

**SZUBTELOMERIKUS KROMOSZÓMA ÁTRENDEZŐDÉSEK KIMUTATÁSA
ÉS A SMITH-LEMLI-OPITZ SZINDRÓMA GENETIKAI ÉS BIOKÉMIAI
ELTÉRÉSEINEK VIZSGÁLATA MENTÁLISAN RETARDÁLT BETEGEKBEN**

Dr. P. Szabó Gabriella

Témavezető: Prof. Dr. Oláh Éva



**DEBRECENI EGYETEM
KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen
2013**

**SZUBTELOMERIKUS KROMOSZÓMA ÁTRENDEZŐDÉSEK KIMUTATÁSA
ÉS A SMITH-LEMLI-OPITZ SZINDRÓMA GENETIKAI ÉS BIOKÉMIAI
ELTÉRÉSEINEK VIZSGÁLATA MENTÁLISAN RETARDÁLT BETEGEKBEN**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. P. Szabó Gabriella okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai orvostudományok doktori iskolája
(Klinikai vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Oláh Éva

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora
tagok: Dr. Csépany Tünde, Ph.D.
Dr. Haltrich Irén, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2013. november 21. 11.00

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Fekete György, az MTA doktora
Dr. Bereczky Zsuzsanna, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Fekete György, az MTA doktora
Dr. Bereczky Zsuzsanna, Ph.D.
Dr. Csépany Tünde, Ph.D.
Dr. Haltrich Irén, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2013. november 21. 13.00, DE OEC Belgyógyászati
Intézet, „A” épület tanterem.

1. BEVEZETÉS

1.1. A mentális retardáció fogalma, előfordulási gyakorisága

Az értelmi képesség, az intelligencia multifaktoriális meghatározottságú, genetikai háttér és környezeti tényezők kölcsönhatása eredményeképpen kialakult állapot, ami az egyed környezethez való viszonyát tükrözi. Intelligencia szintjük szerint a népesség egyedei a Gauss görbével jellemezhető normális megoszlást mutatnak: a görbe jobb szélső értékei a magas IQ-val rendelkező, kiemelkedő képességű egyedeket reprezentálják, míg a bal oldali alsó értékek alacsony IQ-t, enyhe értelmi fogyatékoságot jelentenek. Az ide tartozó egyedek szüleinek IQ-ja is rendszerint alacsonyabb. Ezekben az esetekben specifikus okot nem kell keresnünk. Az értelmi fogyatékosághoz vezető okok keresése elsősorban a súlyos, vagy közepesen súlyos értelmi fogyatékoság esetében indokolt.

Az *American Mental Retardation Association* definíciója szerint az értelmi fogyatékoság (nemzetközi irodalomban: intellectual disability, learning disability, mental retardation) egy speciális funkcionális állapot, amely 18 éves kor alatt manifesztálódik, s amit 70 alatti intelligencia hányados (IQ), valamint a tíz megkülönböztetett adaptív funkció közül kettő vagy három károsodása jellemez. Az IQ alapján megkülönböztetünk enyhe (IQ: 70-51) közepes (IQ: 50-35) és súlyos fokú (IQ: 35-20) értelmi fogyatékoságot. A mentális retardáció prevalenciája átlagosan 2-3 % körüli, de ez az érték populációnként és az alkalmazott vizsgálati módszerektől függően 1-10 % között változik.

1.2. A mentális retardáció etiológiája

A mentális retardáció etiológiája rendkívül heterogén. A háttérben álló okok lehetnek öröklött, genetikai ártalmak vagy pre-, peri-, vagy posztnatális életben szerzett betegségek.

Az értelmi fogyatékosághoz vezető szerzett okok között a **prenatálisan** ható exogén vagy endogén ártalmak említendők: intrauterin infekciók, teratogén ártalmak (pl. magzati alkohol szindróma), anyai szervi vagy anyagcserebetegségek (pl. súlyos szív-, vagy

tüdőbetegségek, anyai PKU stb.). A **perinatális** időszakban súlyos agyi károsodást és következményes mentális retardációt okozhatnak az elhúzódó szülés, a következményes hypoxia, a koraszülés, asphyxia, agyvérzés, szülés alatt szerzett infekció (pl. herpes simplex). A **posztnatális** ártalmak lehetnek központi idegrendszeri infekciók, agyvérzés, koponyasérülés stb.

A genetikai tényezőkről szerzett ismereteink a citogenetikai, molekuláris citogenetikai és molekuláris biológiai technikák fejlődésével egyre inkább bővülnek, így a genetikai háttérrel bíró értelmi fogyatékosok etiológiai csoportosításának szempontjai is folyamatosan változnak. A genetikai módszerek fejlődése ellenére a súlyos/közepesen súlyos értelmi fogyatékosok csupán 60-75 %-ában áll rendelkezésünkre etiológiai diagnózis, míg az enyhe értelmi fogyatékosok 80 %-ában a mentális retardáció oka ismeretlen marad. A genetikai diagnózis pontos ismeretében lehetőség nyílik a patogenetikai háttér megismerésére, a prognózis megítélésére, a családon belüli ismétlődés megelőzésére. A genetikai okok között kiegyensúlyozott és kiegyensúlyozatlan eltérések különböztethetők meg. A kiegyensúlyozatlan eltérések, amelyek lehetnek fénymikroszkóppal látható nagyméretű kromoszóma rendellenességek (triszómiák, monoszómiák, duplikációk, deléciók) vagy csupán finomabb molekuláris módszerekkel kimutatható kisméretű genetikai anyaghányok és többletek. A kiegyensúlyozott eltérések olyan kromoszóma átrendeződések (transzlokációk, inverziók, inzerciók), amelyekben citogenetikai módszerekkel genetikai anyag többlet, vagy hiány nem igazolható. A korszerű molekuláris genetikai módszerekkel vált ismertté, hogy a töréspontokban ezekben az esetekben is kimutathatók mikroduplikációk és/vagy mikrodeléciók. A génen belüli változások: a nukleotid csere vagy nukleotid sorrend megváltozása okozta mutációk különböző – mentális retardációval járó - kórképek kialakulásához vezetnek látható morfológiai eltérésekkel vagy azok nélkül. A genetikai eltérések típusától (méretétől, szintjétől) és a kimutatásukra alkalmas módszerektől függően

az értelmi fogyatékosághoz vezető genetikai eltérések alábbi alcsoportjait különböztethetjük meg:

- klasszikus kromoszóma rendellenességek,
- rejtett (hagyományos citogenetikai vizsgálattal nem kimutatható) kromoszóma rendellenességek,
- kópiaszám variációk (copy number variations, CNVs),
- mendeli és nem mendeli öröklődésű génmutációk (monogénes betegségek, X-hez kötött mentális retardáció, mitokondriális betegségek)
- a génextpressziót megváltoztató genetikai mechanizmusok (uniparentális diszómia, genomikus imprinting) és epigenetikai történések.

Számos genetikai kórkép, mint pl. Down szindróma, Rett szindróma, mucopolisaccharidosis stb. jól körvonalazható fenotípusos jegyek alapján felismerhető, diagnosztikája genetikában jártas klinikus számára nem okoz gondot. Nagyobb kihívást jelent a klinikai genetikusnak a társuló rendellenességgel nem rendelkező közepes/enyhe értelmi fogyatékos beteg, az ún. nem-szindrómás mentális retardáció diagnosztikája, de a nagyszámú, kevésbé ismert multiplex rendellenességgel járó ritka szindróma besorolása is.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Munkám során a mentálisan retardált betegek eltérő genetikai csoportjai közül két, módszertanilag és klinikailag is eltérő megközelítést igénylő betegségcsoporton végzett vizsgálataim eredményét foglalom össze. 1/. a kiegyensúlyozatlan szubtelomerikus kromoszóma aberrációval járó esetek, valamint 2/. a Smith-Lemli-Opitz (SLO) szindrómában szenvedő gyermekek vizsgálata során nyert tapasztalataimat összegzem.

2.1. Szubtelomerikus kromoszóma átredeződések

A kromoszómák génben gazdag telomerikus, szubtelomerikus régióinak aberrációi (deléción, duplikáción, transzlokáción) világos (negatív) festődésük miatt hagyományos G-

sávtechnikával nem mutathatók ki (rejtett aberrációk). A kromoszómák e génben gazdag régióinak vizsgálatára 1995-ben vezették be a szubtelomerikus FISH vizsgálatot, mellyel a közepes és súlyos fokban mentálisan retardáltak 6,8 %-ában, míg az enyhe mentális retardációk 0,5 %-ában igazoltak szubtelomerikus kromoszóma aberrációt. A szubtelomerikus kromoszóma aberrációk változatos tünetegyütteseket hoznak létre. A módszer bevezetése óta a különböző tanulmányokban több, mint tízezer esetről számoltak be. Észleltek olyan szubtelomerikus kromoszóma régiókat, mint az 1pter, 2qter, 22qter, Xqter, amelyek átrendeződései - más kromoszómákkal összehasonlítva - gyakrabban fordultak elő a vizsgált betegcsoportokban. Számos szindróma (1p36 szubtelomerikus deléció, 3q29 szubtelomerikus deléció) klinikai jellemzői jól körülhatárolt, gyakorlott szindromatológus számára könnyen felismerhető tünetcsoportot alkotnak. A szubtelomerikus FISH vizsgálat költség- és munkaigényes, ezért a betegek megfelelő kiválasztása kulcsfontosságú, ugyanakkor túl szigorú szelekciós kritériumok alkalmazása esetén a pozitív esetek egy része felismeretlen marad. Az eltérően megválasztott betegkiválasztási szempontok magyarázzák, hogy a vizsgálat találati aránya a különböző vizsgálatokban eltérő. Egyes munkacsoportok score rendszert dolgoztak ki a szubtelomerikus kromoszóma aberrációban szenvedő betegek klinikai és anamnesztikus adatainak figyelembe vételével. Azt találták, hogy a prenatalisan észlelt növekedési retardáció, a mentális retardációra nézve pozitív családi anamnézis, a szubtelomerikus aberrációkra vonatkozóan prediktív értékű a betegek kiválasztása során. A vizsgálatok azt mutatták, hogy a legfontosabb szelekciós paraméter az értelmi fogyatékoság családi halmozódása. A szubtelomerikus kromoszóma eltérések fele familiáris eredetű, azaz az egyik szülő kiegyensúlyozott transzlokáció hordozó. A meiosis során az ivarsejtekben a kromoszómák szegregációjának következtében parciális deléciók, duplikációk alakulhatnak ki. A fenotípust a deletált és duplikálódott gének együttesen határozzák meg, az utódokban inkább a deléciós fenotípus a penetráns és meghatározó, de a klinikai kép az egyes esetekben

nagy változatosságot mutathat. Kiegyensúlyozatlan transzlokációk esetén a transzlokációban részt vevő partner kromoszómák jelentősen befolyásolják a klinikai képet.

A szubtelomerikus átrendeződések és egyéb rejtett kromoszóma rendellenességek kimutatására alkalmas további módszerek a Multiplex-Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA), a Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation (MAPH) és az array-Comparative Genomic Hybridisation (CGH) technikák. A modern molekuláris citogenetikai technikák fejlődésével egyre több, ritka, kiegyensúlyozatlan transzlokációval járó eset kerül felismerésre. A nagyszámú irodalmi megfigyelés hívta fel a figyelmünket a szubtelomerikus átrendeződések vizsgálatának szükségességére. Ma még meglehetősen kevés szubtelomerikus átrendeződéssel összefüggésbe hozható entitás ismert. Ezért a gyakorlatban – a kromoszóma végek érintettségének várható gyakorisága alapján – valamennyi kromoszóma szubtelomerikus régiójának vizsgálatára sort kell keríteni (az acrocentrikus kromoszómák rövid karja kivételével). További entítások felismeréséhez nagyszámú beteg vizsgálata, fenotípus-genotípus elemzések szükségesek. Ezek ismeretében a vizsgálat célzottabban, a várható kromoszóma átrendeződés kimutatására irányultan, s ezáltal költséghatékonyabban végezhető el. Az átrendeződés kimutatásán túl ma már törekednünk kell a deléció/duplikáció pontos méretének meghatározására, ami lehetővé teszi az érintett régióban lokalizálódó gének és funkcióik megismerését, így a tünetegyüttes patogenetikai hátterének tisztázását. Fentiekből kiindulva munkánk során olyan közepes és súlyos értelmi fogyatékos betegek szubtelomerikus FISH vizsgálatát végeztük el, akiknél a hagyományos kromoszóma vizsgálat normális kariotípust igazolt és egyéb célzott genetikai vizsgálat sem utalt ismert genetikai kórkép (Fragilis-X szindróma, microdeléciós szindróma stb.) fennállására. Vizsgáltuk a kiválasztott betegpopulációban a szubtelomerikus kromoszóma átrendeződést mutató esetek előfordulási gyakoriságát, azok *de novo*, vagy familiáris jellegét és a kóros esetekben – a

pontos töréspont meghatározásával - genotípus-fenotípus elemzést végeztünk, összehasonlítva a fenotípusos jellemzőket az irodalomban közöltekkel.

2.2. Smith-Lemli-Opitz szindróma

A Smith-Lemli-Opitz szindróma (SLO) (McKusick 270400), egy autoszómális recesszíven öröklődő, enyhétől a súlyos klinikai tünetekkel járó, többszörös fejlődési rendellenesség, melyet a koleszterin bioszintézis zavara okoz. A szindrómát 1964-ben írták le, amikor három betegen arcdysmophiát, microcephaliát, hypospadiasist és súlyos növekedési retardációt észleltek. Az SLO szindróma becsült incidenciája a Kaukázusi populációban 1:20 000 és 1:40 000 közé tehető, a hordozó gyakoriság 1 : 50-1 : 70 terjed.

A betegség biokémiai háttere a koleszterin bioszintézis utolsó lépését katalizáló enzim, a 7-dehidrokoleszterin reduktáz (7-DHCR) defektusa. Az enzim csökkent vagy hiányzó működése az enzimblokk előtti szubsztrát, a 7- és 8-dehidrokoleszterin (7-DHC, 8-DHC) felszaporodását, ugyanakkor alacsony koleszterin szintet eredményez. Az SLO szindrómás beteg plazmájában és szöveteiben mért emelkedett 7-DHC koncentráció és az egyidejű alacsony koleszterin szint diagnosztikus értékű. A koleszterin fontos összetevője a sejt membránnak, a lipid raftoknak, a myelinhüvelynek és prekursora az epesavnak, szteroid hormonoknak, neuroszteroidoknak. A koleszterin - az embriogenezis során - a Hedgehog szignálproteinekhez történő kötődése révén fontos szabályozó szerepet játszik a végtag, a genitalia és az agy embrionális fejlődésében. Az SLO szindrómás betegekben a felhalmozódott 7-DHC – helyettesítve a koleszterint – a membrán szterol és kaveolin gazdag régióhoz kötődve, a 7-DHC-ből keletkező oxiszterolok révén megváltoztatja a sejt szignalizációs folyamatát.

A klinikai tünetek SLO szindrómában nagyon jellegzetesek: mentális retardáció, microcephalia, holoprosencephalia, táplálási- és magatartás zavar, arcdysmorphism, végtagrendellenességek, a nemi szervek és a vese rendellenességei. A fenotípus nagy

változatosságot mutat, ezért a klinikai jellemzők pontosabb megítéléséhez, egy súlyossági score rendszert állítottak össze, mely 10 anatómiailag különböző régió (agy, száj-szájpad, végtag, vese, szív, bél rendszer, nemi szervek, máj, tüdő, szem) fejlődési rendellenességeit veszi figyelembe. A pontrendszernek megfelelően megkülönböztetnek enyhe (<20), típusos (közepesen súlyos) (20-50) és súlyos fokú (>50) SLO szindrómát.

A betegségért felelős humán *DHCR7* gént - mely a 11q13 régióba lokalizálódik, 14,100 bp nagyságú és kilenc exont tartalmaz - 1998-ban klónozták. Jelenleg a Human Gene Mutation adatbázis (HGMD) szerint a *DHCR7* génnek összesen 164 különböző mutációját azonosították, ebből misszensz/nonszensz mutáció: 142; splicing: 6; kis deléció: 8; kis inzerció: 2; kis index: 1; nagy deléció: 5.

A biokémiai háttér tisztázásával az SLO szindrómában lehetőség nyílt különböző terápiás beavatkozásokra, amelyek azonban csak szupportív jellegűek. Az 1990-es években számos multicentrikus tanulmány beszámolt arról, hogy a koleszterin pótlás epesavval vagy epesav nélkül SLO szindrómás betegekben egyaránt javíthatja a beteg klinikai állapotát és a biokémiai paramétereit. A koleszterin pótlás ajánlott adagja 50 mg/kg/nap, mely szükség szerint 300 mg/kg/nap dózusra emelhető. A sztatin vegyületekről kimutatták, hogy alternatív útvonalon segítik a 7-DHC → koleszterin átalakulást és a 7-DHCR reziduális aktivitását fokozzák. Stark és munkatársai a szimvasztatin adását követően észleltek klinikai javulást SLO szindrómás betegekben. Az SLO szindrómában alkalmazott kezelések hatékonyságát napjainkban kétségbevonják. Az utóbbi években számos - a korábbi pozitív megfigyeléseket, a klinikai javulást megkérdőjelező - tanulmány jelent meg, amelyek szerzői nem találtak szignifikáns javulást a kezelés hatására.

3. CÉLKITŰZÉSEK

1. Munkám során célom volt Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Gyermekgyógyászati Intézet, Klinikai Genetikai Központjának genetikai szakrendelésén vizsgált értelmi fogyatékos betegek közül kiválasztani azokat, akiknél a nemzetközi kritériumok alapján indokolt a szubtelomerikus FISH vizsgálat elvégzése. Célom volt a kromoszómák terminális részei átrendeződéseinek kimutatását szolgáló szubtelomerikus FISH vizsgálat bevezetése, a vizsgálati módszer értékelése, indikációjának meghatározása és a diagnosztikus folyamatban való elhelyezése, kivizsgálási algoritmus kidolgozása.
2. A laboratóriumunkban rendelkezésünkre álló módszerekkel nyert eredmények molekuláris szintű pontosítására törekedtem – kollaborációban - array Comparatív Genomiális Hibridizáció (CGH) vizsgálat segítségével. A pontos genetikai diagnózis birtokában vizsgálni kívántam a genotípus-fenotípus összefüggéseket: az érintett régiókba lokalizálódó gének adatbankból való visszakeresésével összefüggést kerestem a génfunkciók és az észlelt vagy várható klinikai tünetek között.
3. Célom volt az SLO szindróma klinikai, biokémiai, genetikai diagnosztikája lehetőségének megteremtése központunkban, egy – a téma iránt érdeklődő – munkacsoport létrehozásával. Tapasztalatot kívántam szerezni a kezelés hatásosságáról.
4. Választ kerestünk arra a kérdésre, hogy vajon van-e összefüggés a Magyarországon eddig diagnosztizált SLO szindrómás betegek fenotípusos jellemzői és a biokémiai paraméterek között? Van-e prognosztikai értéke a kezdeti koleszterin szintnek vagy a 7-DHC-nak?

5. Feladatul tűztük ki a betegek és családtagjaiknak gondozását és a diagnózis pontosításával lehetőséget kívántunk biztosítani prenatalis diagnosztika segítségével a családon belüli ismétlődések megelőzésére.

4. BETEGEK és MÓDSZEREK

4.1. Szubtelomerikus kromoszóma átrendeződések vizsgálata

4.1.1. Betegek

A DE OEC Gyermekgyógyászati Intézet Klinikai Genetika Központ Genetikai szakrendelésén 2008.01.01. és 2012.12.31. között megjelent többszörös fejlődési rendellenességben szenvedő, mentálisan retardált gyermek közül 125 beteget választottunk ki Lam és mtsai. által javasolt szelekciós kritériumok alapján. A Genetikai Laboratóriumban összesen 149 szubtelomerikus FISH vizsgálatot végeztünk, ebből 125 mentálisan retardált beteg volt, 24 pedig egészséges hozzátartozó. Az értelmi fogyatékos betegeknél a hagyományos citogenetikai vizsgálat normális kariotípust eredményezett és egyéb célzott genetikai vizsgálat sem utalt ismert genetikai kórkép (Fragilis-X szindróma, mikrodéliációs szindróma stb.) fennállására. A betegek kiválasztásakor alkalmazott, a nemzetközi irodalomban javasolt szelekciós kritériumok a következők: Major kritériumok: 1/. hagyományos G-sáv technikával normális kariotípus (350-450 sáv), 2/. közepes vagy súlyos mentális retardáció (IQ <50, Brunet-Lezine score). Minor kritériumok: 1/. legalább két arcrégiót érintő dysmorphia, 2/. veleszületett szervi rendellenesség, 3/. pre-és/vagy posztnatálisan észlelhető növekedési zavar, 4/. magatartászavarok, 5/. családban mentális retardáció előfordulása, 6/. az anamnézisben perinatális halálozás, spontán vetélés. A vizsgálat indikációjához a két major és három minor kritérium jelenléte szükséges. A mintavételre, a minta tárolására és a vizsgálatok elvégzésére vonatkozó beleegyező nyilatkozatot a betegek törvényes képviselőitől minden esetben megkaptuk. Az esetismertetéseknel a fényképek bemutatása szülői beleegyezéssel történt. Az anamnesztikus és klinikai adatok pontos rögzítésére kérdőívet készítettünk. A kérdőív adatai a

családban előforduló betegségekre, megelőző vetélésekre, halvaszületésekre vonatkozó kérdések mellett, magukba foglalták az adott terhességre vonatkozó jellemzőket, a prenatális szűrővizsgálat eredményeit, a perinatális problémákat, a csecsemő- és kisdedkori fejlődési adatokat, valamint az idegrendszeri és egyéb szervek betegségére utaló tüneteket és leleteket. A kérdőív végén az orvos által észlelt dysmorfhiás tünetek feltüntetésére és családfa készítésre került sor.

4.1.2. Módszerek

4.1.2.1. Szubtelomerikus FISH vizsgálat

A FISH vizsgálat elvégzésére a betegek perifériás vérmintájából készült, metanol-ecetsav 3:1 arányú keverékében fixált kromoszóma preparátumokat használtunk. A szubtelomerikus FISH vizsgálatot ToTelVysion próba panel alkalmazásával (Abbott Molecular/Vysis Inc., Des Plaines, IL) végeztük. A próba panel 15 egyedi „ready-to-use” direkt jelölésű próba keverékből áll, amely valamennyi kromoszóma p és q karjának telomer régiójára specifikus próbát tartalmazza (kivéve az akrocentrikus kromoszómák: 13, 14, 15, 21, 22 p karjait).

A próbakeverékben lévő CEP és LSI próbák belső kontrollként a kromoszómák azonosítására szolgálnak. A célzott vizsgálatokat 10pter (D10S2488), 21qter (D21S1446), 8pter (RH65733), 12pter (D12S158) szubtelomerikus és centromer specifikus CEP10 (D10Z1), CEP8 (D8Z2) próbákkal (Poseidon RF, Kreatech Diagnostic, Vysis) végeztük. Az 1p36.33 régió (D1S2217) deléciójának kimutatásához a szubtelomerikus régióra specifikus FISH próbát (Kreatech) alkalmaztuk. A FISH módszer technikai lépéseit illetően a gyártók ajánlásait követtük. Az értékeléshez *Axioplan 2* (Zeiss) fluoreszcensz mikroszkópot és képanalizáló szoftvert (*MetaSystems, Altusheim, Germany*) használtunk. Minden próbakeverék esetében legalább 15-15 metafázist értékeltünk.

4.1.2.2. Array-Comparativ Genomiális Hibridizáció (CGH)

Az array-CGH vizsgálatot kollaborációban Alida C. Knecht, az Amsterdami Egyetem Klinikai Genetika Centrumának citogenetikusa végezte. A diagnózishoz használt array CGH paraméterei: Agilent 180K oligo-array (Amadid 023363); 13kb overall median probe spacing; NCBI Build 36.1). A jelölési és hibridizációs lépések során a standard metodikát, az array CGH profilok elemzéséhez az Agilent szoftvert használták.

4.2. A Smith-Lemli-Opitz (SLO) szindróma diagnosztizálása

4.2.1. Beteg: SLO szindrómás betegek kiválasztása

Munkánk során az SLO szindróma klinikai, biokémiai, genetikai diagnosztikáját kívántuk megvalósítani egy – a témában elkötelezett – munkacsoport létrehozásával és tapasztalatot kívántunk szerezni a kezelés hatásosságáról. Az SLO program egy eset fenotípusos jellemzők alapján felvetett klinikai diagnózisával kezdődött, amit biokémiai és molekuláris vizsgálattal erősítettünk meg. Majd UV spektrofotometria módszerével az SLO szindrómában szenvedő gyermeknél a szimvasztatin és a koleszterin szubsztitúciós kezelés hatékonyságát vizsgáltuk a 7-DHC és koleszterin értékek monitorozásával. A Brnoban dolgozó Libor Kozak professzorral kollaborációban elvégzett eset molekuláris genetikai vizsgálata indította el azt a hazai kezdeményezést, amelynek során összegyűjtöttük az általunk és egyéb hazai genetikai centrumokban diagnosztizált SLO-s betegeket. A vizsgált 15 magyarországi SLO szindrómás beteg adatainak összegyűjtésével lehetőség nyílt Laboratóriumi Medicina Intézet Molekuláris Genetika Laboratóriumában a *DHCR7* gén molekuláris genetikai vizsgálatára és az LMI és Gyermekgyógyászati Intézet együttműködésében egy „SLO-szindróma diagnosztikai és terápiás munkacsoport”-ot hoztunk létre. Jelen értekezésben molekuláris genetikai vizsgálattal elsőként diagnosztizált magyar SLO szindrómás gyermek genotípus-fenotípus összefüggésének és az alkalmazott terápia hatékonyságának vizsgálatával szerzett

tapasztalataimat ismertetem és beszámolok az általunk vizsgált 15 magyarországi SLO szindrómás beteg klinikai tünetei és biokémiai paraméterei között kimutatott összefüggésről. A 15 beteg (életkor: 0,1-18 év; ffi:nő= 8:7) diagnosztizálása a fenotípusos jellemzők, majd a biokémiai és molekuláris genetikai tesztekkel történt. A fenotípusos jellemzők alapján az SLO szindróma súlyosságát Kelley és Hennekam 2000-ben közzétett súlyossági score rendszere alapján határoztuk meg. Az enyhe fenotípusú csoportba négy beteget soroltunk (n=4, diagnóziskor életkoruk: 0,5-18 év). A tipikus csoportba hét gyermek tartozott (n=7, életkoruk a diagnóziskor: 0,1-7 év), akik közül két beteg két éves életkor előtt meghalt. A súlyos fenotípusú csoport négy gyermekének mindegyike már csecsemőkorában meghalt (n=4, életkoruk diagnóziskor: < 2 hónap).

4.2.2. Módszerek

4.2.2.1. Biokémiai vizsgálat (7-DHC meghatározás)

A koleszterin szint meghatározásához koleszterin oxidáz enzimátikus módszert alkalmaztunk (CHOD-PAP, Roche Diagnostics, Modular P). A szérumban 7-DHC gyors meghatározása a Honda által módosított UV spektrofotometriás vizsgálattal történt, melyet összehasonlítottunk a GC/MS módszerrel. Negatív kontrollnak Humanatrol normal szérumbot használtunk (Human, Germany, Cat. No. 13511). A módszer detekciós határa 10 mg/L körül van és a változások a 10-400 mg/L-es tartományban lineárisak. Az extrakció során 0,2 mL szérumbot és 1,6 mL c-hexán:i-propanol 3:1 arányú keverékét vortexeltük 20 másodpercig, majd centrifugáltuk (10 perc, 900G). A centrifugálást követően a tiszta felülúszó abszorbanciáját 282 nm-en mértük meg. A 7-DHC koncentrációkat összehasonlítottuk a publikált GC/MS eredményekkel. Tíz szérumbot mintát analizáltunk párhuzamosan GC-MS és UV spektrofotométerrel. Ugyanazon minták bizonyultak pozitívnak (n: 3) és negatívnak (n: 6) mind a két módszerrel. Egy hordozó szérumbot mintája mutatott csupán különbséget a két metodika között. Az UV spektrofotométer

alacsonyabb detektálási határa miatt a 0,49 mg/L 7-DHC érték az UV spektrofotometriával nem volt kimutatható. A szérumban lipid és lipoprotein szint mérése fotometriával történt (Modular-P, Roche), kivéve a VLDL-koleszterin arány meghatározását (agaróz gélelektroforézis, Sebia). A szérumban D₃ vitamin szintet kemilumineszcensz immunoassayvel mértük (Modular E-170, Roche).

4.2.2.2. *DHCR7* gén mutáció vizsgálata molekuláris genetikai módszerrel

- *PCR/RFLP analízis*

A genomiális DNS-t 5-10 mL EDTA-val alvadésgátolt vérből izoláltuk só precipitációs módszerrel. Egy gyors PCR-alapú DNS analízist használtunk nyolc – az európai populációban gyakran előforduló - *DHCR7* mutáció kimutatására (p.W151X, p.L157P, p.V326L, IVS8-1G>C, p.L109P, p.R446Q, p.R352Q és p.C380Y). A genotipizálás az eredetileg ott levő vagy a PCR primer által beépített restrikciós helyek használatával történt.

- *Szekvencia analízis*

Az exonok és az exon-intron határok szekvenálása Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit-tel történt (Amersham Biosciences, UK) ALFexpress II (Amersham Biosciences, UK) analizátoron a gyártó ajánlásának megfelelően. A PCR termékeket mindkét irányból megszekvenáltuk.

4.2.2.3. *Statisztikai analízis*

A statisztikai analízishez a Microsoft Office Excel 2003 Analysis ToolPak Add-In (Regression Tool) programot használtuk. A p értékek mindegyik kiválasztott időpontban szignifikánsnak bizonyultak ($p < 0,05$).

A koleszterin, a 7-DHC és az α -lipoprotein szintek statisztikai összehasonlítását a három betegcsoportban Kruskal-Wallis teszttel végeztük. Tekintettel arra, hogy a koleszterin és az

α -lipoprotein szintek Gauss-görbe szerinti eloszlást mutatnak, az értékek páronkénti összehasonlítására a Bonferroni tesztet alkalmaztuk.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A szubtelomerikus vizsgálat eredményei

A DE OEC Gyermekgyógyászati Intézet Klinikai Genetika Központ Genetikai Laboratóriumában 2008.01.01. és 2012.12.31. között összesen 149 szubtelomerikus FISH vizsgálatot végeztünk. Ebből 125 mentálisan retardált beteg (ffi:nő = 73:52, átlag életkor: 9.8 év, szélső értékek: 4 év - 27 év) volt, 24 pedig egészséges hozzátartozó. A nemzetközi kritérium rendszer alapján kiválasztott 125 idiopátiás mentális retardációban szenvedő beteg közül 13 esetben (13/125; 10,4 %) mutattunk ki szubtelomerikus kromoszóma aberrációt, ebből négy *de novo*, míg kilenc eset familiáris eredetűnek bizonyult. ***De novo*** keletkezett eltérések: **ish del(3)(qter-)** (1 beteg); **ish del(1)(pter-)** (2 beteg); **ish del(22)(qter-)** (1 beteg). ***Familiáris aberrációk:*** **ish der(8)t(8;12)(pter-,pter+)** (2 beteg); **ish der(21)t(10;21)(pter+,qter-)** (3 beteg); **ish der(4)t(4;8)(pter-;qter+)** (1 beteg); **ish der(3)t(3;8)(pter-;pter+)** (1 beteg); **ish der(10)t(10;17)(qter-;qter+)** (2 beteg). A 24 egészséges hozzátartozó FISH vizsgálata hét esetben igazolt kiegyensúlyozott transzlokáció hordozást. Mind a 41 szubtelomerikus kromoszóma régiót 81 (81/125) esetben vizsgáltuk meg, 44 esetben célzott FISH vizsgálatra került sor (44/125).

Célzott szubtelomerikus FISH vizsgálatot a szubtelomerikus kromoszóma eltérést hordozó esetek egyenesági hozzátartozóiiban (szülők, testvérek, nagyszülők, nagynénik, nagybácsik, unokatestvérek), vagy a fenotípusos eltérések alapján, egy konkrét szubtelomerikus kromoszóma aberráció gyanúja esetén végeztünk. Minden kromoszómarégió vizsgálatakor kilenc beteg esetében (9/81), a célzott vizsgálati csoportban pedig négy esetben (4/44) mutattunk ki szubtelomerikus kromoszóma aberrációt.

Sajnálatos módon, a familiáris esetekben a második vagy harmadik beteg gyermek megszületése után került csak sor a család vizsgálatára, amikor 2008-ban bevezettük a szubtelomerikus FISH módszert és az idiopátiás mentálisan retardált betegeket a kritérium rendszer alapján kiválasztva, megfelelő indikáció esetén, a vizsgálatot elvégezhettük.

Az 1p36 deléciós szindróma, az egyik leggyakoribb szubtelomerikus kromoszóma aberráció, melyet a közepes/súlyos mentális retardáció, jellegzetes arcdysmorphia, izomhypotonia, obesitas és epilepsia jellemez. A klinikai tünetek gyakran átfedést mutatnak a Prader-Willi szindróma jellemzőivel, ezért 12 olyan Prader-Willi szindrómára jellemző fenotípusú betegnél végeztük el az 1p36 szubtelomerikus deléció FISH vizsgálatát, akikben a Prader-Willi szindróma, a 15q11.2-régió specifikus FISH próbával nem igazolódott. Az uniparentális diszómia lehetőségét négy esetben zártuk ki. A 12 Prader-Willi szindrómára gyanús esetből kettőben igazoltuk az 1p36.33 deléciót (ish subtel del(1pter)), mely mindkét esetben *de novo* eredetűnek bizonyult. A további hat beteg UPD és metilációs mintázat vizsgálata folyamatban van.

5.1.1. Esetismertetések

5.1.1.1. *Familiáris kiegyensúlyozatlan transzlokációk*

ish der(8)t(8;12)(pter-,pter+)

1. család: Az érintett családban egy testvérpár vizsgálatára került sor. A klinikai tünetek feltűnően azonosak voltak s ezek háttérében azonos genetikai eltérés állt. A fenotípusos jellemzők: izomhypotonia, posztaxialis polydactylia és arcdysmorphia (lapos arcközép, hypertelorismus, ptosis, alacsonyan ülő kicsi fülkagyló, lefelé tekintő szájszög), szemészeti vizsgálat retinitis pigmentosát, nystagmust, decolorált papillákat igazolt.

A szubtelomerikus FISH vizsgálat a 8pter régió delécióját és a 12pter régió duplikációját mutatta kiegyensúlyozatlan formában: **ish der(8)t(8;12)(pter-,pter+)**. A családvizsgálat az

apa kiegyensúlyozott transzlokáció hordozását igazolta. Mivel az apai nagyszülőknél az eltérés nem volt kimutatható, az apa eltérése *de novo* kiegyensúlyozott transzlokációnak tekintendő: **ish t(8;12)(pter-,pter+;pter-,pter+)dn.**

ish der(21)t(10;21)(pter+;qter-)

2. család: Egy tetsvérpárt és unokatestvérüket vizsgáltuk. A dysmorphiás tünetek és a mentális retardáció súlyossága mindhárom esetben hasonló volt. A betegeknek észlelt fenotípusos jellemzők: aszimmetrikus ptosis, középarc hypoplasia, hosszú philtrum, malformált fülek (enyhén prominens antihelix, prominens antitragus, nagy felfelé ívelő fülcimpa), keskeny gótikus szájpád, vékony felső ajakpír, micrognathia). A kardiológiai és radiológiai vizsgálatok során pitvari septum defectus, scoliosis és kyphosis igazolódott. Az unokatestvérnél a thenar és hypothénar izmok atrophijája, ízületi hyperflexibilitás, habituális patella luxáció és az alsó és felső végtagi izmokban közepes fokú gyengeség és atrophia volt kimutatható. EMG vizsgálat eredménye közepes fokú miogén lézióra utalt.

A FISH vizsgálat és az array CGH molekuláris szinten is azonos genetikai eltérést igazolt. A szubtelomerikus FISH vizsgálat során egy 21qter és három 10pter specifikus szignált detektáltunk mindhárom érintett betegben, melyek 21qter deléciót és 10pter duplikációt igazoltak kiegyensúlyozatlan transzlokáció hordozás formájában: **ish der(21)t(10;21)(pter+;qter-)**. Mindegyik egyenesági rokonnál elvégeztük a FISH vizsgálatot 10pter, 21qter specifikus próbákkal. A proband édesanyja, lánytestvére, nagynénje és unokatestvére kiegyensúlyozott transzlokáció hordozónak bizonyult: **ish t(10;21)(pter+,qter-;pter+,qter-)**.

Az array profil megerősítette a szubtelomerikus FISH vizsgálat eredményét. A 10-es kromoszómán elhelyezkedő disztális duplikáció nagysága 6,7 Mb és a p15.3-p14 régióban helyezkedik el (410 oligo's), míg a 21-es kromoszóma disztálisan elhelyezkedő deléciója a q22.2-22.3 régióban 5,6 Mb nagyságú (412 oligo's). A töréspont a 10-es kromoszóma rövid

karján a 6873275 és 6885392 bp között, a 21-es kromoszómán a 41244147 és 41270119 bp között helyezkedik el. Az array kariotípus a következő: **arr10p15.3-14(138206-6873275)x3,21q22.2-22.3(41270119-46920225)x1.**

ish der(4)t(4;8)(pter-;qter+)

3. család: A kiegyensúlyozatlan transzlokációt mutató gyermek a genetikai eltérést a kiegyensúlyozott transzlokáció hordozó apától örökölte. A gyermek fizikális vizsgálata során észlelhető volt súlyos szomatikus retardáció, microcephalia, generalizált izomhypotónia, kétoldali dongaláb, arcdysmorphia: aszimmetrikus homlok és occiput, jobb oldali prominens homlokdudor, hemifaciális microsomia, szűk szemrés, pici orr, hipopláziás orrszárny, kerekded orrcsúcs, rövid philtrum, retrognathia, lefelé tekintő szájzug.

Szubtelomerikus FISH vizsgálat a betegben a 4pter régió delécióját és a 8qter régió duplikációját igazolta. A kiegyensúlyozatlan transzlokáció hordozás FISH eredménye a következő: **ish der(4)t(4;8)(pter-;qter+)**. A szülők FISH vizsgálata az adott (4-es, 8-as) próbakeverékkel az apa kiegyensúlyozott transzlokáció hordozó voltát igazolta: **ish t(4;8)(pter-,qter+; pter+,qter-)**. A transzlokáció eredetének tisztázása miatt szükség lett volna az apai nagyszülők vizsgálatára, azonban nem egyeztek bele a vizsgálatba.

ish der(10)t(10;17)(qter-;qter+)

4. család Az érintett családban egy testvérpár vizsgálatára került sor. A klinikai tünetek a következők voltak: proporcionált alacsonynövés és az arcdysmorphia: széles orrnyereg, prominens orrcsúcs, hypertelorismus, alacsonyan ülő fül. Ortopédiai vizsgálat során hanyag testtartást, enyhe scoliosist, spina bifida occultát véleményeztek.

Szubtelomerikus FISH vizsgálat során egy 10qter és három 17qter specifikus szignált detektáltunk mindkét érintett betegben, mely 10qter deléció és 17qter duplikációt igazolt. A

kiegyensúlyozatlan transzlokáció hordozás eredménye a következő: **ish der(10)t(10;17)(qter-;qter+)**. A szülőknél elvégeztük a FISH vizsgálatot az adott (9-es, 10-es) próbakeverékekkel és az apa bizonyult kiegyensúlyozott transzlokáció hordozónak: **ish t(10;17)(qter-,pter+; qter-,pter+)**. A nagymama és az apai nagybácsi vizsgálatát beleegyezés hiányában nem tudtuk elvégezni.

A kórkép háttérében álló genetikai eltérést array-CGH vizsgálattal is megerősítettük. A 10-es kromoszómát érintő 2,9 Mb deléció a 10q26.3 régióban helyezkedik el, míg a 17q25.3 régióban egy 4 Mb méretű duplikáció volt detektálható. A töréspont a 10-es kromoszóma hosszú karján a 132555396 és 132539691 bp között, a 17-es kromoszómán a 77049814 és 77038050 bp között helyezkedik el. Az array kariotípus a következő: **arr 10q26.3(132555396-135474787)x1,17q25.3(77049814-81045222)x3**.

5.1.1.2. De novo esetek

ish subtel del(1pter)

Prader-Willi szindrómára emlékeztető fenotípusos jegyek miatt két gyermek esetében célzott FISH vizsgálatot végeztünk az 1pter szubtelomerikus deléció kimutatására. A fenotípusos jegyek nagymértékben átfedést mutatnak a Prader-Willi szindróma tüneteivel: izomhypotonia, hyperflexibilis ízületek, obesitas, cryptorchismus, mentális retardáció, kicsi kéz és láb, arcdysmorphia (kifejezetten lapos arc, brachycephalia, kicsi orr, rövid philtrum, pontszerű áll, egyenes vonalú szemöldök, alacsonyan ülő fül). Klasszikus kromoszóma vizsgálat, a Fragilis-X és Prader-Willi szindróma FISH teszt negatív eredményt mutatott.

A jellegzetes fenotípusos jellemzők miatt célzottan az 1p36.33 régió delécióját vizsgáltuk az adott régióra specifikus FISH próbával (DIS2217, Kreatech). A vizsgálat az adott régió delécióját igazolta. A szülőknél elvégzett FISH vizsgálat negatívnak bizonyult, igazolva a kromoszóma aberráció *de novo* eredetét.

ish subtel del(3qter)

Egy betegnél 3q29 szubtelomerikus deléciót igazoltunk jellegzetes fenotípussal. A jellegzetes fenotípus mellett – microphthalmia, konvergáló strabismus, scoliosis, coxa valga, V. ujj clinodactylia, hosszú elvékonyodó ujjak, arcdysmorphia (keskeny hosszúkás arc, hypertelorismus, kiemelkedő orrnyereg, bunkósan megvastagodott orrcsúcs, rövid philtrum), és szemészeti vizsgálat során ritka szemészeti rendellenességet, uvea colobomát lehetett kimutatni.

A szubtelomerikus FISH vizsgálat a 3qter (D3S4560) szubtelomerikus régió delécióját igazolta: **ish del(3)(qter-)**. A szülők célzott szubtelomerikus FISH vizsgálata negatívnak bizonyult, a deléció *de novo* keletkezett.

5. 2. Az első SLO szindrómás gyermek klinikai és genetikai diagnosztikája

Terápiás próbálkozásaink

A fenotípus alapján felmerült az SLO szindróma lehetősége egy betegnél, akinél már születéskor észlelhetők voltak a jellegzetes klinikai tünetek: arcdysmorphia (ptosis, epicanthus, micrognathia, széles orrgyök és orrcsúcs, előretekintő orrnyílásokkal, submucosus szájpadasadék, alacsonyan ülő malformált fülkagyló), microcephalia, cryptorchismus, hypospadiasis, 2.-3. lábujj közötti syndactylia, pitvari szeptum defektus, csecsemőkorban izomhypotonia és súlyos táplálási nehezítettség, súlyos mentális retardáció.

A beteg az SLO súlyossági score szerint 25 pontot kapott, ez a szindróma „típusos” (közepes súlyossági fokú) csoportjának felel meg (a típusos csoport score értéke: 20-50). A fenotípus alapján történő diagnózist megerősítették a biokémiai és molekuláris genetikai vizsgálati eredmények: az alacsony koleszterin szint (2,77 mmol/L) és a magas 7-DHC (102 mg/L, ref: < 0,15 mg/L). Kiterjesztett lipoprotein (TG, HDL-, LDL-, VLDL-koleszterin, Lp(A),

apolipoprotein-A1) és D3 vitamin (118 nmol/L) vizsgálatok kóros eltérést nem mutattak, kivéve a mérsékelten alacsonyabb apolipoprotein B-100 értéket (0,38 g/L).

Molekuláris genetikai vizsgálat során a betegnél összetett heterozigótaság igazolódott, a beteg genotípusa: c.964-1 G>C/c.1097 G>T (p.G366V). A c.1097 G>T mutáció - mely a *DHCR7* gén 9-es exonjában helyezkedik el és a 4. citoplazmatikus hurkot érinti, - egy új mutáció, mely guanin-timin nukleotid cserével jár és glicin-valin aminosav cserét eredményez a 7-dehidrokoleszterin reduktáz enzimben. A c.964-1 G>C mutáció ismert, az SLO szindrómára jellemző genetikai eltérés. A c.964-1 G>C mutációt az édesanya és a lánytestvér, míg a c.1097 G>T mutációt a beteg édesapja hordozza. Betegség-specifikus mutáció az iker fiútestvérből nem volt kimutatható.

A koleszterin szubsztitúciós kezelést az Irons és mtsai. által javasolt protokoll szerint kiviteleztek (Cholesterol Module, 100 mg/kg/day, Nutricia; product code number 18,012), míg a szimvastatin kezelésnél Jira és mtsai. (0,2 mg/kg/day) ajánlását követték. A kezelést a beteg hat éves korában kezdtük el, mindvégig jól tolerálta, gyógyszer mellékhatás nem jelentkezett. A 25-hónapos kezelési időszak alatt szignifikáns mértékben emelkedett a szérumban a koleszterin szint (2,77 mmol/L → 3,2 mmol/L) és csökkent a szérumban a 7-DHC érték (102 mg/L → 53 mg/L). A beteget kéthavonta rendszeresen ellenőriztük és a következő paramétereket rögzítettük: testsúly, testhossz, mell-és fejkörfogat, valamint a szérumban a triglicerid, koleszterin, HDL, LDL, 7-DHC, GOT, GPT, CK, AP, γ GT. A beteg viselkedésének változását és a pszichomotoros fejlődését két módszerrel mértük: 1. szülői interjú; 2. Vineland Adaptív Viselkedési Skála. A szülők szerint a beteg gyermek kevésbé volt irritábilis, csökkentek az autoagresszív megnyilvánulásai, javult az alvása és jobb lett az étvágya a kezelés ideje alatt. Az adaptív funkciókban bekövetkezett változásokat a Vineland Adaptive Viselkedési Skálával objektívizáltuk, mely szerint a hétköznapi rutin tevékenységek (Daily Living Skill-personal

subdomain) és a nagy mozgások (Motor Skill-gross subdomain)) területén mérsékelt javulás volt kimutatható a terápia alatt. A beteg fejlődési hányadosa (DQ) nem változott.

5.3. A 15 magyar SLO szindrómás beteg klinikai és biokémiai paraméterek közötti összefüggésének vizsgálata

Az SLO szindrómás betegek életkora a diagnózis megállapításakor széles tartomány között mozgott (0,5-18 év). Az enyhe fenotípusú csoportban (n=4; score: <20), a szérum koleszterin átlagértéke $2,37 \pm 0,8$ mmol/L, a 7-DHC átlaga pedig $0,38 \pm 0,14$ mmol/L (147 ± 55 mg/L) volt. A közepes súlyosságú – tipikus - csoportban (n=7; score: 20-50) a diagnózist korábbi életkorban állították fel (0,1-7 év), a biokémiai vizsgálatok eredményei a következők: szérum koleszterin átlagértéke $1,47 \pm 0,7$ mmol/L, a 7-DHC átlaga pedig $0,53 \pm 0,20$ mmol/L-nek (202 ± 77 mg/L) bizonyult. Azok a betegek, akik már újszülöttkorban vagy fiatal csecsemőkorban (2 hónapos koruk előtt) meghaltak, mindannyian a súlyos fenotípusú csoportba voltak besorolhatók a társuló rendellenességeik alapján (n=4, score: > 50). Ebben a csoportban a 7-DHC értékek ($0,47 \pm 0,14$ mmol/L; 181 ± 52 mg/L) hasonlóak voltak a tipikus csoportba sorolt betegek értékeihez, de a koleszterin értékek szignifikánsan alacsonyabbnak ($0,66 \pm 0,27$ mmol/L) bizonyultak, összehasonlítva az enyhe SLO fenotípusú csoport betegeivel ($2,37 \pm 0,8$ mmol/L). A koleszterin/7-DHC arány és a klinikai súlyosság fordított arányosságot mutatott, szignifikáns különbség volt megfigyelhető az egyes betegcsoportok között (Kruskal-Wallis teszt, $p=0,004$). A lipoprotein gél elektroforézis során a súlyos SLO csoportban csökkent α -lipoprotein %-ot (7 ± 5 %) detektáltunk, összehasonlítva az egészséges kor-specifikus kontroll csoporttal ($25,4 \pm 1,6\%$, n=5; 0-3 év) vagy a tipikus ($31,6 \pm 9$ %) és enyhe (33 ± 6 %) SLO-s betegcsoporttal. Bonferoni teszt szerint, az α -lipoprotein arány szignifikánsan alacsonyabb volt a súlyos csoportban, mint a tipikus ($p=0,003$) és az enyhe fenotípusú ($p=0,004$) SLO szindrómás betegcsoportban.

6. MEGBESZÉLÉS

A mentális retardáció etiológiája rendkívül heterogén. Az esetek jelentős részében azonban öröklött vagy szerzett genetikai károsodás a mentális retardáció oka. Mindennapi munkánkban gyakran jelent nehézséget a genetikai eltéréssel nem járó szerzett vagy a genetikai károsodás okozta fogyatékos állapotok elkülönítése. Érthető ez, hiszen a központi idegrendszer morfológiai vagy funkcionális károsodásának klinikai következményei – mint pl. epilepszia, mentális retardáció, viselkedés-, és magatartászavarok stb. - gyakran teljesen hasonlóak. Sokszor halljuk a genetikával nem foglalkozók szájából, hogy nincs értelme a túlzott diagnosztikus erőfeszítéseknek, hiszen az ok kiderítése nem változtat a gyermek állapotán, sőt a fejlesztési és kezelési lehetőségek is hasonlóak az etiológiától függetlenül. Miért kell mégis törekednünk a genetikai diagnózis minél pontosabb tisztázására? Ennek számos oka van:

- A korszerű és intenzíven fejlődő genetikai módszerek lehetővé teszik a genetikai eltérésben érintett gének pontos meghatározását, funkcióik ismeretében genotípus-fenotípus összefüggések tisztázását.
- Gyakorlati szempontból a pontos diagnózisnak számos előnye van:
 - A genetikai diagnózis, az etiológia segít meghatározni a szindróma-specifikus és társuló szomatikus tüneteket.
 - A genetikai eltérés, az érintett gén funkciójának pontos ismerete esetenként a még nem észlelhető, de várhatóan később fellépő tünetekre is felhívhatja a figyelmet, ami megelőzésre vagy korai felismerésre és ezáltal eredményesebb kezelésre nyújt lehetőséget.
 - A genetikai eltérés meghatározza az értelmi fogyatékoság típusát, súlyosságát és a várható prognózist. Mindez támpontot nyújt a beteg célzott, a várhatóan

legeredményesebb kezelésének megválasztásához, a korai fejlesztés és a megelőzési programok megszervezéséhez.

- A már megszületett beteg gyermek ellátása, felnevelése, gondozása óriási anyagi, fizikai és lelki terhet jelent az egyed, a család és a társadalom számára egyaránt. A hatásos megelőzés feltétele azonban a pontos genetikai diagnózis, amelynek birtokában az érintett családokban egy következő terhesség esetén prenatális vizsgálat elvégzésére, s ezáltal újabb beteg gyermek születésének megelőzésére nyílik lehetőség.

Mindezek alapján nem kétséges, hogy minden eszközzel törekednünk kell az etiológia, az értelmi fogyatékosok hátterében álló genetikai eltérés pontos kimutatására. Minden egyes eset tisztázása előbbre visz a fent említett célok eléréséhez.

6.1 Diagnosztikai eszközök felhasználása a mentális retardáció diagnosztikájában, genetikai eltérések pontos meghatározása

A genetikai tényezőkről szerzett ismereteink a citogenetikai, molekuláris citogenetikai és molekuláris biológiai technikák fejlődésével napról napra bővülnek. Mégis, - a genetikai módszerek rohamos fejlődése ellenére - a súlyos/közepesen súlyos értelmi fogyatékosoknak ma is mindössze 60-75 %-ában áll rendelkezésünkre etiológiai diagnózis, az enyhe értelmi fogyatékosoknak pedig 80 %-ában marad ismeretlen a mentális retardáció oka. Ezért tűztem ki célul egy olyan új genetikai diagnosztikai módszer alkalmazását laboratóriumunkban, amely lehetőséget kínált arra, hogy a korábbi módszerekkel nem tisztázható, ismeretlen eredetű mentális retardációk eseteiben vagy legalább azok egy részében pontos genetikai diagnózishoz jussunk. A szubtelomerikus kromoszóma átrendeződések kimutatására szolgáló módszerek egyike a szubtelomerikus FISH vizsgálat. A módszer bevezetésével lehetőség nyílt a kiválasztott betegcsoportban a mentális retardáció genetikai hátterének tisztázására.

Emellett a monogénes szindrómák egyikében, a Smith-Lemli-Opitz szindrómában szenvedő betegek molekuláris genetikai vizsgálattal Magyarországon elsőként diagnosztizált esetét és a Magyarországon munkacsoportunk által összegyűjtött 15 SLO szindrómás beteg klinikai és biokémiai paraméterei között kimutatott összefüggést mutatom be.

6.1.1. Szubtelomerikus kromoszóma átrendeződések

A szubtelomerikus kromoszóma átrendeződések olyan kromoszóma aberrációk, amelyek a hagyományos kromoszóma analízissel kimutatható kromoszóma eltérésektől méretükben kisebbek és a halványan festődő kromoszóma végeken, a telomerikus régiókban helyezkednek el. Emiatt a hagyományos módszerekkel nem detektálhatók. Ugyanakkor genben gazdag területekről van szó, amelyek kiegyensúlyozatlan kópiaszám variációi (deléciói és duplikációi) súlyos tünetegyüttesekhez vezetnek.

A DE OEC Gyermekgyógyászati Intézet Klinikai Genetika Központ Genetikai Laboratóriumában 125 mentálisan retardált beteg és 24 egészséges hozzátartozó esetében végeztünk szubtelomerikus FISH vizsgálatot, melyből 13 esetben mutattunk ki szubtelomerikus kromoszóma aberrációt, ebből négy *de novo* eset, míg kilenc eset familiáris eredetűnek bizonyult. A vizsgálat detekciós rátája 10,4 % volt, amely érték magasabbnak bizonyult a nemzetközi irodalomban közölt értékek többségénél. A szubtelomerikus FISH vizsgálat költség- és munkaigényes, ezért a betegek megfelelő kiválasztása kulcsfontosságú, ha azonban túl szigorú szelekciós kritériumokat alkalmazunk, a pozitív esetek egy része felismeretlen marad. Vizsgálatainkban Lam és mtsai. által javasolt kritérium-rendszert alkalmaztuk. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a legfontosabb szelekciós paraméter az értelmi fogyatékoság családi halmozódása. Több ezer vizsgálat és közölt eset elemzése lehetővé tette bizonyos szubtelomerikus régiókhoz tartozó tünetegyüttesek megismerését, új szindrómák leírását. A leggyakrabban előforduló szindrómák a következők: del(1pter), del(1qter), del(2qter), del(22qter). Ezért a szubtelomerikus vizsgálataink során esetenként a

fenotípusos jegyek alapján is indikáltunk célzott vizsgálatokat, különös tekintettel az 1p36 deléció kimutatására. Az említett szindróma fenotípusos jegyei bizonyos tekintetben átfedést mutatnak a Prader-Willi szindróma klinikai tüneteivel.

Az 1p36 deléciós szindróma, az egyik leggyakoribb szubtelomerikus deléciós szindróma, melyet a közepes/súlyos mentális retardáció, jellegzetes arcdysmorphia, izomhypotonia, obesitas és epilepszia jellemez. A klinikai tünetek gyakran átfedést mutatnak a Prader-Willi szindróma jellemzőivel, ezért 12 olyan Prader-Willi szindrómára jellemző fenotípusú betegnél végeztük el az 1p36 szubtelomerikus deléció FISH vizsgálatát, akiknél a Prader-Willi szindróma specifikus genetikai tesztek negatív eredményt adtak. A szubtelomerikus FISH vizsgálatot megelőző Prader-Willi kimutatására szolgáló vizsgálatok: a specifikus régió (15q11.2) deléciójának kimutatása FISH módszerrel, a gén inaktiválódásának vizsgálatára szolgáló metilációs mintázat analízise és az inaktív anyai allél megduplázódását eredményező anyai uniparentális diszómia (UPD) kimutatása. A 15q11.2 régió delécióját egyetlen esetben sem tudtuk igazolni. A 12 FISH-negatív eset közül négyben került sor UPD vizsgálatra, negatív eredménnyel. A 12 betegből két betegnél igazoltuk az 1p36.33 deléciót: **ish del(1pter)**, mindkettő *de novo* eredetűnek bizonyult. A Prader-Willi és az 1p36 deléciós szindrómák közös vezető tünete az újszülött korban jelentkező generalizált izomhypotonia, a „floppy-baby”-tünet. Tapasztalataink alapján felvetjük, hogy minden hypotoniás újszülöttnél érdemes a FISH tesztek elvégzése a Prader-Willi és az 1p36 deléciós szindróma kizárására.

6.1.2. SLO szindróma

Az értekezésben bemutatott SLO szindrómás gyermek klinikai, biokémiai és genetikai diagnosztikája indította útjára a Debrecenben létrehozott SLO diagnosztikus és terápiás munkacsoportot, ami ma már országos központként biztosítja az SLO-s betegek komplex vizsgálatát. A bemutatott gyermek esetében egy eddig le nem írt új mutációt azonosítottunk,

ami egy ismert mutációval kettős, összetett (compound) heterozigótáság formájában vezetett a kórkép kialakulásához.

A bemutatott SLO-s betegnél a szindróma lehetőségét - a fenotípus alapján - már a gyermek fél éves korában felvetettük – de csak évekkel később került sor a biokémiai és genetikai háttér tisztázására. Ebben az UV spektrofotometria új módszerének bevezetése és a molekuláris genetikai vizsgálat lehetőségének megteremtése játszott döntő szerepet. Ez tette lehetővé a diagnózis biokémiai és genetikai megerősítését, valamint a szimvasztatin és koleszterin szubsztitúciós kezelés hatásának laboratóriumi követését. Molekuláris genetikai vizsgálat során a betegnél összetett heterozigótáság igazolódott, a beteg genotípusa: **c.964-1 G>C/c.1097 G>T** (p.G366V). A c.1097 G>T mutáció, amely a *DHCR7* gén 9-es exonjában helyezkedik el és a 4. citoplazmatikus hurkot érinti, egy korábban nem közölt új mutáció, mely guanin-timin nukleotid cserével jár és glicin-valin aminosav cserét eredményez a 7-dehidrokoleszterin reduktáz enzimben. A c.964-1 G>C mutációt az édesanya és a lánytestvér, míg a c.1097 G>T mutációt a beteg édesapja hordozza. Betegség-specifikus mutáció az iker fiútestvérben nem volt kimutatható. A terápia hatékonyságának megítélésében a klinikai tünetek alakulására és a 7-DHC és koleszterin értékek változásának monitorozására támaszkodtunk.

A külföldi kollaborációban elvégzett első molekuláris genetikai vizsgálatot követően a 15 magyarországi SLO szindrómás beteg összegyűjtésével lehetőség nyílt a DE OEC LMI Molekuláris Genetika Laboratóriumában a *DHCR7* gén molekuláris genetikai vizsgálatára és az LMI és Gyermekgyógyászati Intézet Klinikai Genetikai Központ munkatársai együtt egy SLO-szindrómás diagnosztikai és terápiás munkacsoportot hoztunk létre. A bemutatott eset a molekuláris genetikai módszerrel elsőként diagnosztizált magyarországi beteg. Ezt az esetet követően került be a rutin diagnosztikába a 7-DHC meghatározása UV-spektrofotometriás módszerrel, amellyel lehetővé vált az új esetek diagnózisának megerősítése és a szimvasztatin

és koleszterin szubsztitúciós terápia monitorozása. A létrehozott munkacsoportban (az LMI Molekuláris Genetikai Részlegén) az első eset óta bevezetett *DHCR7* gén molekuláris genetikai vizsgálata lehetővé teszi az új esetek családspecifikus mutációinak kimutatását és újabb terhességvállalás esetén prenatális diagnosztikai vizsgálat elvégzését.

A diagnózis megerősítését követően a betegnél a koleszterin szubsztitúciós kezelést és a szimvastatin kezelést indítottuk el. A kezelést a beteg jól tolerálta, gyógyszer mellékhatás nem jelentkezett. A 25-hónapos kezelési időszak alatt szignifikáns mértékben emelkedett a szérum koleszterin szint (2,77 mmol/L → 3,2 mmol/L) és csökkent a szérum 7-DHC érték (102 mg/L → 53 mg/L). A laboratóriumi paramétereken kívül javulást mutattunk ki a beteg antropometriai paramétereiben és magatartásában is. Jóllehet a beteg kezelését a diagnózis biokémiai és genetikai megerősítését követően, csupán hat éves korban volt módunk elkezdeni. Az SLO szindrómában sajnálatos módon a károsodás, már a korai embrionális életben kialakul, így a korábbi életkorban bevezetett terápia hatékonysága is kétséges.

Fordított arányú összefüggést találtunk az általunk vizsgált 15 magyarországi SLO szindrómás beteg klinikai súlyossági foka és a kezdeti koleszterin értékek között. Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a kezdeti koleszterin szint jelentősen meghatározza a beteg klinikai állapotát, életkilátásait, így prognosztikai jelentőségű. A súlyos fenotípusú betegcsoportban szignifikánsan alacsonyabb kezdeti koleszterin értékeket mértünk összehasonlítva az enyhe fenotípusú csoporttal. Érdekesnek találtunk azt a megfigyelést, hogy a koleszterin/7-DHC hányados és az α -lipoprotein aránya szintén prognosztikai értékű lehet SLO szindrómában.

6.2. Genotípus-fenotípus korrelációk

A szubtelomerikus kromoszóma aberrációk esetében a fenotípust a deletált és duplikálódott gének együttesen határozzák meg. A deletált és duplikálódott régiók nagyságának és a töréspontoknak a pontos meghatározására alkalmas módszer az array-CGH.

A töréspontok ismeretében lehetőség nyílik az érintett gének tanulmányozására, a genotípus-fenotípus kapcsolatának pontos megismerésére. A genotípus ismeretében a meghatározó tünetekre, a betegség klinikai megjelenési formájára és várható kórlefolásra (esetleg később megjelenő tünetekre) is következtethetünk. Array-CGH vizsgálatra két család beteg tagjaiban került sor.

ish t(8;12)(pter-,pter+;pter-,pter+)

Az *első családban* vizsgált testvérpár mindkét tagja egy derivált 8-as kromoszómát örökölt az apától, amelynek szubtelomerikus régiójában egy 12-es kromoszóma eredetű kromoszóma részlet volt kimutatható, így 8pter deléció és 12pter duplikáció alakult ki. A **8pter deléció** mentális és növekedési retardációval, szívfejlődési rendellenességgel és magatartási problémával járó tünetegyüttes. Az irodalomban beszámoltak két <5,1 Mb nagyságú 8pter deléciós esetről, ahol enyhe értelmi fogyatékossgot és magatartászavart találtak, egyidejű szívfejlődési rendellenesség nélkül. Kimutatták, hogy a <5,1 Mb nagyságú deléció proximális helyzete miatt a *GATA4* gén, amely a szívfejlődési rendellenességekkel hozható összefüggésbe, nem deletálódott. Az általunk vizsgált első családban mindkét testvérnél a **dup(12p) szindrómára** jellemző fenotípusos eltérések, elsősorban az arcdysmorphia jellemző tünetei is megfigyelhetők voltak. Az eddig közölt dup(12p) szindrómás esetek nagy része familiáris eredetű. Annak ellenére, hogy a fenotípust a duplikáció mérete ill. az átrendeződésben részt vevő partner kromoszóma jelenléte jelentősen befolyásolja, az arcdysmorphia a dup(12p) szindrómában, mint esetünkben is, nagyon jellemző. A lapos arc, prominens homlok és áll, rövid orr, lefelé tekintő szájzug, hypertelorismus, hátrafelé rotált fülkagyló megfigyelhető.

ish der(21)t(10;21)(pter+,qter-)

A *második családban* kimutatott kiegyensúlyozatlan transzlokáció a 10p15.3-14 és a 21q22.2-22.3 régiók között jött létre, s mindhárom betegben közepes mértékű mentális

retardációt, a beszédfejlődés késését, izomhypotoniát, arcdysmorphiát, szívfejlődési és ortopédiai rendellenességet eredményezett. A **szubmikroszkópikus 10p triszómiát** eddig négy esetben írták le, az általunk bemutatott család érintett tagjai a legnagyobb hasonlóságot a Stone által közölt esettel mutatják. Munkacsoportunk által bemutatott betegeknél kimutatott 6,7 Mb nagyságú 10p duplikáció az eddig közölt esetekkel összehasonlítva a legkisebb. A Stone által leírt család két tagjánál a kiegyensúlyozatlan transzlokáció a 10p és 9p kromoszóma régiók között jött létre, a 10p14-15 régiót érintő duplikáció 9 Mb nagyságúnak bizonyult. Egy másik szerző beszámolt egy betegről, akinél 6,9 Mb nagyságú szubtelomerikus 10p duplikációt (10pter-p15) és egy 18q szubtelomerikus deléciót (18q23-qter) detektáltak. A beteg fenotípusos jellemzői a következők voltak: pszichomotoros retardáció, cardiomyopathia, strabismus, köldöksérv és arcdysmorphia.

A **parciális 21q monoszómia** egy ritka, változatos klinikai megjelenésű kromoszóma aberráció. A klinikai tünetek függenek a deléció méretétől, a deletált szakasz lokalizációjától és a transzlokációban részt vevő partner kromoszómától is. Holoprosencephalia jelenlétét a tiszta parciális 21q22.3 monoszómiás betegben írták le. A HPE1 régiót magában foglaló, kiegyensúlyozatlan transzlokációból származó két 21q22.3 parciális monoszómiás esetet közöltek az irodalomban, ahol a 4 Mb nagyságú deléció a legdisztálisabban helyezkedett el (chr21:41521879-46944323, UCSC 2006 hg18 assembly). A 21q monoszóma szindróma genotípus-fenotípus összefüggése jelenleg még nem teljesen körvonalazott. A korábban már közölt parciális 21q monoszómiás esetek kapcsán öt fő fenotípusos jellemzőt meghatározó régióról tesznek említést, mely mindegyike az *ETS2* géntől proximálisan helyezkedik el. Közlemények szerint a terminális deléció proximális határát a *HMG14* és *MXI* gének között helyezték el. Egy másik tanulmányban, ahol egy betegnél 7,9 Mb nagyságú 21q terminális deléciót detektáltak - amely magában foglalta az *ETS2* gént is - nagyon enyhe fenotípust írtak le: vékony, marfanoid testalkat, enyhe értelmi fogyatékoság, arcdysmorphia. Esetünkben,

ahol az *ETS2*, *HMG14* gének nem deletálódtak és a töréspont a *MXI* géntől proximálisan helyezkedik el, a következő fenotípusos jellemzőket észleltük: közepes fokú mentális retardáció, beszédfejlődés késése, izomhypotonia, arcdysmorphia (ptosis, középarc hypoplasia, micrognathia, hosszú philtrum, malformált fül, vékony felső ajakpír), szív fejlődési rendellenesség, scoliosis és kyphosis. A betegünknel észlelt 21q deléció – a HPE1 kritikus régiót tekintve - átfedést mutat a Muenke által leírt delécióval (UCSC 2006 hg18 assembly). A közös fenotípusos jellemzők a mentális retardáció, megkésett fejlődés, patella anomália voltak.

A betegnél az array-CGH segítségével detektált 6,7 Mb nagyságú duplikáció a 10p15.3-14 régióban, az 5,6 Mb deléció pedig a 21q22.2-22.3 régióban helyezkedik el. A duplikálódott régióban (10p15.3-14) 21 lokalizálódó gén közül az OMIM adatbázis szerint a következő gének funkció-fenotípus kapcsolata ismert: *AKRIC2* (OMIM ref.: 600450, HGNC ID: 385), *IL2RA* (OMIM ref.: 147730, HGNC ID: 6008). A deletálódott régióban (21q22.2-22.3) 54 gén érintett, ebből 16 gén funkciója hozható összefüggésbe a fenotípussal. Ezen gének közé tartozik a *COL6A1* és *COL6A2* gén is, melynek trunkált és misszenz mutációi Bethlem myopathiát okozhatnak, mely egy autoszómális dominánsan öröklődő, a törzs és végtag izmainak közepes fokú gyengeségével és atrophijával járó, benignus myopathia. A betegnél elvégzett EMG vizsgálat myopathiára jellegzetes mintázatot mutat. A 2. család, legidősebb betegénél észlelt izomatrophia, izomgyengeség, scoliosis, kyphosis, ízületi hyperflexibilitás és habituális patella sublúxió összefüggésbe hozható a *COL6A1* és *COL6A2* gének haploinsufficienciája okozta gén-termék, illetve génfunkció kiesésével. Természetesen az említett összefüggések csupán a klinikai kép és a genetikai eredmények alapján született felvetések, amelyek csupán a gén termékek kimutatásával és funkciójuk vizsgálatával lenne bizonyítható.

3q29 mikrodeléciós szindróma

A **3q29 mikrodeléciós** szindróma, egy jól körvonalazott genetikai betegség, melyet 2001-ben írtak le először, hat esetben mutatták ki a 3q29 régió ~1,5 Mb nagyságú delécióját. A fenotípusra a következő tünetek a jellemzőek: enyhe-közepes fokú értelmi fogyatékoság, hosszú, vékony arc, rövid philtrum, magas orrnyereg, autisztikus viselkedés, ataxia, mellkas deformitás, hosszú, elvékonyodó ujjak, microcephalia, szájpad-ajakhasadék, patkóvese, hypospadiasis, laza ízületek, kóros pigmentáció, visszatérő középfül infekciók. Később számos munkacsoport számolt be további fenotípusos jellemzők előfordulásáról, mint csigolya rendellenességek, ízületi kontraktúrák, nazális hang, congenitális cataracta és egyéb szemrendellenesség, hasadt hüvelykujj. Az általunk vizsgált esetben a 3q29 mikrodeléciós szindrómára jellegzetes fenti fenotípusos eltérések mellett, ritka szemészeti rendellenesség, uvea coloboma fordult elő.

1p36 deléciós szindróma

Az **1p36 deléciós szindrómát**, 1997-ben írták le először. Az egyik leggyakoribb szubtelomerikus kromoszóma aberráció, incidenciája 1:5000-1:10000. Nagyon jellegzetes és könnyen felismerhető klinikai entitás. Fenotípusos jellemzői a mentális retardáció, brachycephalia, arcdysmorphia, izomhypotonia, kis kéz és láb, agyi fejlődési rendellenesség, epilepszia, vitium, szemészeti rendellenesség, obesitas és hypothyreosis. A genetikai diagnózis 5 Mb-nál nagyobb deléció és komplex átrendeződések esetén high-resolution citogenetikai vizsgálattal is lehetséges, az 5 Mb-nál kisebb szubtelomerikus vagy intersticiális deléciók esetén szubtelomerikus FISH ill. array-CGH módszer áll rendelkezésünkre. Differenciál diagnosztikai szempontból felmerülő szindrómák: a Prader-Willi szindróma, az Angelman szindróma és a Rett szindróma. Az 1p36 deléció klinikailag leginkább a Prader-Willi szindrómával mutat átfedést, ezért számos tanulmány jelent meg a „Prader-Willi-like” fenotípusú betegben végzett vizsgálatokról. Összefüggést találtak a Prader-Willi fenotípus és

az 1p36 deléciós szindróma között, míg egyes szerzők cáfolták ezt. Az 1p36 deléciós szindróma jellegzetes tünete az epilepszia, amely klinikai megjelenésében nagy változatosságot mutat az 1p36 deléciós szindrómás betegekben. Az epilepszia patomechanizmusa ebben a kórképben még nem teljesen tisztázott, a klinikai megjelenés a génben gazdag 1p terminális szakasz deléciójának (nagyság, kiterjedés) függvénye. A szindrómában az elvesztett szakaszokon két ismert epilepszia gént mutattak ki: az egyik a *KCNAB2*, egy feszültség-függő kálium csatorna β -alegység gén, a másik pedig a *GABRD*, egy human γ -aminovajsav A receptor delta-alegység gén. E megfigyelések megerősítik, hogy az epilepsziával járó szubtelomerikus szindrómák array-CGH vizsgálata segítséget jelentene az epilepszia kialakulásában szerepet játszó gének megismerésében.

Smith-Lemli-Opitz szindróma

Az SLO szindróma várható incidenciája 1:15900 és 1:17000 közé tehető, míg a szomszédos országokban, Csehországban és Szlovákiában 1:10000- től 1:20000-ig terjed. Magyarországi incidenciára vonatkozó adat jelenleg még nem áll rendelkezésünkre. Ahhoz, hogy meg tudjuk becsülni a betegség ill. a hordozók gyakoriságát a magyar populációban is, a kórkép alkalmazott biokémiai és molekuláris genetikai diagnosztikájának hazai bevezetése és a magyarországi esetek összegyűjtése szükséges. Örömeinkre szolgál, hogy ezt a folyamatot Debrecenben, munkacsoportunk közreműködésével sikerült elindítani. Az SLO szindróma fenotípusa nagyon változatos megjelenésű. Számos munkacsoport talált összefüggést bizonyos mutációk jelenléte és a betegség klinikai súlyossági foka között, így pl. a W151X nonszenz mutáció és az I251N mutáció az SLO szindróma súlyos formáját okozza. Ezzel ellentétben az IVS8-1G>C/V326L genotípus enyhe tünetekkel jár. Egyes szerzők úgy találták, hogy a genotípus és a fenotípus között nincs egyértelmű korreláció, mivel egyéb paraméterek szintén szerepet játszhatnak a prognózis meghatározásában, így pl. a magasabb szérum

koleszterin szint kedvezőbb prognózissal jár. Ugyancsak megerősítették azt a korábbi megfigyelést, hogy a 7-DHC érték nem mutat összefüggést a klinikai súlyossággal. A betegség súlyossága és a szérum koleszterin közötti fordított arányú korrelációt munkacsoportunk is megerősítette. A leggyakrabban előforduló *DHCR7* génmutációk a következők: IVS8-1G>C (27,3 %), T93M (10,4 %), W151X (5,7 %), V326L (4,8 %) és R404C (4,5 %). Az említett öt mutáció, az ismert mutációk 50-60 %-át adja. A kevésbé gyakori mutációk között a R352W (2,8 %), E448K (2,8%), G410S (1,9 %), R242C (1,6%), S169L (1,6%) és a F302L (1,5%) említendő. Az általunk bemutatott beteg genotípusának jelentősége, hogy a kettős heterozigóta beteg egyik alléljének mutációja, a c.1097 G>T egy eddig le nem írt új patogén mutáció. A mutáció a *DHCR7* gén 9-es exonjában helyezkedik el, a negyedik citoplazmatikus hurkot érinti - s guanin-timin nukleotid cserével jár, ami a kódolt fehérjében, a 7-dehidrokoleszterin reduktáz enzimben glicin-valin aminosavcserét eredményez.

A 90-es évek óta az SLO szindrómában alkalmazott terápiás beavatkozásokról számos multicentrikus tanulmány jelent meg. Kézenfekvőnek látszott a betegekben igazolt biokémiai eltérés, mindenekelőtt az alacsony koleszterinszint korrekciójával való próbálkozás. Kimutatták, hogy a koleszterin szubsztitúció hatására javulnak a biokémiai paraméterek. Ezt a sztatin terápiás bevezetése követte, amit két megfigyelés támasztott alá: a HMG-CoA reduktáz enzim gátlásával a kórosan felszaporodott prekursorok, a 7-DHC és 8-DHC mennyisége csökkenthető, másrészt az a megfigyelés, hogy *in vitro* koleszterinmentes-közegben tartott humán fibroblaszt tenyészetben lovasztatin hozzáadásával a 7-DHCR aktivitásának upregulációja volt igazolható.

A szimvasztatin képes a deficiens 7-DHCR expresszióját is növelni. A javuló koleszterin szintézis a mutáns allél expressziójának növekedésével, így az enzim reziduális funkciójának fokozódásával magyarázható. A terápiásan adott koleszterin pótlás a perifériás szövetekben

javította a szterol profilt, de a központi idegrendszer szöveteiben nem. A Dhcr7 egerek (T93M/Delta 3-5) szimvasztatinnal történő kezelése csökkentette a 7-DHC szintet a perifériás szövetekben, de az agyban nem. Magunk a beteg hat éves korában kezdtük el a koleszterin szubsztitúciót és a szimvasztatin terápiát, aminek hatására definitív javulást észleltünk a biokémiai paraméterekben és néhány magatartási mintában is javulás volt megfigyelhető. Az SLO szindrómában alkalmazott kezelések hatékonyságát ma már kétségbevonják. Az utóbbi években ugyanis számos - a korábbi pozitív megfigyeléseket, a klinikai javulást megkérdőjelező - tanulmány jelent meg, melyekben nem tudtak szignifikáns javulást igazolni a kezelés eredményeképpen. Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy az intrauterin életben elszenvedett koleszterin hiány már a korai embrionális életben súlyos, több szervet érintő irreverzibilis károsodásokhoz vezet, amelyek később már nem korrigálhatók. Ez a megfigyelés a genetikai diagnosztika fontosságát és prenatális diagnosztika lehetősége megteremtésének fontosságát húzza alá, tekintettel arra, hogy az anya anyagcseréje nem kompenzálja a koleszterin hiányt, mint más anyagcserebetegségben.

6.3. Az eredmények gyakorlati hasznosítása

- ***Kivizsgálási algoritmus kidolgozása és továbbfejlesztése***

A International Standard Cytogenomic Array (ISCA) Konzorcium (2010) javaslatának megfelelően a mentális retardáció/veleszületett rendellenességek kivizsgálásában az array technikákat helyezi a diagnosztikai lépések első helyére, melyet az Egyesült Államokban és a Nyugat-Európai országokban már rutinszerűen alkalmaznak. Hazánkban az array technikák rutinszerű alkalmazására jelenleg nem adottak a feltételek, így a magyar klinikai genetikus „rákényszerül” egy hazai kivizsgálási algoritmus kidolgozására és alkalmazására. Minden olyan esetben, amikor mentális retardációt észlelünk többszörös rendellenességhez társulva vagy anélkül, első lépésként a hagyományos citogenetikai vizsgálat elvégzését javasoljuk.

Jóllehet, ez a módszer nem nyújt molekuláris szintű információt a háttérben álló genetikai eltérésről, a pozitív eredmény a klinikai igényeket kielégíti: tisztázza a rendellenesség vagy az értelmi fogyatékoság okát és eszközt ad a kezünkbe az érintett család esetében egy következő terhesség során prenatalis vizsgálat elvégzésére. Normális kariotípus vagy nem egyértelmű eredmény (pl.: marker kromoszóma) esetén kiegészítő molekuláris citogenetikai vizsgálatok pl.: mikrodélciós FISH, szubtelomerikus FISH, mFISH elvégzése szükséges. Amennyiben monogénes szindróma merül fel, mint. pl. SLO szindróma, Rett szindróma, Fragilis-X szindróma, a klinikai tünetek alapján, molekuláris genetikai vizsgálat javasolt. Ha az elvégzett vizsgálatok negatív eredménnyel zárulnak, vagy a szubtelomerikus FISH vizsgálattal kóros eltérést kapunk – a töréspontok pontos azonosítása érdekében – javasolt array-CGH vizsgálat elvégzése. Az érintett gének és funkciók megismerésével klinikai-genetikai összefüggések vizsgálhatók, információt nyerünk a betegség patomechanizmusáról, esetleg később várható tünetek megjelenéséről, s a betegség várható lefolyásáról, a prognózisról. A genotípus-fenotípus összefüggések ismerete és rögzítése lehetővé teszi a szubtelomerikus deléciók klinikai képpel való összefüggésének tisztázását, újabb specifikus entitások leírását, ezáltal a betegek fenotípus alapján történő pontosabb kiválasztását, azaz a vizsgálat indikációjának pontosítását. A diagnózishoz szükséges idő lerövidítésén túl ily módon javítható a költség-haszon arány. Emellett a továbbfejlesztett beteg-szelekciós kritériumok alkalmazásával nagyobb találati arányt érhetünk el és csökkenthetjük a felesleges vizsgálatok számát.

Remélhető, hogy a molekuláris genetikai technikák fejlődésével egyre kevesebb esetben találkozunk tisztázatlan háttérű értelmi fogyatékoságban szenvedő gyermekkel és egyre ritkábban állunk tehetetlenül az érintett családok veszélyeztetett terhességei előtt. Az értelmi fogyatékoság genetikai háttérének tisztázásával a familiáris esetekben, a kiegyensúlyozott transzlokáció hordozó szülők és családtagok vagy heterozigóta mutációt hordozók újabb terhessége esetén megelőzhetjük a betegség családon belüli ismétlődését.

Mindez felbecsülhetetlen fontosságú a beteg gyermek, a család és a társadalom terheinek csökkentése szempontjából.

A PhD értekezés új eredményei

1. Ismeretlen eredetű mentális retardáció/többszörös veleszületett rendellenességek kivizsgálási menetébe beillesztettük a szubtelomerikus FISH vizsgálatot a nemzetközi kritérium rendszer alapján kiválasztott értelmi fogyatékos betegcsoportban, s a hazai lehetőségekre alapozva diagnosztikus algoritmust dolgoztunk ki. A szubtelomerikus FISH vizsgálatok során kilenc familiáris és négy *de novo* esetben mutattunk ki szubtelomerikus kromoszóma aberrációt – 10,4 %-os találati aránnyal (13/125).
2. Kollaborációban végzett array-CGH vizsgálattal meghatároztuk a deléció és duplikáció nagyságát, tanulmányoztuk a transzlokációban érintett géneket, s ezek alapján tanulmányoztuk a genotípus-fenotípus összefüggéseket (COL6A1 és 2 gének).
3. Az SLO szindrómás betegnél eddig nem közölt patogén mutációt (p.G366V) írtunk le összetett (compound) herozigóta formában. Az SLO szindrómában tapasztalatot szereztünk a koleszterin szubsztitúciós és szimvasztatin kezelés alkalmazásával. Egy eset kapcsán javulást tapasztaltunk a biokémiai paraméterekben, valamint bizonyos klinikai tünetekben, melyet a szülői interjú és a Vineland Adaptív Viselkedési Skála segítségével objektivizáltunk. Diagnosztikus és terápiás munkacsoportot hoztunk létre a Gyermekgyógyászati Intézet és a Laboratóriumi Medicina Intézet munkatársaival együtt.
4. Munkacsoportunk által összegyűjtött 15 magyarországi SLO szindrómás betegekben fordított arányú összefüggést mutattunk ki a klinikai súlyosság és a kezdeti koleszterin szint között. A kezdeti koleszterin szint mellett a 7-DHC és az α -lipoprotein értéknek prediktív értéke lehet az SLO szindróma prognózisának megítélésében.

5. A genetikai diagnózis pontosításával, a családspecifikus mutáció kimutatásával lehetőség nyílt arra, hogy prenatális diagnosztikával a családon belüli ismétlődéseket megelőzzük, így már öt egészséges gyermek született az „SLO családokban”.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A mentális retardáció etiológiája rendkívül heterogén. A háttérben álló okok lehetnek öröklött, genetikai ártalmak, vagy pre-, peri-, vagy posztnatális életben szerzett betegségek. A citogenetikai, molekuláris citogenetikai és molekuláris biológiai technikák fejlődése ellenére a súlyos/közepesen súlyos értelmi fogyatékos betegek 60-75 %-ában, míg enyhe értelmi fogyatékosok 80 %-ában a mentális retardáció oka ismeretlen marad. Munkám célja: új genetikai diagnosztikai módszerek alkalmazása laboratóriumunkban, mellyel a korábbi módszerekkel nem tisztázható, ismeretlen eredetű mentális retardációk további alcsoportjában válik lehetővé a pontos genetikai diagnózis meghatározása. A szubtelomerikus kromoszóma átrendeződések kimutatására szolgáló módszerek egyike a szubtelomerikus FISH vizsgálat. A 125 mentálisan retardált beteg közül 13 esetben mutattunk ki szubtelomerikus kromoszóma aberrációt, ebből négy *de novo* eset, míg kilenc familiáris eredetűnek bizonyult. ***De novo*** keletkezett eltérések: **ish del(3)(qter-); ish del(1)(pter-); ish del(22)(qter-).** **Familiáris aberrációk:** **ish der(8)t(8;12)(pter-,pter+); ish der(21)t(10;21)(pter+,qter-); ish der(4)t(4;8)(pter-;qter+); ish der(3)t(3;8)(pter-;pter+); ish der(10)t(10;17)(qter-;qter+).** Ez az egyéb módszerrel tisztázatlanul maradt esetek egy tizedében vezetett a genetikai eltérés tisztázásához. A fenti kromoszóma eltéréssel járó esetek mellett az értekezésben egy monogénes kórképben, a súlyos értelmi fogyatékossgal járó Smith-Lemli-Opitz szindrómában szenvedő, molekuláris genetikai vizsgálattal Magyarországon elsőként diagnosztizált esetet mutatok be. A beteg genetikai vizsgálata során eddig nem közölt új patogén mutációt igazoltunk, amely egy már ismert mutációval együtt, összetett heterozigóta formában vezetett a betegséghez: **c.964-1 G>C/c.1097 G>T (p.G366V).** A hazai SLO-s betegek klinikai, biokémiai és genetikai diagnózisának biztosítására munkacsoportot hoztunk létre. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a kezdeti koleszterin érték jelentősen meghatározza az SLO szindróma súlyosságát és a betegek életkilátásait, valamint hogy a

koleszterin/7-DHC hányados és az α -lipoprotein további prognosztikai értékkel bír. A genetikai eltérések igazolása lehetőséget teremt a családon belüli ismétlődések megelőzésére, a genotípus-fenotípus összefüggések elemzése pedig a betegség patomechanizmusának megismerésében, a betegség prognózisának megítélésében és az adekvát beavatkozás megtervezésében nyújthat segítséget.

Iktatószám: DEENKÉTK/299/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: P. Szabó Gabriella

Neptun kód: BAFBXD

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Oláh, A.V., **P. Szabó, G.**, Varga, J., Balogh, L., Csábi, G., Csákváry, V., Erwa, W., Balogh, I.: Relation between biomarkers and clinical severity in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Eur. J. Pediatr.* 172 (5), 623-630, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00431-012-1925-z>
IF:1.907 (2012)
2. **P. Szabó, G.**, Knegt, A.C., Ujfalusi, A., Balogh, E., Szabó, T., Oláh, É.: Subtelomeric 6.7 Mb trisomy 10p and 5.6 Mb monosomy 21q detected by FISH and array-CGH in three related patients. *Am. J. Med. Genet. A.* 158A (4), 869-876, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.35236>
IF:2.304
3. **P. Szabó, G.**, Oláh, A.V., Kozak, L., Balogh, E., Nagy, A., Blahakova, I., Oláh, É.: A patient with Smith-Lemli-Opitz syndrome: Novel mutation of the DHCR7 gene and effects of therapy with simvastatin and cholesterol supplement. *Eur. J. Pediatr.* 169 (1), 121-123, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00431-009-0987-z>
IF:1.644
4. **P. Szabó G.**, Bessenyei B., Balogh E., Ujfalusi A., Szakszon K., Oláh É.: Szubtelomerekus kromoszómaátrendeződések kimutatása idiopathiás mentális retardációban. *Orv. Hetil.* 151 (27), 1091-1098, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2010.28911>



További Közlemények

5. Balogh, I., Koczok, K., **P. Szabó, G.**, Török, O., Hadzsiev, K., Csábi, G., Balogh, L., Dzsudzsák, E., Ajzner, É., Szabó, L., Csákváry, V., Oláh, A.V.: Mutational spectrum of smith-lemli-opitz syndrome patients in Hungary.
Mol Syndromol. 3 (5), 215-222, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000343923>

Összesített impakt faktor: 5.855

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 5.855

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.09.09



Az értekezés témájában elhangzott előadások, bemutatott posztterek

P. Szabó G., Oláh A., Balogh E., Nagy A., Oláh É.: **Terápiás lehetőségek Smith-Lemli-Opitz szindrómában**, MGYT Fiatal Gyermekgyógyászok III. Konferenciája, Szeged, 2004. ápr.3.

P. Szabó G., Bessenyei B., Szakszon K., Ujfalusi A., Balogh E., Oláh É.: **8p; 12p szubmikroszkópikus kromoszóma átrendeződés kimutatása szubtelomerikus FISH vizsgálattal egy testvérpárban**, MGYT Országos Nagygyűlése, Eger, 2009. jún.18.

P. Szabó G., Szakszon K., Ujfalusi A., Bessenyei B., Balogh E., Oláh Éva: **1p36 deléció kimutatása Prader-Willi szindróma tüneteit mutató betegekben**, Magyar Humánogenetikai Társaság Konferenciája, Debrecen, 2010.09. 2-4.
Magyar Gyermekgyógyász Társaság Konferenciája, Esztergom, 2010.09.23-25.

P. Szabó G., A.C. Knegt, Boczán J., Mechler F. Oláh É.: **Bethlem myopathia előfordulása 10;21 szubtelomerikus kromoszóma aberrációban. A genotípustól a fenotípusig**, Magyar Klinikai Neurogenetikai Társaság Konferenciája, Budapest, 2011.dec.2-3.

P. Szabó G., Ujfalusi A., Balogh E., Szakszon K., Bessenyei B., A.C. Knegt, Oláh É.: **Szubtelomerikus kromoszóma átrendeződések kimutatása mentális retardációban**, Magyar Humánogenetikai Társaság Konferenciája, Szeged, 2012.08.22-24.

G. P. Szabó, A. C. Knegt, E. Balogh, K. Szakszon, A. Ujfalusi, É. Oláh: **Subtelomeric study of 65 Hungarian patients with idiopathic mental retardation, facial dysmorphism and/or congenital anomalies**, 8th European Cytogenetics Conference, Porto, 2011.07. 2-5.

További előadások, posztterek

P. Szabó G., Balogh E., Bessenyei B., Lengyel Zs., Karcagi V. Oláh É.: **Fragilis X szindróma halmozódása egy családban „Mit rejthet egy fénykép”**, MGYT Fiatal Gyermekgyógyászok IV. Konferenciája, Budapest, 2005. márc.20.

P. Szabó G., Balogh E., Ujfalusi A., Princzinger Á., Oláh É.: **Ritka citogenetikai eltérések mentális retardációban**, MGYT Észak-Kelet Magyarországi Területi Szervezetének Tudományos Ülése, Nyíregyháza, 2007.jún.8-9.

P. Szabó G., Nagy A., Balogh E., Oláh É.: **Albers-Schönberg szindróma egy eset kapcsán**, Magyar Humánogenetikai Társaság Konferenciája, Győr, 2006. okt.

A. Ujfalusi, E. Balogh, A. C. Knegt, G. P. Szabó, K. Szakszon, É. Oláh: **Rare de novo duplication of 9p24.3-9p13.1 in two Hungarian cases**
8th European Cytogenetics Conference, Porto, 2011.07. 2-5.