

**FENOTÍPUS ÉS GENOTÍPUS ELEMZÉSEK  
RETT SZINDRÓMÁBAN**

PhD értekezés

**Dr. Kárteszi Judit**

PTE Orvosi Genetikai és Gyermekfejlődéstani Intézet

Témavezető: Dr. Kosztolányi György egyetemi tanár  
Programvezető: Dr. Melegh Béla egyetemi tanár

2005

## BEVEZETÉS (IRODALMI ÁTTEKINTÉS)

### 1. A Rett szindróma klinikai jellemzői

A Rett szindróma (OMIM 312750) idegfejlődési rendellenesség, amelynek gyakorisága irodalmi adatok alapján 1/10000-1/-15000 között van. Hagberg és munkatársai 1983-ban megjelent angol nyelvű cikke után nagyobb figyelem fordult e különleges betegség felé, amely úgy tűnt, hogy csak leányokat érint. A klasszikus Rett szindróma kritériumait 1988-ban nemzetközi megegyezés alapján alkották meg: normális perinatális időszak, normális születés kori fejkörfogat, látszólag normális pszichomotoros fejlődés az első 6 hónapban, fejkörfogat növekedés lelassulása, a tudatos kézhasználat elmaradása, súlyos beszédzavar kialakulása, ataxia, pszichomotoros elmaradás és sztereotíp kézmozgások.

Látszólag normális a fejlődés az első hónapokban (pre-regresszió), de néhány jel utalhat már a betegségre, például az izomtónus zavar, nyelvnyújtogatás, abnormális szem- és ujjmozgás, kéz sztereotípiák és tremor. A regresszió 6-18 hónapos korban kezdődik a beszéd elvesztésével, ataxiás járással, alvászavarral, viselkedésváltozással és autisztikus jegyekkel. Irregularis légzés és sztereotíp kézmozgás jelenik meg. Az epilepszia, ízületi deformitás, scoliosis, osteoporosis és dystrophia a betegség késői manifesztációi (poszt-regresszió). A hirtelen halál esélye megemelkedett, hátterében feltehetőleg szívritmia, illetve agytörzsi diszfunkció áll.

A Rett szindróma klinikai megjelenése eltérhet a klasszikus tünet együttestől, variánsai a már korai csecsemőkorban kezdődő, korai epilepsziával járó súlyos formák és az enyhébb, úgynevezett „forme fruste” vagy „preserved speech” variánsok.

### 2. A Rett szindróma genetikai háttere

A Rett szindróma X-hez kötötten öröklődik, az esetek többsége sporadikus, de ismertek familiáris esetek is. A betegség genetikai okát tekintve számos találgatás látott napvilágot, végül 1999-ben írták le hátterében az X-kromoszómán elhelyezkedő methyl-CpG-kötő fehérje 2 gén (*MECP2*) mutációit. Az *MECP2* az X-kromoszóma hosszú karján az Xq28 régióban helyezkedik el, és egy ubikviter fehérjét (methyl-CpG-kötő fehérje 2: MeCP2) kódol.

A 4 exonból álló gén két fő funkcionális doménnel rendelkezik: a „methyl-CpG-binding domain” (MBD) és a „transcriptional repression domain” (TRD). A fehérje a „histone-deacetylase complex” (HDAC) felépítésében vesz részt, és eddig még nem ismert gének átíródását gátolja. Korábbi tanulmányok azt találták, hogy a TRD-ben található vagy nonsense mutációk súlyosabb klinikai képet okoznak, mint az MBD-ben található vagy missense mutációk, de pontos összefüggést nem tártak fel.

A különböző tanulmányok a Rett szindrómás betegek kb. 50-80%-ában kimutatták az *MECP2* gén valamilyen mutációját.

A lányoknál jóval ritkábban, fiúknál is leírták már az *MECP2* gén mutációit. A csekély előfordulási arányt magyarázhatja, hogy a mutáció létrejötte fiúknál gyakran már intrauterin elhalással, esetleg a születést követő egy-két éven belüli

halállal jár, amikor nem születik diagnózis a nem specifikus tünetek miatt. Egy másik magyarázat, hogy a megfigyelések alapján a mutáció gyakoribb az apai eredetű X kromoszómán, ami a fiú utódoknál hiányzik. Az X-hez kötött öröklődéssel kapcsolatban a mai napig sok a tisztázatlan kérdés, ez magyarázza, hogy mindezen megfontolások csak hipotézisek.

### **3. Az X-inaktiváció szerepe**

A Rett szindrómás gyermek fenotípusának meghatározásában, a jelenlegi elképzelések alapján, a mutáció típusán és helyén kívül fontos szerepet játszik az X-inaktiváció is. A Lyon-hipotézis szerint a női sejtekben jelenlévő két X-kromoszóma közül az egyik (vagy az apai, vagy az anyai) inaktívvá válik az embrionális élet kezdetén. Az aktív X-en bekövetkező károsodás, mutáció vezethet leginkább a sejt abnormális működéséhez.

Random X-inaktivációról beszélünk, ha az apai vagy az anyai X megközelítőleg fele-fele arányban inaktiválódik a sejtekben. Non-random (eltolódott) X-inaktiváció esetén ugyanazon szülőtől származó X inaktiválódik a sejtek több mint 80%-ában.

Ismert olyan eset, amikor tünetmentes, vagy csak minimális tüneteket mutató, *MECP2* gén mutációt hordozó nőben kimutatták az extrém mértékben eltolódott X-inaktivációt. Az eddigi vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy Rett szindrómásokban, csakúgy, mint más X-hez kapcsolódó betegségekben, gyakrabban fordul elő eltolódott X-inaktiváció, mint a normál populációban.

### **4. Az MeCP2 fehérje funkciója és vizsgálata**

A betegség leírása, genetikai diagnosztikája mellett egyre nagyobb erőfeszítések történnek a kezelés irányában. Erre a lehetőséget az adhatja, ha a kóros fehérje szerepe a pathogenezisben tisztázódik.

Az MeCP2 a metilált DNS-hez kötődve kulcsszerepet játszik az úgynevezett „transzkripciós silencing” komplex kialakításában. A komplex feladata a hiszton deacetilálása, amely a kromatin tömörödéséhez vezet. A kromatin ebben a formában elérhetetlenné válik az átíró transzkripciós faktorok számára. Az elméletek szerint az MeCP2 fehérjének jelentős szerepe van a korai agyi fejlődésben. Kevés irodalmi adat áll rendelkezésre a fehérje vizsgálatát illetően. Az ismert, hogy egy ubiquiter fehérjéről van szó, amely különböző mennyiségben expresszálódik a különböző szövetekben.

## **VIZSGÁLATI CÉLKITŰZÉSEK**

**I.** Fenotípus-genotípus elemzésünk alapja a részletes klinikai megfigyelés, a tünetek leírása és a betegség lefolyásának követése volt. Munkánk során a genetikai vizsgálatokat részletes klinikai vizsgálat előzte meg, amely magába foglalta a részletes anamnézist (kérdőív), fizikális vizsgálatot, röntgen vizsgálatokat, ortopédiai vizsgálatot, pszichológiai és neurológiai vizsgálatot, valamint az EEG elemzést, néhány esetben a cardiológiai és gerinc DEXA vizsgálatot is. Jelen dolgozat az anamnézis és fizikális vizsgálat során nyert információk összefoglalását tartalmazza.

2. 2001 óta végezzük a klinikai vizsgálatok alapján Rett szindrómásnak tartott betegeknek az *MECP2* mutáció analízisét. Célul tűztük ki annak megállapítását, hogy a magyarországi Rett szindrómás betegek körében kimutatható-e olyan számú esetben mutáció, mint amennyi az irodalmi adatok alapján várható.

3. Napjainkban az érdeklődés középpontjába került minden betegségben, így Rett szindrómában is, annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy van-e direkt összefüggés a klinikai kép és egy adott mutáció (mutáció típus) között, vagy egyéb faktorok is szerepet játszanak a fenotípus kialakításában.

4. Az irodalmi adatok ismeretében vizsgáltuk, hogy a mutáció analízissel pozitívnak bizonyult magyar Rett szindrómás betegek körében milyen arányban fordul elő eltolódott X-inaktiváció, ez milyen kapcsolatban áll a mutáció típusával, és milyen lehetséges hatással van a fenotípus kialakítására.

5. Az MeCP2 fehérje sejten belüli elhelyezkedését vizsgáltuk immunfluoreszcens technikával gyorsan osztódó sejteken (daganatos sejtvonal), normális humán lymphocytákon és mutációval rendelkező Rett szindrómás betegek lymphocytáin.

## **BETEGEK ÉS MÓDSZEREK**

### **1. A vizsgált betegpopuláció**

2001-ben kezdtük el a magyarországi Rett szindrómás betegek prospektív klinikai és genetikai vizsgálatát. Először azoknak a betegeknek a szüleit kerestük fel levélben, akiket a Rett Szindróma Társaság számon tartott. Az általuk elküldött címlista szerint ez 47 beteget jelentett, közülük 22-en jelentkeztek levelünkre. A későbbiekben több fórumon beszámoltunk az első eredményekről, amelyet követően Magyarország minden tájáról érkeztek betegek, akiknél a Rett szindróma gyanúja merült fel. Törekedtünk arra, hogy minden gyermeket személyesen is megvizsgálhassunk, sok esetben azonban, az ország távolabbi részeiből, csak a vérmintát kaptuk meg. Eddig összesen 66 leány genetikai vizsgálatát végeztük el, egyenlőre csak 37 betegnél volt lehetőségünk a részletes fenotípus elemzés elvégzésére is.

### **2. A fenotípus elemzés módja**

A betegség kialakulásának, lefolyásának pontos leírásához szerkesztettünk egy kérdőívet, amely hat nagyobb részre tagolódott: családi anamnézis, perinatális anamnézis, pszichomotoros fejlődés, szociális fejlődés, korábbi anamnézis, jelen panaszok. Minden betegnél részletes belszervi és neurológiai vizsgálatot végeztünk.

A fenotípus elemzést irodalmi ajánlások alapján végeztük el. Az 1. táblázatban foglaltuk össze a vizsgált tüneteket és az alkalmazott pontozási rendszert: összesen 21, a betegségre jellemzőnek tartott tulajdonságot vizsgáltunk, és a súlyosság alapján 0-2 vagy 0-1 pontot adtunk, a maximális összegzett pontszám 39 lehetett. Minél súlyosabb, illetve jellegzetesebb volt egy adott betegnél a klinikai kép, annál magasabb pontszámot kapott.

1. táblázat: A fenotípus elemzés pontozási rendszere

<b>Vizsgált paraméter</b>	<b>Pont=0</b>	<b>Pont=1</b>	<b>Pont=2</b>
<b>Pszichomotoros fejlődés</b>	normális	6 hónapos korig normális, de regresszió	lassú már $\leq 6$ hónapos korban
<b>Regresszió kezdete</b>	$\geq 18$ hónapos korban	6-18 hónapos korban	$\leq 6$ hónapos korban
<b>Születés kori fejkörfogat</b>	normális, nincs csökkent növekedés	normális, de csökkent növekedés	nem alkalmazzuk
<b>Aktuális fejkörfogat</b>	$\geq 50$ percentil	25-50 percentil	$\leq 3$ percentil
<b>Testsúly</b>	$\geq 10$ percentil	3-10 percentil	$\leq 3$ percentil
<b>Scoliosis</b>	nincs	van	operálták
<b>Sztereotípiá</b>	soha	az idő 25-50%-ában	az idő 75-95%-ában
<b>Kézhasználat</b>	normál, önállóan eszik	valamennyi, segítséggel eszik	nincs
<b>Beszéd</b>	normál	néhány szótag	nincs
<b>Epilepszia</b>	nincs	Pozitív EEG, de nem igényel kezelést	kezelést igényel
<b>Légzés</b>	normál	abnormális	nem alkalmazzuk
<b>Microcirculatio</b>	normál	hideg kezek, lábak	nem alkalmazzuk
<b>Nyelvkészség</b>	valamilyen beszéd	gügyögés, szótagok	kiáltás, nincs hangképzés
<b>Alvászavar</b>	nincs	időnként	kifejezett
<b>Motoros készség (felülés)</b>	$\leq 8$ hónapos korban	$\geq 8$ hónapos korban	nem ül önállóan
<b>Járás</b>	normál	ataxiás	soha nem járt, vagy elvesztette a képességét
<b>Járás kezdete</b>	$\leq 18$ hónapos korban	18-30 hónapos korban	$\geq 30$ hónapos korban, soha
<b>Non-verbális kommunikáció</b>	megőrzött, akaratlagos	jó szemkontaktus	nincs szemkontaktus
<b>Izomtónus</b>	normál	enyhén kóros	súlyos zavar
<b>Izületi kontraktúrák</b>	nincs	enyhe	súlyos
<b>Hangulati labilitás</b>	nincs	van	nem alkalmazzuk
<b>Érzelmek kifejezése, megértése</b>	nincs	van	nem alkalmazzuk

### 3. Az *MECP2* mutáció analízise direkt szekvenálással

A DNS izolálás perifériás vérből kisózással történt. Az *MECP2* gén 3 kódoló exonjának (2-es, 3-as és 4-es exon) amplifikálásához az irodalomban korábban publikált hat primer párt használtuk. A PCR reakciót 50 µl végtérfogatra számolva a következőképpen állítottuk össze: 1X PCR puffer (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; 0.1 % Triton X-100); 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 µM a dATP, dCTP, dTTP, dGTP nukleotidok mindegyikéből; 0.04 µM a forward és reverse primerből; 40 ng/µl DNS. A PCR kivitelezése MJR PTC-150 típusú készüléken történt a következő kondíciók szerint: elődenaturálás 2 perc 96 °C-on, ezt követően 35 cikluson keresztül 1 perc denaturálás 96 °C-on, 1 perc primer kötés 55 °C-on és 1 perc extenzió 72 °C-on, amelyet 5 perc végső extenzió követett 72 °C-on. A PCR termékeket direkt forward és reverse szekvenálással analizáltuk ABI PRISM 310 automata szekvenálóval, Big Dye terminátor reagensek felhasználásával.

### 3. Az X-inaktivációs vizsgálat módszere

A leggyakrabban - és általunk is - használt technika a humán androgén receptor gén teszt, amely a génben található CAG trinukleotid ismétlődések számának polimorfizmusán alapul. Az androgén receptor génben egy metiláció szenzitív enzim (*HpaII*) hasítási helyei találhatóak. Az enzimmel végzett emésztéskor a metilcsoportokkal jelölt inaktív szál védett, ép marad, az aktív szál viszont metilcsoportok hiányában elhasad.

A DNS izolálás perifériás vérből kisózással történt. PCR reakciót végeztünk a gyermek emésztett és emésztetlen DNS-ével, valamint az egyik szülő DNS mintájával az alábbiak alapján. A vizsgált gyermek DNS-ét *HpaII* metiláció szenzitív restriktív endonukleázzal megemésztettük a gyártó (MBI FERMENTAS) ajánlása szerint.

A polimeráz lánreakcióhoz használt primer párok:

SBMA-A: TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC, és SBMA-B: GCTGTGAAGGTT GCTGTTCCAT.

A PCR hőprogram a következő volt: 5 perces 95 °C-os elődenaturáció után 30 cikluson keresztül 1 perc denaturálás 96 °C-on, 1 perc primer kötődés 62 °C-on és 1 perc extenzió 72 °C-on, amelyet a program végén 10 perc végső extenzió követett. A detektálás 2%-os agaróz gélelektroforézissel és 8%-os poliakrilamid gélelektroforézissel, etídium-bromidos festéssel és ezüstözéssel történt.

A módszer nem informatív, ha a két allélen a trinukleotid ismétlődések száma megegyezik, vagy csak kis mértékben tér el egymástól. Random inaktivációnak értékeljük a vizsgálatot, ha az emésztetlen DNS-en végzett PCR reakció mintázata megegyezik azzal, amit az emésztett DNS minta adott. Non-random (eltolódott) inaktivációról beszélünk, ha az emésztett DNS-sel végzett PCR mintázatában az egyik allélnek megfelelő band (ez az aktív szál) hiányzik.

#### **4. Az immunfluoreszcens vizsgálat leírása**

A következő pontban leírt vizsgálatok (immunfluoreszcens festés és flow citometria) a PTE Patológiai Intézetben történtek.

##### **A módszer beállítása REH daganatos sejteken:**

A REH sejtuszpenziót (human, leukémiás sejt vonal, pre-B sejt) lecentrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük, PBS-sel mostuk.

A fixálás 1%-os formaldehiddel szobahőmérsékleten történt (10 perc), majd centrifugáltuk a mintát, a felülúszót leöntöttük.

2 ml PBS-t mértünk a sejtekre, majd kettéválasztottuk a mintát, centrifugáltunk, a felülúszót leöntöttük.

Az egyikhez hozzáadtuk az anti-MeCP2 antitestet (Santa Cruz goat antitest, 1:100 hígítás, 100 µl), a másik volt a kontroll. 37 °C-on inkubáltuk 40 percig, ezt követően PBS-sel mostuk.

Mindkét csőhöz anti-goat FITC jelölt második antitestet adtunk, 37 °C-on inkubáltuk 40 percig. PBS mosást végeztünk, majd az utófixálás 0,1 %-os formaldehiddel történt (200 µl). A centrifugálás minden lépésnél 1200 rpm-en, 10 percig történt.

##### **Human lymphocytákon végzett vizsgálat menete:**

A sejtek nyerése két módon történt:

1, a heparinos csőbe levett vért Ficollra rétegeztük (1:2 arányban), és 3000 rpm-mel, 30 percig centrifugáltuk. A mononuclearis fractiót leszívtuk, fiziológiás sóval mostuk, lecentrifugáltuk a mintát, a felülúszót leöntöttük.

2, egyébként a karyotipizáláshoz használt Chromosome Medium IA táptalajra (GIBCO) 5 csepp vért cseppentettünk, a szuszpenziót 72 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. Lecentrifugáltuk, a felülúszót leöntöttük, és 8 ml 0,05 M KCl-os hipotonizáló oldatot mértünk rá, 30 percig 37 °C-on inkubáltuk, majd fiziológiás sóval mostuk.

A fixálás, illetve a vizsgálat további menete mindkét esetben úgy történt, mint a daganatos sejt vonalnál, annyi különbséggel, hogy a mosásokat fiziológiás sóval, nem PBS-sel végeztük.

A szuszpenziókból tárgylemezre cseppentettünk, megszáritottuk őket, majd DAPI-val háttérfestést végeztünk. A lemezeket Nikon FXA fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A flow citometriás vizsgálat Partec PAS II típusú készülékkel történt.

## **EREDMÉNYEK**

### **1. A klinikai vizsgálatok eredményei**

A Rett szindróma klasszikus definíciója szerint a korai pszichomotoros fejlődés normális, ezért a szerkesztett kérdőív tartalmazta az erre vonatkozó kérdést. Több esetben beszámoltak a szülők arról (a fenotípus elemzésben résztvevő 37 gyermek közül 25-nél), hogy már az első hónapokban jelentkezett valamilyen tünet a következők közül: furcsa testtartás, figyelmetlenség, érdektelenség, tremor, etetési nehézség, súlyfejlődés késés, aluszékonyság, feltűnő nyugodtság, vagy az, hogy a

csecsemő nem mosolygott. Egy nemrégiben megjelent közlemény szintén hangsúlyozza, hogy vannak korai jelek, amelyek Rett szindrómára utalhatnak.

A leányok több mint felében (21/37) a mozgásfejlődés elmaradása már 6 hónapos korban, vagy előtte elkezdődött. A születéskori fejkörfogat minden esetben normális volt (a fenotípus pontozási rendszert a jövőben úgy módosítjuk, hogy születéskori microcephalia esetén nem adunk 2 pontot, mert ez, vizsgálataink alapján, nem jellemző a betegségre), a vizsgálat időpontjában azonban már 28 betegben microcephaliát észleltünk, és nem volt olyan eset, ahol a fejkörfogat elérte volna az 50 percentiles értéket. 15 gyermeknél súlyos dystrophia volt jó étvágy mellett. Nem tartozik a klasszikus tünetek közé, de 12 esetben alacsony testmagasságot (<3 percentil) is észleltünk. Scoliosist 19 betegnél találtunk.

A betegség kardinális tünetének számító sztereotíp kézmozgást minden betegünkönél megfigyeltük, az esetek többségében a kézmozgás állandó volt. A kézmozgás típusa legtöbbször jellemző, kitekert csuklóval dörzsölik össze kezeiket, azonban más fajta kézmozgás is megjelenhet (pl. kezüket szájukba veszik, vagy kezükkel szájukat ütögetik). Adataink szerint a sztereotíp kézmozgás átlagosan 3 éves kor körül kezdődik (8 hó-6 év), tehát a legtöbb esetben nem tartozik az igazán korai jelek közé.

A betegség másik klasszikus jelének számít, hogy a tudatos kézhasználat elveszik, azonban 23 betegben megfigyelhető volt valamilyen szintű kézhasználat (segítséggel eszik, tárgyért nyúl, tárgyat rövid ideig megfog). A 14 betegünk a balkezét részesítette előnyben.

Megfigyelésünk szerint leginkább a beszédfejlődésre jellemző a betegség karakterisztikus jegyének tartott normális fejlődés, majd regresszió. Betegeink többsége 1 éves korában elkezdett szavakat mondani, majd átlagosan 1,5-2 éves korban a fejlődés megtorpant és visszafejlődött, néhány betegnél maradt csak meg néhány szó mondása. A legtöbb esetben azonban csak kiabálás, gügyögés volt jellemző (32/37). A beszédfejlődés e jellegzetes megtorpanása a Rett szindróma egyik korai jelének tekinthető.

Manifeszt epilepszia 18 leánynál volt, általában 4-5 éves életkorban kezdődött, 7 esetben azonban 2 éves kor előtt lépett fel. 5 gyermeknél csak az EEG mutatott eltérést, de görcs nem volt. Légzésszavart (szapora légzést, légzésvisszatartást vagy levegőnyelést) 21 esetben észleltünk. Jellemző tünetként említhető a microcirculatio zavara (a kezek és/vagy lábak hidegek voltak a 26 betegben), és az izületi kontraktúra, főleg az Achilles-ín kötöttsége (29/37).

Izomtónus eltérést a legtöbb esetben észleltünk (30/37), ez leggyakrabban törzs közeli hypotóniát, és a végtagokban fokozott tónust (felső végtagokban rigiditás) jelentett. Az esetek egy részében a mélyreflexek élénkek voltak, de kóros reflexet nem észleltünk.

Alvászavar a betegek többségében (31/37) nem volt, leginkább a regresszió időszakára lehet jellemző, a viselkedésváltozással együtt.

Vizsgálataink alapján a sztereotíp kézmozgás és a beszédfejlődés megtorpanása mellett a Rett szindróma legjellemzőbb tünete a járás zavara. A járás késik vagy a gyermek nem tanul meg járni (22/37). Ataxiás járást észleltünk mindegyik járási tudó gyermeknél. Felülni 12 leány nem tudott.



A súlyos mentális elmaradással járó betegségek körében különlegesnek számít a Rett szindróma azon vonása, hogy a gyermekek érzelmileg kötődnek környezetükhöz, érzelmeiket kifejezik, környezetük érzéseit megértik (1 beteg kivételével minden gyermek szülei erről számoltak be). Eredeti fenotípus elemzésünk ezt a jellemzőt nem tartalmazta, mert az irodalmi ajánlásokban nem szerepelt. Vizsgálataink alapján azonban ezt a vonást a betegségre jellemzőnek gondoljuk (a fenotípus pontozási rendszert ezzel a jellemzővel a jövőben kiegészítjük, pont=0: nincs érzelmi kötődés, pont=1: van érzelmi kötődés, pont=2: nem alkalmazzuk). A Rett szindrómás gyermekek kívánságait a legtöbb esetben kifejezik a non-verbális kommunikáció eszközeivel (pl. szemkontaktus). Gesztusokat viszont nem utánoznak. Hangulati labilitás 21 esetben volt észlelhető.

A fenotípus pontozás értékelésekor az életkort fontos figyelembe venni, hiszen vannak olyan jellemzők, amelyek idősebb életkorban jelennek csak meg (pl. scoliosis, epilepsia, érzelmi kötődés), és vannak olyanok, amelyek kisgyermekkorban észlelhetők (pl. alvászavar, viselkedésváltozás, szemkontaktus kerülése). Betegeinket 6 éves kor alatti és feletti korcsoportra osztottuk (decimális életkort számítottunk). A legfiatalabb beteg 1,7, a legidősebb 21,2 éves volt (4. táblázat a „Fenotípus-genotípus elemzés” fejezetben). A fenotípus pontozáskor kapott legalacsonyabb pontszám 11, legmagasabb 33 volt. A 6 évesnél fiatalabb betegek átlag pontszáma valamivel alacsonyabb volt (20,4), mint a 6 évesnél idősebb betegek átlag pontszáma (23,2).

A fenotípus elemzésben résztvevő betegeket a Rett szindróma klasszikus formájába sorolhatjuk, bár az egyes esetek lefolyása egyedi különbségeket mutatott. Az egyik gyermeknél például, aki az első vizsgálatkor 12,7 éves volt (22-es eset), és ekkor még 40 szavas szókinccse volt, azt gondoltuk, hogy „preserved speech” variáns, de a 2,5 évvel későbbi kontroll vizsgálatkor állapota sokkal súlyosabb volt, már nem tudott beszélni, csak hangadásra volt képes. Egy másik betegünkönél, aki 20,4 éves volt (25-ös eset), a betegség klasszikus tünetei megjelentek kisgyermek korában, viszont vizsgálatunkkor az egyik legjobb állapotú betegnek bizonyult, néhány szót tudott mondani és járásképesége is viszonylag jól megtartott volt („forme fruste” variáns?). Ehhez hasonlóan a 6-os, 11-es és 34-es esetekben is a Rett szindróma enyhébb formáját láttuk, mint a többi betegnél. A 8-as esetünkönél, aki az első vizsgálatkor 7,6 éves volt, és ekkor súlyos állapotot észleltünk (nem tudott állni, járni, súlyos epilepsziája volt, szemkontaktust sem tartott), a 3 évvel későbbi kontroll állapotjavulást mutatott, érdeklődőbbé vált (veleszületett súlyos forma?). Hasonlóan súlyos formáját láttuk a betegségnek a 24-es esetben.

Betegeink között egy ikerpár volt (14-es és 15-ös eset), akiknél a klinikai kép súlyossága jelentősen különbözött egymástól, bár a fenotípus mindkét esetben klasszikus volt.

11 beteg kontroll vizsgálatát végeztük el 1-3 évvel az első vizsgálat után, amely során azt láttuk, hogy az esetek egy részében az állapot stagnál, vagy kissé javul, több gyermeknél viszont fokozatos leromlást észleltünk a mozgás és kommunikáció terén.

Fenotípus elemzésünk végén említjük meg a dysmorphológiai vizsgálatot, amely során feltűnően karakterisztikus külső jelet nem észleltünk. A leányok

többségének kellemes arcvonásai voltak, tekintetük nem utalt arra a súlyos szellemi elmaradásra, amelyet minden esetben megfigyeltünk. Az irodalomból ismert arc aszimmetriát, valamint a kis kezeket és lábakat mi is több betegnél láttuk. Több esetben észleltünk széles, elálló elülső metszőfogakat, amelyről az irodalomban még nem olvastunk. Szinte minden leánynál gótikus szájpadozt észleltünk, amelyet összefüggésbe hoznak a magzat csökkent intrauterin mozgásaival.

A fenotípus elemzés alapján mondhatjuk, hogy minden olyan gyermeknél érdemes a Rett szindróma diagnózisát felvetni, akinél a bemutatott pontrendszerrel 20 feletti érték jön ki. Amennyiben ennél alacsonyabb pontszám van, de a beszédfejlődés fenn részletezett megtorpanása és ataxiás járás észlelhető (obligát tünetek), a Rett szindróma diagnózisa valószínű. Bár a sztereotíp kézmozgás a betegség legismertebb vonása, önmagában nem tekinthetjük abszolút specifikus jelnek. A jellemző sztereotíp kézmozgás a betegség korai stádiumában általában még nem észlelhető, és más ok miatt jelentkező szellemi elmaradásban is megfigyelhető hasonló monoton kézmozgás.

## 2. A mutáció analízis eredményei

Vizsgálataink során eddig 66 leánynál végeztük el az *MECP2* gén mutáció analízisét. A klinikai vizsgálatok alapján 42 esetben tartottuk a Rett szindróma diagnózisát megalapozottnak. Ezek közül 32 esetben (~76%) találtuk meg a mutációt. Ez az arány megfelel más szerzők által korábban észlelt százalékoknak. Tizenegy, már korábban leírt mutációt találtunk 24 betegnél: T158M, R255X – 4 betegnél; R294X, R133C – 3 betegnél; R106W, R168X, és R270X – mindegyikét 2 betegnél; P152R, P225R, 806delG és 1157del41 – mindegyikét 1 betegnél. Nyolc Rett szindrómás betegünkönél detektáltunk korábban még nem közölt mutációt: S134P, T203M, 276insG, 710delG, 1157del32, 1160del7, 1163del35, 1121del191; 1322del9.

Azokban az esetekben, ahol nem tudtunk kimutatni mutációt az *MECP2* 2-es, 3-as és 4-es exonjában, felmerül a gén 1-es exonjának eltérése, illetve más gének szerepe a betegség kialakításában. A legújabb ismeretek szerint korai epilepsziával járó formánál a *CDKL5* génben található mutáció.

Az irodalom az Angelman szindrómát említi, mint fő differenciál diagnosztikai problémát, amelynek oka, hogy Rett szindrómában is gyakran észlelhető akaratlan nevetés, hangulatingadozás. Minden betegünkönél elvégeztük Angelman szindróma irányában a 15-ös kromoszóma specifikus régiójának FISH analízisét és az *MECP2* mutáció negatív betegekönél a 15-ös kromoszóma UPD vizsgálatát is, de eltérést nem találtunk.

## 3. Fenotípus-genotípus elemzés

A fenotípus elemzésben résztvevő 37 beteg közül 28-nál tudtunk kimutatni mutációt az *MECP2* génben (2. táblázat). A mutáció analízis során azt találtuk, hogy a missense (aminósav cserével járó) mutációk döntően az MBD-ben, a nonsense (csonka fehérjéhez vezető) mutációk pedig a TRD-ben fordulnak elő. Ezt a jelenséget az irodalomban azzal magyarázzák, hogy a missense mutációk „enyhébb” klinikai képhez vezetnek, mint a nonsense mutációk, és ha a nonsense

mutáció a gén korai szakaszán található, nem a klasszikus Rett szindrómára jellemző fenotípus, hanem súlyosabb klinikai kép alakul ki, és nem derül fény a diagnózisra.

A részletes fenotípus elemzést összevetve a mutáció analízis eredményével úgy találtuk, nincs direkt összefüggés a mutáció típusa és a klinikai kép között, más tényezőknek is szerepet kell játszaniuk a fenotípus meghatározásában. A részletes elemzés azért néhány jellegzetességet felfedett, bár az esetszám nem olyan nagy, hogy biztos következtetéseket lehessen levonni. A mutációk szempontjából 4 csoportra osztottuk betegeinket (1. nonsense, 2. missense, 3. deléció a 4-es exonban, 4. normál). Elemzésünket a 3. táblázatban foglaltuk össze.

A nonsense mutációs esetekben gyakrabban észleltünk dystrophiát, scoliosist, a súlyos microcephalia is jellemző volt. A missense mutáció esetén gyakoribb volt az alacsony testmagasság. A 4-es exonban lévő deléció esetén a mozgásfejlődés jellemzően már 6 hónapos korban megkésett volt, többségük a vizsgálatkor nem tudott ülni. Légzészavar szinte mindegyik gyermeknél megjelent, a kézhasználat rosszabb volt, mint a többi csoportban, és az epilepszia, hangulati labilitás is gyakoribb volt. Szemészeti problémát (pl. strabizmus) csak ebben a csoportban találtunk.

Kilenc esetben nem tudtunk kimutatni mutációt az *MECP2* gén ismert kódoló régiójában, a klinikai kép viszont egyértelműen Rett szindrómára volt jellemző. Ebben a csoportban a legjellemzőbb közös vonás az volt, hogy minden betegnél a mozgásfejlődés nagymértékben megkésett (csak 5-6 éves korukban tanultak meg járni, illetve többségük nem tanult meg). Az esetek többségében, ahol az *MECP2*-ben mutációt találtunk és a vizsgálat idejében nem tudtak járni, a járásképeség elvesztése későbbi életkorban történt. Ez alól kivétel volt a fenotípus elemzésnél említett két súlyos állapotú beteg (8-as és 24-es), akik nem tanultak meg járni.

Fenti megfigyelésünk szerint tehát a fenotípusban is található különbség azoknál a betegeknél, akiknél nem tudtunk kimutatni mutációt az *MECP2* génben, a klinikai kép alapján azonban a Rett szindróma diagnózisa merül fel. Az irodalomban erre vonatkozóan nem találtunk leírást. Ez a megfigyelés felveti annak lehetőségét, hogy nem egy különálló entitásról van-e szó, amely további tanulmány kérdése lehet.

2. táblázat: A fenotípus-gentotípus elemzésben résztvevő betegek

Eset	Életkor (decimális év)	Mutáció típusa	X- inaktivációs mintázat	Fenotípus pontszám
1	8,8	C880T (R294X)	NR	23
2	11,7	N		29
3	9,9	C316T (R106W)	R	32
4	12,3	C397T (R133C)	NI	22
5	11,7	N		24
6	12,8	C316T (R106W)	NR	11
7	6,0	C455G (P152R)	NR	17
8	7,6	C502T (R168X)	NR	31
9	8,2	C808T (R270X)	R	24
10	21,2	276insG	NR	27
11	8,8	N		15
12	11,5	1121del91;1322del9	R	31
13	13,5	N		21
14	12,5	N		18
15	12,5	N		31
16	8,3	C880T (R294X)	NI	19
17	8,1	C763T (R255X)	NR	16
18	4,7	C397T (R133C)	NR	17
19	9,3	1157del41	R	20
20	13,6	C808T (R270X)	NR	21
21	2,5	C473T (T158M)	NI	21
22	12,7	C880T (R294X)	NR	19
23	8,3	1160del7	R	25
24	18,6	T400C (S134P)	-	33
25	20,4	C473T (T158M)	NR	11
26	1,7	C608T (T203M)	-	23
27	16,9	C473T (T158M)	-	27
28	7,1	N		27
29	3,2	C502T (R168X)	NI	17
30	4,1	1163del35	NI	22
31	6,0	N		29
32	2,8	710delG	NI	24
33	5,8	C763T (R255X)	NR	19
34	4,6	C397T (R133C)	NI	11
35	2,9	806delG	-	18
36	3,6	C763T (R255X)	-	23
37	2,0	N		24

NR: nonrandom, R: random, NI: nem informatív, -: nem volt minta a szülőktől. Kékkel kiemeltük a 6 éves illetve annál fiatalabb betegeket. Azoknál a betegeknél, akiknél az *MECP2* génben nem találtunk mutációt (N) nem végeztünk X-inaktivációs vizsgálatot.

3. táblázat: A Rett szindróma nem obligát, de karakterisztikus jellemzőinek gyakorisága a mutációk csoportosítása szerint (kiemeltük az adott csoportra jellemző tulajdonságokat)

	<i>Nonsense (%)</i>	<i>Missense (%)</i>	<i>Deléció a 4-es exonban (%)</i>	<i>Normál (%)</i>	<i>Összes (%)</i>
Átlag életkor (év)	8	10	6,5	9,5	8,5
Fenotípus pontszám átlaga	21,7	20,4	23,3	22,5	22
<b>6 hónapos kor előtt megkésett pszichomotoros fejlődés</b>	<b>4 (36)</b>	<b>6 (54)</b>	<b>4 (67)</b>	<b>7 (78)</b>	21 (57)
<b>Regresszió kezdete 6-18 hónapos kor között</b>	<b>5 (45)</b>	<b>4 (36)</b>	<b>2 (33)</b>	<b>2 (22)</b>	13 (35)
<b>Microcephalia</b>	<b>9 (89)</b>	<b>8 (73)</b>	<b>4 (67)</b>	<b>6 (67)</b>	27 (73)
<b>Dystrophia</b>	<b>6 (54)</b>	<b>3 (27)</b>	<b>1 (16)</b>	<b>5 (55)</b>	15 (41)
<b>Alacsony növés</b>	<b>2 (18)</b>	<b>5 (45)</b>	<b>1 (16)</b>	<b>4 (44)</b>	12 (32)
<b>Scoliosis</b>	<b>7 (64)</b>	<b>4 (36)</b>	<b>2 (33)</b>	<b>6 (67)</b>	19 (51)
<b>Nincs kézhasználat</b>	<b>5 (45)</b>	<b>3 (27)</b>	<b>4 (67)</b>	<b>2 (22)</b>	14 (38)
<b>Epilepszia</b>	<b>6 (54)</b>	<b>6 (54)</b>	<b>5 (83)</b>	<b>6 (67)</b>	23 (62)
<b>Légzészavar</b>	<b>8 (73)</b>	<b>6 (54)</b>	<b>5 (83)</b>	<b>2 (22)</b>	21 (57)
<b>Microcirculatio zavara</b>	<b>9 (89)</b>	<b>9 (89)</b>	<b>5 (83)</b>	<b>4 (44)</b>	27 (73)
<b>Nem mond szavakat</b>	<b>7 (64)</b>	<b>7 (64)</b>	<b>4 (67)</b>	<b>9 (100)</b>	27 (73)
<b>Alvászavar</b>	<b>3 (27)</b>	<b>2 (18)</b>	<b>1 (16)</b>	<b>0 (0)</b>	6 (16)
<b>Kifejezett motoros elmaradás (nem tud ülni)</b>	<b>1 (9)</b>	<b>3 (27)</b>	<b>2 (33)</b>	<b>6 (67)</b>	12 (32)
<b>Járás kezdete kifejezetten megkésett vagy nem tanult meg</b>	<b>4 (36)</b>	<b>5 (45)</b>	<b>4 (67)</b>	<b>9 (100)</b>	22 (59)
<b>Jó non-verbális kommunikáció</b>	<b>9 (89)</b>	<b>8 (73)</b>	<b>4 (67)</b>	<b>7 (78)</b>	28 (76)
<b>Izomtónus zavara</b>	<b>10 (91)</b>	<b>7 (64)</b>	<b>5 (83)</b>	<b>8 (89)</b>	30 (81)
<b>Izületi kontraktúra</b>	<b>9 (89)</b>	<b>9 (89)</b>	<b>5 (83)</b>	<b>6 (67)</b>	29 (78)
<b>Hangulati labilitás</b>	<b>6 (54)</b>	<b>3 (27)</b>	<b>5 (83)</b>	<b>7 (78)</b>	21 (57)
<b>Összes beteg</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>37 (100)</b>

#### **4. Az X-inaktivációs vizsgálat eredményei**

Az X-inaktivációs vizsgálatot a fenotípus-genotípus analízisben résztvevő, mutációval rendelkező betegek (28 eset) közül 23-nál tudtuk elvégezni, a többi esetben nem állt rendelkezésünkre egyik szülőtől sem DNS minta (2. táblázat). Azoknál a betegeknél, akiknél nem találtunk mutációt, nem végeztük el a vizsgálatot. A 23 eset közül 7 nem volt informatív. Az X-inaktivációs mintázatot 5 betegnél randomnak (~22%), 11 betegnél non-randomnak (~49%) találtuk.

Az irodalmi adatok megoszlanak az eltolódott X-inaktiváció arányáról. A tanulmányok többsége csak kevés esetben talált emelkedett arányú eltolódott X-inaktivációt, Weaving és munkatársai azonban a közelmúltban hasonló arányú eltolódott X-inaktivációt (43%) közöltek, mint amelyet vizsgálataink során mi is találtunk. Adataink tehát - noha az általunk vizsgált esetek száma elmaradt az említett tanulmányétól - megerősítik az X-inaktiváció szerepének jelentőségét a Rett szindróma kialakulásában.

Az X-inaktiváció jelen tudásunk szerint akkor játszódik le, amikor a blastocysta 10-20 sejtből áll. A folyamat legtöbbször random módon történik, a női magzat sejtjeinek felében az apai, másik felében az anyai X kromoszóma inaktiválódik (minden utódsejtben ugyanaz az X kromoszóma inaktiválódik, mint a progenitor sejtben). A normális populációban is észlelhető azonban kis százalékban non-random X-inaktiváció. Amennyiben a zygota olyan sejteket tartalmaz, amelyekben valamilyen kromoszóma rendellenesség van, eddig nem pontosan ismert folyamatok révén döntően azok a sejtek élnek túl, amelyek genetikai állománya normális (esetlegesen mozaik formában lesz jelen a genetikai eltérés). Amennyiben csak néhány normális progenitor sejt volt a blastocystában, a gyermeknél eltolódott X-inaktivációt fogunk észlelni, amennyiben több volt a normális progenitor sejt, az X-inaktiváció random lesz.

X-hez kötött domináns betegségek (a legújabb irodalom felveti, hogy az X-hez kötött domináns és X-hez kötött recesszív meghatározás helyett csak X-hez kötött öröklődést használjunk) esetén logikusan adódik a feltételezés, hogy azok a sejtek élnek döntően túl, amelyekben a mutációt tartalmazó allél inaktiválódik.

A 11 non-random X-inaktivációt mutató esetben egy kivételével azt találtunk, hogy az apai X-kromoszóma inaktiválódott (91%). Az irodalmi adatok alapján a sporadikus Rett szindrómás esetek többségében a mutáció az apai X kromoszómán található.

Azoknál a betegeknél, akiknél a 4-es exonban találtunk deléciót, random X-inaktivációt láttunk (a kis esetszám miatt azonban ebből következtetést nem tudunk levonni).

Vizsgálataink alapján azt mondhatjuk, hogy az X-inaktiváció a Rett szindróma kialakulásában nagy valószínűséggel szerepet játszik, a fenotípus befolyásolásának részletei azonban nem tisztázottak (ugyanúgy észleltünk eltolódott X-inaktivációt az enyhe esetekben, mint klasszikus és súlyos formánál).

#### **5. Az MeCP2 fehérje vizsgálatának eredményei**

A módszer beállítását daganatos sejtvonalon (REH) végeztük el. A pozitív sejtekben (amelyhez az első antitestet hozzáadtuk), a kontrollhoz (nem adtunk hozzá első antitestet) viszonyítva egyértelmű jelintenzitást észleltünk a

sejtmagban. Flow citometriás vizsgálattal el lehetett választani a pozitív és kontroll sejtpopulációt.

Human lymphocita sejteken végezve a vizsgálatot sokkal kisebb jelintenzitást észlelünk a pozitív sejteken, a jelek leginkább a marginális heterochromatinnak megfelelően jelentkeztek. Flow citometriás vizsgálattal nem lehetett a kontroll és pozitív sejteket elválasztani. Elvégeztük a vizsgálatot 3 napos tenyésztésen átesett lymphocita sejteken is, ekkor a jelintenzitás emelkedését észleltük, de flow citometriával ekkor sem lehetett különbséget detektálni.

Mivel a jelintenzitás a tenyésztett sejteken jobb volt, a későbbiekben öt, mutációval rendelkező Rett szindrómás betegnél, tenyésztett sejteken végeztük el az immunfluoreszcens vizsgálatot. A feltevésünk szerint azokban a sejtekben, ahol kóros vagy csonka fehérje képződik, nem mutatható ki jelintenzitás a fehérje C-terminálisához kötődő antitestet alkalmazva. Vizsgálataink során nem észleltünk különbséget a mutációval rendelkező betegek és egészséges kontrollok lymphocytái között (mindkét esetben észleltünk fluoreszcens szignált). Ennek az eredménynek az okát nem tudjuk, felvetődik az X-inaktiváció szerepe, vagy hogy az antitest kötődik a kóros fehérjéhez is, esetleg az, hogy a kóros sejtek nem osztódnak.

Vizsgálataink során azt a megfigyelést tettük, hogy gyorsan osztódó sejteken az MeCP2 fehérje nagyobb jelintenzitással észlelhető, mint differenciált sejteken. A jövőben azt szeretnénk megvizsgálni, hogy lehet-e szerepe e fehérjének a sejtosztódásban.

## **AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE ÉS ÖSSZEFOGLALÁSA**

A szellemi elmaradással járó betegségek nagy részében még tisztázatlan a genetikai háttér. Azoknak a betegségeknek a pontos megismerése, amelyekben igazolódik egy génnek vagy géneknek a mutációja, segíthetnek megfejteni a fenotípus-genotípus összefüggés alapvető szabályait, amelyekről ma még csak sejteink vannak.

A Rett szindróma egy ilyen betegség, X kromoszómán elhelyezkedő génjét (methyl-CpG-binding protein 2, MECP2) 1999-ben fedezték fel. Az eltelt időben több kutatócsoport beszámolt a klinikai kép sajátosságairól, a génben található mutációkról, az X-inaktiváció szerepéről és a fehérje funkciójára vonatkozó adatokról.

**Prospektív vizsgálatainkat 2001-ben kezdtük el, Magyarországon elsőként, az akkor rendelkezésre álló irodalmi adatok áttekintése után. A következő céljaink voltak: 1. a lehető legrészletesebb klinikai vizsgálat elvégzése (olyan tünetek keresése, amelyek nagy biztonsággal felismerhetővé és más betegségtől megkülönböztethetővé teszik a Rett szindrómát), 2. az MECP2 szekvencia analízisének beállítását követően a klinikailag diagnosztizált esetek mutáció analízisének elvégzése, a mutációk hazai gyakoriságának megállapítása, 3. fenotípus-genotípus összefüggés keresése, 4. adatok nyerése a betegség patomechanizmusának megértésére.**

A célkitűzéseinkben feltett kérdésekre válaszolva tanulmányunk alapján (összesen 66 beteg került Rett szindróma gyanújával genetikai vizsgálatra), az

irodalom tükrébe állítva, az alábbi összefoglaló megállapításokat fogalmazzuk meg.

**1. Az elvégzett klinikai vizsgálatok alapján (a 66-ból 37 beteg részletes fenotípus elemzésére volt lehetőségünk) konkrét ajánlást tudunk tenni arra vonatkozóan, hogy milyen klinikai tünetek esetén érdemes elvégezni az MECP2 mutációját:**

- Az irodalmi adatokkal egyezően azt találtuk, hogy a Rett szindrómás gyermekek születéskori antropometriai adatai, különös tekintettel a fejkörfogatra, normálisak.
- **A Rett szindróma irodalomban leírt kritériumai között szerepel a látszólag normális korai csecsemőkori fejlődés, az általunk vizsgált gyermekeknél azonban már az első élethónapokban észlelték a szülők a mozgásban, viselkedésben, figyelemben eltérést.** Ez a megfigyelésünk egyezik egy közelmúltban megjelent közlemény adataival.
- A betegség lefolyására karakterisztikusnak tartják az irodalomban (14) a regresszió időszakát, amely során a gyermek elveszti minden megszerzett képességét (járást, kézhasználatot, beszédet). Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a járásfejlődés a legtöbb esetben kezdettől fogva megkésett, és leginkább a beszédfejlődésre jellemző a normális kezdeti fejlődés, majd regresszió. **Megállapítottuk tehát, hogy a regresszió nem homogén: a betegség egyik korai jele a járás késése, illetve bizonytalansága, látszólag normális kezdeti szellemi fejlődés mellett. Karakterisztikus, hogy a beszédfejlődés normálisan indul, majd 1,5 éves kor körül megáll és visszafejlődik.**
- A klasszikus kritériumok között szerepel a tudatos kézhasználat teljes elhagyása, vizsgálataink során azt találtuk, hogy a gyermekek többségében ez a képesség valamilyen szinten fennmarad.
- **A betegségre jellegzetes sztereotíp kézmozgás késői jelnek tekinthető, csak átlagosan 3 éves kor körül jelentkezik.**
- **Jellemzőnek találtuk betegeinknél azt a vonást, hogy a súlyos szellemi elmaradás mellett az érzelmi értés és kifejezés fennmarad.** Ennek a jellemzőnek a kiemelése nem szerepel az irodalomban található fenotípus elemzésekben, újszerű észrevételünk azonban további megerősítést igényel.

**Mindezek alapján kidolgoztunk irodalmi ajánlásokra támaszkodva egy fenotípus pontozási rendszert, amelynek alkalmazásával jó találati arány (50-80% között) biztosítható az MECP2 mutáció analízis során.**

2. Rett szindrómás betegeknél eddig az MECP2 gén 3-as és 4-es exonjában mutattak ki mutációt, az általunk észlelt mutációk is ebben a két exonban találhatóak (a 2-es exonban nem találtunk eltérést). A missense mutációkat döntően az MBD-ben, a nonsense és frameshift mutációkat pedig, a TRD-ben találtuk, amely egyezik a mutáció adatbázisok (pl. The Human Gene Mutation Database) adataival.

**A klinikai vizsgálatok alapján a 66-ból 42 esetben tartottuk a Rett szindróma diagnózisát megalapozottnak, ezek közül 32 esetben (~76%)**



találtuk meg a mutációt. Ez az eredmény megfelel az irodalomban közölt adatoknak (50-80%).

A hazai Rett szindrómás gyermekek vizsgálata során nyolc esetben korábban még nem közölt mutációt detektáltunk.

**3a. Az X-inaktivációs vizsgálatok során azt találtuk, hogy a Rett szindrómás betegeknel az eddig közölteknel nagyobb arányban (~49%) fordul elő eltolódott (non-random) X-inaktiváció.** Weaving és munkatársai a közelmúltban hasonló arányú eltolódott X-inaktivációt (43%) közöltek. A tanulmányok betegcsoport összetételében lévő különbségeken felül az irodalom sem említi más magyarázatot. **Azt is megfigyeltük, hogy 1 beteg esetének kivételével az apai X-kromoszóma inaktiválódott (91%),** ami abból a szempontból figyelemre méltó, hogy az irodalmi adatok alapján sporadikus Rett szindrómában a mutáció az esetek többségében az apai X kromoszómán található.

**3b. Fenotípus-genotípus elemzésünk eredményét összefoglalva úgy tűnik, önmagában sem a mutáció helye, típusa, sem az X-inaktiváció nincs direkt összefüggésben a fenotípussal.** Egy közelmúltban megjelent közlemény megállapítja, hogy bár direkt összefüggést nem lehet találni, de a részletes elemzéssel feltárhatók összefüggések a klinikai kép és a mutáció típusa között. Vizsgálatunk során nekünk is sikerült néhány, a különböző mutáció típusokra jellemző vonást megállapítanunk (visszautalás: lásd 3. táblázat). Valószínűleg egyes esetekben az X-inaktiváció is befolyásolja a klinikai képet.

**Kiemeljük, hogy azokban a betegekben, akiknél a klinikai kép egyértelműen Rett szindrómára utalt, de nem tudtunk kimutatni mutációt az MECP2 génben, jellemzően súlyosan megkésett mozgásfejlődést észleltünk, amely felveti egy különálló entitás lehetőségét.** Ilyen eseteket más összefoglaló tanulmányok is említene. Valószínűnek tartom, hogy további fenotípus-genotípus elemzések a későbbiekben az MECP2 génen kívül más gének oki szerepére is rávilágítanak. A legújabb ismeretek szerint például korai epilepsziával járó formánál a CDKL5 génben található mutáció.

**4. Az MeCP2 fehérje analízisére végzett vizsgálatok a dolgozat megírásáig csak kezdeti stádiumig jutottak. Az immunfluoreszcens vizsgálatok során azt láttuk, hogy osztódó sejtekben a jelintenzitás sokkal nagyobb, mint differenciált sejtekben. A jeleket a marginális heterokromatinnak megfelelően láttuk.** A betegség mechanizmusának megértéséhez szükségesnek tartjuk e vizsgálatok folytatását. Szeretnénk megérteni a fehérje sejtekben betöltött funkcióját, ennek vizsgálatára Western blott és további immunfluoreszcens vizsgálatokat tervezünk.

## **A DOLGOZAT TÉMÁJÁBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK ÉS IDÉZHETŐ ABSTRAKTOK**

1. *Kárteszi J.*, Hollódy K., Bene J., Morava É., Hadzsiev K., Czakó M., Melegh B., Kosztolányi Gy.: Az MECP2 gén mutációinak analízise direkt szekvenálással magyarországi Rett szindrómás betegekben. *Orv Hetil*, 2004, 145(17): 909-911.
2. *Kárteszi J.*, Hollódy K., Bene J., Morava É., Hadzsiev K., Czakó M., Melegh B., Tészás A., Kosztolányi Gy.: Mutation analysis of MECP2 and determination of the X-inactivation pattern in Hungarian Rett syndrome patients. *Am J Med Genet*, 2004, 131(1): 106. IF: 2,603
3. *Kárteszi J.*, Bene J., Morava É., Czakó M., Hollódy K., Melegh B., Kosztolányi Gy.: Analysis of the MECP2 gene by direct sequencing in Hungarian Rett syndrome patients. *Eur J Hum Genet*, 2002, 10, P0740. IF: 3,136
4. Weisenbach J., Hollódy K., *Kárteszi J.*, Hadzsiev K., Melegh B., Kosztolányi Gy.: Characteristic X-ray sign of Rett syndrome: extreme thin diaphysis with narrow medulla of tubular bones. *Eur J Hum Genet*, 2003, 11, P234. IF: 3,669
5. *Kárteszi J.*, Bene J., Hollódy K., Morava É., Hadzsiev K., Czakó M., Melegh B., Tészás A., Kosztolányi Gy.: Mutation analysis of MECP2 and determination of the X-inactivation pattern in Hungarian Rett Syndrome patients. *Eur J Hum Genet*, 2004, 12, P050.
6. Hollódy K., Bene J., Morava É., Hadzsiev K., Czakó M., Melegh B., Tészás A., *Kárteszi J.*, Kosztolányi Gy.: Phenotypic and Genotypic analysis of Rett syndrome: Prospective study of Hungarian Rett syndrome patients. (közlésre elküldve)

## **MÁS TÉMAKÖRBE MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK ÉS IDÉZHETŐ ABSTRAKTOK**

1. *Kárteszi J.*, Morava É., Czakó M., Gáti I., Czopf J., Kosztolányi Gy., Melegh B.: Kennedy-betegség egy progresszív beszédzavarban szenvedő férfiben. *Orv Hetil*, 2001, 142(35): 1915-1917.
2. *Kárteszi J.*, Morava É., Czakó M., Kosztolányi Gy.: Smith-Magenis-szindróma – genetikailag kódolt viselkedészavar? *Gyermekgyógyászat*, 2001, 52(4): 369-373.
3. Cser B., Morava É., Czakó M., *Kárteszi J.*, Szőnyi L., Wevers R., Kosztolányi Gy.: Veleszületett glikozilációs zavar (CDG-Ia betegség) egy izomhipotóniás, hepatopathiás gyermekben. *Gyermekgyógyászat*, 2003, 54(1): 37-42.
4. Morava É., Bartsch O., Czakó M., Frensel A., *Kárteszi J.*, Kosztolányi Gy.: A girl with cutaneous hyperpigmentation, café au lait spots and ring chromosome 15 without significant deletion. *Genet Counsel*, 2003, 14(3): 337-342. IF: 0,417
5. Morava É., Bartsch O., Czakó M., Frensel A., Kalscheuer V., *Kárteszi J.*, Kosztolányi Gy.: Small inherited terminal duplication of 7q with hydrocephalus, cleft palate, joint contractures, and severe hypotonia. *Clin Dysmorphol*, 2003, 12(2): 123-127. IF: 0,649
6. Morava É., Czakó M., *Kárteszi J.*, Cser B., Weissbecker K., Méhes K.: Ulnar/fibular ray defect and brachydactyly in a family: a possible new autosomal dominant syndrome. *Clin Dysmorphol*, 2003, 12(3): 161-165. IF: 0,649
7. *Kárteszi J.*, Kress W., Szász M., Czakó M., Melegh B., Kosztolányi Gy., Morava É.: Partial craniosynostosis in a patient with deletion 22q11. *Genet Counsel*, 2004, 15(4): 481-483. IF: 0,417
8. *Kártesz J.*, Morava É., Czakó M., Decsi T., Kosztolányi Gy.: Dup 9p syndrome with multiplex hemangiomas and deafness in a familial t(10;22) carrier. *Eur J Hum Genet*, 2001, 9: P0264. IF: 3,173

9. Czakó M., Morava É., Cser B., *Kárteszi J.*, Kosztolányi Gy.: Terminal deletion 4q in a patient with complex chromosomal rearrangement and characteristic phenotype. *Eur J Hum Genet*, 2002, 10: P0330. IF: 3,136
10. *Kárteszi J.*, Morava É., Hadzsiev K., Czakó M., Kosztolányi Gy.: Cutis laxa, lipodystrophy and transient progeroid phenotype in mosaic polyploidy. *Eur J Hum Genet*, 2003, 11: P165. IF: 3,669
11. Cser B., Morava É., Czakó M., *Kárteszi J.*, Kosztolányi Gy.: Hip dysplasia, characteristic face, relative macrocephaly, delayed motor development, failure to thrive and café au lait spots – possible new autosomal dominant syndrome. *Eur J Hum Genet*, 2003, 11: P174. IF: 3,669
12. Czakó M., Szabó L., Morava É., Hadzsiev K., *Kárteszi J.*, Kosztolányi Gy.: Pregnancy outcome in carriers of translocation involving the Miller-Dieker critical region. *Eur J Hum Genet*, 2003, 11: P208. IF: 3,669
13. Morava É., Cser B., *Kárteszi J.*, Huijben K., Szőnyi L., Kosztolányi Gy., Wevers R.: Screening for CDG type Ia in Joubert syndrome. *Med Sci Monit*, 2004, 10: 469-472.
14. Czakó M., Kress W., *Kárteszi J.*, Kosztolányi Gy., Morava É.: Craniosynostosis in a 22q11.2 microdeletion patient without FGFR3 mutation. *Eur J Hum Genet*, 2004, 12: P079.
15. *Kárteszi J.*, Melegh B.: Springer Betegség enciklopédia fejezetei:
  - 18-as trisomia-szindróma
  - 21-es triszómia-szindróma
  - 4p deléció-szindróma
  - 5,10-metiléntetrahidrofolát reduktáz-hiány
  - 5p deléció-szindróma
  - Argininosuccinát-lyase-hiány
  - Argininosuccinát-syntetase-hiány
  - Carbanyl phosphate syntetase-hiány
  - Cisztation B-szintáz hiány
  - Cystinuria
  - Galactokinase-hiány
  - Galactose-1-phosphate uridyltransferase-hiány
  - Hyperargininaemia
  - Homocisztinuria
  - Kobalamin-hiány
  - Mucopolipidosis I.
  - Mucopolipidosis II.
  - Mucopolipidosis III.
  - Mucopolipidosis IV.
  - Mucopolysaccharidosis I. H típus
  - Mucopolysaccharidosis I. H/S típus
  - Mucopolysaccharidosis I. S típus
  - Mucopolysaccharidosis II. típus
  - Mucopolysaccharidosis III. típus
  - Mucopolysaccharidosis IV. típus
  - Mucopolysaccharidosis II. típus
  - Mucopolysaccharidosis VI. típus
  - Mucopolysaccharidosis VII. típus
  - Mucopolysaccharidosisok
  - Ornitin transzkarbamiláz-hiány

Uridine diphosphate galactose-4-epimerase-hiány

Veleszületett fructose intolerancia

X-monosomia-szindróma

XXX-XXXX- és XXXXX-szindróma

XXXY- és XXXXY-szindróma

XXY-szindróma

XYY-szindróma

16. *Kárteszi J.*, Kosztolányi Gy., Czakó M., Hadzsiev K., Morava É.: Transient progeroid phenotype and lipodystrophy in mosaic polyploidy. Clin Dysmorphol (közlésre elfogadva) IF: 0,649

17. Stankovics J., *Kárteszi J.*, Nagy Á., Meng B., Molnár D.: Severe outcome of neonatal meningitis and arterial ischemic stroke – the possible role of hereditary prothrombotic factors. (közlésre elküldve)

### KONGRESSZUSI ELŐADÁSOK

1. *Kárteszi J.*, Morava É., Hermann R., Paschke E. és Kosztolányi Gy.: A Sanfilippo betegség klinikai és enzimszintű diagnosztikája (esetismertetés). A Magyar Gyermekgyógyász Társaság Dél-dunántúli Területi Szervezete Tudományos Ülése (Szigetvár, 2000. szeptember 23.)

2. *Kárteszi J.*, Morava É., Hermann R., Paschke E. és Kosztolányi Gy.: A Sanfilippo betegség diagnosztikája és gondozása (esetismertetés). 6. Magyar MPS Konferencia (Leányfalu, 2000. október 15.)

3. *Kárteszi J.*, Morava É., Czakó M., Decsi T., Kosztolányi Gy.: Dup 9p szindróma egy familiáris 10;22 transzlokációt hordozó betegben. Humángenetikai Társaság III. Kongresszusa (Debrecen, 2001. június 8-9.)

4. Hadzsiev K., *Kárteszi J.*, Melegh B., Kosztolányi Gy.: Early diagnosed Hurler disease (presentation of a new case). 7. Magyar Mucopolysaccharidózis és Társult Betegségek Konferencia (Lillafüred, 2001. október 11-14.)

5. *Kárteszi J.*, Hollódy K., Bene J., Hadzsiev K., Czakó M., Melegh B., Kosztolányi Gy.: Beszámoló a Rett szindrómás gyermekek klinikai és genetikai vizsgálatáról. II. Magyar Gyermekneurológiai, Idegsebészeti, Gyermek- és Ifjúságpszichiátriai Társaság éves kongresszusa (Szeged, 2002. május 31.)

6. *Kárteszi J.*, Bene J., Hadzsiev K., Hollódy K., Melegh B., Kosztolányi Gy.: A MECP2 gén mutációinak analízise direkt szekvenálással Rett szindrómás betegekben. Magyar Humángenetikai Társaság IV. Kongresszusa (Budapest, 2002. november 22.)

7. Weisenbach J., Hollódy K., *Kárteszi J.*: Rett syndroma radiológiai jellegzetessége. Gyermekradiológiai Kazuisztikák (Budapest, 2002. november 9.)

8. *Kárteszi J.*, Bene J., Hollódy K., Morava É., Hadzsiev K., Czakó M., Melegh B., Tészás A., Kosztolányi Gy.: Az MECP2 gén mutáció analízise és az X-inaktivációs mintázat vizsgálata Rett szindrómás betegekben. Magyar Humángenetikai Társaság V. Kongresszusa (Szeged, 2004. november 12-13.)

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Kosztolányi Györgynek, hogy tanított, amelyet a szó legnemesebb értelmében tett. Nemcsak egy betegséggel ismertetett meg, hanem olyan szemléletet is adott, amelynek segítségével lehet hinni a tudomány és az orvoslás értelmében. Ötleteim megvalósítását mindig támogatta, és mindig bizalommal fordulhattam hozzá.

Köszönöm Dr. Méhes Károlynak, hogy tanulhattam tőle az együtt vizsgált betegek kapcsán, és hogy támogatásával elindította a fehérje vizsgálatot.

Köszönetet mondok a program vezetőjének, Dr. Melegh Bélának a munkámhoz nyújtott segítségért.

Szeretném megköszönni Dr. Morava Évának, hogy 2 évig velem lehettem a genetikai tanácsadóban, hogy megtanított beteget vizsgálni, orvosi véleményt és cikket írni, hogy „nagy” diagnózisok felállításában részt vehettem. De legfőképpen a barátságát köszönöm.

A Rett szindróma megismerése során segítséget kaptam több kollégámtól: Dr. Hadzsiev Kingától, Dr. Hollódy Katalintól, Bondor Bertától, Dr. Weisenbach Jánostól. A mutáció analízis elvégzéséhez segítséget nyújtott Berenténé Bene Judit és Oksai Judit, a fehérje vizsgálatokhoz Dr. Méhes Gábor és Deák Linda (PTE Pathológiai Intézet), az X-inaktivációs vizsgálatokhoz Dr. Tészás Alexandra. Köszönöm nekik is.

Köszönöm az Orvosi Genetikai és Gyermekejlődéstani Intézet minden munkatársának, hogy szeretetteljes légkörben dolgozhattam.

Szüleimnek tartozom a legtöbb hálával, mert mindig engedték, hogy a saját utamat járjam, támogattak szeretetükkel és olyan értékrendszert állítottak elém példaként, amelynek az ember mindenképpen meg akar felelni, és ez megerősíti a lelkét.