

Debreceni Egyetem

Kossuth Lajos Gyakorló Gimnáziuma és Általános Iskolája Csengő
utcai feladatellátási hely

A *KCNQ2* GÉN GENETIKAI VIZSGÁLATA



Horváth Karolina Dóra

11. évfolyamos gimnáziumi tanuló

37. OTDK Biológiai Szekció

Dr. Krakomperger Zsolt

mentor

Prof. Dr. Balogh István

tanszékvezető egyetemi tanár

A pályamunka beküldéséhez hozzájárulok.

Debrecen

2024.

Tartalom

Absztrakt	1
I. Bevezetés	2
II. Irodalmi összefoglaló	2
1. <i>A KCNQ2 gén és a feszültség függő kálium csatorna felépítése</i>	2
2. <i>KCNQ2 mutációi okozta betegségek</i>	3
III. Célkitűzés	4
IV. Anyagok és módszerek	5
1. <i>Plazmid vektor</i>	5
2. <i>Escherichia coli</i>	5
3. <i>A transzformálás lépései</i>	6
4. <i>A DNS amplifikáció</i>	6
5. <i>A plazmid kinyerése</i>	7
6. <i>A DNS mennyiségének és minőségének ellenőrzése</i>	8
V. Eredmények	10
VI. Diskusszió	12
VII. Köszönetnyilvánítás	13
VIII. Irodalomjegyzék	14
Függelék	16

Absztrakt

Bevezetés: Az öröklött betegségek genetikai vizsgálatai fontos szerepet játszanak a diagnosztika területén. A kimutatott variáns esetében azonban nincs mindig bizonyíték arra, hogy valóban oki tényező lehet-e, ekkor kísérletes úton kell megvizsgálni a mutáció fehérjére gyakorolt hatását. Ennek eszköze a molekuláris klónozás.

A *KCNQ2* gén egy feszültségfüggő kálium csatornát kódol, amely az agyban fejeződik ki. A génben kimutatott mutációk szerepet játszhatnak egy epilepszia típus kialakulásában.

Célkitűzés: Munkám során célom volt a *KCNQ2* gén egy korábban a diagnosztikai laboratórium által egy betegben kimutatott korábban nem tesztelt mutációja (Ser113Phe) létrehozásának előkészítése a későbbi funkcionális kísérletekhez.

Anyagok és módszerek: A vizsgálatokat a Debreceni Egyetem Klinikai Genetikai Tanszékén végeztem *E. coli* sejteken, molekuláris klónozás segítségével. A rekombináns DNS egy inzert DNS-ből és egy vektorból áll. A vektor a gazda sejtben replikálódni képes, de elkülönül a gazdasejt genomjától. Erre azért van szükség, hogy szaporítható és fenntartható legyen a klónozendó DNS molekula (inzert).

A *KCNQ2* gén a rendelkezésemre állt. A plazmid DNS-t hősokk segítségével juttattam be *K12 TB1* sejtbe, a baktérium-DNS elegyet antibiotikum tartalmú agarokra szélesztettem, mivel a vektor ampicillin rezisztencia gént hordoz, egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltam, majd egy különálló telepet oltottam LB tápoldatba, amit 37°C-on inkubáltam 16 órán át. A baktériumtenyészetből plazmid DNS-t izoláltam. A DNS koncentrációját lemértem, az izolálás sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Ebben az izolált DNS-ben hozták később létre a Ser113Phe mutációt.

Eredmények: A *KCNQ2* gént tartalmazó vektort *E.coli*-ban sokszoroztam. A DNS koncentrációja és tisztasága megfelelő volt.

Következtetés: Sikerrel juttattam be rekombináns DNS-t tartalmazó plazmid vektort baktérium törzsbe, ahol azt megfelelő mennyiségben sikerült létrehozni és izolálni, ezzel megalapozva a későbbi munkát.

I. Bevezetés

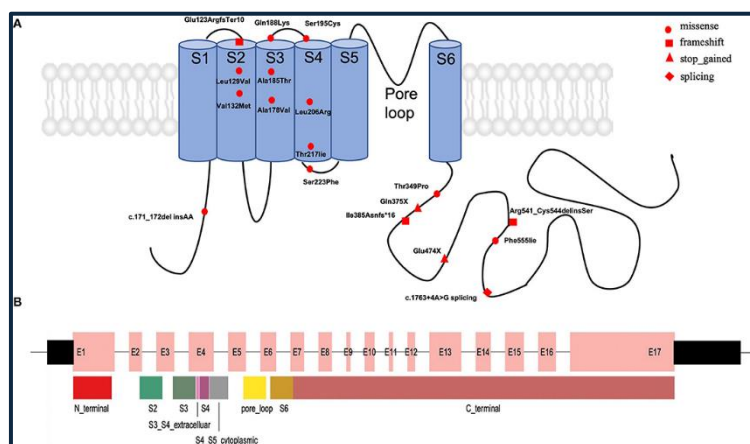
A ritka betegségek jelentőségét akkor ismerjük fel igazán, ha közvetlen környezetünkben találkozunk olyan beteggel, akinél valamelyik formáját állapították meg. Láthatjuk milyen nehéz ezzel kapcsolatban tájékozódni, hiszen nehéz olyan ellátó helyet találni, ahol gyakorlattal bírnak az adott ritka betegség kezelésében. Jellemzően kutatásuk és így kezelésük is nehéz, hiszen kevés beteggel gyűjtött tapasztalatot kell összegezni. Ugyan egy ritka betegségben 100000 ember közül kevesebb mint 5 érintett, de az egyén számára az 100%. Bár külön-külön ritkák, de összeségében 27-36 millió ember szenved valamelyik formájától. Az Európai Bizottság Közegészségügyi alosztálya külön foglalkozik a ritka betegségekkel [1].

A részletes fizikális vizsgálat, kórtörténet, családfa kutatás és egyéb laboratóriumi vizsgálatok elvégzése sok esetben nem elég a diagnózishoz. A ritka betegségek körülbelül 80%-a genetikai eredetű [1]. Ezért, az öröklött betegségek genetikai vizsgálatai fontos szerepet játszanak a diagnosztika területén. De vannak esetek, amikor a kimutatott variáns esetében nincs bizonyíték arra, hogy valóban oki tényező lehet-e, ekkor kísérletes úton kell megvizsgálni a mutáció fehérjére gyakorolt hatását. Ennek eszköze a molekuláris klónozás.

II. Irodalmi összefoglaló

1. A KCNQ2 gén és a feszültség függő kálium csatorna felépítése

A KCNQ2 (K- kálium, CN- csatorna, Q- alcsoport, 2- második tagja) a 20-as kromoszóma hosszú karának 13.33 lokuszán található. A Kv7.2 fehérjét kódolja, mely egy feszültségfüggő kálium csatornát alkot. Ez a kálium csatorna a kálium ionok sejtből kifelé való áramlását biztosítja. A csatorna 4 alfa alegységből áll, egy alfa alegység, pedig 6 doménből (S1-S6). Az S4 domén felelős a membrán potenciál változásának érzékeléséért, ezt a benne lévő töltéssel rendelkező aminosav oldalláncok az elektromos erőter változására, elmozdul a feszültség szenzor domén. Az S5, S6 alakítja ki a pórust, a két domént összekötő pórust alkotó hurok biztosítja a magas szelektivitást, így csak a kálium ionok jutnak át a sejtmembránon (1.ábra), [2,3].



1.ábra A KCNQ2 csatorna alfa alegysége (Xiao és mtsai, *Frontiers in Molecular Neuroscience*; 15; 2022)

Az emberben a hippocampus, a cortex temporale, a cortex cerebellaris és a medulla oblongata területén expresszálódik. A medulla oblongata *KCNQ2* gén expressziója főleg a magzati élet során történik, születés után ez folyamatosan csökken [2].

2. *KCNQ2* mutációi okozta betegségek

A génben kimutatott malignus mutációk nagy része szerepet játszhatnak egy epilepszia altípus kialakulásában, amely jellemzően már neonatális korban megjelenik. A tünetek alapján felfogható egy spektrum betegségként, a mutációtól függően lehet kevésbé súlyos vagy súlyos is. Enyhe tünetek jellemzik például az SLFNE-t (self-limited familial neonatal epilepsy), amit a korábbi nevezéktan benignus familiáris epilepsiának nevezett. Jóindulatú, mivel bár újszülöttkorban kialakulnak az epilepsiás rohamok, gyorsan megszűnnek, nem okoznak súlyos tüneteket. Ugyanakkor lehet súlyos, enkefalopátiát okozó forma is mint a NEO-DEE (neonatal developmental and epileptic encephalopathy) [4,5,6]. Ebben az esetben többféle epilepsiás roham fordul elő egy betegnél és egy nap alatt többször, hiába szűnnek meg a rohamok idővel fejlődési rendellenesség, autizmus, viselkedési zavarok is társulhatnak hozzá. Ezen kívül ritkábban okozhatnak még csecsemő és kisgyermek korban jelentkező epilepsiát, nem epilepsiás myoclonust és értelmi fogyatékoságot epilepszia nélkül. Az epilepsiás rohamok kezelése sok szempontból fontos, a napi többszöri epilepsiás roham károsan befolyásolhatja

az értelmi fejlődést és az életminőséget is rontja. Az antikonvulzívumok (ASM) alkalmazása sokszor szükséges, de a *KCNQ2* gén mutációjához társuló epilepszia formáknál sokszor tapasztalható a rohamok spontán megszűnése is. A genetikai vizsgálatokkal ma már lehetséges előre prognosztizálni a súlyosságot, genetikai variációtól függően [7]. A súlyosabb esetekben a megfelelő gyógyszer vagy gyógyszerek kombinációjának a megtalálása kihívást jelenthet. Ezért is nagyon fontos az, hogy időben tudjuk a betegséget diagnosztizálni. Hiszen, ha időben felismerik a probléma eredetét, akkor hamarabb kaphatja a beteg a megfelelő ASM-t. Ráadásul előfordulhat, hogy nem megfelelő gyógyszerrel éppen a fordítottját érjük el, és növeljük a rohamok számát, vagy újabb epilepsziás roham típusok jelennek meg. Ismert mutációval ezek elkerülhetőek [5,6,7,8].

KCNQ2 mutáció okozta epilepsziás szindrómában hamarabb nyúlhat a kezelőorvos például karbamazepinhez mint egyébként csecsemőnél tenné. Kálium-csatornán ható gyógyszer is jó választás lehet, ilyen a retigabin hatóanyag. Az ASM kitűnő rohamgátló szer volt, és alkalmazható lett volna ebben a betegségben [9]. Azonban 2017-ben kivonták a forgalomból, súlyos mellékhatásai miatt [10].

Előfordul, hogy a gyógyszeres kezelés, ASM terápia önmagában nem biztosít megfelelő rohamkontrollt, ilyenkor ismert mutáció esetén hamarabb merülhet fel egyéb kezelési lehetőség gyerekeknél mint például a vagus ideg stimulációját (VNS) [10]. Emellett fontos arról is megemlékezni, hogy egy súlyos beteg gyerek kezelhetősége, jövője az egész családnak jövőjét is meghatározza, illetve a későbbi családtervezésnél genetikai tanácsadása lesz szükséges.

Összességében szükséges a beteget közvetlen gyógyító szakemberek, genetikusok, laboratóriumi diagnosztikai szakemberek szoros együttműködése.

III. Célkitűzés

1. A *KCNQ2* gén egy korábban a diagnosztikai laboratórium által egy betegben kimutatott, addig nem tesztelt mutációja (Ser113Phe) létrehozásának előkészítése a későbbi funkcionális kísérletekhez.
2. Közről látni és lehetséges módon részt venni középiskolás diákként a kutatómunkában.

IV. Anyagok és módszerek

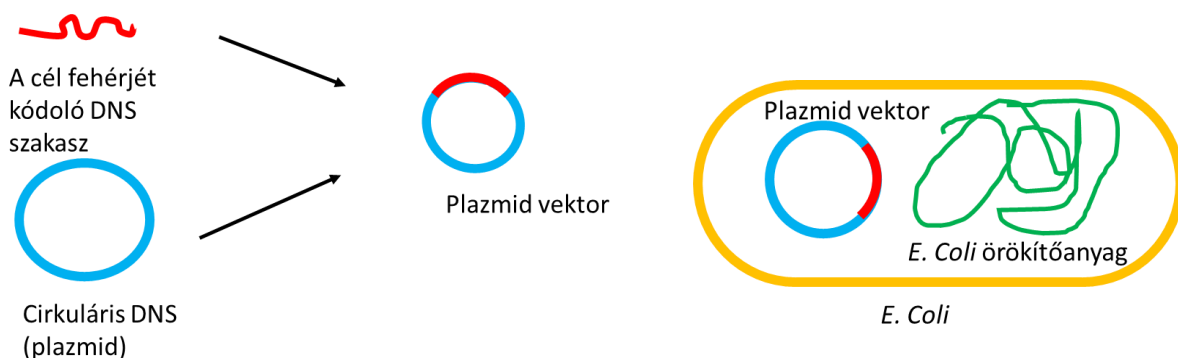
A vizsgálatokat a Debreceni Egyetem Klinikai Genetikai Tanszékén végeztem *Escherichia coli* sejteken, molekuláris klónozás segítségével.

1. Plazmid vektor

Vizsgálatainkhoz szükség volt a *KCNQ2* gén intronmentes formáját tartalmazó plazmid vektorra (2.ábra). A rekombináns DNS egy inzert DNS-ből és egy vektorból áll. A vektor a gazda sejtben replikálódni képes, de elkülönül a gazdasejt genomjától (2.ábra). Erre azért van szükség, hogy szaporítható és fenntartható legyen a klónozendó DNS molekula (inzert). Ez a módszer azért jó, mert előre, gyárilag megtervezett, ellenőrzött „tisztá” gént lehet sokszorozni, így biztosítjuk annak egyformaságát. A kívánt allélen kívül még tartalmaz a vektor egyéb géneket is, amelyek fontosak a cirkuláris DNS fenttartásában és a tisztaságának megőrzésében. Például ampicillin rezisztencia gének is találhatóak, aminek elengedhetetlen a szerepe a baktérium törzsek szelekciójánál az amplifikáció során [11,12] (2. ábra).

2. *Escherichia coli*

Az *E.coli* sejt egy rövid pálcikaalakú Gram-negatív baktérium. Az 1970-es évek óta használják a DNS kutatásokban, napjainkban a molekuláris klónozás egyik legfontosabb faj a természetben. Az *E.coli*- prokarióta, ezért könnyen alkalmazható molekuláris klónozásra. Az örökítő DNS állomány mellett bejuttathatunk egy kör alakú plazmid DNS-t, mely így tud a baktériummal szaporodni. A kísérlet során a ***K12 TB1*** törzset használtam fel (2. ábra).



2. ábra A plazmid vektor és a transzformált *E. coli* (saját)

3. A transzformálás lépései

Első lépésben a kompetens sejtet jégen kiolvastottam, majd az 50 µl sejthez 1 µl (50 ng) plazmid DNS-t pipettáztam.

Ezt az elegyet 30 percig inkubáltam jégen, majd hősokkot alkalmaztam, azaz 30 másodpercig 42 °C -os vízfürdőbe helyeztem a mintát. Ezáltal a sejthártya átjárhatóvá vált és bejutott a plazmid vektor. Ezután azonnal jégre helyeztem a mintákat 2 percre, a sejthártya ekkor már nem volt permeábilis, ismét zárt lett (3.ábra).



3. ábra A transzformálás folyamata (saját)

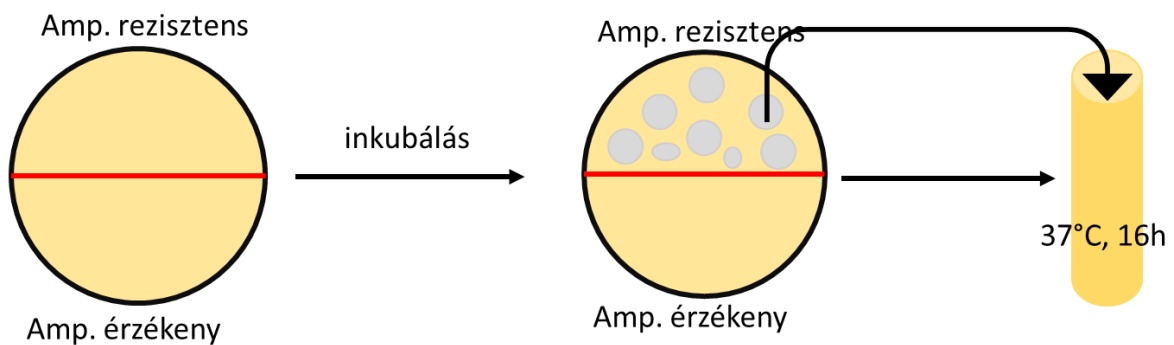
Ezt követően előmelegített 37 °C-os S.O.C. médiumot (Invitrogen) adtam a baktérium-DNS elegyhez, amit 37°C-on 1 óráig rázattam.

- ♦ *SOC medium* összetétele (10 ml): 2% tripton, 0,5% gomba kivonat, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glükóz.

A folyamatot One Shot™ TOP10 Chemically Competent E. coli protokollja alapján végeztük .

4. A DNS amplifikáció

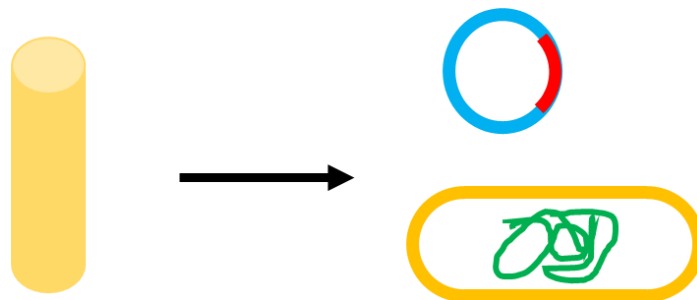
Az inkubálás során felszaporodott baktérium elegyet antibiotikum tartalmú agarokra szélesztettem és egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltam. Mivel az alkalmazott vektor ampicillin rezisztencia gént hordozott, az ezzel nem rendelkező baktériumok elpusztultak az ampicillin tartalmú agaron, ezáltal a plazmidot nem tartalmazó törzsek szelektálódnak. Másnap a túlélő baktériumtelepekből egy-egy különálló, szabályos, kerek telepet oltottam 5 mL ampicillin tartalmú folyékony LB tápoldatba, amit 37°C-on inkubáltam 16 órán át rázás mellett (4. ábra).



4. ábra A rekombináns vektort tartalmazó baktérium-DNS elegy felszaporítása (saját)

5. A plazmid kinyerése

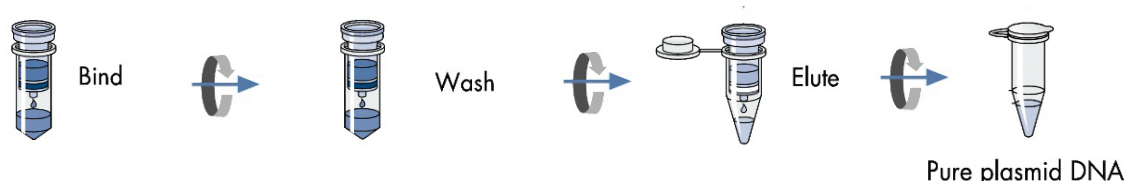
A tenyészetet az inkubációs idő letelte után 2000 rpm-en 10 percig szobahőmérsékleten centrifugáltam, majd a baktérium pelletből plazmid DNS-t izoláltam QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) felhasználásával (5.ábra).



5. ábra Plazmid vektor kinyerése (saját)

A baktérium pelletet 250 µl P1 pufferben szuszpendáltam és egy mikrocentrifuga csőbe átpipettáztam. Ezután 250 µl P2 puffert adtam a mintához, a cső 4-6 alkalommal történő forgatásával homogenizáltam a mintát, ami viszkózussá, enyhén átlátszóvá vált. Ez a reagens a lízis reakcióért felelős, ha túl sokáig hagyjuk állni vagy nem megfelelően kezeljük az elegyet akkor károsodhat a plazmid. Ezt követően 350 µl N3 puffert adtam a mintához és azonnal 4-6 alkalommal megforgattam a csövet elkerülve a precipitáció kialakulását. Az opállossá vált oldatot 13,000 rpm-en 10 percig centrifugáltam, így egy kompakt pelletet kaptam. A felülúszóból 800 µl-t a QIAprep 2.0 Spin oszlopra pipettáztam. Az oszlopot centrifugáltam (13000 rpm, 1 perc), majd a centrifugálás során az oszlopon átfolyt folyadékot kiöntöttem. 500 µl PB puffert pipettáztam az oszlopra és újból centrifugáltam 13000 rpm mellett 1 percig, majd a felesleges folyadékot leöntjük.

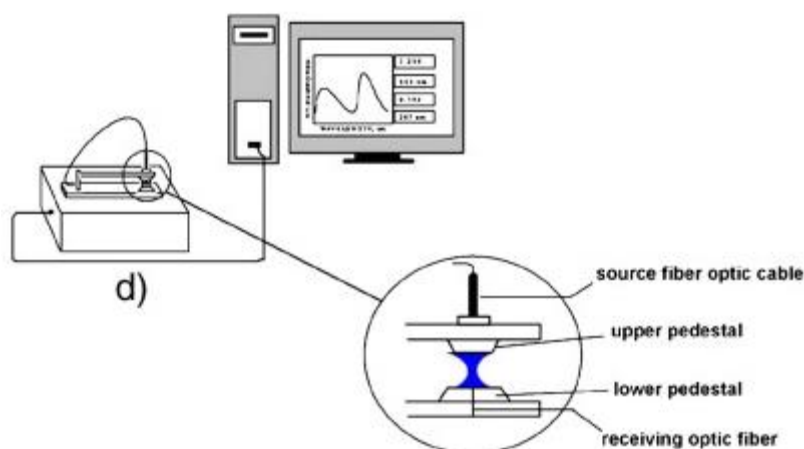
750 µl PE pufferrel mostam az oszlopot, majd centrifugáltam (13000 rpm, 1 perc), a gyűjtőcső tartalmát kiöntöttem és ismételten centrifugáltam 1 percig a reziduális etanol eltávolítása céljából. Az oszlopot áthelyeztem egy 1,5 ml-es steril Eppendorf csőbe, majd 50 µl EB puffert pipettáztam az oszlopra. Az 1 perces inkubációs idő letelte után újra 1 percig centrifugáltam a mintát, majd az oszlopot eldobva, az eppendorf csőben tárolható az eluált plazmid DNS (6.ábra).



6. ábra QIAprep 2.0 Spin Column és a plazmid DNS tisztítási folyamata

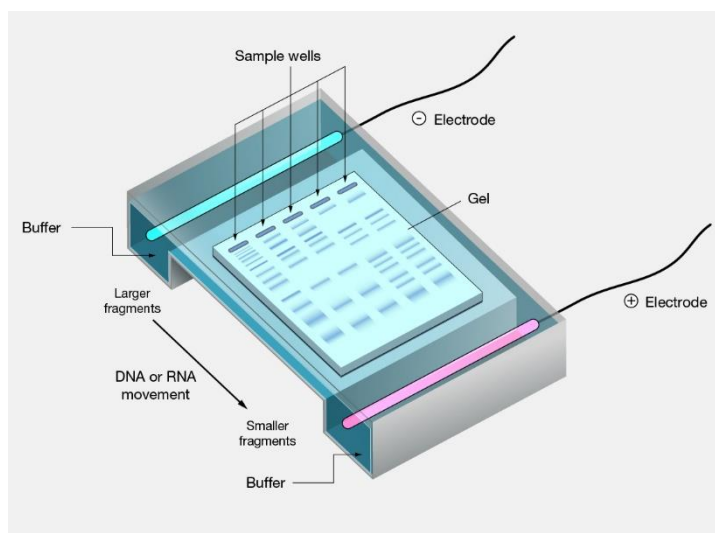
6. A DNS mennyiségének és minőségének ellenőrzése

A kinyert plazmid DNS mennyiségét és tisztaságát NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) spektrofotométerrel ellenőriztük [13]. A NanoDrop készülék is mint a többi spektrofotométer is a vizsgált anyagok fény abszorpcióján alapuló készülék. Desztilláltvizes, majd eluáló pufferes kalibrálás után lemértem a három minta koncentrációját és tisztaságát. A koncentrációt 260 nm-en mért abszorbancia alapján határozza meg a készülék, míg a tisztaságát a 260 nm és a 280 nm-es adat hányadosa adja meg [12, 13,14] (7.ábra).



7.ábra A NanoDrop készülék felépítése (source fiber optic cable- fényforrás optikai kábel, upper/ lower pedestal- felső/ alsó talpazat, receving optic fiber- detector optici kábel) [17]

Az izolálás sikerességét agaróz gélelektroforézissel is ellenőriztem. A negatív töltésű DNS a pozitív elektroda felé fog vándorolni adott idő alatt. A gélelektroforézishez 1%-os agaróz gél készítem 0,35 g agaróz és 35 mL 1x TBE puffer felhasználásával. Az agaróz feloldódását követően 30 µl 10x hígítású GelRed festéket (Biotium) adtam az agaróz-puffer elegyhez, ami a DNS-t teszi láthatóvá UV megvilágítás mellett. A minta felviteli helyeit a gélöntéskor „fésű” használatával alakítottam ki, melyet a gél szilárdulását követően eltávolítottam a gélből, az így létrejött mintafelviteli helyekbe ún. zsebekbe pipettáztam 10 µl mintát. A minták mellett egyidejűleg molekulatömegmarkert is használtam, segítségével beazonosítható az ellenőrizni kívánt minta mérete (bázispár). (8.ábra). A felvitel előtt mind a mintákhoz, mind a molekulatömegmarkerhez 5x GelPilot Loading Dye festéket (Qiagen) adtam, ami a mintafelvitelt segíti, sűrűségéből adódóan lehúzza a zseb aljára, illetve a minták futását teszi láthatóvá.

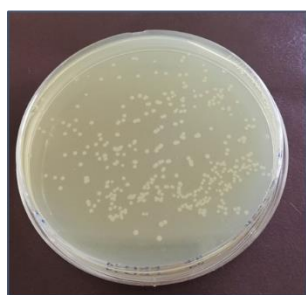


8. ábra gélelektroforézis felépítése (sample wells-zsebek, buffer- puffer, larger fragments- nagyobb darabok, smaller fragments- kisebb darabok, DNA or RNA movements- DNS vagy RNS haladási iránya) [15]

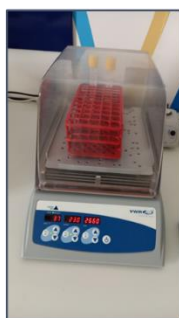
V. Eredmények

A *KCNQ2* gént tartalmazó vektor rendelkezésemre állt. A plazmid vektor a *KCNQ2* gén vad típusát tartalmazta.

Munkám során sikeresen transzformáltam a *KCNQ2* gént tartalmazó vektort *E. coli*-ba és szaporítottam fel megfelelő mennyiségben. A 9. ábra első képén láthatóak az ampicillin tartalmú agarokon felszaporodott azon baktérium telepek, melyek a transzformálási lépés során felvették az ampicillin rezisztencia génnel rendelkező vektort. A 3. képen a centrifugacsövekben látható opaleszkáló tápoldat mutatja a baktérium felszaporodásának sikerességét.



1.kép: az ampicillin rezisztencia génnel rendelkező baktérium telepek szilárd táptalajon



2. kép: a leoltott baktériumtelep szaporítása LB tápoldatban



3. kép: A leoltott baktériumtelep a felszaporítás előtt (tiszta tápoldat) és után (opálos)tápoldat

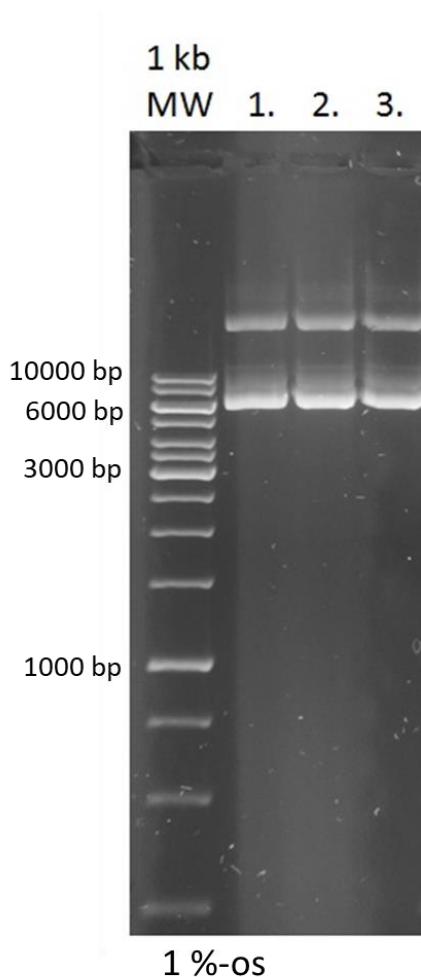
9. ábra Az amplifikáció folyamata (saját)

A felszaporított baktériumtelepből izolált plazmid DNS mennyiségét és tisztaságát NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) spektrofotométerrel ellenőriztük, ami alapján mindhárom minta koncentrációja megfelelő volt. A tisztaságát is ellenőriztük, lemérve 280 nm-en a fehérje koncentrációját (1. táblázat). A 260nm/280nm arány alapján megfelelő volt a tisztaság (tiszta DNS normál tisztasági aránya 1,8-2) [12].

1. táblázat NanoDrop spektrofotométeren mért DNS koncentráció és a tisztasági arány.

Minta sorszáma	Koncentráció	Tisztaság (260nm/280nm)
1. minta	0,099 µg/µl	1,86
2. minta	0,138 µg/µl	1,90
3. minta	0,128 µg/µl	1,89

Ezt követően agaróz gélelektroforézissel is ellenőriztük az izolálás sikerességét (10. ábra). Mindhárom minta esetén dupla sávot látunk a gélen. Az egyik sáv az összetekeredett plazmid konformáció, második sáv plazmid DNS cirkuláris alakjából adódik. (10. ábra)



10. ábra 1% -os agaróz gélen végzett gélelektroforézis képe. Ábramagyarázat: 1 kb MW: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific), 1., 2. és 3. megegyezik a minta sorszámaival.

VI. Diszkusszió

A molekuláris genetikai módszerek napjainkban egyre nagyobb teret hódítanak és lassan a mindennapi, „rutin” kezelés is elképzelhetetlen nélkülük. Bár elsajátításuk időigényes, nagy tapasztalatot igényel, de középiskolásként közelebb kerülhetünk megismeréshez, ha legalább egy részét saját magunk is megtanuljuk.

A munkám során betekintést nyerhettem egy ritka betegség genetikai vizsgálatának egy részébe. Ezáltal ismerkedhettem magával a betegséggel az irodalmi áttekintés során.

Feladatomban volt a *KCNQ2* gén egy korábban a diagnosztikai laboratórium által egy betegben kimutatott, addig nem tesztelt mutációja (Ser113Phe) létrehozásának előkészítése a későbbi funkcionális kísérletekhez. Sikerral juttattam be rekombináns DNS-t tartalmazó plazmid vektort baktérium törzsbe, ahol azt megfelelő mennyiségben sikerült létrehozni és izolálni, ezzel megalapozva a későbbi munkát. Ebben az izolált DNS-ben hozták később létre a Ser113Phe mutációt.

Ezzel a módszerrel lehetett biztosítani, hogy egységes legyen a DNS minta és kizárólag a tervezett Ser113Phe alakuljon ki a *KCNQ2* génben. Ez már a későbbi vizsgálatok alapjául szolgálhatott. Ezt felhasználva fehérjét lehet létrehozni, melynek szerkezete vizsgálható, így megérthető ezen mutáció milyen változást hoz létre a csatornába. Megérthető ezáltal működése, hiszen kiderül milyen funkció esik ki a Ser113Phe mutáció esetén. Lehet tanulmányozni azt is a későbbiekben így létrejövő modellen milyen anyagok javítják vagy ellensúlyozzák a mutáció által létrehozott működési zavart.

Ritka betegségek esetén az ilyen modelleken keresztül van lehetőség vizsgálni és megérteni a betegséget, hiszen szerencsére csak kevés embernél alakul ki a betegség.

A mutáció ismerete már előrejelezheti a kórkép súlyosságát [7], meghatározhatja a betegek kezelését.

VII. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Balogh István Professzor Úrnak, a Klinikai Genetikai Tanszék vezetőjének, aki szakmai tudásával segítette munkámat, középiskolásként lehetőséget adott, hogy betekintést nyerjek a kutatásba.

Köszönöm Bálega-Molnár Csillának a labormunkám során nyújtott sok segítségéért, megtanított a precíz munkára és nem hagyott elveszni a vizsgálatok útvesztőjébe egyértelmű és szemléletes magyarázataival.

Felkészítő tanárainknak Dr. Krakompergerné Aros Adriennek és Dr. Krakomperger Zsoltnek, akik hittek bennem és irányítottak tanulmányaim alatt is. Mindig együtt izgultak velem minden lépcsőfoknál.

És nem utolsósorban családomnak, akik mindig támogattak és segítettek.

VIII. Irodalomjegyzék

1. Richter T, Nestler-Parr S, Babela R, Khan ZM, Tesoro T, Molsen E, Hughes DA; International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research Rare Disease Special Interest Group. Rare Disease Terminology and Definitions-A Systematic Global Review: Report of the ISPOR Rare Disease Special Interest Group. *Value Health*. 2015 Sep;18(6):906-14. doi: 10.1016/j.jval.2015.05.008.
2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3785> utolsó hozzáférés: 2023.04.15.
3. Xiao T, Chen X, Xu Y, Chen H, Dong X, Yang L et al. Clinical Study of 30 Novel KCNQ2 Variants/Deletions in KCNQ2-Related Disorders. *Front Mol Neurosci*. 2022 Apr 26;15:809810. doi: 10.3389/fnmol.2022.809810
4. Falsaperla R, Criscione R, Cimino C, Pisani F, Ruggieri M. KCNQ2-Related Epilepsy: Genotype-Phenotype Relationship with Tailored Antiseizure Medication (ASM)-A Systematic Review. *Neuropediatrics*. 2023 Oct;54(5):297-307. doi: 10.1055/a-2060-4576.
5. Kato, M., Yamagata T, Kubota M, Arai H, Yamashita S, Nakagawa T, et al. Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation. *Epilepsia* 2013;54(7): 1282-1287. doi: 10.1111/epi.12200
6. Weckhuysen S, Mandelstam S, Suls A, Audenaert D, Deconinck T, Claes L et al. KCNQ2 encephalopathy: emerging phenotype of a neonatal epileptic encephalopathy. *Ann Neurol*. 2012 Jan;71(1):15-25. doi: 10.1002/ana.22644
7. Ritter DM, Horn PS, Holland KD. In silico predictions of KCNQ variant pathogenicity in epilepsy. *Pediatr Neurol* 2021; 118:48-54.
8. Miceli F, Soldovieri MV, Weckhuysen S, Cooper E, Tagliatela M. KCNQ2-Related Disorders. 2010 Apr 27 [updated 2022 May 19]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Amemiya A, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2025.
8. Millichap JJ, Park KL, Tsuchida T, Ben-Zeev B, Carmant L, Flamini R et al. KCNQ2 encephalopathy: Features, mutational hot spots, and ezogabine treatment of 11 patients. *Neurology Genetics* 2016 Oct; 2(5): e96. doi: 10.1212/NXG.0000000000000096
9. Brickel N, Hewett K, Rayner K, McDonald S, De'Ath J, Daniluk J et al. Safety of retigabine in adults with partial-onset seizures after long-term exposure: focus on unexpected

ophthalmological and dermatological events. *Epilepsy Behav.* 2020 Jan;102:106580. doi: 10.1016/j.yebeh.2019.106580

10. Fernandez L, Gedela S, Tamber M, Sogawa Y. Vagus nerve stimulation in children less than 3 years with medically intractable epilepsy. *Epilepsy Res.* 2015 May;112:37-42. doi: 10.1016/j.epilepsyres.2015.02.009.

11. Balogh István, Kappelmayer János Molekuláris diagnosztika, on-line jegyzet, 2011. <https://dtk.tankonyvtar.hu/xmlui/handle/123456789/8731> utolsó hozzáférés: 2023.04.15.

12. Bodai László A rekombináns DNS technikában használt főbb módszerek és eszközök: vektorok, enzimek, hibridizáció, PCR, DNS szekvencia meghatározás. Segédlet a BSc záróvizsgára felkészüléshez, SZTE 2020

13. Andruch V, Kocúrová L, Balogh I.S., Škrliková J. Recent advances in coupling single-drop and dispersive liquid–liquid microextraction with UV–vis spectrophotometry and related detection techniques. *Microchemical Journal*, Volume 102, 2012, Pages 1-10, ISSN 0026-265X, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.10.006>.

14. Desjardins P, Conklin D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp.* 2010 Nov 22;(45):2565. doi: 10.3791/2565.

15. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Electrophoresis> utolsó hozzáférés: 2023.04.15.

16. Vasil Andruch, Livia Kocúrová, Ioseph S. Balogh, Jana Škrliková, Recent advances in coupling single-drop and dispersive liquid–liquid microextraction with UV–vis spectrophotometry and related detection techniques, *Microchemical Journal*, Volume 102, 2012, Pages 1-10, ISSN 0026-265X, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.10.006>.

Függelék

Saját munka

- laboratóriumban az eredményekben is bemutatott lépéseket végeztem el ellenőrzés mellett
- saját ábrák elkészítése
- előadás elkészítése
- pályamunka elkészítése