusos absence és fokális rohamok. A WS-val induló betegek nagy részében később LGS alakult ki. Egy másik tanulmány adatai alapján az idic (15) szindrómás betegek 80%-ában (28/35) jelentkezett epilepszia, az első roham jelentkezésekor a betegek életkora 2 hónap és 9 év 3 hónap közé esett. A betegek 1/3-ában jól kontrollálhatóak voltak a rohamok, míg másik 1/3 részük kombinált antiepileptikus kezelés ellenére sem lett rohammentes. A betegek több, mint 1/4 részében (10/35) az első roham csecsemőkorban jelentkezett, egy betegben tónusos rohamok, a másik kilenc betegben IS-ok képében. A WS-val diagnosztizált betegek fele jól reagált orális szteroid kezelésre, a másik részükben viszont később LGS alakult ki. További hét betegben az első roham fokális vagy generalizált tónusos roham volt. Az a nyolc idic (15) szindrómás beteg, akinek az első epilepsziás rohama atípusos absence volt, később terápia-rezisztens LGS klinikai képét mutatta. A betegek EEG eltérései változatos megjelenésűek, a betegségre karakterisztikus eltérés nem került leírásra. A leghatékonyabb antiepileptikumnak a valproát, a lamotrigin és a rufinamid bizonyult a vizsgálatban (Battaglia A, 2016).

Az idic (15) szindrómában szenvedő betegek epilepszia fenotípusa igen változatos annak ellenére, hogy háttérben oki tényezőként ugyanaz, egy számfeletti marker kromoszóma áll. Számos teória látott már napvilágot az SMC géntartalmának és az epilepsziának az összefüggésében. Ezek közül néhány az érintett gének extra kópiaszámát, mások a megváltozott génexpresszióhoz vezető különböző mechanizmusokat, mint az imprinting, teszik felelőssé a rohamok jelentkezéséért. A *CHRNA7*- gén lehetséges szerepe autizmus és epilepszia kialakulásában ismételt felmerült az irodalomban, de a klinikai szignifikanciája a mai napig kétséges. Különböző méretű, a *CHRNA7*- gént – mely a nikotinérzékeny acetilcholin-receptor alfa 7-es alegységét kódolja - tartalmazó microduplicatiós esetet vizsgálva, felmerül a szerepe, mint hajlamosító tényező különböző idegrendszeri betegségekben (Szafranski P, 2010). Az általunk vizsgált betegek idic (15) kromoszómája tartalmazta a *CHRNA7*-gént, kivéve az 1-es beteget, akinél sem epilepszia, sem autizmusra utaló tünet eddig nem jelentkezett. Az 1-es beteg idic (15) kromoszómája az array CGH vizsgálat eredmény alapján nem tartalmazza a *CHRNA7*-gént.

A betegség klinikai heterogenitására azonban úgy tűnik, a töréspontok különbözősége és a genomialis tartalom nem nyújt kielégítő magyarázatot. Korábbi vizsgálatok alapján felmerült a lehetősége, hogy a segmentalis aneuploidia által érintett 15q11.2-q13 régiót tartalmazó allélek a homológok párosodása során egyensúlyzavart okozhatnak. (Wang NJ, 2008, Hogart

A, 2007, Hogart A, 2009). Ez a teória újabb mechanizmus felismeréséhez vezethet, ami a kóros fenotípus kialakulásának hátterében áll, mivel ez a komplex régió számos imprintált és biállélikusan expresszált gént tartalmaz. A három GABA<sub>A</sub> receptor alegység gén (*GABRB3*, *GABRA5* és *GABRG3*, melyek a receptor  $\beta 3$ ,  $\alpha 5$ , és  $\gamma 3$  alegységeit kódolják) különös jelentőséggel bír epilepsziával és autizmussal járó idegfejlődési zavarok kialakulásában, mivel a GABA az agy fő inhibitoros neurotransmittere (Pizzarelli R, 2011). Hogart és mtsai feltételezték, hogy az apai és anyai eredetű homológok 15q11-q13 régiói közötti *trans* interakciónak fontos szerepe van a GABA<sub>A</sub> receptor gének optimális biállélikus expressziójában (Hogart A, 2007). A *GABRB3* fehérje hiánya vagy csökkent szintje egérmodellben epilepsziás rohamokkal, alvászavarral, sztereotip mozgászavarral jár (DeLorey TM, 1998). Hogart és mtsai kimutatták, hogy a biparentális kromoszómális hozzájárulás zavarának negatív hatása van a *GABRB3* expresszióra (Hogart A, 2007). Ezeket az adatokat figyelembe véve elképzelhető, hogy az epilepsziát és autisztikus tüneteket mutató 4 betegünk fenotípusa az aszimmetrikus marker struktúrával magyarázható. A tünetek kialakulásához vezető pathomechanizmusok között figyelembe kell tehát vennünk azt, hogy a marker egy részének alacsonyabb kópiaszáma megzavarhatja a két szülőtől származó homológok *trans* interakcióját.

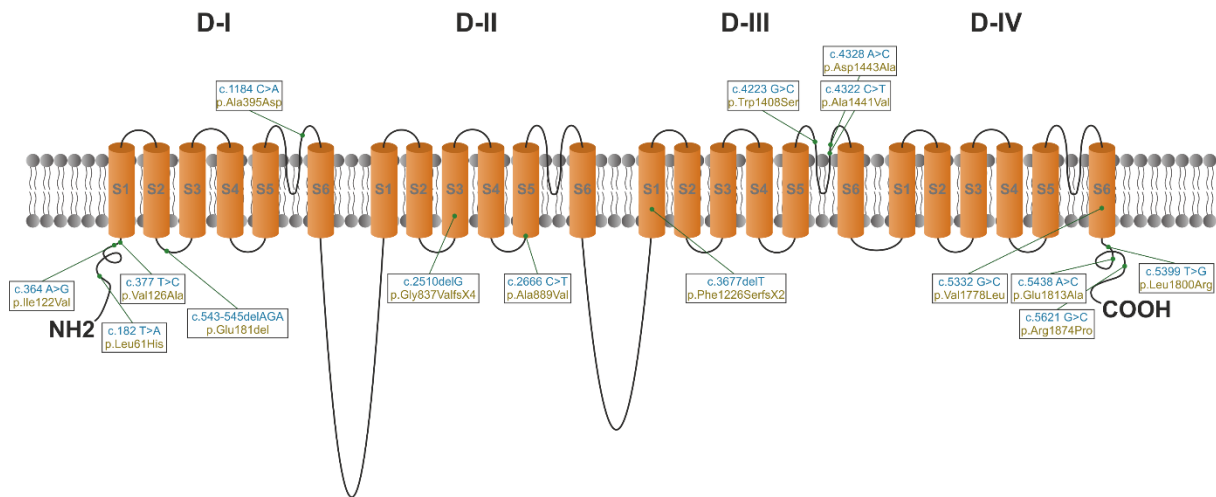
## **7.2. A Dravet szindróma és a GEFS+ szindróma fenotipikus és genotipikus heterogenitása**

Miután Claes L. és munkatársai 2001-ben kimutatták az *SCN1A*-gén *de novo* mutációit hét DS-s betegben, az *SCN1A*-gén a legtöbbet vizsgált epilepszia génné, a DS pedig az EE prototípusává vált (Claes L, 2001, Dravet C, 2011, Dravet C, 2012). A 63 láz provokálta rohamokat mutató, klinikailag DS-s vagy GEFS+ szindrómás beteg közül 33 betegben igazoltuk az *SCN1A*-gén mutációját (52,4%), valamint öt tünetmentes/tünetszegény hozzátartozóban. A betegek közül 27 fenotípusa DS-nak, hat betegé és egy DS-s fiúgyermek édesanyjái pedig GEFS+ szindrómának felelt meg.

Tizenkét ismert mutációt mutattunk ki 18 betegben és 15 új eltérést írtunk le 17 betegben. A legtöbb általunk azonosított mutáció missense mutációnak bizonyult, mely feltehetően megváltoztatja, de nem szünteti meg az ioncsatorna működését (Escayg A, 2010). Az általunk detektált mutációk közül két ismert, recurrensnek mutatkozó eltérés volt, melyet a kohortunkban egynél több betegben azonosítottunk (p.Thr1174Ser és p.Arg1245\*). A mi adatainkhoz hasonlóan, a több, mint 1200 ismert *SCN1A*-mutáció közül más szerzők is csak kb. 18%-ot találtak recurrensnek (Meng H, 2015). Az irodalomból ismert a p.Thr117Ser mutációnak a különböző *SCN1A*-asszociált fenotípusokkal való összefüggése. Egy három

generációs családot vizsgálva, a fenti mutációt hordozó családtagok közül hárman egyszerű lázgörcs és/vagy fokális occipitalis epilepszia fenotípusát mutatták, míg két másik családtag típusos familiaris hemiplegiás migrénben szenvedett (Cestéle S, 2013). A 30 pontmutációs eset mellett MLPA-módszerrel három nagy géndeletiós esetet is diagnosztizáltunk. Az MLPA módszerrel igazolt esetek aránya a vizsgálatunkban 9,09% volt, ami hasonló Marini C. és munkatársai adataihoz (Marini C, 2009, Marini C, 2011). Irodalmi adatok alapján az MLPA-módszerrel kimutatható deletiók és duplicatiók aránya kb. 10-12% a szekvenálással *SCN1A*-negatív betegek körében; ezért a módszer a szűrés második lépcsőjeként ajánlható (Bene J, 2009). A nagy géndeletios DS fenotípusú betegeink fenotípusa nem különbözik jelentősen a pontmutációs betegekéttől: lázas és/vagy láztalan rohamok, értelmi akadályozottság jellemzi őket. Az egyik esetben azonban a nagy, heterozygota deletio ellenére a fenotípus enyhébbnek mutatkozik. A feszültségfüggő Na-csatorna alegységeinek génjei egymás mellett helyezkednek el a 2-es kromoszóma hosszú karján. Irodalmi adat, hogy ha az *SCN1A*-gén deletio *SCN2A* és *SCN3A* gének deletiójával társul, a fenotípus s DS-nál súlyosabb, korai kezdet és progresszív microcephalia a jellemző. Ha viszont, az *SCN1A*-gén deletiójához az *SCN9A*-gén deletiója társul, enyhébb fenotípus várható (Gataullina S, 2017). A szomszédos gének érintettségének vagy annak hiányának tehát hatása van a fenotípus kialakulására.

Hasonlóan más szerzőkhöz, nem találtunk szoros genotípus-fenotípus összefüggést a vizsgált betegekben. Ahogy a **17. ábrán** látható, az újonnan leírt mutációk eloszlása egyenletes a fehérjelánc mentén.



17. ábra: Az újonnan leírt mutációk elhelyezkedése az SCN1A fehérjén

A fenotípus kialakításában nemcsak az SCN1A fehérjének lehet szerepe, hanem számos más fehérjének is, amelyek tehát modifikáló hatással vannak a betegségre (Brunklaus A, 2014).

Az elmúlt évtizedben DS állatmodellekkel szerzett ismereteink a betegség neurobiológiájának pontosabb megismeréséhez vezettek (Ogiwara I, 2007, Yu FH, 2006). A DS ioncsatorna-betegség, amely az egész agy területén kimutatható feszültségfüggő nátriumcsatorna dysfunkcióval jár, és így encephalopathia kialakulásához vezet. Ez a sérülékeny rendszer fogékony további károsító behatásokra, mint a status epilepticus.

A DS korai klinikai diagnózisa esetenként nehéz lehet, mert a jellegzetes tünetcsoport csak a követés során bontakozik ki. Ha egy csecsemőnek elhúzódó lázas rohama volt, és SCN1A-mutáció igazolódik a háttérben, azt mondhatjuk, hogy SCN1A-gén-asszociált betegsége van. Következetes genotípus-fenotípus összefüggések hiányában a betegség elején megjósolhatatlan, hogy GEFS+ szindróma vagy DS fenotípus alakul-e ki.

A prognózis vonatkozásában Cetica V. és munkatársai a közelmúltban közölt tanulmányukban azt találták, hogy SCN1A-mutáció esetén az első roham jelentkezésének időpontja szorosabb predikációs tényező a mutáció típusánál. A korai felismerés és az ismétlődő, elhúzódó rohamok kezelése, prevenciója az első életévben az EE irányába történő progressziót korlátozhatja (Cetica V, 2017, Brunklaus A, 2012).

### 7.3. A teljesexom-szekvenálás szerepe a genetikus generalizált epilepszia diagnózisában

Az SLC12A5-gén terméke egy a központi idegrendszerben expresszálandó kálium-klorid kotransporter (KCC2) fehérje, a kation-klorid kotransporter géncsalád tagja. A KCC2 normál működése alacsony intracelluláris Cl<sup>-</sup> koncentrációt eredményez az érett neuronokban, ami

elengedhetetlen a megfelelő synapticus gátlás kialakulásához (Hübner CA, 2001). Régóta feltételezik, hogy az *SLC12A5*-gén defektusa, így a KCC2 fehérje expressziójában és működésében bekövetkező változások felelősek az amúgy precízen szabályozott, gyors postsynapticus GABAerg gátlás elégtelenségéért és a csökkent hyperpolarizációért, melyet különböző neurológiai és pszichiátriai betegségek (pl. schizophrenia) kialakulásával hoztak összefüggésbe (Tao R, 2012). A szakirodalomban azonban eddig csak kevés esetben számoltak be az *SLC12A5*-gén mutációi következtében létrejövő monogénes betegségekről.

Az utóbbi években az *SLC12A5*-génben azonosított variánsokat két igen eltérő fenotípussal járó epilepszia szindróma kialakulásával hozták összefüggésbe: mindkét allél mutációja esetén egy súlyos lefolyású korai infantilis EE, az EIMFS, míg az egyik allél mutációja esetén egy jóval enyhébb lefolyású GGE kialakulása várható. Kahle K. T. és munkatársai GGE-s betegeket vizsgálva két különböző heterozygota, aminosavcserevel járó variánst azonosítottak az *SLC12A5*-génben kanadai francia populációban. *In vitro* funkcionális vizsgálatokkal kimutatták a klorid kiáramlási kapacitás csökkenését a mutációt hordozó sejteken. A variánsok előfordulását tünetmentes szülőkből az inkomplett penetranciával magyarázták (Kahle KT, 2014).

Stöberg és munkatársai WES vizsgálattal két különböző család négy érintettjében compound heterozygota, illetve homozygota mutációt mutattak ki az *SLC12A5*-génben klinikailag EIMFS-ben szenvedő betegekből (Stöberg T, 2015). A szerzők munkájukban *in vitro* funkcionális vizsgálatokkal kimutatták, hogy a mutációk csökkentik a gén expresszióját, kórossá válik a posttranslatív modifikáció, és a transport funkció csökkenése a normális synapticus gátlás csökkenéséhez, azaz az idegsejtek fokozott excitabilitásához vezet. Később Saitsu és munkatársai négy EIMFS fenotípusú betegben három különböző *SLC12A5*-gént érintő compound heterozygota mutációt, majd Saito és munkatársai további egy compound heterozygota mutációt közöltek (Saitsu H, 2016, Saito T, 2017). Az irodalomban eddig közölt *SLC12A5*-gén mutációkat a **8. táblázat** összesíti.

**8. táblázat: Az irodalomban eddig közölt SLC12A5 mutációk típusai és a betegek fenotípusa**

Gén	Nukleotid szintű eltérés	Protein szintű eltérés	Öröklődés	Fenotípus	Referencia
<i>SLC12A5</i>	c.1417G>A	p.Val473Ile	AD	IGE-14	jelen vizsgálat
	c.2855G>A	p.Arg952His	AD	IGE-14	Kahle, 2014
	c.3145C>T	p.Arg1049Cys	AD		
	c.1277T>C c.1652G>A	p.Leu426Pro p.Gly551Asp	AR, compound heterozygota	EIMFS	Stöbberg, 2015
	c.932T>A	p.Leu311His	AR, homozygota		
	c.279+1G>C c.572C>T	p.Glu50_Gln93del p.Ala191Val	AR, compound heterozygota		
	c.967T>C c.1243A>G	p.Ser323Pro p.Met415Val	AR, compound heterozygota	EIMFS	Saitsu, 2016
	c.953G>C c.2242_2244del	p.Trp318Ser p.Ser748del	AR, compound heterozygota		
	c.1196C>T c.2639G>T	p.Ser399Leu p.Arg880Leu	AR, compound heterozygota	EIMFS	Saito, 2017

**Rövidítések:** IGE-14: idiopathiás generalizált epilepszia 14-es típus; EIMFS: (epilepsy of infancy with migrating focal seizures), korai migráló fokális epilepszia; AD: autosomalis domináns; AR: autosomalis recesszív;

Betegünk tünetmentes édesapjánál is kimutatható mutációt, Kahle K. T. és munkatársai megfigyeléséhez hasonlóan az inkomplett penetranciával, a GGE komplex öröklődésmentével magyarázzuk.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az új-generációs molekuláris genetikai módszerek (NGS, array CGH) forradalmasították az epilepszia genetikát, de nem váltották fel a hagyományos cytogenetikai (karyotypizálás, FISH) és molekuláris genetikai (Sanger-féle szekvenálás, MLPA) módszereket, hanem kiegészítették azokat. A hagyományos és új módszerek korlátainak nagy része egymás melletti alkalmazásuk esetén kiküszöbölhető (pl. gyűrűkromoszómák detektálása). Az új-generációs módszerek az új eltérések detektálásán túl, nagy felbontóképességük révén alkalmasak a hagyományos technológiák eredményeinek megerősítésére, illetve pontosítására. És fordítva, az NGS-sel azonosított variánsok validálása hagyományos bidirectionalis (Sanger) szekvenálással minden esetben megtörténik. Az új eltérések betegségkókozó szerepének tisztázása nagy körültekintést igényel, kihívások elé állítja mind a laboratóriumban, mind a klinikumban dolgozó genetikusokat.

Kutatásomban a különböző, hagyományos és új-generációs genetikai módszerek az epilepszia betegség molekuláris diagnosztikájában betöltött szerepével és hatékonyságával foglalkoztam. Vizsgálataimat két súlyos, gyakran terápia-rezisztens rohamokkal járó EE-ban szenvedő betegcsoportban, a WS – LGS-val csaknem minden esetben érintett idic (15) szindrómás betegek és a GEFS+ - DS spektrumbetegséggel érintett betegek körében végeztem. Kutatásom harmadik részében az előzőektől eltérően, egy nem ritka betegségnek számító, az epilepsziával élő betegek jelentős részét érintő betegcsoport, a GGE-k genetikai hátterének vizsgálata felé fordult a figyelmem.

Eredményeinket az alábbiakban témánként foglalom össze.

1. Vizsgálatunk eredményeit összegezve, az idic (15) szindróma lehetősége fel kell, hogy merüljön strukturális agyi elváltozást nem mutató, nehezen kezelhető epilepszia szindrómák esetén, mint a WS és LGS. Korai centralis izomhypotonia esetén is szükséges a genetikai kivizsgálás dysmorphiás tünetek hiányában is. A FISH vizsgálattal kiegészített rutin karyotypizálás diagnosztikus értékű a betegségben. Az array CGH vizsgálat következő diagnosztikus lépcsőként alkalmas a korábban felállított diagnózis megerősítésére, és az SMC genomialis tartalmának pontos meghatározására. Ez lehetőséget teremthet ebben a klinikailag heterogén betegségben bizonyos genotípus–fenotípus összefüggések feltárására, ezáltal pontosabb betekintést nyerhetünk az EE-k kialakulásában szerepet játszó molekuláris mechanizmusokba, amelyek ismerete a jövőben terápiás konzekvenciával is járhat. Az SMC géntartalmának pontos ismerete a beteg gondozására is hatással lehet, és prognosztikai értékkel is bír. A genomialis struktúra különbözősége mellett a szülői eredet és a mozaicizmus mértéke

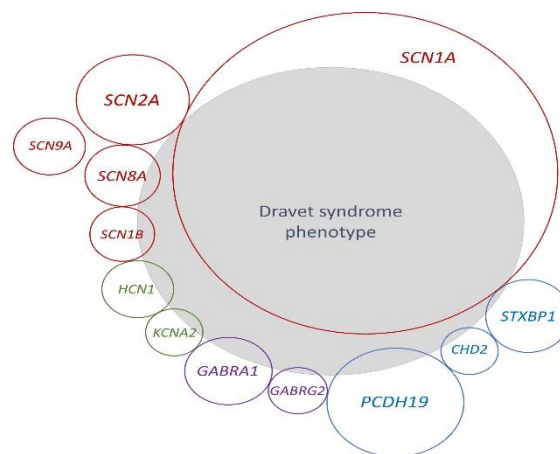


is hatással lehet a fenotípusra (Wang Q, 2015). A mi betegeink esetében a mozaikosság nem merült fel. A szülői eredetet nem vizsgáltuk, methylatio-specifikus MLPA vizsgálat elvégzésével tervezzük kiegészíteni a kutatást, mellyel a szülői eredet tisztázható lenne. Az irodalomban eddig közölt idic (15) esetek csaknem mindegyike *de novo* létrejött, anyai eredetű számfeletti marker kromoszóma, mely a PWS/AS kritikus régiót tartalmazza (Crolla JA, 1995, Webb T, 1998). Korábban úgy tűnt, hogy csak a régió anyai eredetű duplicációja vezet kóros fenotípus kialakulásához, bár néhány enyhe fenotípust mutató apai eredetű esetet is publikáltak (Eggermann K, 2002, Al Ageeli E, 2014).

2. Munkánk az első genetikai tanulmány, mely a magyar populációban láz-provokálta rohamokat mutató GEFS+ vagy DS fenotípusú betegek körében vizsgálta az *SCN1A*-gént Sanger-féle szekvenálással és MLPA-módszerrel. Az *SCN1A*-gén célzott szekvenálása során 15 új, eddig nem közölt pontmutációt találtunk betegeinkben a 12 ismert pontmutáció mellett. Bár szoros genotípus-fenotípus összefüggést nem sikerült feltárnunk, a betegségspektrum néhány fontos aspektusára vizsgálatunk eredményei is rávilágítottak. Néhány eset örökletesnek bizonyult, a családi halmozódást mutató esetekben a családtagok fenotípusos heterogenitása a komplex öröklődés menettel, más gének betegségmódosító hatásával lehet összefüggésben. A későbbiekben tervezzük kutatásunk ilyen irányú kiterjesztését. Három DS-ás betegnél nagy géndeletio igazolódott MLPA-módszerrel, ami aláhúzza a vizsgálat elvégzésének szükségességét a szekvenálás során negatívnak mutató esetekben. Más szerzőkhöz hasonlóan mi is azt találtuk, hogy előfordulhat GEFS+ fenotípus *de novo* mutációként, majd az utódra átörökítve DS klinikai képe fejlődik ki, ezért úgy gondoljuk, hogy indokolt a genetikai vizsgálat elvégzése mindkét fenotípust mutató betegben és családjában. A fenotipikus heterogenitás másik magyarázata lehet a postzygoticus mutáció okozta mozaikosság, aminek szerepét több szerző is hangsúlyozza (de Lange IM, 2018), ennek vizsgálata értékes adatokkal egészítené ki kutatásunkat, és a jövőben tervezzük ennek vizsgálatát. Más szerzők és a saját tapasztalatunk alapján is úgy gondoljuk, hogy a GEFS+ és a DS fenotípusok elkülönítése nem mindig lehetséges teljes biztonsággal, főleg a betegség kezdetén, ezért helyesebb az *SCN1A*-asszociált epilepszia kifejezés használata. A kutatás folytatásaként célunk az igazolt *SCN1A*-mutációt hordozó betegek követése, a fenotípusuk pontosítása és a betegség természetes lefolyásának minél alaposabb megismerése a lehető legtöbb esetben elvégzett szegregációs vizsgálat mellett.

Vizsgálatunk során a 63 klinikailag GEFS+ vagy DS beteg 52,4%-ban tudtuk a betegséget genetikailag alátámasztani, ez elmarad az irodalmi adatok alapján várható aránytól.

Ennek egyik magyarázata lehet, hogy a konvencionális szekvenálással néhány mutáció rejtve maradhat, ahogy ezt Djemie T. és munkatársai igazolták vizsgálatukban (Djemie T, 2016). Az *SCN1A*-negatív betegek mintájának NGS panel/WES-sel történő vizsgálata tovább pontosíthatná eredményeinket, nemcsak további *SCN1A*-gén-mutációkra derülhetne fény, hanem a DS háttérben álló más gének mutációjára is, pontosabban a DS-ra nagyon hasonló epilepsziák genetikai háttérét azonosíthatnánk. A **18. ábra** érzékelteti a DS fenotípus genetikai heterogenitását (Steel, D, 2017). Minden limitációja ellenére a célzott *SCN1A*-gén vizsgálatnak (Sanger-féle szekvenálás és MLPA) kiemelt szerepe van olyan klinikailag jól definiált betegségcsoport esetén, mint a GEFS+ - DS spektrum, hiszen a genetikai diagnózisnak itt terápiás következménye van.



**18. ábra: A DS fenotípussal asszociált gének**

Piros szín jelöli a Na-csatornákat, zöld a K-csatornákat, lila a Cl-csatornákat. A nem ioncsatornát kódoló gének kék színnel vannak feltüntetve (Az ábra forrása: Steel D, 2014; *Epilepsia* 58 (11): 1807-1816.).

**3.** Bemutatott esetünk jól példázza azt, hogy a GGE betegségcsoport komplex öröklődésű kórkép. Külföldi genetikai laboratórium a betegben talált eltérést ugyan VUS-ként értékelte, és a szegregációs vizsgálat során a tünetmentes édesapában is kimutattuk, de ez nem zárja ki a variáns betegségokozó szerepét, hiszen más gének betegségmódosító hatásával is számolnunk kell. A „gold standard” egy eltérés pathogenként való értékelésében az *in vitro* funkcionális vizsgálattal igazolt fehérjefunkció-változás (ebben az esetben a klorid kiáramlási kapacitás csökkenése), ennek vizsgálatára azonban nem volt lehetőségünk. Az irodalmi adatok (az *SLC12A5*-gén mutációnak funkcionális vizsgálatokkal igazolt szerepe EIMFS-ben és IGE-ben) és a fenotípusos egyezés miatt úgy gondoljuk, hogy az eltérés, ha nem is okozza, de hozzájárul a beteg GGE betegségéhez. A genetikai tanácsadás kiemelt jelentőségű ebben az

esetben betegünk majdani gyermekvállalása szempontjából, annak tudatában, hogy a gén homozygota és compound heterozygota eltérései egy nagyon súlyos, korai kezdetű EE-val asszociáltak. Az új-generációs szekvenálási technikáknak, azon belül is a WES vizsgálatnak létjogosultsága van az epilepsziás betegek (EE, GGE) diagnosztikus algoritmusában (Dunn P, 2018).

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

Al Ageeli E, Drunat S, Delanoe C. et al. Duplication of the 15q11-q13 region: clinical and genetic study of 30 new cases. *Eur J Med Genet.* 2014; 57: 5-14.

Allen AS, Berkovic SF, Cossette P. et al., the Epi4K Consortium, and the Epilepsy Phenome/Genome Project. De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature* 2013; 501: 217-221.

Alter AS, Engelstad K, Hinton VJ. et al. Long-term clinical course of Glut1 deficiency syndrome. *J Child Neurol.* 2015; 30 (2): 160-169.

Annegers JF, Hauser WA, Anderson VE. et al. The risks of seizure disorders among relatives of patients with childhood onset epilepsy. *Neurology* 1982; 32 (2): 174-179.

Bailey JN, Patterson C, de Nijs L. et al. EFHC1 variants in juvenile myoclonic epilepsy: reanalysis according to NHGRI and ACMG guidelines for assigning disease causality. *Genet Med.* 2017; 19 (2): 144-156.

Barcia G, Fleming MR, Deligniere A. et al. De novo gain of function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy. *Nat Genet.* 2012; 44 (11): 1255-1259.

Battaglia A. The inv dup (15) or idic (15) syndrome (Tetrasomy 15q). *Orphanet J of Rare Dis.* 2008; 3: 30.

Battaglia A, Bernardini L, Torrente I. et al. Spectrum of epilepsy and electroencephalogram patterns in idic (15) syndrome. *Am J Med Genet.* 2016; Part A 170A: 2531-2539.

Bene J, Hadzsiev K, Komlosi K. et al. [De novo SCN1A gene deletion in therapy-resistant Dravet syndrome]. *Orv Hetil.* 2015; 156 (49): 2009-2012.

Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 2010; 51 (4): 676-685.

Berkovic SF. Genetics of epilepsy in clinical practice. *Epilepsy Currents* 2015; 15 (4): 192-196.

Berkovic SF, Howell RA, Hay DA. et al. Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes. *Ann Neurol.* 1998; 43 (4): 435-445.

Brunklaus A, Ellis R, Reavey E. et al. Prognostic, clinical and demographic features in SCN1A mutation-positive Dravet syndrome. *Brain* 2012; 135 (8): 2329-2336.

Brunklaus A et Zuberi SM. Dravet syndrome--from epileptic encephalopathy to channelopathy. *Epilepsia* 2014; 55 (7): 979-984.

Bruun TUJ, DesRoches CL, Wilson D. et al. Prospective cohort study for identification of underlying genetic causes in neonatal encephalopathy using whole-exome sequencing. *Genet Med.* 2018; 20 (5): 486-494.

Burgess R, Wang S, McTague A. et al. The genetic landscape of epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Ann Neurol.* 2019; 86: 821-831.

Carvill GL, Heavin SB, Yendle SC. et al. Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1. *Nat Genet.* 2013; 45: 825-830.

Cestele S, Labate A, Rusconi R. et al. Divergent effects of the T1174S SCN1A mutation associated with seizures and hemiplegic migraine. *Epilepsia* 2013; 54 (5): 927-935.

Cetica V, Chiari S, Mei D. et al. Clinical and genetic factors predicting Dravet syndrome in infants with SCN1A mutations. *Neurology* 2017; 88 (11): 1037-1044.

Charlier C, Singh NA, Ryan SG. et al. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat Genet.* 1998; 18 (1): 53-55.

Claes L, Del-Favero J, Ceulemans B. et al. De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy. *Am J Hum Genet.* 2001; 68: 1327-1332.

Conant KD, Finucane B, Cleary N. et al. A survey of seizures and current treatments in 15q duplication syndrome. *Epilepsia* 2014; 55(3): 396-402.

Crolla JA, Harvey JF, Sitch FL. et al. Supernumerary marker 15 chromosomes: a clinical, molecular and FISH approach to diagnosis and prognosis. *Hum Genet.* 1995; 95: 161-170.

de Kovel CGF, Trucks H, Helbig I. et al. Recurrent microdeletions at 15q11.2 and 16p13.11 predispose to idiopathic generalized epilepsies. *Brain* 2010; 133 (1): 23-32.

de Lange IM, Koudijs MJ, van 't Slot R. et al. Mosaicism of de novo pathogenic SCN1A variants in epilepsy is a frequent phenomenon that correlates with variable phenotypes. *Epilepsia* 2018; 59 (3): 690-703.

De Lorey TM, Handforth A, Anagnostaras SG. et al. Mice lacking the beta3 subunit of the GABA<sub>A</sub> receptor have epilepsy phenotype and many of the behavioral characteristics of Angelman syndrome. *J Neurosci.* 1998; 18: 8505-8514.

Depienne C, Arzimanoglou A, Trouillard O. et al. Parental mosaicism can cause recurrent transmission of SCN1A mutations associated with severe myoclonic epilepsy of infancy. *Hum Mutat.* 2006; 27 (4): 389.

Depienne C, Trouillard O, Gourfinkel-An I. et al. Mechanisms for variable expressivity of inherited SCN1A mutations causing Dravet syndrome. *J Med Genet.* 2010; 47: 404-410.

Djemie T, Weckhuysen S, von Spiczak S. et al. Pitfalls in genetic testing: the story of missed SCN1A mutations. *Mol Genet Genomic Med.* 2016; 4 (4): 457-464.

Dravet C. How Dravet syndrome became a model for studying childhood genetic epilepsies. *Brain* 2012; 135 (8): 2309-2311.

Dravet C, Bureau M, Dalla Bernardina B. et al. Severe myoclonic epilepsy in infancy (Dravet syndrome) 30 years later. *Epilepsia* 2011; 52 Suppl 2: 1-2.

Dravet C, Bureau M, Oguni H. et al. Severe myoclonic epilepsy in infancy: Dravet syndrome. *Adv Neurol.* 2005; 95: 71-102.

Dunn P, Albury CL, Maksemous N. et al. Next generation sequencing methods for diagnosis of epilepsy syndromes. *Front Genet.* 2018; 9: 20.

Eggermann K, Mau UA, Bujdosó G. et al. Supernumerary marker chromosomes derived from chromosome 15: analysis of 32 new cases. *Clin Genet.* 2002; 62: 89-93.

Ellis CA, Petrovski S és Berkovic SF. Epilepsy genetics: clinical impacts and biological insights. *Lancet Neurol.* 2020; 19 (1): 93-100.

Escayg A et Goldin AL. Sodium channel SCN1A and epilepsy: mutations and mechanisms. *Epilepsia* 2010; 51 (9): 1650-1658.

Escayg A, MacDonald BT, Meisler MH. et al. Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat Genet.* 2000; 24 (4): 343-345.

Ezughá H, Anderson CE, Marks HG. et al. Microarray analysis in children with developmental disorder or epilepsy. *Pediatr Neurol.* 2010; 43: 391-394.

Fischer RS, Acevedo C, Arzimanoglou A. et al. A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014; 55 (4): 475-482.

Fischer RS, Cross HJ, D'Souza C. et al. Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia* 2017; 58 (4): 531-542.

Gataullina S et Dulac O. From genotype to phenotype in Dravet disease. *Seizure Eur J Epilep.* 2017; 44: 58-64.

Goldberg-Stern H, Aharoni S, Afawi Z. et al. Broad phenotypic heterogeneity due to a novel SCN1A mutation in a family with genetic epilepsy with febrile seizures plus. *J child Neurol.* 2014; 29 (2): 221-226.

Goldin AL. Evolution of voltage-gated Na(+) channels. *J Exp Biol.* 2002; 205 (5): 575-584.

Guerrini R et Oguni H. Borderline Dravet syndrome: a useful diagnostic category? *Epilepsia* 2011; 52 Suppl 2: 10-12.

Harkin LA, Bowser DN, Dibbens LM. et al. Truncation of the GABA(A)-receptor gamma2 subunit in a family with generalized epilepsy with febrile seizure plus. *Am J Hum Genet.* 2002; 70 (2): 530-536.

Helbig I, Mefford HC, Sharp AJ. et al. 15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Nat Genet.* 2009; 41 (2): 160-162.

He N, Kin ZJ, Wang J. et al. Evaluating the pathogenic potential of genes with de novo variants in epileptic encephalopathies. *Genet Med.* 2019; 21: 17-27.

Heron SE, Crossland KM, Andermann E. et al. Sodium-channel defects in benign familial neonatal-infantile seizures. *Lancet* 2002; 360 (9336): 851-852.

Heron SE, Khosravani H, Varela D. et al. Extended spectrum of idiopathic generalized epilepsies associated with CACNA1H functional variants. *Ann Neurol.* 2007; 62 (6): 560-568.

Hirose S, Scheffer IE, Marini C et al. SCN1A testing for epilepsy: application in clinical practice. *Epilepsia* 2013; 54 (5): 946-952.

Hogart A, Leung KN, Wang NJ. et al. Chromosome 15q11-13 duplication syndrome brain reveals epigenetic alterations in gene expression not predicted from copy number. *J Med Genet.* 2009; 46: 86-93.

Hogart A, Nagarajan RP, Patzel KA. et al. 15q11-13 GABA<sub>A</sub> receptor genes are normally biallelically expressed in brain yet are subject to epigenetic dysregulation in autism-spectrum disorders. *Hum Mol Genet.* 2007; 16 (6): 691-703.

Hollódy K. (ed) *Gyermekneurológia 2019*; Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest

Hübner CA, Stein V, Hermans-Borgmeyer I. et al. Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron* 2001; 30: 515-524.

Inoue Y, Ohtsuka Y, et Group STPS. Long-term safety and efficacy of stiripentol for the treatment of Dravet syndrome: A multicenter, open-label study in Japan. *Epilepsy Res.* 2015; 113: 90-97.

Janszky J, Fogarasi A. (ed) *Klinikai epileptológia 2017*; Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest

Kahle KT, Merner ND, Friedel P. et al. Genetically encoded impairment of neuronal KCC2 cotransporter function in human idiopathic generalized epilepsy. *EMBO Rep.* 2014; 15: 766-774.

Kalume F, Yu FH, Westenbroek RE. et al. Reduced sodium current in Purkinje neurons from Nav1.1 mutant mice: implications for ataxia in severe myoclonic epilepsy in infancy. *J Neurosci.* 2007; 27 (41): 11065-11074.

Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV. et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016; 536 (7616): 285-291.

Lemke JR, Riesch E, Scheurenbrand T. et al. Targeted next generation sequencing as a diagnostic tool in epileptic disorders. *Epilepsia* 2012; 53 (8): 1387-1389.

Lesca G, Rudolf G, Bruneau N. et al. GRIN2A mutations in acquired epileptic aphasia and related childhood focal epilepsies and encephalopathies with speech and language dysfunction. *Nat Genet.* 2013; 45: 1061-1066.

Liehr T, Claussen U, Starke H. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenet Genome Res.* 2004; 107: 55-67.

Marini C, Mei D, Helen Cross J. et al. Mosaic SCN1A mutation in familial severe myoclonic epilepsy of infancy. *Epilepsia* 2006; 47 (10): 1737-40.



Marini C, Mei D, Temudo T. et al. Idiopathic epilepsies with seizures precipitated by fever and SCN1A abnormalities. *Epilepsia* 2007; 48 (9): 1678-1685.

Marini C, Scheffer IE, Nabbout R. et al. SCN1A duplications and deletions detected in Dravet syndrome: implications for molecular diagnosis. *Epilepsia* 2009; 50 (7): 1670-1678.

Marini C, Scheffer IE, Nabbout R. et al. The genetics of Dravet syndrome. *Epilepsia* 2011; 52 Suppl 2: 24-29.

MacArthur DG, Manolio TA, Dimmock DP. et al. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature* 2014; 508: 469-476.

Matricardi S, Darra F, Spalice A. et al. Electroclinical findings and long-term outcomes in epileptic patients with Inv Dup (15). *Acta Neurol Scand.* 2018; 137 (6): 575-581.

McTague A, Howell KB, Cross JH. et al. The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Lancet Neurol.* 2016; 15: 304-316.

Medina MT, Duron RM, Alonso ME. et al. Childhood absence epilepsy evolving to juvenile myoclonic epilepsy: electroclinical and genetic features. *Adv Neurol.* 2005; 95: 197-215.

Mefford HC, Yendle SC, Hsu C. et al. Rare copy number variants are an important cause of epileptic encephalopathies. *Ann Neurol.* 2011; 70: 974-985.

Meng H, Xu HQ, Yu L. et al. The SCN1A mutation database: updating information and analysis of the relationships among genotype, functional alteration, and phenotype. *Hum Mutat.* 2015; 36 (6): 573-580.

Mercimek-Mahmutoglu S, Pate J, Cordeiro D. et al. Diagnostic yield of genetic testing in epileptic encephalopathy in childhood. *Epilepsia* 2015; 56 (5): 707-716.

Miceli F, Soldovieri MV, Ambrosino P. et al. Genotype-phenotype correlations in neonatal epilepsies caused by mutations in the voltage sensor of K<sub>v</sub>7.2 potassium channel subunits. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2013; 110: 4386-4391.

Michaud JL, Lachance M, Hamdan FF. et al. The genetic landscape of infantile spasms. *Hum Mol Genet.* 2014; 23 (18): 4846-4858.

Myers KA, Burgess R, Afawi Z et al. De novo SCN1A pathogenic variants in the GEFS+ spectrum: Not always a familial syndrome. *Epilepsia* 2017; 58 (2): e26-e30.

Myers KA, Johnstone DL, Dymont DA. et al. Epilepsy genetics: Current knowledge, applications, and future directions. *Clin Genet.* 2019; 95: 95-111.

Ogiwara I, Miyamoto H, Morita N. et al. Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an *Scn1a* gene mutation. *J Neurosci.* 2007; 27 (22): 5903-5914.

Ohmori I, Kahlig KM, Rhodes TH. et al. Nonfunctional SCN1A is common in severe myoclonic epilepsy of infancy. *Epilepsia* 2006; 47 (10): 1636-1642.

Orsini A, Zara F, Striano P. Recent advances in epilepsy genetics. *Neurosci Lett.* 2018; 667: 4-9.

Ottmann R, Hirose S, Jain S. et al. Genetic testing in the epilepsies—report of the ILAE genetics commission. *Epilepsia* 2010; 51 (4): 655-670.

Paciorkowski AR, Thio LL, Dobyns WB. A genetic and biologic classification of infantile spasms. *Pediatr Neurol.* 2011; 45 (6): 355-367.

Pizzarelli R et Cherubini E.: Alterations of GABAergic signaling in autism spectrum disorders. *Neural Plast.* 2011; 2011: 297153.

Ream MA et Patel AD. Obtaining genetic testing in pediatric epilepsy. *Epilepsia* 2015; 56 (10): 1505-1514.

Richards S, Aziz N, Bale S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015; 17 (5): 405-424.

Roberts SE, Maggouta F, Thomas NS. et al. Molecular and fluorescence in situ hybridisation characterization of the breakpoints in 46 large supernumerary marker 15 chromosomes reveals an unexpected level of complexity. *Am J Hum Genet.* 2003; 73: 1061-1072.

Saito T, Ishii A, Sugai K. et al. A de novo missense mutation in *SLC12A5* found in a compound heterozygote patient with epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Clin Genet.* 2017; 92: 544-658.

Saitsu H, Kato M, Mizuguchi T, et al. De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet.* 2008; 40: 782-788.

Saitsu H, Watanabe M, Akita T. et al. Impaired neuronal KCC2 function by biallelic SLC12A5 mutations in migrating focal seizures and severe developmental delay. *Sci Rep.* 2016; 6: 30072.

Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G. et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 2017; 58 (4): 512-521.

Schutte SS, Schutte RJ, Barragan EV. et al. Model systems for studying cellular mechanisms of SCN1A-related epilepsy. *J Neurophysiol.* 2016; 115 (4): 1755-1766.

Shbarou R et Mikati MA. The expanding clinical spectrum of genetic pediatric epileptic encephalopathies. *Semin Pediatr Neurol.* 2016; 23: 134-142.

Siegler Z, Barsi P, Neuwirth M. et al. Hippocampal sclerosis in severe myoclonic epilepsy in infancy: a retrospective MRI study. *Epilepsia* 2005; 46 (5): 704-708.

Singh NA, Charlier C, Stauffer D. et al. A novel potassium channel gene, *KCNQ2*, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet.* 1998; 18 (1): 25-29.

Singh R, Andermann E, Whitehouse WP. et al. Severe myoclonic epilepsy of infancy: extended spectrum of GEFS+? *Epilepsia* 2001; 42 (7): 837-844.

Spencer SS Neural networks in human epilepsy: Evidence of and implications for treatment. *Epilepsia* 2002; 43 (3): 219-227.

Steel D, Symonds JD, Zuberi SM. et al. Dravet syndrome and its mimics: Beyond SCN1A. *Epilepsia* 2017; 58 (11): 1807-1816.

Steinlein OK, Mulley JC, Propping P. et al. A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Genet.* 1995; 11 (2): 201-203.

Stöberg T, McTague A, Riuz AJ. et al. Mutations in SLC12A5 in epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Nat Commun.* 2015; 6: 8038.

Sugawara T, Mazaki-Miyazaki E, Ito M. et al. Na<sub>v</sub>1.1 mutations cause febrile seizures associated with afebrile partial seizures. *Neurology* 2001; 57 (4): 703-705.

Suls A, Mullen SA, Weber YG. et al. Early-onset absence epilepsy caused by mutations in the glucose transporter GLUT1. *Ann Neurol.* 2009; 66 (3): 415-419.

Suzuki T, Delgado-Escueta AV, Aguan K. et al. Mutations in *EFHC1* cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet.* 2004; 36 (8): 842-849.

Szafranski P, Schaaf CP, Person RE. et al. Structures and molecular mechanisms for common 15q13.3 microduplications involving *CHRNA7*: benign or pathological? *Hum Mutat.* 2010; 31 (7): 840-850.

Szirmai I. (ed) *Neurológia egyetemi tankönyv 2011*; Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest

Tao R, Li C, Newburn EN. et al. Transcript- specific associations of *SLC12A5* (*KCC2*) in human prefrontal cortex with development, schizophrenia, and affective disorders. *J Neurosci.* 2012; 32: 5216-5222.

Vadlamudi L, Dibbens LM, Lawrence KM. et al. Timing of de novo mutagenesis-a twin study of sodium-channel mutations. *N Engl J Med.* 2010; 363: 1335-1340.

Veeramah KR, Johnstone L, Karafet TM. et al. Exome sequencing reveals new casual mutations in children with epileptic encephalopathies. *Epilepsia* 2013; 54: 1270-1281.

Wallace RH, Wang DW, Singh R. et al. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na<sup>+</sup>-channel beta1 subunit gene *SCN1B*. *Nat Genet.* 1998; 19 (4): 366-370.

Wang J, Gotway G, Pascual JM. et al. Diagnostic yield of clinical next-generation sequencing panels for epilepsy. *JAMA Neurol.* 2014; 71 (5): 650-651.

Wang J, Lin ZJ, Lui L. et al. Epilepsy-associated genes. *Seizure Eur J Epilep* 2017; 44: 11-20.

Wang N.J., Parokonny A.S., Thatcher K.N. et al. Multiple forms of atypical rearrangements generating supernumerary derivative chromosome 15. *BMC Genetics* 2008; 9: 2.

Wang Q, Wu W, Xu Z. et al. Copy number changes and methylation patterns in an isodicentric and a ring chromosome of 15q11-q13: report of two cases and review of literature. *Mol Cytogenet.* 2015; 8: 97.

Webb T, Hardy CA, King M. et al. A clinical, cytogenetic and molecular study of ten probands with supernumerary inv dup (15) marker chromosomes. *Clin Genet.* 1998; 53: 34-43.

Wilmshurst JM, Gaillard WD, Vinayan KP. et al. Summary of recommendations for the management of infantile seizures: Task Force Report for the ILAE Commission of Pediatrics. *Epilepsia* 2015; 56: 1185-1197.

Wu YW, Sullivan J, McDaniel SS. et al. Incidence of Dravet Syndrome in a US Population. *Pediatrics* 2015; 136,(5): 1310-1315.

Yu FH, Mantegazza M, Westenbroek RE et al. Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat Neurosci.* 2006; 9 (9): 1142-1149.

Zuberi SM, Brunklaus A, Birch R. et al. Genotype-phenotype associations in SCN1A-related epilepsies. *Neurology* 2011; 76: 594-600.

## 10. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

### A dolgozat alapjául szolgáló eredeti közlemények

Czakó M, Till Á, Szabó A, Ripszám R, Melegh B, Hadzsiev K. Possible Phenotypic Consequences of structural differences in idic (15) in a small cohort of patients. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 4935.

**IF:4.183 (2018)**

Till Á, Zima J, Fekete A, Bene J, Czakó M, Szabó A, Melegh B, Hadzsiev K. Mutation spectrum of the *SCN1A* gene in a Hungarian population with epilepsy. *Seizure* 2020; 74:8-13.

**IF:2.765 (2018)**

Till Á, Szalai R, Hegyi M, Kövesdi E, Büki G, Hadzsiev K, Melegh B. Generalizált epilepszia háttérében azonosított ioncsatorna-génmutáció ritka formája. *Orv Hetil* 2019; 160 (21): 835-838.

**IF:0.564 (2018)**

### A témában megjelent egyéb közlemények

Düh A, Till Á, Bánfai Zs, Hegyi M, Melegh B, Hadzsiev K. Súlyos epilepsiás encephalopathia háttérében azonosított *MECP2*-gén-mutáció fiúbetegben. *Orv Hetil* 2019; 160 (51): 2036-2039.

**IF:0.564 (2018)**

### Más témában megjelent közlemények

Zima J, Eaton A, Pál E, Till Á, Ito YA, Warman-Chardon J, Hartley T, Cagnone G, Melegh BI, Care4Rare Canada, Boycott KM, Melegh B, Hadzsiev K. Intrafamilial variability of limb-girdle muscular dystrophy, LGMD1D type (online megjelent, nyomtatás alatt). *Eur J Med Genet* 2019: 103655.

**IF:2.022 (2018)**

Hadzsiev K, Gyorsok Z, Till Á, Czakó M, Bartsch O. Rubinstein-Taybi syndrome 2 with cerebellar abnormality and neural tube defect. *Clin Dysmorphol* 2019; 28 (3): 137-141.

**IF:0.760 (2018)**

Fekete A, Hadzsiev K, Bene J, Nászai A, Mátyás P, Till Á, Melegh B. Két generációban megfigyelhető mitokondriális DNS A8344G mutáció. *Orv Hetil* 2017; 158 (12): 468-471.

**IF:0.322**

**Till Á**, Hadzsiev K, Lőcsei-Fekete A, Czakó M, Duga B, Melegh B. A 22-es csapdája? A 22q11 deletiós szindróma változatos klinikai megjelenése két eset kapcsán. *Orv Hetil* 2015; 156 (45): 1834-1838.

**IF:0.291**

**Till Á**, Rózsai B, Kovács N, Storcz J, Somogyvári F, Deák J, Ertl T, Decsi T. Újszülöttkori Cytomegalovírus-fertőzés kezelése ganciclovirrel. *Orv Hetil* 2006; 147 (13): 609-612.

#### **Idézhető absztraktok**

**Till Á**, Hadzsiev K, Szabó A, Bánfai Z, Melegh B, Berente Bene J, Czakó M. Co-occurrence of two recurrent copy number alterations in a child with complex phenotype. *Eur J Hum Genet* 2019; 27: 1-688.

**IF: 3,650 (2018)**

Zima J, **Till Á**, Ripszám R, Szabó A, Bánfai Z, Laufer Z, Hadzsiev K. Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome due to a new *PTEN* gene mutation. *Eur J Hum Genet* 2019; 27: 1-688.

**IF: 3,650 (2018)**

**Összesített impaktfaktor idézhető absztraktok nélkül: 11,471**

**Összesített impaktfaktor idézhető absztraktokkal: 18,771**

## **11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Hadzsiev Kinga Tanárnőnek, aki bízott bennem, megszerettette velem a neurogenetikát, és akihez bármikor fordulhattam tanácsért, és Melegh Professor Úrnak, aki munkám során végig támogattott és bátorított. Köszönöm Nekik, hogy támogató munkahelyi légkört teremtenek, ahol inspiráló a gyógyító munka, a kutatás és az oktatás. Köszönöm az Orvosi Genetika Intézet minden munkatársának, orvos kollégáimnak, biológus kollégáimnak, az ambulancián és a laboratóriumban dolgozó szakdolgozóknak, asszisztenseknek, hogy segítették munkámat. Hálával tartozom Dr. Czakó Mártának, aki sokszor átsegített a nehézségeken és bevezetett a cytogenetikai és molekuláris genetikai módszerek világába. Köszönöm Dr. Bene Juditnak a sok tanácsot, támogatást, Dr. Szabó Andrásnak a technikai segítségét. Köszönet a családomnak, férjemnek, gyermekeimnek és szüleimnek támogató szeretetükért és Mindenért!



## **12.MELLÉKLETEK**

A dolgozat alapjául szolgáló eredeti közlemények.