

Hagyományos és új-generációs genetikai módszerek az epilepszia molekuláris diagnosztikájában

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. TILL ÁGNES

Doktori iskola vezetője:

Dr. Gallyas Ferenc
egyetemi tanár

Témavezetők:

Dr. Hadzsiev Kinga
egyetemi adjunktus

Dr. Melegh Béla
egyetemi tanár

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Interdiszciplináris Tudományok Doktori Iskola

Klinikai Központ, Orvosi Genetikai Intézet

Pécs, 2020

1. BEVEZETÉS

1.1. Az epilepszia genetika története és az epilepszia szindrómák új klasszifikációja

Az új-generációs genetikai módszerek megjelenése, elterjedése átalakította az epilepszia molekuláris diagnosztikájának klinikai gyakorlatát. 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. Az epilepszia betegség genetikai hátterének lehetősége már régen felmerült. A generalizált epilepszia előfordulásának valószínűsége elsőfokú rokonok esetén az átlag populációhoz képest 5-10-szeresre emelkedik. Ikervizsgálatok is megerősítették az örökletességet, melyet tradicionálisan multifactorialisnak véltek. 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*). 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.

Az elmúlt évtizedekben az epilepsziakutatás során elért eredmények hozzájárultak az epilepsziás rohamok, az epilepsziák és az epilepsziás szindrómák új klasszifikációjának kidolgozásához (International League Against Epilepsy, ILAE 2017). 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. 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.

1.2. A fejlődési és epilepsziás encephalopathiák

Az új-generációs szekvenálás (NGS) megjelenésével és elterjedésével a legkorábbi, legegységesebb genetikai összefüggések az epilepsziás encephalopathiák (EE) vonatkozásában láttak napvilágot. EE-ről beszélünk, ha az epilepsziás aktivitás önmaga olyan

súlyos kognitív és magatartásbeli romlást okoz, amelyet a háttérben álló pathológiával magyarázni nem lehet (pl. corticalis malformatio). A romlás bármely életkorban előfordulhat, és különböző súlyosságú lehet, számos epilepszia szindrómát érinthet. Az encephalopathiával asszociált epilepszia szindrómák nagy része genetikai háttérű, 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 a továbbiakban az EE kifejezést használom. Az EE magába foglal számos korhoz kötött electroklinikai 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. A molekuláris forradalom megjelenésével folyamatosan nő a betegség háttérben álló ismert gének száma: leggyakrabban *de novo* domináns mutációkat azonosítanak. Több gén hibája okozhatja ugyanazt az electroklinikai 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. EE háttérben először 2001-ben igazolódott genetikai eltérés, amikor Claes L. és munkatársai hét Dravet szindrómás (DS) gyermek mintájában *de novo* *SCN1A*-gén (feszültségfüggő nátriumcsatorna alfa-1 alegység) mutációt igazoltak.

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. A pathogen microdeletiók, microduplicatiók kimutatása miatt az array komparatív genomhibridizáció (array CGH) vizsgálat EE esetén az egyik első diagnosztikus lépcső a genetikai kivizsgálás során. Az NGS technológia hatékonyságának növekedése, árának csökkenése szintén hozzájárult az EE háttérben álló gének gyors felfedezéséhez. A teljesexom-szekvenálás (WES) alkalmazása a proband és szüleinek mintáin (trio-szekvenálás) hatékony módszernek 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. 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.

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. 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 talált variánsok értékelése nem ér véget a laboratóriumban. Az ismeretlen jelentőségű variánsok (variant of unknown significance, VUS) interpretációt igényelnek, de nem feltétlenül segítik a diagnózist. A szülők mintájának vizsgálata és a fenotípus pontosítása szükséges a VUS-ok további klasszifikációjához.

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, így EE esetén.

1.3. A genetikus generalizált epilepsziák és genetikai hátterük

Az 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 öröklődésmenetének 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. 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. 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. Ezen gyakoribb előfordulású, kevésbé súlyos lefolyású, későbbi életkorban manifesztálódó epilepsziák esetén az öröklődés multifactorialis vagy több, alacsony penetranciájú gén komplex öröklődése áll a háttérükben. Kalciumcsatorna-gén (*CACNA1H*), kloridcsatorna-gén (*CLCN2*), nátriumcsatorna-gének (*SCN1A*, *SCN1B*) és a GABA-receptor alegységek géneinek (*GABRG2*, *GABRA1*) mutációi is leírásra kerültek GGE háttérében.

2. 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 háttérét 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, végül is a betegek és családjaik számára nyújthat részletesebb ismereteket a prognózisról, a várható társuló betegségek előfordulásáról, és esetleg terápiás konzekvenciával is járhat.

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 genetikus epilepszia lázas görcs plusz (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 betegségcsoportban. VUS-ként klasszifikált eltérés interpretációja.

3. A VIZSGÁLATBAN RÉSZTVEVŐ BETEGEK

3.1. 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 abnormális 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. 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. 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.

3.2. Dravet szindrómás és Generalizált epilepszia lázas görcs plusz 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. 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.

3.3. Genetikus generalizált epilepsiában szenvedő beteg

A kutatás harmadik részében 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.

4. MÓDSZEREK

4.1. 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 Helsinkai Nyilatkozat (1971) irányelveit követtük.

4.2. 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.

4.3. GTG sávozás

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

4.4. Fluorescens in situ hibridizáció

Tekintettel az SMC-k gyakori 15-ös eredetére, az *UBE3A* lókuszra (PWS/AS kritikus régió) specifikus próbát és a 15p11.2 és 15q22-es régiókra specifikus kontroll próbákat használtunk a vizsgálathoz (Vysis, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). A protokollt a gyártó előírásai szerint alkalmaztuk.

4.5. Uniparentalis disomia

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.

4.6. Array komparatív genom hibridizáció

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 nemben 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.

4.7. Automatizált Sanger-féle szekvenálás

Az *SCN1A*, a *TSC1* és *TSC2* és az *SLC12A5*-gének exonjainak amplifikálása polimeráz láncreakcióval (PCR) történt, intézetünkben tervezett exonspecifikus primerpárok alkalmazásával. A kapott PCR termékek elemzését bidirectionalis 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, a PolyPhen-2, a PROVEAN és a Mutation Assessor predikciós software-ek segítségével történt. A talált mutációkat a betegtől nyert második minta vizsgálatával validáltuk. Az új mutációk klasszifikálásakor az ACMG elveit követtük.

4.8. Multiplex ligációfüggő próba amplifikáció

Az *SCN1A*, a *TSC1* és a *TSC2*-gének 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 fluorescensen 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.

4.9. 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.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Idic (15) szindrómás betegek fenotípusa és strukturális különbségei

5.1.1. A betegek fenotípusa

Betegeink mindegyikének fenotípusa az idic (15) szindrómára jellegzetes: különböző fokú generalizált izomhypotonia, globalis fejlődésbeli elmaradás, általában közepsúlyos-súlyos értelmi akadályozottság, az expresszív beszédfejlődés súlyos zavara, egy eset kivételével autisztikus viselkedészavar és epilepszia jellemző rájuk. A tünetek súlyossága azonban meglepő változatosságot mutat. Jellegtelen arcdysmorphia és társuló fejlődési rendellenességek hiánya szintén közös vonás a betegeinkben.

5.1.2. GTG sávozás és FISH

A betegek mintáinak GTG-sávozása 550-sáv szintű felbontással történt. A betegek mindegyikének karyotypusa egy G-csoportbeli acrocentricus számfeletti marker kromozómát 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 (*DI5Z1* és *UBE3A* régió) jelet adott (a normál 15-ös kromozómák mellett), igazolva ezzel a marker kromozóma 15-ös eredetét.

5.1.3. 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.

5.1.4. Array CGH

A kópiaszámokat és az idic (15) kromoszóma kialakulásában résztvevő különböző genomialis régiók töréspontjait összegzi az **1. táblázat** (az ISCN 2016 alapján). A genomialis eltérések bázispár pozícióit a „February 2009 Assembly” alapján jelöltük meg (GRCh37/hg19).

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

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

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.

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.

5.2. Az SCN1A-gén mutációs spektruma a magyar epilepsziás populációban

Vizsgálatunkkal összesen 12 ismert SCN1A-mutációt igazoltunk (15 betegben és 3 családtagban), és 15 korábban nem ismert pathogen eltérést mutattunk ki (15 betegben és 2 családtagban) Sanger-féle szekvenálással. MLPA vizsgálattal további három betegben 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 öröklődésmenetet 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, vagy gyermekkori lázgörcsük volt, illetve két esetben teljesen tünetmentesnek bizonyultak.

Az új, korábban még nem közölt mutációk között 12 missense variánst, két frameshiftet okozó és egy in-frame deletiót okozó mutációt azonosítottunk. A szekvencia variánsok interpretálását az ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) ajánlása alapján végeztük el, a 15 új eltérésből kettő bizonyult "pathogénnek", 12 "valószínűen pathogénnek", egy eltérés pedig "ismeretlen jelentőségű variánsnak". A DS klinikai diagnózisát további három betegben sikerült alátámasztanunk MLPA-módszerrel. Két beteg fenotípusa nem különbözött jelentősen a pontmutációs betegekétől, a harmadik beteg fenotípusa viszont, aki egy nagy, heterozygota deletiót hordoz (exon 1-17), meglepően enyhe formája a betegségnek.

5.3. Generalizált epilepszia háttérében azonosított ioncsatorna-génmutáció ritka formája

A kiterjedt hypopigmentált folttal rendelkező, kisdedkorban myoclonusos-atóniás rohamokat mutató, gyermekkori 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 predikációs 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.

6. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

6.1. 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 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.

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. 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 kétéves, így ezek a tünetek a későbbiekben még kialakulhatnak nála. A betegek közül ketten (2. és 3.) megegyező, aszimmetrikus töréspontokkal rendelkeznek, mindkettejük epilepsziája csecsemőkori kezdetű, infantilis spazmusokkal (IS) induló, electroklikailag West szindrómának (WS)-nak megfelelő. A 3. beteg esetében a későbbiekben változatos rohamok jelentkeztek, és terápia-rezisztens Lennox-Gastaut szindróma (LGS) klinikai képe bontakozott ki.

Az idic (15) szindrómában szenvedő betegek epilepszia fenotípusa igen változatos annak ellenére, hogy hátterében 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 ismételten felmerült az irodalomban, de a klinikai szignifikanciája a mai napig kétséges. 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 lehetőség, hogy a segmentalis aneuploidia által érintett 15q11.2-q13 régiót tartalmazó allélek a homológok párosodása során egyensúlyzavart okozhatnak. Ez a teória újabb mechanizmus felismeréséhez vezethet, ami a kóros fenotípus kialakulásának hátterében áll, mivel ez a komplex régió számos imprintált és biallélikusan expresszált gént tartalmaz. A három GABA_A 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. Feltételezhető, hogy az apai és anyai eredetű homológok 15q11-q13 régiói közötti *trans* interakciónak fontos szerepe van a GABA_A receptor gének optimális biallélikus expressziójában. Így elképzelhető, hogy az epilepsziát és autisztikus tüneteket mutató négy betegünk fenotípusa az aszimmetrikus marker struktúrával magyarázható.

6.2. A Dravet szindróma és a GEFS+ szindróma fenotipikus és genotipikus heterogenitása

A legtöbb általunk azonosított mutáció missense mutációnak bizonyult, mely feltehetően megváltoztatja, de nem szünteti meg az ioncsatorna működését. Az általunk detektált mutációk közül két ismert, recurrensnek mutató 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. 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 az irodalmi adatokhoz, ezért a módszer a szűrés második lépcsőjeként ajánlható. Hasonlóan más szerzőkhöz, nem találtunk szoros genotípus-fenotípus összefüggést a vizsgált betegekben.

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

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.

6.3. A teljesexom-szekvenálás szerepe a genetikus generalizált epilepszia diagnózisában

Az *SLC12A5*-gén terméke egy, a központi idegrendszerben expresszálódó kálium-klorid kotransporter (KCC2) fehérje, a kation-klorid kotransporter géncsalád tagja. A KCC2 normál működése alacsony intracelluláris Cl^- koncentrációt eredményez az érett neuronokban, ami elengedhetetlen a megfelelő synapticus gátlás kialakulásához. Régóta feltételezik, hogy az *SCL12A5*-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 hozták összefüggésbe. 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, a korai migráló multifokális epilepsziás encephalopathia, míg az egyik allél mutációja esetén egy jóval enyhébb lefolyású GGE kialakulása várható. *In vitro* funkcionális vizsgálatokkal kimutatták a klorid kiáramlási kapacitás csökkenését a mutációt hordozó sejteken. Betegünk tünetmentes édesapjánál is kimutatható mutációt az inkomplett penetranciával, a GGE komplex öröklődésmenetével magyarázzuk.

7. 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. 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. Vizsgálatainkat 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 végeztük. A kutatás 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 figyelmünk.

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.

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 öröklődésmenettel, más gének betegségmódosító hatásával lehet összefüggésben. 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. 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.

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 betegségkókozó szerepét, hiszen más gének betegségmódosító hatásával is számolnunk kell. A „gold standard” egy eltérés pathogénként 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 diagnosztikus algoritmusában.

8. 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 epilepsziás 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

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Hadzsiev Kinga Tanárnőnek, aki bízott bennem, megszerettette velem a neurogenetikát, és akihez bármikor fordulhattam tanácsért és Melegh Béla Professor Úrnak, aki munkám során végig támogatott és bátorított. Köszönöm Nekik, hogy támogató munkahelyi légkört teremtenek, ahol inspiráló a gyógyító munka, a kutatás és az oktatás. Köszönöm az Orvosi Genetikai Intézet minden munkatársának, orvos kollégáimnak, biológus kollégáimnak, az ambulancián és a laboratóriumban dolgozó szakdolgozóknak, asszisztenseknek, hogy segítették munkámat. Hálával tartozom Dr. Czako 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!