

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D) ÉRTEKEZÉS

Ritka betegségek speciális genotípus-fenotípus asszociációi

Dr. Hadzsiev Kinga

Témavezető: Prof. Dr. Melegh Béla

Készült:

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Orvosi Genetikai Intézet

2011.

Tartalom

Rövidítések.....	3
1. Bevezetés.....	4
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1. CDG szindróma.....	6
2.2. Rett szindróma.....	7
2.3. Mitokondriális betegségek.....	8
2.3.1. Genetikailag determinált halláskárosodás.....	9
2.3.2. Leigh szindróma.....	11
3. Célkitűzések.....	13
4. A vizsgálatban résztvevő betegek.....	14
5. Módszerek.....	18
5.1. Transzferrin izoelektromos fókuszálás.....	18
5.2. Polimeráz láncreakció (PCR).....	18
5.3. Restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus (RFLP) módszer.....	19
5.4. DNS szekvencia meghatározás és analízis.....	19
5.5. Multiplex ligációfüggő próba amplifikáció.....	20
6. Eredmények.....	21
6.1. A CDG Ix klinikai spektruma.....	21
6.2. A fenotípus-genotípus vizsgálata Rett szindrómában.....	24
6.3. A mtA7445G mutáció miatt kialakult halláskárosodás.....	28
6.4. A mtC11777A mutáció következtében kialakult Leigh szindróma fenotípusa.....	29
7. Eredmények megbeszélése.....	32
7.1. CDG Ix.....	32
7.2. Rett szindróma.....	33
7.3. A mtA7445G mutáció miatt kialakult halláskárosodás.....	35
7.4. A mtDNS 11777C>A mutáció következtében kialakult Leigh szindróma.....	36
8. Összefoglalás.....	38
9. Irodalomjegyzék.....	40
10. Közlemények jegyzéke.....	47

Rövidítések

APP – amiloid prekursor protein

ASD – pitvari sővény defektus

ATP – adenozin trifoszfát

CDG – kongenitális glikozilációs defektus

CDKL5 - ciklin-dependens kináz-szerű 5
gén

EDTA - etilén-diamin-tetra-acetát

FAD – familiáris Alzheimer betegség

FOXG1 - forkhead box protein G1

GJB2 – konnexin26

KSS – Kearns-Sayre szindróma

LLO – lipid- kapcsolt oligoszacharid

LS - Leigh szindróma

MBD - metil-CpG-t kötő domaint

MECP2 - metil-CpG-kötő fehérje 2 gén

MELAS – mitokondriális encefalopátia
laktát acidózis, stroke

MLPA - multiplex ligációfüggő próba
amplifikáció

MTATP6 - mitokondriális ATP szintáz
enzimet kódoló gén

MT-COI-II – mitokondriális citokróm
oxidáz I-II

MT-CYB – mitokondriális citokróm B gén

mtDNS – mitokondriális DNS

MT-ND – mitokondriális NADH
dehidrogenáz enzim

PCR - polimeráz láncreakció

PDA – nyitott ductusz arteriozus

PDHA1 - piruvát dehidrogenáz alfa 1

PMI – foszfomannóz izomeráz

PMM – foszfomannomutáz

PPK - palmoplanatris keratoderma

PSEN – presenilin

PSV – preserved speech variant

RB- retinoblasztoma

RFLP – restrikciós fragmentum hossz
polimorfizmus

rRNS – riboszómális ribonukleinsav

RTT - Rett szindróma

SAD – sporadikus Alzheimer betegség

SDS-PAGE - nátrium dodecil szulfát
poliakrilamid gél elektroforézis,

TIEF – transferrin izoelektromos
fókuszálás

tRNS – transfer ribonukleinsav

1. Bevezetés

A genetikai tudásanyag bővülésével egyre több betegség/betegségcsoport molekuláris patomechanizmusa kerül felismerésre. Így azonosíthatók egyrészt a gyakori, felnőttkori krónikus betegségek háttérében álló genetikai variánsok, másrészt az ún. ritka betegségek pontos diagnosztizálása és differenciáldiagnosztizálása is lehetővé válik. A ritka betegség meghatározása nem egységes, egyik definíciója kizárólag az adott betegségben szenvedő páciensek számára támaszkodik, más meghatározások egyéb faktorokat - mint pl. a betegség súlyossága, vagy megfelelő kezelés elérhetősége - is figyelembe vesznek. Az Egyesült Államokban a meghatározás alapja szigorúan a betegség prevalenciája, eszerint ritka betegségnek számít, ami az USA-ban kevesebb, mint 200000 embert érint, vagy pedig 1500 emberben egyszer fordul elő. Japánban az érvényes meghatározás szerint az országban 50000-nél kevesebb beteg, vagy 2500 egyedből 1 érintett esetén tekintik a kórképet ritkának. Ezzel szemben az Európai Unióban a definíció szerint a ritka betegség az életet veszélyeztető, krónikusan senyvesztő, alacsony prevalenciájú kórkép. Az alacsony prevalencia a későbbiekben 5/10000-ben lett megadva, így az EU-ban ez hozzávetőlegesen 25-30 millió érintettet jelent. Jelen ismereteink szerint 5000-8000 ritka kórkép létezik, és így a világ népességének 6-8 százalékát érinti valamelyik. A ritka betegségek 75%-a gyermekeben fordul elő, akik 30%-a nem éri meg az ötödik életévét (www.eurordis.org).

Egyes ritka betegségek prevalenciája különböző populációkban eltérő lehet, a cisztás fibrózis elterjedtsége például Ázsiában alacsony (1:300000), Európában és európai eredetű populációkban relatívan gyakoribb (1:2500). Kisebb közösségekben - az alapító hatás miatt - egy világszerte nagyon ritka betegség gyakorivá válhat.

E betegségek általában genetikai eredetűek, egyes becslések szerint kb. 80%-ukban azonosították a genetikai háttérét. A molekuláris genetikai vizsgálat, majd ezt követően a genotípus-fenotípus elemzés kapcsán felismerésre került, hogy egyetlen gén mutációja több különböző fenotípus kialakulásában is szerepet játszhat (pl. mitokondriális mutációk), illetve 1 fenotípus háttérében több gén mutációja (pl. Rett szindróma fenotípusa) is leírásra került. A ritka kórképek esetében nagyon gyakran megfigyelhető, hogy a különböző, multisztémás tünetek mentális érintettséggel társulnak. A ritka kórképek molekuláris mechanizmusainak vizsgálata jelentős hatást fejtett ki a gyakori betegségekkel kapcsolatos ismereteinkre is a kórokok felderítése, a patomechanizmusok megértése és a komplexitás megfejtése tekintetében (www.orpha.net).

A kórok felderítésére jó példaként szolgál a retinoblastoma (RB), egy ritka daganat vizsgálata. Alfred Knudson az 1970-es években végzett vizsgálataiban során a RB autoszómális domináns öröklődésű familiáris formáját észlelte, amit összefüggésbe hozott az érintett családban felfedezett 13-as kromoszóma deléciójával, ahol a későbbiekben a RB lókuszt leírták. Knudson feltételezése szerint a daganat kialakulási mechanizmusának az első lépése egy mutáció kialakulása az egyik RB allélon, ami majd továbbörökítődik. Ezt embrionális retinában egy másik, a 13-as kromoszómát érintő mutáció, ún. szomatikus mutáció követi, aminek a következménye a *RB* gén és így az általa kódolt fehérje funkcióinak teljes hiánya lesz. Bert Vogelstein és Robert Weinberg vizsgálataiból tudjuk, hogy a *RB* az első felfedezett tumor szupresszor gén. Későbbi vizsgálatok kiderítették, hogy a sejtproliferáció a tumor szupresszor gének ellenőrzése alatt áll, és mutációik felelősek a daganatok kialakulásáért. A daganatok kialakulásában szerepet játszó első lépéseket egy ritka daganat vizsgálata során ismertük meg.

A sporadikus Alzheimer betegségénél (SAD) lényegesen ritkábban előforduló familiáris (FAD) forma vizsgálata közelebb vitt a betegség két formájának háttérében álló patomechanizmus megismeréséhez. Azokban a családokban, ahol a FAD előfordult, a 21-es kromoszómán elhelyezkedő β -amyloid előalakját, az amyloid prekursor proteint kódoló *APP* gén mutációit észlelték. A későbbiekben emellett a presenilin (*PSEN*) gének hibáit is összefüggésbe hozták a korai FAD kialakulásával. Az *APP* overexpressziója (pl. 21-es triszómia esetén), vagy az *APP*, a *PSEN1* vagy *PSEN2* mutációja a neurotoxikus β -amiloid akkumulációját okozza a neuronokban. Mindez jó példája annak, hogy egy betegség patomechanizmusában több gén eltérése is közrejátszik.

A betegségek komplexitására pedig a mitokondriális működés és az ezzel összefüggésbe hozható betegségek említhetők példaként. A mitokondrium megfelelő működéséhez már eleve a két, fizikálisan és funkcionálisan elkülönült genom, a nukleáris és a mitokondriális DNS összehangolt működése szükséges. A mitokondrium funkciója egyrészt az ATP termelés, de emellett a reaktív oxigén származékokat is termeli, illetve az apoptózisban is kulcsszerepet játszik.

A genetikai eltérések alapján, didaktikailag a ritka betegségek két fő csoportja különíthető el: az egyik csoportot a nukleáris kódolású kórképek, míg a másikat a mitokondriális kódolású kórképek alkotják.

2. Irodalmi áttekintés

Intézetünkben néhány, országos egyedülálló molekuláris genetikai vizsgálat érhető el, ami lehetőséget ad a ritka betegségek bizonyos csoportjainak vizsgálatára. Ezek alapján a továbbiakban az alább részletezett négy ritka betegséggel foglalkozom.

2.1.CDG szindróma

A kongenitális glikozilációs defektus (CDG) az oligoszaharidok N-glikozilációs szintézisében, képződésében és processzáálásban szerepet játszó 21 enzim bármelyikének hiánya miatt fellépő, abnormális oligoszaharid glikoziláció miatt kialakuló anyagcsere rendellenesség (Aebi 1999, Jaeken 1984). Az 1980-es évek végén Jaek Jaeken írta le először az autoszómális recesszív öröklődést mutató, általában gyermekkorban kezdődő rendellenességet (Jaeken 1984). Mivel a testfehérjéknek kb. a fele tartalmaz szénhidrát láncot és az emberi genom közel 1%-a (200-300 gén) szerepet játszik a glikozilációs folyamatokban, ezért a klinikai manifesztáció is rendkívül változatos: a súlyos fejlődésbeli elmaradás, izomhipotónia mellett észlelhető, többszervi – leggyakrabban idegrendszeri, izom és emésztőrendszeri - érintettséggel járó formától a normál fejlődéssel és hipoglikémiával társuló proteinvesztő enteropátiáig terjed. Hasonlóan változatos a kórlefolyás is, a gyermekkorban bekövetkező haláltól, az enyhe felnőttkori érintettségig különböző súlyosság figyelhető meg (Freeze 1998, Grünwald 2002). Alcsoportjainak fenotípusa még nem teljesen ismert, hiszen néhány formájában eddig mindössze egy-egy beteg került felismerésre a világon, és a jelenleg leggyakoribbnak tartott Ia típusból is csak 700 körüli az ismert érintett betegek száma, bár a prevalenciáját 1:20000 körül valószínűsítik (www.orpha.net).

A CDG diagnosztikus tesztje a transferrin izoelektromos fókuszálás, ennek mintázata alapján különíthető el e két fő csoport: az I-es típusában az N-oligoszaharid prekursorok szintézisének egy korábbi szakaszában, míg a II. típusban a szintézis terminális szakaszában, az oligoszaharidok processzáálásában fellépő hiba miatt alakul ki a betegség. Ez a két fő csoport további alcsoportokra osztható (Ia-Io és IIa-IIIh a jelenleg elfogadott felosztás), így 28 alcsoportját különítették el, ezekben a molekuláris genetikai eltérések is ismertek már (Grünwald 2002, Leonard 2001, Di Rocco 2005, Thiel 2003, Kranz 2007).

A biokémiailag megoldatlan eseteket Ix jelzéssel különítjük el az ismert formáktól. Bár a klinikai tünetek nem specifikusak, ebben a csoportban is két további alcsoport különböztethető meg: az egyikben tisztán neurológiai tünetek (fejlődésbeli késés és axiális izomhipotónia), a másikban neurológiai és egyéb szervi tünetek észlelhetők. A ritka, nem CDG specifikus tünetekre fordított fokozott figyelem segítséget nyújthat a klinikusoknak abban, hogy bizonyos tünetek együttes jelentkezésekor a CDG szindróma fennálltára gondoljanak, a klinikai csoportosítás pedig hasznos a prognózis meghatározásában és a genetikai tanácsadásban.

2.2. Rett szindróma

A Rett szindróma (OMIM 312750) egy, főleg lányokban jelentkező súlyos, a központi idegrendszer szürkeállományát érintő, korai fejlődési zavar. A kórképet először Andreas Rett írta le 1966-ban (Rett 1966), majd nemzetközi megegyezés alapján 1988-ban fektették le a klasszikus Rett szindróma kritériumait. Ennek a formának lefolyása a preregresszió, regresszió és posztregresszió stádiumaira osztható (Hagberg 2002). Az első stádiumban esetlegesen táplálási zavar, izomhipotónia és figyelemzavar tűnhet fel, azonban a fejlődés normális ütemet is mutathat. Az érintett kisgyermek elkezdnek járni, beszélni, majd fejlődésük leáll, a fejkörfogot növekedése lelassul. A regresszió stádiuma 8-40 hónapos kor között jelentkezik, ebben az időszakban gyorsan elvesztik az addig megszerzett képességeket. Mozgáskoordináció- és viselkedészavar (autisztikus vonások), sztereotíp kézmozgás, fogcsikorgatás, strabizmus, disztónia, légzésvizsgálat alakul ki. Az ezt követő stádiumban javuló szociabilitás, epilepszia, ízületi deformitás, táplálási nehézség, törzs- és járási ataxia, disztóniás spazmusok, alvászavar, hangulatingadozás figyelhető meg.

Emellett a klasszikus forma mellett több variáns is ismert: a „megőrzött beszéd”-, más néven Zapella-variáns (preserved speech variant, PSV), amely formában a beszéd lassú visszaépülése, normál fejkörfogot és autisztikus viselkedés jellemző (Zapella, 2001). Ezek a gyermekek gyakran kövérek, a jellegzetes kézmosó mozgás kezdetben rájuk is jellemző, ám néhány év után eltűnik. A kórkép jellegzetes 3 stádiuma azonban ebben a formában is megfigyelhető. Az ún. „csonka formában” enyhébb fenotípus és későbbi gyermekkorban fellépő regresszió figyelhető meg, míg néhány esetben leírták az ún. kongenitális formát, amit megszületéstől fennálló, progresszív encefalopátia jellemez. Szintén atípusos forma, az első leírójáról Hanefeld szindrómának is nevezett forma, amiben az igen korai csecsemőkorban (3-

6 hét) megjelenő, majd később gyakran terápia rezisztens epilepsziás rohamok képezik a vezető tünetet (Nemos 2009, Scala 2005).

A betegség előfordulási gyakorisága 1/10000-15000 lányokban, öröklődése - úgy tűnik - X-hez kötött domináns mintát mutat. Az esetek többségében sporadikusan fordulnak elő, de leírtak familiáris megjelenést is (Weaving 2004, Skjeldal 1997). A kórkép hátterében az Xq28 régióban elhelyezkedő metil-CpG-kötő fehérje 2 gén (*MECP2*) mutációit írták le kórokozóként (Amir 1999), ez a klasszikus formát mutató betegek 80-96%-ban, az atípusos formát mutató betegek kb. 40-50%-ban található meg (Moretti 2006, Kriaucionis 2003). Mivel néhány esetben klinikailag jól meghatározhatóan Rett szindrómás betegekben az *MECP2* gén mutációi nem voltak kimutathatóak, ezért felmerült más gének szerepe is a kórkép létrejöttében. Így derült fény a ciklin-függő-kináz-szerű 5 (*CDKL5*) (Scala 2005, Weaving 2004) és a forkhead box protein G1 (*FOXG1*) (Ariani 2008) gének kórokozó szerepére a szindróma atípusos formáinak kialakulásában. Későbbi vizsgálatok bizonyították, hogy a *CDKL5* fehérje ugyanazon a jelátviteli útvonalon fejt ki hatását, mint az *MeCP2*, valamint kináz aktivitásán keresztül képes foszforilálni az *MeCP2*-t (Mari 2005). A *FOXG1* pedig a különböző transzkripciós represszorokkal együttműködve a korai agyfejlődésben játszik fontos szerepet (Tan 2003).

A lányoknál ritkábban, de fiúkban is leírták már az *MECP2* gén mutációit, ezek a betegek általában atípusos fenotípust mutattak (Villard 2000). A ritkább előfordulás egyik oka az lehet, hogy az XY nemi kromoszómákat tartalmazó fiú sejtekben a transzkripció kizárólag a mutáns *MECP2* génről történik, míg lányoknál az X-inaktiváció a sejtek bizonyos százalékában a károsodott gént érinti, így ezekben a sejtekben a fehérje átíródása az ép allélról történik. Ezért valószínűleg a fiúknál a mutáció létrejötte már intrauterin elhalással, esetleg korai csecsemő/kisgyermekkorban bekövetkező halállal jár, amikor a nem specifikus tünetek miatt még nem születik diagnózis. Másik okként feltételezhető, hogy a megfigyelések szerint a mutáció gyakrabban az apai eredetű X kromoszómán lép fel, ez azonban a fiú utódoknál hiányzik (Girard 2001).

2.3. Mitokondriális betegségek

A mitokondriális betegségek általában ritka, multisisztémás kórképek, klinikailag, genetikailag és biokémiaileg nagyon különbözőek (Maasz 2008, Di 2009, Edmond 2009). A klinikai tünetek alapján szindrómás és nem szindrómás formákra oszthatóak. (Finsterer 2009).

A kettőszálú, cirkuláris mitokondriális DNS 16569 bázipárból áll és 37 gént kódol, emellett a mitokondrium fehérjéit több nukleáris gén is kódolja. A mitokondriális DNS törvényszerűségei eltérőek a nukleáris DNS-től, ezért az öröklésmenetben is más szabályszerűségek figyelhetők meg. A mtDNS mutációs rátája egy nagyságrenddel nagyobb, mint a nukleáris DNS-é, mivel a mitokondriumban kevésbé hatékony javító mechanizmusok figyelhetők meg, és nincsenek hisztonok, amik megvédenék a DNS-t a szabadgyökök okozta károsodástól. Ezért, valamint annak következtében, hogy egy átlagos sejtből több száz mitokondrium van, mindegyikben 5-10 DNS-molekulával, lehetséges, hogy egy sejtben belül kóros és egészséges mitokondrium is jelen van (heteroplazmia-homoplazmia). Ez klinikai tüneteket csak akkor okoz, ha a kóros mitokondriumok aránya eléri a betegség kialakulásához szükséges küszöböt. A klinikai tünetek általában többszervi tünetek, amik idegrendszeri eltérésekkel társulnak, de előfordulnak izolált tünetekkel járó kórképek is, általában jellemzően a nagy energiaigényű szövetek érintettek a mitokondriális kórképekben.

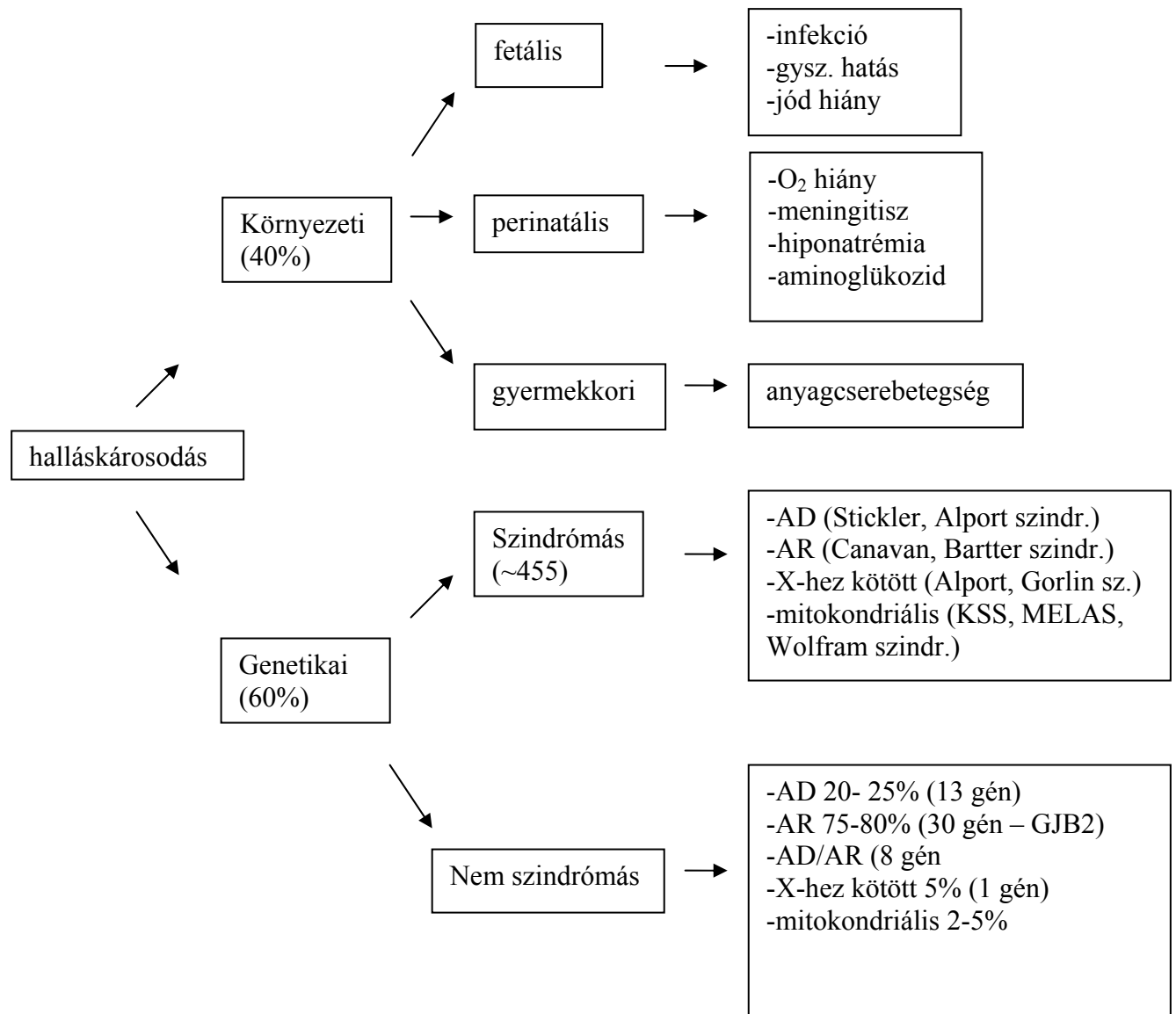
A mitokondriális DNS anyai öröklődésű, mivel a petesejtben a mitokondriumok aránya nagyságrendekkel nagyobb, mint a spermiumokban, amelynek mitokondriumai a megtermékenyítés után elpusztulnak, így a zigótában már csak az anyai eredetűek maradnak meg.

A mitokondrium funkciói az élethez nélkülözhetetlenek, ezek közül a legfontosabb az energiatermelő funkciója. Az oxidatív foszforiláció során a légzési láncon keresztül a tápanyagokat ATP-vé alakítja. Emellett a hőtermelésben, a nyomelem tárolásban és a nukleinsav szintézisben is szerepet játszik.

2.3.1. Genetikailag determinált halláskárosodás

A halláskárosodás a leggyakoribb veleszületett érzékszervi rendellenesség, 1000 újszülöttről egyet érint (Fischel-Ghodsian 1998, Fischel-Ghodsian 1999, Willems 2000). Sokféle csoportosítása ismert. A fellépés ideje alapján pre- és posztlingualisra osztható, attól függően, hogy más tünetekkel társul-e, szindrómás és nem-szindrómás halláskárosodás különíthető el, illetve csoportosítható a súlyosság alapján is. Oka lehet genetikai vagy nem genetikai (perinatális infekció, ototoxikus gyógyszer, trauma) eredetű. A kórkép hátterében gyakran észlelhető multifaktoriális kóreredit, amikor a génmutációk mellett exogén hatások is kimutathatóak (Fischel-Ghodsian 2003, Kokotas 2007). A monogénes prelingualis halláskárosodás az esetek 75%-ban autoszómális recesszív öröklődést mutat. Ebben a

csoporthoz az elváltozás háttérében eddig körülbelül 120 gént azonosítottak, a pontosan ismertek közül 23 autoszómális recesszív, 21 autoszómális domináns kettő pedig X-hez kötött öröklődést mutat (Kokotas 2007, Petersen 2006, Van Camp 1997, Petersen 2002, de Kok 1995, Tranebjerg 1995). A halláskárosodás felosztását az 1. ábra mutatja.



1. ábra A csecsemő és gyermekkorban észlelhető halláskárosodások felosztása

A mitokondriális DNS mutációi is állhatnak a halláskárosodás háttérében, ezek szintén szindrómás és nem-szindrómás formában fordulhatnak elő. A szindrómás formára jól ismert

példa a Wolfram szindróma, ahol a hallásvesztés diabétesz inszpidusszal, diabétesz mellitusszal és optikus atrófiával társul. Egyéb mitokondriális betegségekben (KSS-betegség, MELAS) is gyakran észlelhető társuló tünetként a halláskárosodás, mert a stria vasculáris és a szőrsejtek különösen érzékenyek a mtDNS károsodására.

A mtDNS rRNS-génjében bekövetkező mt1555A>G nukleotidcsere mind homo-, mind heteroplazmiás formában szenzorieuronális hallásvesztést okoz. Korábbi kutatások alapján a hallásvesztést a másodlagos ATP-hiány idézi elő, amely biokémiai defektushoz vezet a sejtlégzés során (Tekin 2003).

A mtDNS Ser^{UCN}-tRNS génjében bekövetkező mutáció gyermekkorban kezdődő, majd az életkor előrehaladtával súlyosbodó, bilaterális szenzorieuronális hallásvesztést okoz. Izolált nem-szindrómás hallásvesztéssel jár a Ser^{UCN}-tRNS génben található mt7511T>C és mt7510T>C mutáció (Hutchin 2000, Jaksch 1998, Verhoeven 1999), egyes mutációknál pedig további tünetek is társulhatnak a kórképhez: például az mt7445A>G mutáció esetében palmoplantaris keratoderma, a 7472-es pozícióban történt C-bázis-inzerciónál pedig ataxia és myoclonus.

A mtDNS 7445-ös pozíciójában létrejövő adenin-guanin bázispár szubsztitúció a citokróm oxidáz első alegység mRNS-nek stopkodonjában helyezkedik el. A mutáció mitokondriális működésre ható szerepét számos kísérletben vizsgálták (Guan 1998, Levinger 2007, Li 2005, Reid 1997) és azt találták, hogy a 7445G allélnak a légzési funkciókban, azon belül is kifejezetten a komplex I aktivitásában van jelentős szerepe. Azt is kimutatták, hogy az mt7445A>G mutációt hordozó sejtekben a ND6 hatos alegység mRNS csökkent szintje észlelhető, illetve ezekben a sejtekben csökkent egyes mitokondriális proteinek, mint például az ND6 szintézise. Első sorban ezek az elváltozások felelősek a csökkent komplex I aktivitásért, ami a kohleáris sejtekben csökkent ATP produkciót eredményez. A tRNS-ben bekövetkező mt7445A>G mutáció a 7444-es pozícióban egy másodlagos mutációt okozhat, erről korábbi kutatások során kiderült, hogy kapcsolatban áll a Leber-féle optikus neuropátiával (Casano 1998, Lehtonen 2000, Tekin 2003, Li 2004, Usami 2000).

2.3.2. Leigh szindróma

Az egyik legismertebb mitokondriális szindróma elnevezését első leírójáról, Denis Leigh-ről kapta, aki 1951-ben közölte, és az észlelt elváltozások alapján – agytörzsi kapilláris

proliferáció és fokális nekrozis - szubakut nekrotizáló enkefalomielopátiának nevezte el (Leigh 1951).

A kórkép hátterében az energia metabolizmus számos, ezen belül is az oxidatív foszforilációban és az ATP képzésben szerepet játszó mitokondriális légzési lánc komplexek (I,II,III,IV,V), vagy a piruvát dehidrogenáz komplex alegységeinek nukleáris és mitokondriális génmutációját azonosították (Santorelli 1993, Rahman 1996, DiMauro and De Vivo 1996, Tiranti 1998, Zhu 1998, Ruiter 2007). A kórkép általában gyermekkorban kezdődő neurodegeneratív betegség, jellemzően a központi idegrendszer, ezen belül is az agytörzs, a talamusz, a bazális ganglionok, a cerebellum és a gerincvelő területén észlelhető fokális, bilaterális lézióival, ami demielinizáció, gliózis, nekrozis, spongiózis vagy kapilláris proliferáció lehet (Leigh 1951, Worsley 1965, Hommes 1968, Finsterer 2008). A kórkép előfordulási gyakorisága kb. 2,05/100000, ami 6 éves kor előtt 1/32000-re tehető. A tünetek leggyakrabban két éves kor előtt jelennek meg (infantilis forma), azonban előfordul, hogy későbbi gyermekkorban (juvenilis forma), illetve felnőtt korban lépnek fel. Az érintett gyermeknél a jellegzetes tünetek megjelenése előtti időszakban is gyakran észlelhető etetési nehézség, hányás és növekedéskésései elmaradás. A halál általában néhány évvel a tünetek megjelenése után lép fel, leggyakoribb oka a progresszív légzési elégtelenség.

A klinikai tünetek a központi idegrendszer léziójának lokalizációjától függenek, de a szomatomentális késés, izomhipotónia, laktát acidózis, epilepsziás rohamok általában a klinikai kép részét képezik, és gyakran megfigyelték a hipertrófiás kardiomiopátia társulást is. Neurológiai tünetek között gyakoriak az agytörzsi jelek (főleg strabizmus, nisztagnus és nyelési nehézség), ataxia, piramis tünet, illetve ezek jelentős romlása akut infekció kapcsán.

A kórkép genetikai háttere szintén nagyon heterogén, jelen ismeretek szerint a leggyakoribb hibák a következők: az X-hez kötött recesszív módon öröklődő piruvát dehidrogenáz alfa 1 gén (*PDHA1*) mutációi, a mitokondriális öröklődésű ATP szintáz enzim 6-os alegységét kódoló gén (*MTATP6*) gén mutációi, valamint a komplex IV defektusai, amik autoszómális recesszív öröklődésűek, ezt követi a 7 mitokondriális gén által kódolt komplex I hiány.

A jelentős klinikai, genetikai és biokémiai heterogenitás ellenére a betegek alapvető neuropatológiai eltérései ugyanazok, nevezetesen a demielinizációval, vaszkuláris proliferációval és gliózissal társuló kétoldali szimmetrikus, fokális, nekrotikus léziók, amik az agytörzset, a diencefalont, a bazális ganglionokat és a kisagyat érintik.

3. Célkitűzések

A laboratóriumi technikák fejlődésének köszönhetően a molekuláris eltérések és mechanizmusok feltárása egyre gyorsabbá vált. Fontos feladat, hogy ezekhez a felfedezett eltérésekhez minél pontosabban meg tudjuk határozni a fenotípusbeli jellegzetességeket. Ezért alapvető célkitűzésünk volt, hogy különböző, ritka betegségcsoportokban klinikai adatokat gyűjtsünk a jellegzetes tünetek és a kórlefolyás minél részletesebb meghatározására. Ezek alapján a későbbiekben egyrészt részletesebb tanácsadást tudunk nyújtani a hozzánk forduló betegeknek a várható prognózist és a gondozást illetően. Másrészt célunk volt, hogy a kapott eredményeink megfelelő értelmezésével bővítsük a differenciál diagnosztikai ismereteket.

A dolgozat alapját képező négy fő betegség/betegségcsoport nem a szokásos módon, előre kiválasztva, prospektíven került vizsgálatra. A klinikai kép alapján felmerült genetikai hiba alátámasztását követően a fenotípus részletes elemzését végeztük fizikális és egyes esetekben különböző eszközös vizsgálatokkal. Mindezek alapján az egyes vizsgált betegségben további célokat határoztunk meg:

1. A CDG Ix csoportba tartozó betegek klinikai adatait összehasonlítva a leggyakoribb dizmorfiás jelek, neurológiai és klinikai tünetek alapján a diagnosztizált betegek gondozása során javasolt vizsgálatok meghatározása. A kórlefolyás elemzésével ezekben a betegekben a prognózis pontosítható, aminek nagy jelentősége van a genetikai tanácsadás során, hisz az érintett családoknak több információ nyújtható.

2. A Rett szindróma tüneteit mutató magyar betegekben egyrészt meghatározni - lehetőség szerint legpontosabban - genetikai eltérést, az *MECP2*, a *CDKL5* és a *FOXG1* gének vizsgálatával, majd ezt követően a betegcsoportban azonosított mutációk frekvenciáját és eloszlását meghatározni.

Az adatok ismeretében a genotípus-fenotípus összefüggések feltárása, ennek ismeretében pedig egy diagnosztikus algoritmus felállítása.

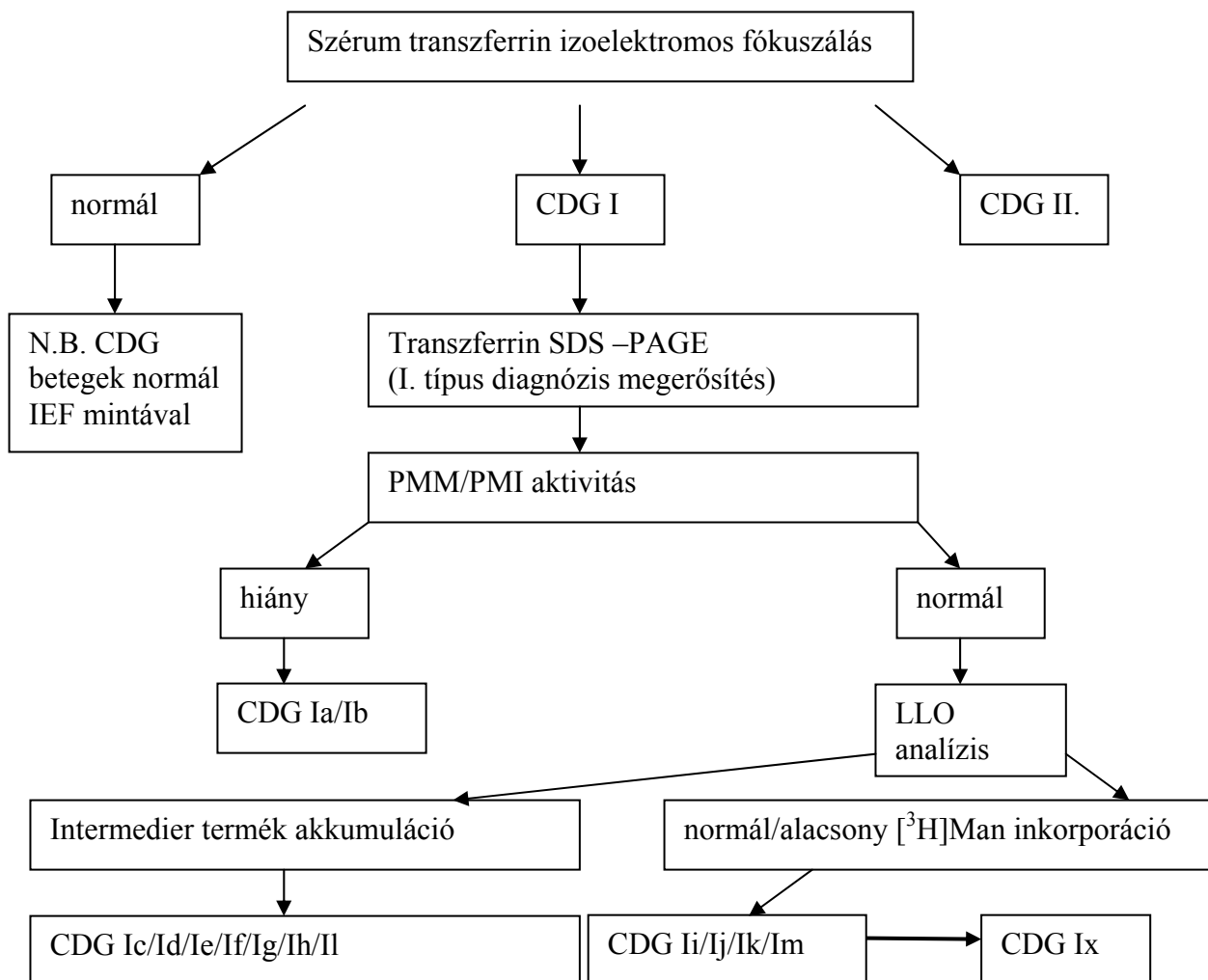
3. A mt7445A>G mutáció miatt kialakult halláskárosodás és esetleges kísérő tünetek részletes feltárása saját betegeinkben. Mivel az általunk vizsgált betegek az első felismert magyar család, akikben a fenti mutáció felelős a tünetekért, adataikat ezért a nemzetközi irodalomban ismertett betegek adataival összehasonlítva, az eddig ismert fenotípustól eltérő fenotípusos kép leírása.

4. A mt11777C>A mutáció detektálását követően a leletek és kórlefolyás ismeretében egy, az eddig ismerttől eltérő Leigh szindróma fenotípus részletes meghatározása.

4. A vizsgálatban résztvevő betegek

Az értekezés témája egyes ritka betegségek részletesebb, vagy új fenotípusos jellegzetességének vizsgálata. Az Európai Unió javaslata alapján a ritka betegségek ellátásában országos központok létrehozása szükséges. Magyarországon intézetünk látja el ezt a feladatot, ami a koordinálási munkák mellett diagnosztikai feladatot is jelent. Új, országosan egyedül álló módszerek beállításával, majd ezekről szakmai körben történt tájékoztatást követően kerülnek a betegek intézetünk genetikai járóbeteg ellátására. Ebből adódóan egy-egy ritka betegséggel is relatívan gyakran találkozunk, és így a fenotípusos variációk detektálásában nagyobb lehetőségekkel rendelkezünk. A dolgozat beteganyaga ennek következtében állt össze .

A CDG-s betegcsoportban 10 olyan beteg fenotípusát elemeztük, akiknél a vizsgálatok során a CDG Ix diagnózist állítottuk fel. A diagnózis felállítását a 2. ábrán bemutatott algoritmus alapján végeztük. Ezeknél a betegeknél a transferrin izoelektromos fókuszálás (TIEF) minden esetben csökkent tetraszialo-, emelkedett aszialo- és diszialotranszferrin szintet mutatott. Gél elektroforézis során a nem-glikozilált vagy monoglikolizált transferrin pozícióban további sáv jelent meg, ami azonban megerősítette a CDG I. típus fennálltát. A transferrin kódoló gén polimorfizmusát és egyéb, CDG I-et okozó tényezőket (galaktozémia, fruktozémia, alkoholfogyasztás) laboratóriumi és klinikai vizsgálatokkal szintén kizártuk. A foszfomannomutáz (PMM) és foszfomannóz izomeráz (PMI) mérések kizárták az Ia és Ib altípust, a lipid kapcsolt oligoszaccharid (LLO) mérés pedig az Ic-Ih és az Ii altípust. A későbbiekben ezeknek a betegeknél a fenotípusát hasonlítottuk össze az irodalomban eddig ismertetett betegekkel (Aeruggi 1998, Assmann 2001, Cohn 2006, De Lonlay 2001, Mckenzie 2007, Mention 2001, Prietsch 2002, Zentilin 2003).



2. ábra Kivizsgálási algoritmus CDG szindrómában

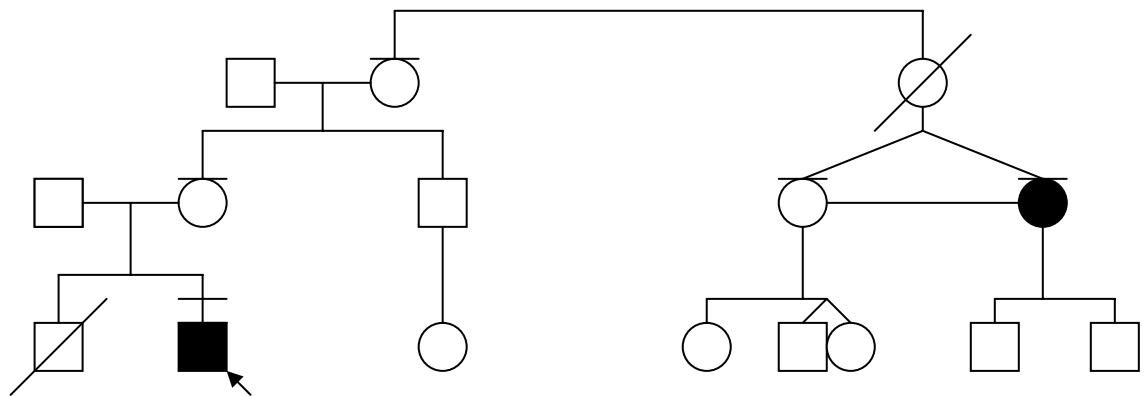
A vizsgálat második részének beteganyagát azon betegek alkották, akiket a PTE Orvosi Genetikai Intézetben Rett szindróma fenotípusa miatt, annak alátámasztása, illetve differenciáldiagnosztikája miatt vizsgáltunk. Ebben a csoportban 158 beteg részletes fizikális és dizmorfológiai vizsgálatát követően első lépésben az *MECP2* gén analízisét végeztük el. Akiknél ebben a génben eltérést nem találtunk, a következő lépésként a *CDKL5* gén vizsgálata történt meg. Azokban a betegekben, akiknél a fenti két gén vizsgálata során kórokozó eltérést nem tudtunk kimutatni, a *FOXG1* gén vizsgálatát is elvégeztük.

A molekuláris vizsgálatokat követően az eredményeket összevetettük a fenotípus vizsgálat eredményeivel.

A halláskárosodás vizsgálata során egy három generációs családot vizsgáltunk, két érintett egyeddel. A 12 éves proband terhességi és perinatális anamnézise negatív, fizikális és dizmorfiás státuszában a 2. és 3. ujj között észlelhető szindaktiliától eltekintve eltérés nem volt. Pszichomotoros fejlődése megfelelő ütemben zajlott, szenzorineurális halláskárosodását három éves korában észlelték. Testvére 2,5 éves korában nagyér-transzpozíció következtében exitált. Az édesanya első unokatestvére szintén halláskárosodásban szenved.

Az érintett betegen, a halláskárosodás hátterében az esetek jelentős hányadában azonosított konnexin 26 gén (*GJB2*) 35delG mutációja mellett a leggyakoribb mitokondriális eltéréseket (mt1555A>G, mt3243A>G, mt7472insC, mt7445A>G, mt7511T>C) is vizsgáltuk.

A későbbiekben a család négy tagjánál bőrgyógyászati, neurológiai és általános laboratóriumi vizsgálatot követően szintén molekuláris genetikai vizsgálatot végeztünk a fent említett mitokondriális mutációk irányába. A vizsgált család pedigréjét a 3. ábra mutatja.

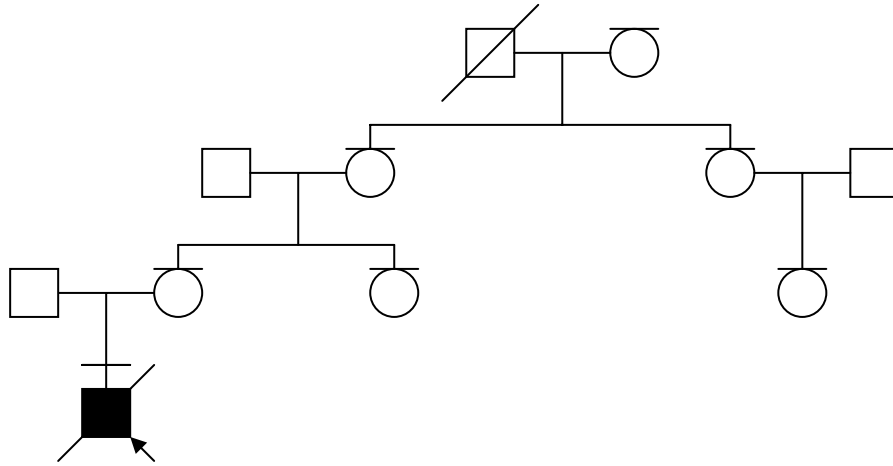


3.ábra A mt7445A>G mutációt hordozó magyar család családfája. A vizsgált családtagokat felső vonallal jelöltük.

Mivel a halláskárosodás hátterében, magyar betegek közül ebben a családban mutattuk ki először a mt7445A>G mutációt, fenotípusukat az eddig ismertetett betegekével hasonlítottuk össze (Reid 1994, Fischel-Ghodsian 1995, Sevier 1998, Caria 2005, Hutchin 2001, Martin 2000).

A Leigh szindrómás betegünk családfáját a 4. ábra mutatja. A gyermeknél a genotípus meghatározása után került sor a fenotípus pontos elemzésére a rendelkezésre álló kórleírások, eszközös vizsgálatok (koponya MR, kardiológiai vizsgálatok, BERA, VEP) leletei alapján. A genotípust különböző szövetekből nyert mintán is meghatároztuk. A gyermek további hat

családtagjánál végeztük el a mutáció meghatározását. Az így nyert adatainkat itt is a korábban már ismertetett betegek adataival vetettük össze (Komaki 2003, Bugiani 2004, Deschauer 2003).



4. ábra Leigh szindrómás betegünk családfája. Vízszintes vonalakkal jelöltük a családtagokat, akinél molekuláris genetikai vizsgálatot végeztünk.

5. Módszerek

5.1. Transzferrin izoelektromos fókuszálás

A vizsgálat elvégzéséhez 10 µl szérums minta szükséges, amelyet első lépésben vassal szaturálunk: a szérumsot 10 mM Fe(III)citrát (SIGMA) és 0,5 M NaHCO₃ (MERCK) 2:1 arányú elegyből vett 3 µl mennyiségű oldattal összekeverve 30 percig inkubáljuk szobahőmérsékleten. Ezután a mintát 6x-osra hígítjuk desztillált vízzel, majd vortexeljük.

A szaturáció után elvégezzük az izoelektromos fókuszálást: 5-8 közötti pH gradienst tartalmazó poliakrilamid gélt 15 °C-ra hűtött szeparáló felületre helyezünk (PHASTSYSTEM; Pharmacia). Az előkészített mintákból 1 µl-t a géltre felviszünk, majd elvégezzük az elektroforézist (2000 V, 5.0 mA, 3.5 W, 15 °C kondíciók mellett 130 Vh ideig).

Az elektroforézis után a gél felszínén 60 µl anti-transzferrin antitestet (RABBIT ANTI-HUMAN TRANSFERRIN, DAKO, A0061) eloszlatunk. Az antitest a gélben jelenlévő transzferrinhez kötődve azt immobilizálja. Az elválasztott, immobilizált transzferrin formákat (asialo-transzferrin -> hexasialo-transzferrin) Coomassie blue festéssel tesszük láthatóvá. Az egyes minták különféle sialo-transzferrin formáinak mintázatát egy kóros és egy normál kontroll mintához viszonyítva értékeljük.

5.2. Polimeráz lánreakció (PCR)

Munkánk során alkalmazott genomi DNS mintát etilén-diamin-tetra-acetáttal (EDTA) alvadásgátolt perifériás vér fehérvérsejtjeiből nyertük rutin kisózásos módszerrel (Miller 1988). A rendelkezésünkre álló DNS mintákból a vizsgálni kívánt szakaszokat általunk tervezett polimeráz lánreakcióval amplifikáltuk fel. A reakcióelegyet minden vizsgálatunknál 50 µl végtérfogatra állítottuk össze, melyhez 200 µM dNTP oldatot, 1 U Taq polimeráz enzimet (10 U/µl), 5 µl puffer oldatot (500 mM KCl, 14 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl; pH 9,0), 0,2 mM megfelelő primerpárt (Metabion International AG, Martinsried, Germany) és 1 µg DNS templátot használtunk.

5.3. Restriktációs fragmentum hossz polimorfizmus (RFLP) módszer

A restriktációs endonukleázokkal történő hasításhoz 10-15 µl PCR terméket használtunk fel. A reakcióhoz minden esetben 1 U megfelelő restriktációs endonukleázt (Fermentas Inc., Burlington, ON, Canada), az enzim működéséhez szükséges 10x puffert és steril desztillált vizet használtunk, majd a reakcióelegyet a restriktációs enzimnek megfelelő hőmérsékleten inkubáltuk. A restriktációs hasítás tervezésénél minden esetben arra törekedtünk, hogy az enzimnek a felszorzott DNS szakaszban a genotípustól függetlenül legyen egy obligát hasítási helye, amely segítségével meggyőződhetünk az enzim megfelelő működéséről.

5.4. DNS szekvencia meghatározás és analízis

Mutációanalízis céljából illetve RFLP eredményeink alátámasztása érdekében mindkét irányból történő direkt szekvenálással határoztuk meg mintáink nukleotidsorrendjét. A vizsgálatot ABI Prism 3100 Avant típusú automata szekvenáló készüléken végeztük (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A kapott szekvenciák referencia-szekvenciával történő összehasonlítását a Winstar genetikai programcsomaggal végeztük (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA).

Az *MECP2*, *CDKL5* és *FOXG1* gének vizsgálata direkt szekvenálással történt. Az *MECP2* gén 3 kódoló szakaszának (2-es, 3-as és 4-es exon) amplifikálásához az általunk tervezett 9 primer párt használtuk. A *CDKL5* gén esetében részben az irodalomban korábban publikált (Scala et al JMedGenet 2005), részben általunk tervezett primerekkel analizáltuk a 22 kódoló szakaszt, míg a *FOXG1* gén vizsgálatánál saját tervezésű primereket alkalmaztunk. A PCR reakciót 50 µl végtérfogatra számolva a következőképpen állítottuk össze: 10X PCR puffer (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; 0.1 % Triton X-100); 1 mM MgCl₂; 200 µM a dATP, dCTP, dTTP, dGTP nukleotidok mindegyikéből; 0.04 µM a forward és reverz primerből; 40 ng/µl DNS. A PCR kivitelezése MJR PTC-200 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.

5.5. Multiplex ligációfüggő próba amplifikáció

Az MECP2 és a CDKL5 gén nagyobb átrendeződéseit a SALSA MLPA kit P015 MECP2 kitek segítségével vizsgáltuk a gyártó MRC Holland (Amszterdam, Hollandia) ajánlása szerint próbamix az MECP2, CDKL5, ARX és NTNG1 génekre specifikus próbákat tartalmaz.

A multiplex ligációfüggő amplifikációhoz 100ng genomiális DNS-t 16 órán át hibridizáltunk a specifikus próbákkal, majd a ligációt követően fluoreszcensen jelölt primerek jelenlétében PCR amplifikációt alkalmaztunk. A PCR termékeket ABI Prism 310 Genetic Analyzer automata szekvenátoron, fragment analízis során szeparáltuk és kvantifikáltuk. Az adatok kiértékelése során a fragmentek csúcsmagasságát vettük figyelembe, és normalizáltuk úgy, hogy a kontroll fragmentek csúcsmagasságának összegével osztottuk el az egyes csúcsmagasságokat. Ezek után az öt kontroll minta átlagos normalizált csúcsmagasságával osztottuk el a kapott értéket. Ezzel a módszerrel a kapott eredmények az adott allélok kópiaszámát adják meg normál kontrollokhoz viszonyítva. Azon mintákat, amelyek valamilyen kópiaszámbeli eltérést mutattak, újból alávetettük az analízisnek, és csak akkor tekintettük a deléció vagy duplikáció igazoltnak, amennyiben azt a két független mérés eredménye egyhangúlag alátámasztotta.

6. Eredmények

6.1. A CDG Ix klinikai spektruma

Azoknál a betegeknél, akik esetében a CDG Ix diagnózisát állítottuk fel, a két meghatározó tünet a fejlődésbeli késés és az axiális hipotónia volt. Előbbit a betegek 91, utóbbit 82%-ában észleltük (21 és 19 beteg). Emellett nem-specifikus tüneteket, mint dizmorfiás jelek, rendellenes alvadási faktorok, hipoalbuminémia, májbetegségek, különböző audiológiai és szemészeti rendellenességek, figyeltünk meg.

Kraniofaciális dizmorfiát a betegeink 43%-ában (10 beteg) láttunk. A három leggyakoribb a mikro/retrognátia, a hipertelorizmus, és a nagy, alacsonyan ülő fül volt. A legismertebb és leggyakoribb CDG alcsoportra, az Ia-ra jellegzetes befelé forduló emlőbimbó és a gluteális régióban észlelhető abnormális szubkután zsíreloszlás az Ix formában nem jellemző, vizsgálatunkban 10% körüli arányban fordult elő (1, illetve 2 beteg, egy gyermekben mindkettő).

Egyéb dizmorfia, mint a mikrokefália és végtag rendellenesség (jobb oldali dongaláb, arachnodaktília, kétoldali 5-ujj klinodaktília, kis kezek és lábak, köröm diszplázia) 6-6 betegnél volt megfigyelhető, ami 25%-os gyakoriságot jelent.

Véralvadási defektusok előfordulása adataink alapján 40% körülire tehető. Ez jelenthet trombotikus epizódokat, fokozott vérzékenységet, de klinikai tünet nélküli, kóros véralvadási laboratóriumi értékek előfordulása is lehetséges. A leggyakrabban csökkent protein C, protein S vagy antitrombin III szintet találtunk, azonban izolált faktor XI hiány, megnyúlt protrombin idő és aktivált parciális tromboplastin idő is előfordult. Viszonylag gyakran észleltünk májkárosodást és hipoalbuminémiát (34 és 47 %).

CDG Ix betegek esetén viszonylag gyakori a szemészeti rendellenességek előfordulása is, mi a betegek 65%-nál észleltünk ilyen jellegű eltérést. Leggyakrabban optikus atrófia (5 beteg), ritkábban katarakta (2 beteg), egy-egy betegnél pedig glaukóma és retinitis pigmentosa is társult a klinikai képhez, a más CDG alcsoportra jellegzetes konvergens strabizmus és nisztagnus ritkábban fordult elő.

A klinikum számára fontosnak tartunk kiemelni néhány olyan beteget, akiknél a tünetek szokatlan, azonban CDG Ix-re jellegzetes társulása volt megfigyelhető:

- Négy betegben optikus atrófia és ennek következtében kialakuló vakság extrapiramidális tünetekkel társult, ebből két betegnél kisagyi atrófia, egynél polineuropátia is társult a klinikai képhez, illetve egynél májkárosodás jelei és véralvadási rendellenességek volt megfigyelhetőek.
- Két betegben katarakta és epilepsziás rohamok társultak májkárosodással.
- Egy – egy betegben nefrózis szindróma, mikrokefáliával, epilepsziás rohammal, aszcitesszel és hepatomegáliával, illetve artrogripózis makrokefáliával, polineuropátiával és vesecisztával járt együtt.

A klinikai tünetek alapján jól elkülöníthető a kórkép két alcsoportja: a kizárólag neurológiai tünetekkel, illetve a neurológiai és többszervi manifesztációval járó forma. Anyagunkban a kórkép kizárólagosan neurológiai prezentációja 6 betegnél volt észlelhető.

Az első két életévben kilenc gyermek halt meg, minden esetben súlyos többszervi érintettség társult az idegrendszeri tünetekhez. Több betegben súlyos hipoalbuminémia, rezisztens epilepsziás roham, légzési elégtelenség állt fenn, 7 betegben központi idegrendszeri szerkezeti rendellenesség – leggyakrabban kisagy/vermis hipoplázia és cerebrális atrófia – került felismerésre, két gyermekben agyvérzés, egynél pedig stroke-like epizód zajlott le. Veleszületett szívfejlődési rendellenesség 3 gyermeknél volt (kamrai szeptum hipertrófia, nyitott ductus arteriosus - PDA, pitvari sövény defektus - ASD), 8 betegnél a fő klinikai tünet a májelégtelenség, dehidrációt okozó súlyos hasmenés és masszív protein-vesztés volt.

A saját 10 betegünk és az irodalomban közölt 13 beteg részletes tünettánát az 1. táblázat mutatja.

1. táblázat CDG Ix betegek klinikuma

Tünet	Beteg																	
	1	2	3 ^a	4	5	6 ^b	7 ^a	8	9 ^a	10	11-13	14	15	16-17	18	19	20-21	22-23
Dizmorfiás jelek	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+
Izom hipotónia	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Pszihomotoros retardáció	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
Retinitisz pigmentóza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Glaukoma	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Katarakta	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Optikus atrófia	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Extrapiramidális tünetek	-	-	+/-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Stroke-like epizódok	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Epilepsziás roham	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+/-	+	-	+/-	-	+	+	-
Kardiomiopátia	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Izomgyengeség, emelkedett CK	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Polineuropátia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Kisagyi atrófia	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
Artrogripozis	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Növekedési zavar	+	+	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
Cisztás vesebetegség	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Légzési elégtelenség	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Hasmenés/hányás	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+/-	+	-	+	-	-	-	+
Májkárosodás	-	+	+/-	-	+	+	-	-	-	-	+/-	+	-	+	+	-	+	+
Hipoalbuminémia	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
Alvadási rendellenesség	-	+	+/-	+/-	+/-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Trombocitopénia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+	-	+	-	-	-	+
Visszatérő infekciók	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Idegrendszeri prezentáció	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Ideg+ többszervi prezentáció	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+

^a tranziens májfunkciós rendellenesség

Későbbi diagnózis. CDG Ix.

11-13: De Lonlay et al (2001). 14: Mention et al (2001). 15: Prietsch et al (2002). 16-17: Acarregui et al (1998). 18: Zentilin et al (2003). 19: Assmann et al (2001). 20-21: Cohn et al (2006). 22-23: McKenzie et al (2007)

6.2. A fenotípus-genotípus vizsgálata Rett szindrómában

Ebben a betegcsoportban első lépésben elvégeztük az *MECP2* gén mutációsűrését, majd azokban a betegekben, akiknél ennek során eltérést nem találtunk a *CDKL5* gén vizsgálata történt. Utolsó lépésként azoknál, akiknél mindkét gén vizsgálata negatív volt, a *FOXG1* gént analizáltuk.

Az *MECP2* vizsgálata során 22 különböző ismert eltérést észleltünk 42 betegnél: 7 frameshift deléció, 4 nonsense és 10 missense mutációt, egy betegben pedig egy nukleotid inzerciót találtunk. Az észlelt mutációk megoszlását a 2. táblázat foglalja össze.

Egy betegben a Rett szindróma patogenezisében eddig még nem tisztázott szerepet játszó c.925C>T (p.Arg309Trp) missense mutációt észleltük, amit eredetileg egy, beszédmaradás és fejlődésbeli késés miatt vizsgált 7 éves fiúban írtak le először.

Ezen kívül egy 18 bázispáros deléciót (c.1162_1179del18) találtunk egy betegünkben és az édesapjában is. Mivel az apa egészséges volt, és a probanda hordozott még egy, a leolvasási keret eltolódását okozó inzerciót (c.276_277insG) is, azt feltételeztük, hogy – bár a RettBASE: IRSF *MECP2* Variation Database szerint nem egyértelműen eldönthető, hogy ez a deléció mutáció vagy polimorfizmus - betegünkben nem a 18 bázispárnyi deléció felelős a Rett fenotípusért.

Az *MECP2* vizsgálata során nyert genotípus-fenotípus összefüggéseket részletesen a 3. táblázat mutatja, néhány adatot azonban fontosnak tartunk kiemelni: az *MECP2* negatív betegek mindössze 17%-a mutatta a RTT klasszikus formáját, 8% esetében az RTT kongenitális formája volt valószínűsíthető, és 12%-uk fiú volt. Míg az *MECP2* pozitív csoportban, az első stádiumban elhúzódó pszichomotoros fejlődés a betegek 51%-ánál állt fenn, ennek aránya az *MECP2* negatív betegek között 71,25%-ban volt észlelhető. Ellentétben ezzel, mikrocefália az *MECP2* pozitív csoportban volt lényegesen gyakoribb (74% vs 41%). Az *MECP2* pozitív betegeink 4,65%-a enyhe fenotípust mutatott.

2. táblázat Az MECP2 génben talált mutációk megoszlása

Beteg	Lokalizáció	Mutáció	Fehérje	Mutáció típus	Hivatkozás
R/74	Exon 4	c.710delG	p.Gly237fs	Deléció	Buyse és mtsai. 2000
R/96	Exon 4	c.806delG	p.Gly269fs	Deléció	Amano és mtsai. 2000
R/32	Exon 4	c.1121_1310del191; c.1322_1330del9	p.Glu374fs	Deléció	Karteszi és mtsai. 2004
R/103	Exon 4	c.1157_1188del32	p.Leu386fs	Deléció	Bienvenu és mtsai. 2002
R/41	Exon 4	c.1157_1197del41	p.Leu386fs	Deléció	De Bona és mtsai. 2000
R/51	Exon 4	c.1160_1166del7	p.Pro387fs	Deléció	Karteszi és mtsai. 2004
R/70	Exon 4	c.1163_1197del35	p.Pro388fs	Deléció	Philippe és mtsai. 2006
R/34	Exon 3 and 4	c.276_277insG; c.1162_1179del18	p.Pro94fs; p.Pro388_Pro393del6	Inzerció; deléció	Karteszi és mtsai. 2004; Cardiff, Rettbase
R/2	Exon 4	c.502C>T	p.Arg168Stop	Nonszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/63	Exon 4	c.502C>T	p.Arg168Stop	Nonszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/39	Exon 4	c.763C>T	p.Arg255Stop	Nonszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/79	Exon 4	c.763C>T	p.Arg255Stop	Nonszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/97	Exon 4	c.763C>T	p.Arg255Stop	Nonszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/102	Exon 4	c.763C>T	p.Arg255Stop	Nonszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/5	Exon 4	c.808C>T	p.Arg270Stop	Nonszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/45	Exon 4	c.808C>T	p.Arg270Stop	Nonszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/154	Exon 4	c.808C>T	p.Arg270Stop	Nonszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/17	Exon 4	c.880C>T	p.Arg294Stop	Nonszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/37	Exon 4	c.880C>T	p.Arg294Stop	Nonszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/46	Exon 4	c.880C>T	p.Arg294Stop	Nonszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/145	Exon 4	c.880C>T	p.Arg294Stop	Nonszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/4	Exon 3	c.316C>T	p.Arg106Trp	Miszszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/8	Exon 3	c.316C>T	p.Arg106Trp	Miszszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/159	Exon 3	c.317G>A	p.Arg106Gln	Miszszensz	Buyse és mtsai. 2000
R/237	Exon 3	c.317G>A	p.Arg106Gln	Miszszensz	Buyse és mtsai. 2000
R/28	Exon 4	c.397C>T	p.Arg133Cys	Miszszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/50	Exon 4	c.397C>T	p.Arg133Cys	Miszszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/86	Exon 4	c.397C>T	p.Arg133Cys	Miszszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/111	Exon 4	c.397C>T	p.Arg133Cys	Miszszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/172	Exon 4	c.397C>T; c.582C>T	p.Arg133Cys; p.Ser194Ser	Miszszensz, Polimorfizmus	Hoffbuhr és mtsai. 2001; Orrico és mtsai. 2000
R/55	Exon 4	c.401C>T	p.Ser134Phe	Miszszensz	Fukuda és mtsai. 2005
R/128	Exon 4	c.401C>G	p.Ser134Cys	Miszszensz	Budden és mtsai. 2005
R/3	Exon 4	c.455C>G	p.Pro152Arg	Miszszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/40	Exon 4	c.473C>T	p.Thr158Met	Miszszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/58	Exon 4	c.473C>T	p.Thr158Met	Miszszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/67	Exon 4	c.473C>T	p.Thr158Met	Miszszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/144	Exon 4	c.473C>T	p.Thr158Met	Miszszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/170	Exon 4	c.473C>T	p.Thr158Met	Miszszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/266	Exon4	c.473C>T	p.Thr158Met	Miszszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/106	Exon 4	c.674C>G	p.Pro225Arg	Miszszensz	De Bona és mtsai. 2000
R/213	Exon 4	c.916C>T	p.Arg306Cys	Miszszensz	Hoffbuhr és mtsai. 2001
R/114	Exon 4	c.925C>T	p.Arg309Trp	Miszszensz - ismeretlen	Campos és mtsai. 2007
R/217	Exon 4	c.375C>A	p.Ile125Ile	Polimorfizmus	Cheadle és mtsai. 2000
R/132	Exon 4	c.582C>T	p.Ser194Ser	Polimorfizmus	Orrico és mtsai. 2000
R/173	Exon 4	c.602C>T	p.Ala201Val	Polimorfizmus	Amano és mtsai 2000
R/62	Exon 4	c.608C>T	p.Thr203Met	Polimorfizmus	Orrico és mtsai. 2000
R/197	Exon 4	c.753C>T	p.Pro251Pro	Polimorfizmus	Chae és mtsai. 2004
R/195	Exon 4	c.753C>T	p.Pro251Pro	Polimorfizmus	Chae és mtsai. 2004
R/212	Exon 4	c.999G>T	p.Gly333Gly	Polimorfizmus	Huppke és mtsai. 2000
R/210	Exon 4	c.1161C>T	p.Pro387Pro	Polimorfizmus	Zahorakova és mtsai. 2007
R/6	Exon 4	c.1189G>A	p.Glu397Lys	Polimorfizmus	Hampson és mtsai. 2000
R/200	Exon 4	c.1266C>T	p.Gly422Gly	Polimorfizmus	Donzel-Javouhey és mtsai.2006

3. táblázat. Genotípus-fenotípus összefüggések az *MECP2* gén kapcsán

	Mutáció (43)	Polimorfizmus (8)	Negatív (74) – 9 fiú
I. stádium			
eseménytelen	44,2%	50%	27,39%
lassú fejlődés	51,2%	37,5%	71,23%
izomhipotónia	4,65%	12,5%	1,36%
II. stádium kezdete			
	19,9 hónap (6-48)	14,6 hónap (8-24)	21,39 hónap (3-66)
Nem meghatározható		25%	19,17%
Dizmorfiás jelek			
mikrokefália	74,4%	37,5%	41%
kis láb	46,5%		12,3%
arc aszimmetria	34,8%		
szkoliozis	32,5%		23,2%
diszkránia			15%
negatív	4,65%	12,5%	17,8%
Neurológiai jelek			
Sztereotípiák/kényszeres mozgás	76,7%	62,5%	49%
Görcs	44,1%		42,4%
kóros reflex	37,2%		
izomhipotónia	34,8 %	50%	50,6%
autisztikus jelek		37,5%	
neuroradiológiai eltérések			21,9%
negatív			4%
enyhe fenotípus	4,65%		
klasszikus fenotípus			16,2%
Élekor a vizsgálat idején	6,8 év (2-21)	5,5 év (2-9)	5,3 év (0,75-18)

A vizsgálat következő lépéseként a *CDKL5* gén mutációsűrését végeztük el azokban a betegekben, akikben az *MECP2* tesztelés során kórokozó eltérést nem találtunk. Ennek kapcsán 8 betegben megtaláltuk c.2327A>C (p.Gln791Pro), 1-1 betegben pedig a c.3003C>T (p.His1001His) és c.3084G>C (p.Thr1708Thr) ismert polimorfizmusokat, valamint két betegben 1-1, eddig még nem ismert mutációt, a c.607G>T (p.Glu203Stop) és a c.536C>T (p.Ser179Phe).

Az első beteg családi-, terhességi és perinatális anamnézisében kóros nem volt. Első epilepsziás rohama 3 hetes korában volt, ami kombinált antiepileptikus kezelés mellett 2 éves korára átmenetileg megszűnt, majd ismételten jelentkezett, 14 éves korában ötös gyógyszerkombináció mellett változatlanul napi rendszerességgel jelentkeznek grand-mal rohamai. A Rett szindrómára jellegzetes kényszermozgások 4 éves korában jelentkeztek, ez részben hintázó, részben kézmosó mozgás, a tudatos kézhasználat regrediált, azonban ülni tud, vezetve jár. Dizmorfiás státuszában enyhe arcaszimmetria, mélyen ülő szemek, gótikus szápad, kis kezek és lábak észlelhető, alszár hipotrófia és -tónia, renyhe mélyreflexek, törzs- és végtag ataxia alkotja a neurológiai képet. A betegnél a c.607G>T mutációt detektáltuk, ami a gén 10-es exonjában egy korai stop kodont eredményez a 203-as aminosav pozícióban, így - mivel a gén katalitikus doménjét károsítja - befolyásolja a *CDKL5* fehérje enzimaktivitását.

A második beteg családi-, terhességi és perinatális anamnézise szintén negatív, epilepsziája 6 hetes korában kezdődött. Jelenleg antiepileptikus monoterápia mellett egyértelmű epilepsziás roham nem észlelhető, azonban EEG vizsgálat mind ébrenlétben, mind alvásban multifokális és generalizált, gyakran bal féltekei túlsúlyú interictalis epileptiform jeleket mutatott, amit az alvás kifejezetten provokált. Mélyebb alvásban szinte folyamatos generalizált többtüske-hullám szériák láthatóak. Mozgásfejlődése nagyon lassú, 3 éves korára térdelő ülésbe húzza magát, megül, egyáltalán nem beszél. Dizmorfiás státuszában epicantuszredő, hipertelorizmus, progrediáló mikrocefália észlelhető. Neurológiailag kifejezett izomhipotónia, renyhe mélyreflexek, alsó végtagi mioklonus látható, szemkontaktusba nem vonható, folyamatos kényszermozgások (tapsolás) figyelhető meg. A koponya MR vizsgálat a bal oldali hipokampusz malrotációját mutatta. A *CDKL5* vizsgálata során a 9-es exonban egy aminosav-cserét eredményező mutációt észleltünk (c.536C>T, p.Ser179Phe), ami a PolyPhen predikációs szoftverrel történt analízis alapján a fehérje funkcióját károsan befolyásolja.

Mindkét beteg szüleinek vizsgálata is megtörtént, akiknél az eltéréseket kimutatni nem tudtuk.

6.3. A mt7445A>G mutáció miatt kialakult halláskárosodás

A fenti mutációt eddig mindössze hat családban észlelték a halláskárosodás hátterében (Reid, 1994). Első alkalommal egy kiterjedt skót családban írták le, legalább 13 érintett családtaggal, akiknél a különböző mértékű halláskárosodás 3 – 18 éves kor között lépett fel, egyéb társuló tüneteket nem észleltek (Reid, 1994). Egy új-zélandi család öt generációjában különböző súlyosságú, korai kezdetű, progresszív halláskárosodás hátterében írták le a mtDNS fenti mutációját (Fischel-Ghodsian, 1995). A japán, a francia és a portugál többgenerációs családokban a halláskárosodás mellett a jellegzetes palmoplantáris keratoderma volt megfigyelhető (Bititci 1975, Hatamochi 1982, Seviour 1998, Sharland 1992).

A mutáció vizsgálatára szokványos RFLP analízist végeztünk, ahol a normál mitokondriális DNS 7178 és 8783 nukleotidja közötti amplifikált régióban két *Xba*I hasítási hely van. A 7445-ös pozícióban létrejövő adenin – guanin csere következtében az egyik hasítási hely elveszik. A proband és édesanyja mintájában két fragmentumot (497, 1110 bázispár) észleltünk, ami a mutáció homoplasztikus jelenlétét támasztja alá. Bár az anyánál a mutáció szintén homoplasztikus formában volt jelen, semmilyen szintű halláskárosodás nem volt kimutatható nála, ellentétben a gyermekével, akinél audiológiai vizsgálattal súlyos fokú halláskárosodást detektáltak. A többi vizsgált családtag, tehát a proband anyai nagymamája és a nagymama elhunyt lánytestvéreinek monozigóta ikerlányai mintájában négy fragmentumot (263, 497, 846, 1109 bázispár) észleltünk, ami azt valószínűsíti, hogy a mutáció heteroplasztikus formában van jelen a vizsgáltakban. A kóros forma megoszlásában jelentős különbséget találtunk a családtagok között: a nagymamában az összes mtDNS 90%-a, míg az ikerestvérekben csak 5-10 % volt a kóros mtDNS aránya.

A családnál bőrgyógyászati vizsgálat is történt, ami során - a korábban ismertetett, hasonló mutációt hordozó családoknál néhány esetben jelenlévő - palmoplantáris keratoderma nem volt észlelhető.

A proband testvérétől, aki 2,5 éves korban, nagyértranszpozíció következtében hunyt el, nem állt rendelkezésre tárolt DNS minta, így vizsgálatot nem tudtunk végezni nála. Azonban jelen ismereteink szerint a gyermek szívfejlődési rendellenessége nagy valószínűséggel nem hozható összefüggésbe a családban észlelt mt7445A>G mutációval.

Az általunk vizsgált család és az irodalomban eddig leírt családok eredményeinek összevetését a 4. táblázat mutatja.

4. táblázat. A mt7445A>G mutáció miatt kialakult halláskárosodás fenotípusai

Vizsgált család nemzetisége	Vizsgált/érintett beteg	Mutáció előfordulása	Halláskárosodás megjelenésének ideje	Egyéb tünet	Más lelet	Vizsgált gén
Skót	14/13	homo/heteropl	3-18 év	-	Polimorf.	MT-CYB
új-zélandi	10/18	Heteroplasztikus	2.évtized	-	Két szek. Leber mut.	MT-ND
Japán	3/17	homoplasztikus	gyermekkor	PPK	-	-
francia	2/4	homoplasztikus	>6 év	PPK	nem vizsg.	-
Ukrán	5/7	homoplasztikus	6-15 év	-	-	-
portugál	8/10	homoplasztikus	nincs adat	PPK	Nem vizsg.	-
magyar	5/2	homo/heteropl.	gyermekkor	-	Polimorf.	16S rRNS, MT-ND, Mt-CYB, MT-COI-II

6.4. A mt11777C>A mutáció következtében kialakult Leigh szindróma fenotípusa

A vizsgált gyermek kezdeti tünetei - negatív családi- és terhességi anamnézist követően - a korai perinatális időszakban fellépő nyugtalanság, hányás majd az ötödik életnapon fellépő mioklonusok voltak. Az ekkor elvégzett koponya MR vizsgálat a nyúltagy és a középagy területén kóros szignálintenzitást mutatott, a gastroenterológiai kivizsgálás negatív eredményt adott. Hét hónaposan fizikális státuszában spaszticitás, konvulzió, és cerebrál parézis volt észlelhető, az elvégzett EEG vizsgálat hipszaritmiát véleményezett. West szindróma diagnózisát állították fel, és antiepileptikus kezelést kezdtek, a gyógyszer beállítását követően 16 hónapos koráig görcsmentes volt, EEG vizsgálat negatív lett. A megismételt 1,5-T MR vizsgálat az egész nyúltagy és középagy területén fokozott szignálintenzitást mutatott, a proton spektrometria emelkedett laktát szignált detektált. Bár a gyermeknek „stroke-like” tünetei nem voltak, a klinikai kép mitokondriális encefalomiopátiát valószínűsített. Ezt követően a betegség gyorsan progrediált, a gyermek szomnolens lett, gyakran hányás jelentkezett, a kardiológiai vizsgálat hipertrófiás kardiomiopátiát észlelt. A légzés- és keringés leállása miatt 17 hónaposan exitált.

A kórbonctani vizsgálat során a szív bal kamra súlyos hipertrófiáját és az agy életkorhoz képest alacsonyabb súlyát (80%) észlelték. A fagyasztott izommintán NADH dehidrogenáz és COX enzimaktivitást mértek, a NADH dehidrogenáz aktivitása 40%-os

csökkenést mutatott a negatív kontrollhoz képest. A szív- és vázizom elektromikroszkópos vizsgálata az izomfilamentumok degenerációját, glikogén akkumulációt és súlyos mitokondriális károsodást írt le. Az agy hisztológiai vizsgálati képe megfelelt a szubakut nekrotizáló encefalopátiának.

A beteg véréből, májából és vázizmából izolált DNS-en a leggyakoribb, Leigh szindrómát és MELAS-t okozó mutációk vizsgálata negatív eredményt adott. Ezt követően a mt11777C>A mitokondriális mutációt vizsgáltuk, amit a beteg minden mintájában heteroplazmiás formában detektáltunk. RFLP agaróz gél denzitometriás analízise az 11777A allél arányát vérben 50%-nak, izomban és májban 60%-nak mutatta.

A beteg 6, női ágú rokonánál is elvégeztük a mt11777C>A mitokondriális mutáció vizsgálatát, a gyermek édesanyjában kb. 3%-os arányú heteroplazmiás formában jelen volt a mutáns variáns.

Betegünkben észlelt eltérések összevetését az irodalomban eddig ismertetett betegek tüneteivel az 5. táblázat mutatja.

5. táblázat. A mtDNS 1177C>A mutáció következtében kialakult Leigh szindróma fenotípusa

beteg nemzetisége/neme	vizsgált szövet	1177C>A mutáció aránya (%)	első tünetek megjelenésének időpontja	egyéb tünetek	egyéb lelet	
					Mitochondriális mutáció	haplotípus
japán /nő1	izom vér mioblaszt fibroblaszt	83 40 78 57	3 év 5 hó (alacsony növés)	Exotrópia (jobb szem) mérsékelt izomtónus csökkenés vér és liquor: emelkedett laktát MRI: a középagy és a talamusz területén bilaterálisan kóros jelintenzitás	73A>, 150C>T, 151C>T, 263A>G, 303delC, 310insC, 489T>C, 527C>G, 1107T>C, 1438A>G, 2706A>G, 3106delC, 4200A>T, 4216T>C, 4317A>G, 4769A>G, 4833A>G, 4985G>A, 5178C>A, 5301A>G, 5442T>C, 5554C>T, 7028C>T, 7129A>G, 7669C>T, 8580C>T, 8860A>G, 10397A>G, 10398A>G, 10400C>T, 10873T>C, 11394T>C, 11719G>A, 12705C>T, 12810A>G, 13984C>T, 14783T>C, 14927A>G, 15043G>A, 15301G>A, 15326A>G, 15622T>C, 15737G>A, 16184insC, 16190delC, 16233C>T, 16291C>T, 16311T>C, 16316A>G, 16362T>C	D 5
japán /nő 2	izom vér mioblaszt	76 52 76	3 év (disztónia)	Exotrópia (bal szem), alacsony növés, fokozott mélyreflexek, disztónia vér/liquor: enyhén emelkedett laktát MRI: bazális ganglionok, substancia nigra és gerincvelő területén bilaterálisan kóros jelintenzitás	73A>G, 143G>A, 152T>C, 204T>C, 263A>G, 489T>C, 709G>A, 1438A>G, 3106delC, 3426A>G, 4769A>G, 4833A>G, 4985G>A, 5108T>C, 7028C>T, 7621T>C, 8701A>G, 8854G>A, 8860A>G, 9540T>C, 10398A>G, 10400C>T, 10873T>C, 11335T>C, 11719G>A, 12705C>T, 14569G>A, 14766T>C, 15043G>A, 15301G>A, 15326A>G, 15746A>G, 16233C>T, 16274G>A, 16362T>C	HV-N-L3
olasz/nő	izom	60	6 év (kétoldali látóideg sorvadás)	Leigh szindróma -szerű tünetek, normál laktát MRI: bazális nukleuszok területén kóros jelintenzitás		ND
angol/férfi	izom agy	93 67-81	67 év (bal oldali nyugalmi tremor)	Hemiparézis, epilepszia, pankreatitisz, vér/liquor: emelkedett laktát, MRI: Frontális és parietális lebenyben és a kisagyi hemiszfériumban hiperintenz léziók		ND
magyar/férfi	izom vér máj	60 ^a 50 ^a 60 ^a	7 hó (spaszticitás, hipotónia, cerebrális parézis)	hipszaritmia, West szindróma MRI: frontális atrófia és kamratágulat, fokozott jelintenzitás a teljes mezenkefalon és a nyúltagy területén agyban emelkedett laktát Toxikus hányás, hipetrófiás obstruktív kardiomiopátia	4216T>C, 11719G>A, 12453T>C, 13708G>A, 15452C>A	J

7. Eredmények megbeszélése

7.1. CDG Ix

A 10 általunk diagnosztizált és a 13 korábban közölt CDG Ix szindrómás beteg klinikai adatait áttekintve specifikus tüneteket és különböző szervek érintettségét vizsgáltuk, ennek kapcsán a következő megállapításokat tehetjük:

- A CDG Ia szindrómára jellegzetes invertált emlőbimbót és abnormális zsíreloszlást más CDG formákban is megfigyelhetjük, bár sokkal ritkábban. Abnormális zsíreloszlás egyéb genetikai rendellenességek részét is képezheti, ilyenek például a különböző kromoszóma poliploiditások, a Wiedemann- Rautenstrauch szindróma és egyéb progéria szindrómák. Ezen kívül társulhat izomdisztrófiákkal is, és előfordulhat izolált rendellenességként is.
- A betegekben leggyakrabban észlelt dizmorfiás tünetek - retrognátia, alacsonyan ülő fül és a dongaláb - nem specifikus tünetek, gyakran kísérik a központi idegrendszer kongenitális anomáliáit vagy magzati hipotónia következtében is kialakulhatnak.
- Az abnormális alvadási paraméterek fontos, CDG-re utaló tünetek, különösen gyakran fordulnak elő az Ix altípusban, néha tünetmentesen, csak kóros laboreredmények formájában észlelhetők. Ezért mindig, CDG gyanúja esetén épp úgy, mint konkrét diagnózisnál, az alvadási paraméterek ellenőrzése szükséges.
- Szemészeti elváltozások szintén gyakran észlelhetők CDG-ben, az Ia altípusban meglehetősen specifikus elváltozásokról számolnak be, például konvergencia strabizmus, látótér kiesés vagy retinitisz pigmentóza (Erlandson 2001, Jensen 2003). A CDG Ix alcsoportban az előbb említettek ritkább előfordulása mellett azonban jellegzetesebb a látóideg sorvadás, valamint kissé ritkábban a kétoldali katarakta és glaukóma társulása. Gyermekkori katarakta számos veleszületett anyagcsere rendellenesség része lehet, megfigyelhető galaktozémiában, peroxisómális- és mitokondriális betegségek része lehet, emellett jellegzetes tünete a Barth és a Lowe szindrómának. Felnőttkorban retinitisz pigmentóza következtében alakulhat ki. Vizsgálataink alapján minden izomhipotóniás, dizmorfiás gyermekben, akinél katarakta is fennáll, CDG irányába történő vizsgálatok elvégzését javasoljuk.

Látóideg sorvadást egyéb klinikai tünetekkel együtt különböző CDG altípusokban (Id, Ie, If, Ik) megfigyeltek. Disztóniás mozgással történő társulása Leber optikus neuropátiában észlelhető, azonban CDG eddig még nem tisztázott altípusában is leírásra került. Ezért javasoljuk LHON esetén, amennyiben a mitokondriális vizsgálatok negatív eredményt adnak, CDG tesztelés elvégzését.

A klinikai tünetek és a kórlefolyás alapján a CDG Ix-es betegek két alcsoportra oszthatók, mint ahogy azt De Lonlay 2001-es cikkében a CDG Ia betegekkel kapcsolatosan felvetette. Eszerint a betegek a tünetek alapján tisztán neurológiai és neurológiai-többszervi tüneteket mutató csoportra oszthatók. A csak neurológiai tüneteket mutató betegek kórlefolyása enyhébb, míg a másik csoportba tartozóknál korábbi kezdet, gyorsabb kórlefolyás észlelhető.

7.2. Rett szindróma

A szindróma klasszikus formájában szenvedő betegek kb. 60%-ában lehetett az *MECP2* gén mutációit kimutatni, irodalmi adatok alapján (Moretti 2006, Kriaucionis 2003). Mi a beteganyagunkban mindössze 27,6%-ban találtuk meg ebben a génben az eltérést. Ennek két magyarázata lehetséges: egyrészt az *MECP2* gént érintő nagyobb genomi átrendeződések, amik a szekvenálással nem detektálhatók, és amelyek a klasszikus esetek kb. 37%-ában, míg az atípusos formák 7,5%-ában kórokozók. A viszonylag alacsony arány másik magyarázatát a fenotípus elemzés adja, hisz az *MECP2* negatív betegek mindössze 16,2%-a mutatta a szindróma klasszikus formáját. Ebben a csoportban a betegek 8%-a kongenitális RTT-ra jellegzetes tüneteket mutatott, 12% fiú volt.

Azt a korábbi feltételezést, hogy a RTT genetikai heterogén, az X kromoszómán elhelyezkedő *CDKL5*, majd a kongenitális forma patogenezisében szerepet játszó *FOXP1* gén felfedezése támasztotta alá (Scala 2005, Weaving 2004, Ariani 2008).

Ezeknek a géneknek a vizsgálata során a *CDKL5* gén kóroki eltérését két atípusos RTT fenotípust mutató betegünkönél találtuk meg, míg a *FOXP1* génben egy esetben sem találtunk eltérést. Ennek hátterében szintén két okot találtunk: egyrészt a *FOXP1* gén általában alacsony arányban észlelhető RTT szindrómásokban, a másik ok, pedig - ahogy korábban már említettük – betegeink között mindössze kb. 8%-ban észleltük a kongenitális forma tüneteit.

Eddig mindössze a *CDKL5* gén 83 mutációját írták le (HGM Database), amik a kórkép változó súlyosságú formáját okozhatják. Mivel a betegszám viszonylag alacsony, és a fehérje funkciójáról és regulációjáról szintén kevés az ismeretünk, egyelőre pontosabb genotípus-fenotípus összefüggéseket nem lehet megállapítani. Az általunk észlelt két új *CDKL5* mutáció pontos hatásának megállapításához további vizsgálatok szükségesek.

Azzal kapcsolatban, hogy az *MECP2* gén mutációja milyen mértékben befolyásolja a fenotípust, igen eltérő véleményeket lehet találni. Zapella és mtsai szerint a korai trunkáló mutációk rosszabb prognózisú RTT-hoz, míg a későiek jobb prognózisú, klasszikus RTT-hez, vagy PSV-hoz vezethetnek (Zapella 2001). Ezzel szemben Weaving és mtsai 72 Rett szindrómás betegen végzett vizsgálat során azt találták, hogy a fenotípus súlyossága és a mutáció típusa, vagy az érintett domén között nincs összefüggés. Azonban egyes résztünetek - mint például a fejkörfogat alakulása, a beszédképesség mértéke, vagy a kéz sztereotípiák megjelenési időpontja – azt valószínűsítik, hogy a trunkáló, vagy a metil-CpG-t kötő domaint (MBD) érintő mutációk súlyosabb fenotípust hoznak létre. Nem-random X inaktivációt betegik 43 %-ban találtak, főleg azokban, akiknél trunkáló, vagy az MBD-t érintő mutáció volt. Mindezek alapján azt véleményezték, hogy az X inaktiváció módosítja a fenotípust. (Weaving 2003). Ismét más vélemények szerint azon betegeknél, akiknél missens mutációt találtak, kevésbé súlyos a klinikai kép és jobb a beszédképességük (Schanen 2004).

A génátrendeződések kimutatására alkalmas vizsgálati módszer az MLPA, ami nemrég került beállításra intézetünkben. Azoknál a betegeknél, akiknél a fentebb leírt vizsgálatok során eltérést nem észleltünk, folyamatban van az *MECP2* és a *CDKL5* vizsgálata ezzel a módszerrel, eddig 1 betegnél észleltünk eltérést.

A kislányt 12 évesen vizsgáltuk mentális elmaradás, szkoliozis és sztereotíp kézmozgás miatt. A gyermek terhességi és perinatális anamnézise negatív, azonban felülni, felállni és járni soha nem tanult meg. Beszédfejlődése megindult, egy évesen kéttagú szavakat mondott, de ezt a képességét 16 hónaposan elhagyta, illetve ekkor sztereotíp, dörzsölő jellegű kézmozgás jelent meg. Epilepsziás rohama nem volt, koponya CT és EEG vizsgálat negatív eredményt adott. Dizmorfiás státuszában mikrokefália, lapos orrgyök és occiput, kis kezek és lábak, jobbra konvex torakolumbális szkoliozis és alszár hipotrófia észlelhető. Neurológiai vizsgálat során kétoldali Achilles-klónust, törzsataxiát és sztereotíp kézmozgást találtunk. Az MLPA vizsgálat az *MECP2* gén 13,5 kb-nyi delécióját mutatta.

7.3. A mt7445A>G mutáció miatt kialakult halláskárosodás

A szenzorineurális halláskárosodás kialakulásában fontos szerepet játszik a 12S rRNS és a Ser^{UCN}-tRNS. Az utóbbi gének számos mutációja ismert (pl. mt1555A>G, mt7472insC, mt7510T>C, mt7511T>C, mt7445A>G), amik összefüggésbe hozhatóak a halláskárosodással, akár önmagában, akár egyéb tünetekkel fordul elő. Betegünkben a mtDNS 7445-ös pozíciójában egy adenin-guanin bázispár cserét találtunk. Az mt7445A>G csere a nehézláncon befolyásolja a citokróm C oxidáz mRNS stop kodonját, és emellett a könnyű láncon összefüggésbe hozható a Ser^{UCN}-tRNS prekursorával. Korábbi, a mitokondriális mutációkkal kapcsolatos halláskárosodással foglalkozó vizsgálatok alátámasztották, hogy a 7445G variáns jelenléte szignifikánsan csökkenti a Ser^{UCN}-tRNS szintet, illetve az mt7445A>G mutációt hordozó sejtekben bizonyos mitokondriális fehérjék szintézise alacsonyabb (Reid 1997). Ez különösen igaz a NADH dehidrogenáz 6-os alegységére (ND6). Ez a megfigyelés azt támasztja alá, hogy a ND6 mRNS-e ugyanabból a prekurból származik, mint a Ser^{UCN}-tRNS.

A 7445G variáns eddig mindössze hat családban került felismerésre, elsőként egy skót, halláskárosodás miatt vizsgált családban találták meg homoplasztikus formában. Ezt követően Új-Zélandon, Japánban, Franciaországban, Ukrajnában és Portugáliában is azonosították halláskárosodás miatt vizsgált családokban, néha palmoplantáris keratodermával kombinálódva, néha anélkül (Reid 1994, Fischel-Ghodsian 1995, Sevier 1998, Martin 2000, Hutchin 2001, Caria 2005). A betegség penetranciája és expresszivitása családon belül is változó volt. Az általunk talált magyar család vizsgálata kapcsán úgy gondoljuk, hogy más mitokondriális és nukleáris faktorok, valamint környezeti ágensek is – nagy valószínűséggel - szerepet játszanak a halláskárosodás kialakulásában. Az érintett mutáció a vizsgált családokban homoplasztikus és heteroplasztikus formában is előfordult, azonban eddig olyan családot, ahol egyszerre mindkét - homo- és heteroplasztikus – forma kimutatható volt, rajtunk kívül még nem észleltek. A nagymamában – ugyan alacsony arányban, de még jelen lévő normál allél, az anyában és az érintett gyermekben már nem szegregálódott, azonban a család másik felében igen alacsony arányú heteroplazmia detektálható. Amellett, hogy a heteroplazmia arányában igen jelentős különbségek észlelhetők családon belül, a család mindkét ágában klinikailag érintett (halláskárosodott) családtagok találhatók. Ez alapján azt a megállapítást tehetjük, hogy a mutáns mtDNS aránya önmagában nem határozza meg szükségszerűen a klinikai tünetek kifejlődését.

Fontosnak tartjuk kihangsúlyozni azt is, hogy az mt7445A>G eltérés analízise, ebben és a korábbi vizsgálatokban is, csak a vér leukocitákban történt meg. A normál és a mutáns allélek aránya a különböző szövetekben, pl. a hallószerv sejtjeiben eltérő lehet, mindamellett, hogy a mutáció által károsított fehérje még nem azonosított. Az azonban mindenképpen lényeges adat, hogy egészséges kontrollokon a mt7445A>G mutáció alapos vizsgálata során kizárólag a normál allélt lehetett kimutatni. Ez alátámasztja a vizsgált családban észlelt eltérés patológiás szerepét.

Még kiemelnénk, hogy a halláskárosodott családtagok között a heteroplazmia arányában észlelhető jelentős különbség alátámasztja azt a véleményt, hogy a vérben észlelhető mutáns mtDNS arány nem feltétlenül meghatározó a klinikai tünetek kialakulása szempontjából.

7.4. A mtDNS 11777C>A mutáció következtében kialakult Leigh szindróma

A Leigh szindróma genetikai háttere igen heterogén, ennek megfelelően számos mtDNS mutáció is állhat a hátterében (Finsterer 2009). A leggyakoribb okok az oxidatív foszforiláció rendellenességei, amit számos különböző neurodegeneratív kórképben leírtak (Dahl 1998, Lin 2006). Az 11777-es pozícióban létrejövő C → A csere a NADH dehidrogenáz enzim 4-es alegységét kódoló (ND4) gént érinti, ami a belső mitokondriális membránon elhelyezkedő I-es komplex multiprotein alegysége. A C → A eltérés a 340-es pozícióban egy arginin-szerin aminosav cserét okoz. Annak mechanizmusa, hogy a mutáció hogyan befolyásolja a ND4-et, illetve az I-es komplex funkcióját, még pontosan nem ismert. Az ND4-nek szabályozó szerepe van az I-es komplex által történő NADH-oxidáció folyamán keletkező ubisemiquinon termékek kötése kapcsán. A transzmembrán protein N-terminális régiójában, a membrán mátrixhoz közeli oldalán elhelyezkedő pozitív töltésű arginin stabilizálja az ubisemiquinon anionokat. A C → A bázis szubsztitúció egy töltés nélküli szerin beépülését eredményezi a proteinbe, ami csökkenti az ND4 alegység ubiquinon kötő kapacitását (Fearnley 1992, Bugiani 2004).

Ugyan a mt11777C>A mutáció egy gyakorinak tartott elváltozás, mindössze négy betegben azonosították az irodalomban (Deschauer 2003, Komaki 2003, Bugiani 2004). Az első ismertetett beteg egy angol férfi volt, tünetei – bal oldali nyugalmi tremor, hemiparézis, epilepszia és pankreatitisz - 67 éves korában jelentkeztek. A laborvizsgálatok során emelkedett laktát értéket találtak mind a vérben, mind a liquorban. A koponya MRI

frontálisan és parietálisan, valamint a kisagy területén hiperintenz léziókat talált. Izombiopszia kapcsán elvégzett légzési lánc enzimaktivitás mérés során az I-es komplex aktivitás hiányát észlelték, valamint heteroplazmiás formában megtalálták a mtDNS 11777C>A mutációt. A postmortem elvégzett genetikai vizsgálat során a heteroplazmia arányát a kis-, és középagy területén 67%-nak, a hipokampusz területén 81%-nak és a girusz frontális területén 69%-nak találták (Deschauer 2003). Egy olasz nőbetegben a kezdeti tünet a 6 éves korban fellépő kétoldali látóideg sorvadás volt, az ő esetében a laktát érték normális határon belül volt. Az MR vizsgálat a rostrális középagy és a bazális magok érintettségét mutatta. Az izommintából elvégzett genetikai vizsgálat során a mutáció 60%-os heteroplazmiás arányát észlelték (Bugiani 2004). Rajtuk kívül két japán nőbetegben mutatták ki a nevezett mutációt. Egyikőjüket 3,5 éves korban alacsony növény, jobb szem exotrófia miatt vizsgálták. A laktát szint a vérben és a liquorban is emelkedett volt, az MR a középagyban bilaterálisan és a talamusz területén mutatott kóros jelintenzitást. A másik betegük első tünetei a három éves korban fellépő disztónia, bal szem exotrófia és fokozott mélyreflexek voltak. Az ő esetében is mind a vérben, mind a liquorban emelkedett laktát szint volt kimutatható, illetve MRI-vel és a bazális ganglion, a substantia nigra és a gerincvelő területén volt látható kétoldali kóros jelintenzitás. A mutáns mitokondriális DNS aránya az első betegnél az izomban 83%, a vérben 40%, a mioblasztban 78%, míg a fibroblasztban 57% volt, a második betegnél az izomban 76%, a vérben 52%, a mioblasztban pedig 76% volt (Komaki 2003).

A mtC11777A mutáció minden betegben heteroplazmiás formában volt jelen, ennek aránya 40-93% között változott. Az 11777A allél aránya magasabb volt az agyból és az izomból izolált DNS mintákban, ami patogén mitokondriális DNS mutációk esetén szokásos tünet.

Emelkedett laktát szint, egy ismertetett beteg kivételével, minden esetben kimutatható volt. Az első tünetek - szintén egy beteg kivételével, akinek tünetei 67 évesen jelentkeztek – viszonylag kora gyermekkorban (7 hónap- 6 év) léptek fel.

Az irodalmi adatokat összevetve a tünetek az általunk ismertetett betegnél jelentkeztek a legkorábban (7 hónapos korban), és ezek a többi beteg tüneteitől jelentősen eltértek (West szindróma, toxikus hányás és hipertrófiás obstruktív kardiomiopátia). A betegség progressziója az ő esetében igen agresszív volt, ami korai fatális kimenetelhez vezetett. Mindezek alapján betegünk a többi ismertetett esettől jelentősen eltér, ezzel is alátámasztva, hogy rendkívül széles a talált mutáció által okozott fenotípusos spektrum.

8. Összefoglalás

Tanulmányunkban a következő genotípus-fenotípus asszociációkat figyeltük meg:

1. CDG Ix szindrómás betegek vizsgálata kapcsán:

- meghatározó tüneteknek a fejlődésbeli késést és az axiális izomhipotóniát tartjuk, emellett a betegek kb. felében nem specifikus kraniofaciális dizmorfia észlelhető (mikro/retrognátia, hipertelorizmus, nagy és alacsonyan ülő fül).
- magas a véralvadási rendellenességek előfordulási aránya, ami esetenként csak kóros laboreredmények formájában észlelhető, ezért javasolt az alvadási paraméterek ellenőrzése ezekben a betegekben.
- a klinikai képhez gyakran társul szemészeti rendellenesség, ami leggyakrabban látóideg sorvadás.
- néhány esetben a tünetek szokatlan tárulása alapján merül fel a CDG Ix diagnózisa.

2. A Rett szindróma tüneteit mutató betegekben:

- részletesen meghatároztuk az *MECP2* génben észlelt mutációk megoszlását és frekvenciáját.
- pontos megfigyeléseket tettünk a fenotípusos jegyekkel és a betegség progressziójával kapcsolatban a genotípus viszonylatában.
- a *CDKL5* génvizsgálata során két betegben egy-egy új mutációt írtunk le, amihez meghatároztuk a pontos klinikai képet.
- eredményeink alapján javasoljuk a korai terápiarezisztens epilepsziával járó RTT betegekben a *CDKL5* gén vizsgálatának elvégzését az *MECP2* gén negativitása esetén, vagy akár első vizsgálatként is elvégezni.

3. A mtDNS 7445A>G mutációt hordozó család vizsgálata során:

- első alkalommal észleltük magyar családban ezt a ritka mutációt
- a kóros forma megoszlásában jelentős különbségeket találtunk az érintett és a klinikailag egészséges tagok között, ezzel alátámasztottuk azt a tényt, hogy a klinikai kép szempontjából – akár egy tünet súlyosságát, akár egyéb társuló tünetek jelenlétét tekintve - a vérben észlelhető kóros mtDNS arány nem meghatározó.

4. A mt11777C>A mutációja következtében kialakult Leigh szindróma esetén:

- új fenotípust írtuk le, mivel egyrészt betegünkben lépett fel a legfiatalabb életkorban a betegség. A vezető tünetek - West szindróma, toxikus hányás és hipertrófiás obstruktív kardiomiopátia – szintén eltértek az eddig ismertetett betegektől, a kórlefolyás pedig a többi beteggel összehasonlítva lényegesen gyorsabb progressziót mutatott.
- a saját és az irodalomban ismertetett betegek fenotípusát vizsgálva megfigyeltük, hogy a mt11777C>A mutáció következtében kialakuló kórképek széles klinikai spektrumot ölelnek fel.

9. Irodalomjegyzék

www.eurordis.org

www.hgmd.org

www.orpha.net

<http://mecp2.chw.edu.au/>

Acarregui MJ, George TN, Rhead WJ. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1 with profound thrombocytopenia and normal phosphomannomutase and phosphomannose isomerase activities. *J Pediatr* 1998;133:697-700.

Aebi M, Helenius A, Schenk B, Barone R, Fiumara A, Berger EG. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes become congenital disorders of glycosylation. An updated nomenclature for CDG. First International Workshop on CDGS. *Glycoconj J* 1999;16:669-671.

Amir R, Van den Veyver I, Wan M, Tran C, Francke U, Zoghbi H. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 1999;23:185-188.

Ariani F, Hayek G, Rondinella D, Artuso R, Mencarelli MA, Spanhol-Rosseto A, Pollazzon M, Buoni S, Spiga O, Ricciardi S, Meloni I, Longo I, Mari F, Broccoli V, Zappella M, Renieri A. FOXP1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome. *Am J Hum Genet* 2008;83:89-93.

Assmann B, Hackler R, Peters V, Schaefer JR, Arndt T, Mayatepek E. A new subtype of a congenital disorder of glycosylation (CDG) with mild clinical manifestations. *Neuropediatrics* 2001;32:313-318.

Bititci OO. Familial hereditary, progressive sensori-neural hearing loss with keratosis palmaris and plantaris. *J Laryngol Otol* 1975;89:1143-6.

Bugiani M, Invernizzi F, Alberio S, Briem E, Lamantea E, Carrara F. Clinical and molecular findings in children with complex I deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004;1659, 136-147.

Caria H, Matos T, Oliveira-Soares R, Santos AR, Galhardo I, Soares-Almeida L, Dias O, Andrea M, Correia C, Fialho G. A7445G mtDNA mutation present in a Portuguese family exhibiting hereditary deafness and palmoplantar keratoderma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005;19:455-458.

Casano RA, Bykhovskaya Y, Johnson DF, Hamon M, Torricelli F, Bigozzi M, Fischel-Ghodsian N. Hearing loss due to the mitochondrial A1555G mutation in Italian families. *Am J Med Genet* 1998;79:388-391.

Cohn RD, Eklund E, Bergner AL, Casella JF, Woods SL, Althaus j. Intracranial hemorrhage as the initial manifestation of a congenital disorder of glycosylation. *Pediatrics* 2006;118:514-521.

Dahl HH. Getting to the nucleus of mitochondrial disorders: Identification of respiratory chain-enzyme genes causing Leigh syndrome. *Am J Hum Genet* 1998;63:1594-1597.

De Kok YJ, van der Maarel SM, Bitner-Glindzicz M, Huber I, Monaco AP, Malcolm S, Pembrey ME, Ropers HH, Cremers FR. Association between X-linked mixed deafness and mutations in the Pou domain gene POU3F4. *Science* 1995;267:685-688.

De Lonlay P, Seta N, Barrot S, Chabrol B, Drouin V, Gabriel BM. A broad spectrum of clinical presentations in congenital disorders of glycosylation I: a series of 26 cases. *J Med Genet* 2001;38:14-19.

Deschauer M, Bamberg C, Calus D, Zierz S, Turnbull DM, Taylor RW. Late-onset encephalopathy associated with a C11777A mutation of mitochondrial DNA. *Neurology* 2003;60:1357-1359.

Di DS. Multisystem manifestations of mitochondrial disorders. *J Neurol* 2009;256:693-710.

Di Mauro S, DeVivo DC. Genetic heterogeneity in Leigh syndrome. *Annals Neurol* 1996;40:5-7.

Di Rocco M, Hennet T, Grubemann CE, Pagliardini S, Allegri AE, Frank CG. Congenital disorders of glycosylation (CDG) Ig: report on a patient and review of the literature. *J Inher Metab Dis* 2005;28: 1162-1164.

Edmond JC. Mitochondrial disorders. *Int Ophthalm Clin* 2009;49:27-33.

Erlanson A, Bjursell C, Sibling H, Kristiansson B, Wahlstrom J, Martinsson T. Scandinavian CDG1a patients: genotype/phenotype correlation and geographic origin of founder mutations. *Hum Genet* 2001;108:359-367.

Fearnley IM, Walker JE. Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1992;1140:105-134.

Finsterer J. Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Ped Neurol* 2008;39:223-235.

Finsterer J. Mitochondrial disorders, cognitive impairment and dementia. *J Neurol Sci* 2009;283:143-148.

Fischel-Ghodsian N, Prezant TR, Fourier P, Stewart IA, Maw M. Mitochondrial mutation associated with nonsyndromic deafness. *Am J Otolaryngol* 1995;16:403-408.

Fischel-Ghodsian N. Mitochondrial mutations and hearing loss: paradigm for mitochondrial genetics. *Am J Hum Genet* 1998;62(2):15-19.

Fischel-Ghodsian N. Mitochondrial deafness mutations reviewed. *Hum Mutat* 1999;13(4):261-270.

Fischel-Ghodsian N. Mitochondrial deafness. *Ear Hear* 2003;24:303-313.

Freeze HH. Disorders in protein glycosylation and potential therapy: tip of an iceberg? *J Pediatr* 1998;133:593-600.

Girard M, Couvert P, Carrie A, Tardieu M, Chelly J, Beldjord C, Bienvenu T. Parental origin of de novo MECP2 mutations in Rett syndrome. *Eur J Hum Genet* 2001;9:231-236.

Grünewald S, Imbach T, Huijben K, Rubio-Gozalbo ME, Verrips A, de Klerk JB. Clinical and biochemical characteristics of congenital disorder of glycosylation type Ic, the first recognized endoplasmic reticulum defect in N-glycan synthesis. *Ann Neurol* 2000;47:776-781.

Grünewald S, Matthijs G, Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation: a review. *Pediatr Res* 2002;52:618-624.

Guan MX, Enriquez JA, Fischel-Ghodsian N, Puranam RS, Lin CP, Maw MA, Attardi G. The deafness-associated mitochondrial DNA mutation at position 7445, which affects tRNA^{Ser}(UCN) precursor processing, has long-range effects on NADH dehydrogenase subunit ND6 gene expression. *Mol Cell Biol* 1998;18:5868-5879.

Hagberg B. Clinical manifestations and stages of Rett syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002;8:61-65.

Hatamochi A, Nakagawa S, Ueki H, Miyoshi K, Iuchi I. Diffuse palmoplantar keratoderma with deafness. *Arch Dermatol*. 1982;118:605-7.

Hommes FA, Polman HA, Reerink JD. Leigh's encephalomyelopathy: An inborn error of gluconeogenesis. *Arch Dis Child* 1968;43:423-426.

Hutchin TP, Parker MJ, Young ID, Davis AC, Pulleyn LJ, Deeble J, Lench NJ, Markham AF, Mueller RF. A novel mutation in the mitochondrial tRNA^{(ser(UCN))} gene in a family with non-syndromic sensorineural hearing impairment. *J Med Genet* 2000;37:692-694.

Hutchin TP, Lench NJ, Arbuzova S, Markham AF, Mueller RF. Maternally inherited hearing impairment in a family with the mitochondrial DNA A7445G mutation. *Eur J Hum Genet* 2001;9:56-58.

Jaeken J, van Eijk HG, Corbeel L, Eeckels R, Eggermont E. Sialic acid-deficient serum and cerebrospinal fluid transferrin in a newly recognized genetic syndrome. *Clin Chim Acta* 1984;144:245-247.

Jaksch M, Klopstock T, Kurlmann G, Dorner M, Hofmann S, Kleinle S, Hegemann S, Weissert M, Müller-Hocker J, Pongratz D, Gerbitz KD. Progressive myoclonus epilepsy and mitochondrial myopathy associated with mutation in the tRNA^{(Ser(UCN))} *Ann Neurol* 1998;44:635-640.

Jensen H, Kjaergaard S, Klie F, Møller HU. Ophthalmic manifestations of congenital disorder of glycosylation type 1a. *Ophthalmic Genet* 2003;24:81-88.

- Kokotas H, Petersen MB, Willems PJ. Mitochondrial deafness. *J Clin Genet* 2007;71:379-391.
- Komaki H, Akanuma J, Iwata H, Takahashi T, Mashima Y, Nonaka I. A novel mtDNA C11777A mutation in Leigh syndrome. *Mitochondrion* 2003;2:293-304.
- Kranz C, Jungeblut C, Denecke J. A defect in dolichol phosphate biosynthesis causes a new inherited disorder with death in early infancy. *Am J hum Genet* 2007;80:433-440.
- Kriaucionis S, Bird A. DNA methylation and Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 2003;12 Spec No 2:221-227.
- Lehtonen MS, Uimonen S, Hassinen IE, Majamaa K. Frequency of mitochondrial DNA point mutations among patients with familial sensorineural hearing impairment. *Eur J Hum Genet* 2000;8:315-318.
- Leigh D. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in a infant. *J Neurol Neurosurg Psych* 1951;14:216-221.
- Leonard J, Grünewald S, Clayton P. Diversity of congenital disorders of glycosylation. *Lancet* 2001;357:1382-1383.
- Levinger L, Jacobs O, James M. In vitro 3'-end endonucleolytic processing defect in a human mitochondrial tRNA(Ser(UCN)) precursor with the U7445C substitution, which causes non-syndromic deafness. *Nucleic Acids Res* 2001;29:4334-4340.
- Li R, Greinwald JH, Yang L, Choo DI, Wenstrup RJ, Guan MX. Molecular analysis of the mitochondrial 12S rRNA and tRNA^{Ser}(UCN) genes in paediatric subjects with non-syndromic deafness. *J Med Genet* 2004;41:615-620.
- Li X, Zhang S, Fischel-Ghodsian N, Guan MX. Biochemical characterization of the deafness-associated mitochondrial tRNA^{Ser}(UCN) A7445G mutation in osteosarcoma cell hybrids. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:491-498.
- Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative disease. *Nature* 2006;443:787-795.
- Maász A, Komlósi K, Hadzsiev K, Szabó Z, Willems PJ, Gerlinger I, Kosztolányi G, Méhes K, Melegh B. Phenotypic variants of the deafness-associated mitochondrial DNA A7445G mutation. *Curr Med Chem* 2008;15:1257-62.
- Mari F, Azimonti S, Bertani I, Bolognese F, Colombo E, Caselli R, Scala E, Longo I, Grosso S, Pescucci C, Ariani F, Hayek G, Balestri P, Bergo A, Badaracco G, Zappella M, Broccoli V, Renieri A, Kilstrup-Nielsen C, Landsberger N. CDKL5 belongs to the same molecular pathway of MeCP2 and it is responsible for the early-onset seizure variant of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 2005;14:1935-1946.

Martin L, Toutain A, Guillen C, Haftek M, Machet MC, Toledano C, Arbeille B, Lorette G, Rotig A, Vaillant L. Inherited palmoplantar keratoderma and sensorineural deafness associated with A7445G point mutation in the mitochondrial genome. *Br J Dermatol* 2000;143:876-883.

McKenzie FA, Fietz M, Fletcher J, Smith RLL, Wright IMR, Jaeken J. A previously undescribed form of congenital disorder of glycosylation with variable presentation in siblings: early fetal loss with hydrops fetalis, and infant death with hypoproteinemia. *Am J Med Genet* 2007;143A:2029-2034.

Mention K, Michaud L, Dobbelaere D, Guimber D, Gottrand F, Turck D. Neonatal severe intractable diarrhoea as the presenting manifestation of an unclassified congenital disorder of glycosylation (CDG x). *Arch Dis Child Fetal Neonatol* 2001;85:F217-F219.

Moretti P, Zoghbi H. MeCP2 dysfunction in Rett syndrome and related disorders. *Curr Opin Genet Dev* 2006;16:276-281.

Nemos C, Lambert L, Giuliano F, Doray B, Roubertie A, Goldenberg A, Delobel B, Layet V, N'guyen MA, Saunier A, Verneau F, Jonveaux P, Philippe C. Mutational spectrum of CDKL5 in early-onset encephalopathies: a study of a large collection of French patients and review of the literature. *Clin Genet* 2009;76:357-371.

Petersen MB. Non-syndromic, autosomal-dominant deafness. *Clin Genet* 2002;62:1-13.

Petersen MB, Willems PJ. Non-syndromic, autosomal-recessive deafness. *J Clin Genet* 2006;69:371-379.

Prietsch V, Peters V, Hackler R, Jakobi R, Assmann B, Fang J. A new case of CDG x with stereotyped dystonic hand movements and optic atrophy. *J Inher Metab Dis* 2002;25:126-130.

Rahmann S, Blok RB, Dahl HH, Danks DM, Kirby DM, Chow CW. Leigh syndrome: Clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Annals Neurol* 1996;39:343-351.

Reid FM, Vernahm GA, Jacobs HT. A novel mitochondrial point mutation in a maternal pedigree with sensorineural deafness. *Hum Mutat* 1994;3:243-247.

Reid FM, Vernahm GA, Jacobs HT. Complete mt DNA sequence of a patient in a maternal pedigree with sensorineural deafness. *Hum Mol Genet* 1994;3:1435-1436.

Reid FM, Rovio A, Holt IJ, Jacobs HT. Molecular phenotype of a human lymphoblastoid cell-line homoplasmic for the np 7445 deafness-associated mitochondrial mutation. *Hum Mol Genet* 1997;6:443-449.

Rett A. On an unusual brain atrophy syndrome in hyperammonemia in childhood. *Wien Med Wochenschr* 1966;116:723-726.

Ruiter EM, Siers MH, van den Elzen C, van Engelen BG, Smeitink JA, Rodenburg RJ. The mitochondrial 13513G>A mutation is most frequent in Leigh syndrome combined with reduced complex I activity, optic atrophy and/or Wolff-Parkinson-Witke. *Eur J Hum Genet* 2007;15:155-161.

Santorelli FM, Shanske S, Macaya A, DeVivo DC & DiMauro S. The mutation at nt 8993 of mitochondrial DNA is a common cause of Leigh's syndrome. *Annals Neurol* 1993;34:827-834.

Scala E, Ariani F, Mari F, Caselli R, Pescucci C, Longo I, Meloni I, Giachino D, Bruttini M, Hayek G, Zappella M, Renieri A. CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms. *J Med Genet* 2005;42:103-107.

Schanen C, Houwink EJ, Dorrani N, Lane J, Everett R, Feng A, Cantor RM, Percy A. Phenotypic manifestations of MECP2 mutations in classical and atypical Rett syndrome. *Am J Med Genet* 2004;126A:129-140.

Seviour KB, Hatamochi A, Stewart A, Bykhovskaya Y, Allen-Powell DR, Fischel-Ghodsian N, Maw MA. Mitochondrial A7445G mutation in two pedigrees with palmoplantar keratoderma and deafness. *Am J Med Genet* 1998;75:179-185.

Sharland M, Bleach NR, Gøberdhan PD, Patton MA. Autosomal dominant palmoplantar hyperkeratosis and sensorineural deafness in three generations. *J Med Genet*. 1992;29:50-2.

Skjeldal O, von Tetzchner S, Aspelund F, Herder G, Løfterød B. Rett syndrome: geographic variation in prevalence in Norway. *Brain Dev* 1997;19:258-261.

Tan K, Shaw A, Madsen B, Jensen K, Taylor-Papadimitriou J, Freemont P. Human PLU-1 Has transcriptional repression properties and interacts with the developmental transcription factors BF-1 and PAX9. *J Biol Chem* 2003;278:20507-20513.

Tekin M, Duman T, Bogoclu G, Incesulu A, Comak E, Fitoz S, Yilmaz E, İlhan I, Akar N. Frequency of mtDNA A1555G and A7445G mutations among children with prelingual deafness in Turkey. *Eur J Ped* 2003;162:154-158.

Thiel C, Schwarz M, Peng J, Grzmil M, Hasilik M, Braulke T. A new type of congenital disorders of glycosylation (CDG II) provides new insights into the early steps of dolichol-linked oligosaccharide biosynthesis. *J Biol Chem* 2003;278:22498-22505.

Tiranti V, Hoertnagel K, Carrozzo R, Galimberti C, Murano M, Granatiero M. Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am J Hum Genet* 1998;63:1609-1621.

Tranebjærg L, Schwartz C, Eriksen H, Andreasson S, Ponjavic V, Dahl A, Stevenson RE, May M, Arena F, Barker D. A new X linked recessive deafness syndrome with blindness, dystonia, fractures and mental deficiency is linked to Xq22. *J Med Genet* 1995;32:257-263.

Usami S, Abe S, Akita J, Namba A, Shinkawa H, Ishii M, Iwasaki S, Hoshino T, Ito J, Doi K, Kubo T, Nakagawa T, Komiyama S, Tono T, Komune S. Prevalence of mitochondrial gene mutations among hearing impaired patients. *J Med Genet* 2000;37:38-40.

Van Camp G, Smith RJ. Nonsyndromic hearing impairment. <http://webh01.ua.ac.be/hhh/>. Hereditary Hearing Loss Homepage 1997.

Verhoeven K, Ensink RJ, Tiranti V, Huygen PL, Johnson DF, Schattelman I, Van Laer L, Verstreken M, Heyning P, Fischel-Ghodisan N, Zeviani M, Cremens CW, Willems PJ, Van Camp G. Hearing impairment and neurological dysfunction associated with a mutation in the mitochondrial tRNA^{Ser}(UCN) gene. *Eur J Hum Genet* 1999;7:45-51.

Villard L, Cardoso AK, Chelly PJ, Tardieu PM, Fontes M. Two affected boy in Rett syndrome family: clinical and molecular findings. *Neurology* 2000;55:1188-1193.

Weaving LS, Williamson SC, Bennetts B, Davis M, Ellaway CJ, Leonard H, Thong MK, Delatycki M, Thompson EM, Laing N, Christodoulou. Effects of MECP2 mutation type, location and X-inactivation in modulating Rett syndrome phenotype. *Am J Med Genet* 2003;118:103-114.

Weaving LS, Christodoulou J, Williamson SL, Friend KL, McKenzie OL, Archer H, Evans J, Clarke A, Pelka GJ, Tam PP, Watson C, Lahooti H, Ellaway CJ, Bennetts B, Leonard H, Gécz J. Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation. *Am J Hum Genet* 2004;75:1079-1093.

Willems PJ. Genetic causes of hearing loss. *N Engl J Med* 2000;342(15):1101-1109.

Worsley HE, Brookfield RW, Elwood JS, Noble RL, Taylor WH. Lactic acidosis with necrotizing encephalopathy in two sibs. *Arch Dis Child* 1965;40:492-501.

Zapella M, Meloni I, Longo I, Hayek G, Renieri A. Preserved speech variants of the Rett syndrome: molecular and clinical analysis. *Am J Med Genet* 2001;104:14-22.

Zentilin BM, de Lonlay P, Seta N, Besnard M, Pelatan C, Ogier H. Failure to thrive and intestinal diseases in congenital disorder of glycosylation. *Arch Pediatr* 2003;10:590-595.

Zhu Z, Yao J, Johns T, Fu K, De BI, Macmillan C. SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nature Genetics* 1998;20:337-343.

10. Közlemények jegyzéke

A dolgozat alapjául szolgáló eredeti közlemények

Morava E, Wosik H, Kárteszi J, Guillard M, Adamowicz M, Sykut-Cegielska J, **Hadzsiev K**, Weavers RA, Lefeber DJ. Congenital disorder of glycosylation type Ix:review of clinical spectrum and diagnostic steps. *J Inherit Metab Dis* 2008;31(3):450-456.

IF: 2,69

Maász A, Komlósi K, **Hadzsiev K**, Szabó Z, Willems PJ, Gerlinger I, Kosztolányi Gy, Méhes K, Melegh B. Phenotypic variants of the deafness-associated mitochondrial DNA A7445G mutation. *Curr Med Chem* 2008;15(13):1257-1262.

IF: 4,82

Hadzsiev K, Maász A, Kisfali P, Kálmán E, Gömöri E, Pál E, Berényi E, Komlósi K, Melegh B. Mitochondrial DNA 11777C>A mutation associated Leigh syndrome: case report with review of the previously described pedigrees. *Neuromolecular Med.* 2010;12(3):277-284.

IF: 2,6

Hadzsiev K, Polgár N, Bene J, Komlósi K, Kárteszi J, Hollódy K, Kosztolányi Gy, Renieri A, Melegh B. Analysis of Hungarian patients with Rett syndrome phenotype for *MECP2*, *CDKL5*, and *FOXG1* gene mutations. *J Hum Genet* PMID: 21160487

IF: 2,5

A témában megjelent egyéb közlemények

Hadzsiev K, Veszprémi B, Vizer M. Egy ritka koponyacsont-fejlődési rendellenesség peripheriás csontanomáliákkal. *Gyermekgyógyászat*, 1997, 48 (6): 674-677

Hadzsiev K, Czakó M, Kaiser L, Kosztolányi Gy. Két hétig élt újszülöttben észlelt 14-es triszómia különböző arányú szervi mozaikossággal. *Gyermekgyógyászat*, 2002, 53(1): 65-68

Kárteszi J, Hollódy K, Bene J, Morava E, **Hadzsiev K**, Czakó M, Melegh B, Tészás A, Kosztolányi G. Mutation analysis of MECP2 and determination of the X-inactivation pattern in Hungarian Rett syndrome patients. *Am J Med Genet A*. 2004, 15;131(1):106.

IF: 3,659

Kárteszi J, Hollódy K, Bene J, Morava E, **Hadzsiev K**, Czakó M, Melegh B, Kosztolányi G. Mutational analysis of the MECP2 gene by direct sequencing in Hungarian patients with Rett syndrome. *Orv Hetil.* 2004;145(17):909-11.

Kellermayer R, Siitonen HA, **Hadzsiev K**, Kestilä M, Kosztolányi G. A patient with Rothmund-Thomson syndrome and all features of RAPADILINO. *Arch Dermatol.* 2005;141(5):617-20.

IF: 3,43

Kellermayer R, Hsu AP, Stankovics J, Balogh P, **Hadzsiev K**, Vojcek A, Maródi L, Kajtár P, Kosztolányi G, Puck JM. A novel IL2RG mutation associated with maternal T lymphocyte engraftment in a patient with severe combined immunodeficiency. *J Hum Genet.* 2006;51(5):495-7

IF: 2,205

Kárteszi J, Kosztolányi G, Czakó M, **Hadzsiev K**, Morava E. Transient progeroid phenotype and lipodystrophy in mosaic polyploidy. *Clin Dysmorphol.* 2006;15(1):29-31.

IF: 0,534

Kleefstra T, Wortmann SB, Rodenburg RJ, Bongers EM, **Hadzsiev K**, Noordam C, van den Heuvel LP, Nillesen WM, Hollody K, Gillessen-Kaesbach G, Lammens M, Smeitink JA, van der Burgt I, Morava E. Mitochondrial dysfunction and organic aciduria in five patients carrying mutations in the Ras-MAPK pathway. *Eur J Hum Genet.* 2011, 19(2):138-44.

IF: 3,56

Más témában megjelent közlemények

Kaiser L, Pajor L, Arany A, Veszprémi B, Hadzsiev K, Vizer M. Fetus as a patient- a pathological approach. *Cesko-Slovenska Pediatrie*, 1997,7: 469-470

Hadzsiev K, Veszprémi B, Arany A, Vizer M, Vereczkey G, Szabó I, Farkas A. Congenital malformations dignosed during pregnancy and operated after birth. Review of five years experience: success and pitfalls. *Cesko-Slovenska Pediatrie*, 1997, 7: 474-475

Hadzsiev K, Thurzó V, Ertl T, Sárkány I, Szabó I. Ultrasound examination of gastric emptying in preterm infants. *Archives of Perinatal Medicine*, 4, 45-45, 1998

Ertl T, **Hadzsiev K**, Vincze O, Pytel J, Szabo I, Sulyok E. Hyponatremia and sensorineural hearing loss in preterm infants. *Biol Neonate.* 2001;79(2):109-12.

IF:1,072

Aszmann M, **Hadzsiev K**, Kosztolányi G. Rehabilitation needs of a genetic counseling unit. *Genet Couns.* 2005;16(4):417-9.

IF: 0,456

Hadzsiev K, Tárnok A, Kosztolányi G, Méhes K. Excess of malignancies in grandparents of children with malformations? *Acta Biol Hung* 2006;57(1):137-40.

IF:0, 688

Hadzsiev K, Czakó M, Veszprémi B, Kosztolányi Gy. Magzati kromoszóma-rendellenességek gyors diagnosztizálása interfázis fluoreszcens in situ hibridizációval. *Orv Hetil.* 2007, 148, 30: 1401-1404

Bondor B, Kártesz J, **Hadzsiev K**, Kellermayer R, Melegh B, Kosztolányi G. Psychological aspects of presymptomatic diagnosis in Huntington disease. *Orv Hetil.* 2008;149(13):609-12.

Idézhető absztraktok

Szilágyi A, Thurzó V, **Hadzsiev K**, Feledi É, Ertl T, Szabó I. Perinatal outcome in newborns of diabetic pregnant women. *Diab Nutr Metab* 10 (Suppl to 6) 26, 1997

Hadzsiev K, Schmidt I, Ertl T, Tamás P, Szabó I. Impedance cardiography of the neonate XIIth Congress of Perinatal Medicine, XXth Alpe Adria Meeting Proceedings (eds: Pajntar M, Cerar T, Premu-Srsen, M. Trenkic) Ljubljana, 1998 ISBN 961-90492-3-3, 108

Hadzsiev K, Ertl T, Vincze O, Pytel J, Kiss T, Szabó I, Sulyok E. Hyponatraemia and sensorineural hearing loss in preterm infants. Preeclampsia, perinatal hemorrhage and hemostatic problems, XIIIth Congress of Perinatal Medicine, XXIst Alpe Adria Meeting Abstracts (eds: Walcher W, Rosegger H) Graz, 2000 ISBN: 3-00-005155-4, 38.

K Hadzsiev, S Funke, E Morava, J Kártesz, O Bartsch, K Méhes. Cotsirilos syndrome in twins from unaffected parents. *Eur J Hum Genet*, 2002,10(suppl 1):115. **IF:3,136**

E Morava, M Czako, **K Hadzsiev**, G Kosztolányi, K Méhes. Autosomal dominant ulnar/fibular ray defect: a possible new syndrome. *Eur J Hum Genet*, 2002,10(suppl 1):115. **IF:3,136**

K Hadzsiev, M Czako, B Veszpremi, G Kosztolányi. Prenatal screening of aneuploidy by interphase FISH. *Eur J Hum Genet* 2003,11(supl 1):147. **IF: 3,664**

J Kártesz, E Morava, **K Hadzsiev**, M Czako. G Kosztolányi. Cutis laxa, lipodystrophy and transient progeroid phenotype in mosaic polyploidy. *Eur J Hum Genet* 2003,11(supl 1):97. **IF: 3,664**

M Czako, L Szabo, E Morava, **K Hadzsiev**, J Karteszi, G Kosztolanyi. Pregnancy outcome in carriers of translocation involving the Miller-Dicker critical region. *Eur J Hum Genet* 2003,11(supl 1):106. **IF: 3,664**

J Weisenbach, K Hollódy, J Karteszi, **K Hadzsiev**, B Melegh, G Kosztolanyi. Characteristic X-ray sign of Rett syndrome: extrem thin diapysis with narrow medulla of tubular bones. *Eur J Hum Genet* 2003,11(supl 1):112. **IF: 3,664**

K Hadzsiev, A Nagy, M Czako, R Kellermayer, B Melegh, G Kosztolanyi. Rare case in hemophiliaA in a female patient with a 46,X,idic(Xq) karyotype. *Eur J Hum Genet* 2004,12(supl 1):95. **IF:2,741**

J Karteszi, J Bene, K Hollody, E Morava, **K Hadzsiev**, M Czako, B Melegh, A Teszas, G Kosztolanyi. Mutation analysis of MECP2 and determination of the X-inactivation pattern in Hungarion Rett Syndrome Patients. *Eur J Hum Genet* 2004,12(supl 1):92. **IF:2,741**

R. Kellermayer, M Czako, **K Hadzsiev**, P Gyuris, A Kozari, G Kosztolanyi. Y;autosomal translocation or cryptic tissue mosaicism in a boy with 45,X0? *Eur J Hum Genet* 2004,12(supl 1):130. **IF:2,741**

K Hadzsiev, M Czako, B Veszpremi, G Kosztolanyi. Mosaic 21 trisomy with varying ratio observed by prenatal screening. *Eur J Hum Genet* 2005,13(supl 1):183. **IF:3,251**

Összesített impakt faktor idézhető absztraktok nélkül: 28,214

Összesített impakt faktor idézhető absztraktokkal: 60,618