

**MTA  
DOKTORI ÉRTEKEZÉS**

**ÚJ EREDMÉNYEK A NEUROMUSCULARIS BETEGSÉGEK  
MOLEKULÁRIS DIAGNOSZTIKÁJA ÉS TERÁPIÁJA  
TERÜLETÉN**

**DR. MOLNÁR MÁRIA JUDIT**

**2010**

**BUDAPEST**

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. Bevezetés és célkitűzések .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Előzmények és irodalmi összefoglalás.....</b>	<b>5</b>
2.1. A mitochondrialis betegségek.....	5
2.1.1. A mitochondrialis betegségek molekuláris jellemzése.....	5
2.1.2. A mitochondrialis betegségek molekuláris genetikai diagnosztikai lehetőségei.....	13
2.1.3. Genetikai tanácsadás, prenatális diagnosztika a mitochondrialis betegségekben.....	14
2.2. Az izomdystrophiák.....	15
2.2.1. Az izomdystrophiák molekuláris alapjai .....	15
2.2.2. Az izomdystrophiák state of art diagnosztikája.....	19
2.2.3. Az izomdystrophiák molekuláris terápiája – státusz 2009.....	20
2.3. A hereditér neuropathiák jellegzetességei.....	22
2.3.1. A hereditér neuropathiák genetikai háttere.....	23
2.3.2. A hereditér neuropathiák state of art genetikai diagnosztikája.....	27
2.3.4. NOTCH3 gén mutációhoz társuló neuropathia.....	28
<b>3. Beteganyag és módszerek.....</b>	<b>29</b>
3.1 Vizsgált betegek.....	29
3.2. Alkalmazott módszerek.....	30
3.2.1 PET és Doppler vizsgálatok.....	30
3.2.2. Morfológiai vizsgálatok: fény- és elektronmikroszkópos..... vizsgálatok	32
3.2.3. Molekuláris biológiai metodikák.....	33
3.2.4. Immunszerológiai vizsgálatok.....	38
3.2.5. Génterápiás vizsgálatok.....	38
<b>4. Eredmények.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1. Mitochondrialis betegségek.....</b>	<b>41</b>
4.1.1. Új mtDNS rendellenességek, új mtDNS betegségek leírása.....	41

4.1.2. Fenotípus variációk MERRF (myoclonus epilepsy, ragged red fiber) szindrómában.....	49
4.1.3. Az mtDNS tRNS <sup>Lys</sup> mutációinak elemzése mitochondrialis betegségekben .....	53
4.1.4. Az RRM2B gén heterozygota mutációjának új klinikai megjelenése: autoszomalis domináns progresszív ophthalmoplegia externa .....	60
4.1.5. A cerebrális vérátáramlás és glükóz metabolizmus jellemzése mitochondrialis betegségekben.....	64
4.1.6. Az mtDNS A3243G és A8344G mutációinak epidemiológiai elemzése Magyarországon.....	65
4.1.7. Új diagnosztikai módszer validálása az mtDNS betegségek prenatalis felismerésére.....	67
<b>4.2. Izomdystrophiák .....</b>	<b>69</b>
4.2.1. Dystrophin deficienciához társuló szekunder calpain deficiencia..	69
4.2.2. A siketség, mint a dystrophin deficiencia allélikus variánsa .....	73
4.2.3. Compound heterozygota dysferlin gén mutáció .....	75
4.2.4. A glycosylatios rendellenességek szerepe a végtagöv típusú .....	78
izomdystrophiákban.....	78
4.2.5 A dystrophinopathiák molekuláris terápiája .....	79
<b>4.3. Hereditár perifériás neuropathiák .....</b>	<b>83</b>
4.3.1. Új mutációk leírása örökletes neuropathiákban .....	83
4.3.2. Roma neuropathiák diagnosztikája Magyarországon .....	85
4.3.3. Mitofusin mutáció következtében kialakuló ultrastrukturális elváltozások.....	88
4.3.4. Primer és szekunder mitochondrialis diszfunkcióhoz társuló .....	91
neuropathia	
4.3.5. <i>NOTCH3</i> mutációhoz társuló neuropathia és myopathia .....	100
4.3.6.. Hereditár neuropathia (PMP22 duplikáció) és autoimmun .....	101
betegségek együttes előfordulása	

<b>5. Megbeszélés .....</b>	<b>104</b>
5.1. A neurológiai és pszichiátriai tünetek és a genotípus összefüggéseinek elemzése mitochondriális betegségekből .....	104
5.2. A mitochondriális tRNS <sup>Lys</sup> gén és határoló régióiban talált eltérések jelentősége.....	110
5.3. Az mtDNS A3243G és A8344G mutációinak epidemiológiai vizsgálata ...	111
5.4. A molekuláris biológiai vizsgálatok szerepe az mtDNS betegségek diagnosztikájában és prénatalis diagnosztikájában.....	116
5.5. A nukleáris RRM2B gén heterozygota mutációja, mint az autoszomalisan domináns progresszív ophthalmoplegia externa új etiológiája.....	118
5.6. Az izomdystrophiák és hereditár neuropathiák molekuláris diagnosztikai stratégiája.....	119
5.6.1. A szekunder calpain deficiencia jelentősége az izomdystrophiák diagnosztikája során.....	119
5.6.2. A nem kódoló DNS jelentősége az izomdystrophiák patogenezisében.....	120
5.6.3. A glycosylatio szerepe a végtaggöv típusú izomdystrophiákban ...	123
5.6.4. A hereditár neuropathiák diagnosztikus stratégiája .....	124
5.7. A izombetegségek molekuláris terápiáinak realitásai és útvesztői .....	128
<b>6. Elért tudományos eredmények .....</b>	<b>129</b>
<b>7. A téziseket megalapozó tudományos munkák jegyzéke .....</b>	<b>133</b>
<b>8. Az értekezésben hivatkozott közlemények jegyzéke .....</b>	<b>141</b>
<b>9. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>163</b>
<b>10. Rövidítés jegyzék.....</b>	<b>164</b>

## **1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK**

Tudományos munkásságom az elmúlt 2 évtizedben a neuromusculáris és neurogenetikai betegségek kutatására irányult. Az alkalmazott módszerek a neurológiai és pszichiátriai diagnosztikus vizsgálatok mellett képalkotó eljárásokat, morfológiai és molekuláris genetikai vizsgálatokat foglaltak magukba. Az értekezés fő témakörei a mitochondrialis medicina, az izomdystrophiák és a hereditár neuropathiák molekuláris diagnosztikája és terápiája köré csoportosulnak. Kutatási projektek nem csak a szorosabb értelemben vett klinikai kutatásokra irányultak, hanem a hazai kutatási infrastruktúra stratégiai fontosságú alappilléret képező biobankok építését is jelentették (NEPSYBANK). A tézisek alapjául szolgáló közlemények csak egy részét teszik ki a megjelent publikációimnak, csak szorosan a feldolgozott témához kapcsolódó tudományos eredmények kerültek megemlítésre. Célkitűzéseim: a neuromusculáris betegségek (mitochondriális betegségek, izomdystrophiák, örökletes perifériás neuropathiák) háttérében álló genomikai rendellenességek megismerése, a genomikai eltérések hatásának elemzése a fenotípusa, a központi idegrendszerre (KIR), a vázizomra és perifériás idegekre. Duchenne típusú izomdystrophiában a plazmid mediálta géntranszfer optimalizálása és humán alkalmazásra való előkészítése.

## **2. ELŐZMÉNYEK ÉS IRODALMI ÖSSZEFOGLALÁS**

### **2.1. A mitochondrialis betegségek**

#### **2.1.1. A mitochondrialis betegségek molekuláris jellemzése**

A mitochondrialis cytopathiák multiszisztémás betegségek, amelyek döntően a központi idegrendszer és a vázizom betegségeit eredményezik, de számos egyéb szerv működészavarát is okozhatják. Elsősorban a nagy energiaigényű szövetek, mint a központi idegrendszer, vázizmok, szívmusculus, az endokrin szervek, máj, vese és a szem érintettek. A klinikai tünetek specifikusak, de nagyon változatosak (DiMauro és Davidzon 2005). A mitochondrialis betegség kialakulásához a mitochondriumok működését meghatározó maternalisan öröklődő mitochondrialis DNS (mtDNS), és nukleáris DNS (nDNS) mutációi vezethetnek. A DNS mutációja okozhat nukleotid-szubsztitúciót, ami érinthet tRNS-t, rRNS-t vagy proteinkódoló gént és eredményezhet delécióval/duplikációval járó gén

átrendeződést (Shoubridge és Molnar, 2002). Esetenként az mtDNS depléciója okoz súlyos tüneteket.

Mutáció lokalizációja		Mutációk száma	Előfordulási gyakorisága
RNS	rRNS	12	4%
	tRNS	137	42%
	NAD	86	27%
Protein kódoló gének	ATP	16	5%
	Cytochrom	70	22%

**2.1. Táblázat:** Patogén pontmutációk megoszlása a mitochondriális genomban (www.mitomap.org)

A mitochondriális betegségek (mtDNS és nDNS kapcsolt) átlag prevalenciája mai ismereteink alapján 1: 5000-re becsülhető (Schaefer et al. 2004). Egyes mitochondriális DNS mutációk kifejezetten gyakoriak, ezek közül kimagaslik az A3243G pontmutáció, amely előfordulási gyakorisága a felnőtt finn populációban eléri a 16,3/100.000-t (Majamaa et al. 1998). Eddig közel 200 betegség háttérben azonosítottak mtDNS mutációt és folyamatosan nő azon kórképek száma, amelyek háttérben a nukleáris genom mitochondriumok működéséért felelős génjeinek hibái állnak ([www.mitomap.hu](http://www.mitomap.hu)). A mitochondriális genomban az irodalomból eddig közel 500 patogén mutáció ismert (www.mitomap.org), amelyből 321 pontmutáció (2.1. Táblázat). A mitochondriális betegségek alosztályokba sorolása számos problémát vet föl a mitochondriális biológia sajátosságainak köszönhetően (Wallace 1999). Ezek a sajátosságok: az egyes szövetek, sejtek eltérő mitochondrium tartalma, a vad és mutáns mtDNS-ek együttes jelenléte a sejtekben (heteroplasmia); a threshold effektus (a sejtek diszfunkciójához bizonyos heteroplasmia arány elérése szükséges); ugyanazon mtDNS mutáció változatos klinikai képet eredményezhet; nincs egyértelmű fenotípus-genotípus korreláció. Mindezek alapján a klinikai diagnosztika számára a tisztán klinikai alapon történő klasszifikáció a leghasznosabb annak ellenére, hogy sok beteg nem sorolható egyik kategóriába sem. Sok esetben a  $\beta$ - oxidációs zavarok diagnosztikája jelenti a nehézséget, de ezekben a myopathológiai és tandem tömeg spektroszkópiás vizsgálatok segíthetik a klinikust (**3. és 10. Közlemény**).

*A mitochondrialis betegségek háttérében álló gének és azok mutációi (ld. irod. Shoubridge és Molnar 2002)*

Az emberi mtDNS cirkuláris, kettősszálú molekula, mely maternalisan öröklődik, 16569 bp-ból áll, 37 ismert gént tartalmaz. A guanin-gazdag nehéz lánc (L) 2 tRNS-t, az I. komplex 6 alegységét, a III. komplex cytochrom b-jét, a IV komplex legnagyobb alegységeit (CO I., II., III.) és az V. komplex ATP alegységeit kódolja. A cytosin-gazdag könnyű lánc (H) a 8 tRNS és az I. komplex 1. alegységének kódolásáért felelős. A mitochondrialis genom által kódolt polypeptidek az oxidatív foszforilációs rendszer tagjai. A légzési lánc és az oxidatív foszforiláció többi polypeptidjét a nDNS kódolja és azok döntően a cytosolban szintetizálódnak. A „displacement regio” (D-loop) rövid nem-kódoló szakaszának kivételével nincsenek nem kódoló génszakaszok (intronok) a H láncon (Anderson et al. 1981). A humán mitochondrialis transzkripció a két origóból indul és a prokaryota szervezetekhez hasonlóan polycisztronikus (Attardi G 1993). Az mtDNS nem rendelkezik protektív hatású hisztonokkal, repair rendszere fejletlen, így a mutagén ágensekkel szemben rendkívül érzékeny, mutációs rátája kb. 10-szerese a nukleáris DNS-ének. A sejtek osztódásakor a mutáns mitochondrialis DNS molekulák aránya a mitotikus szegregációnak köszönhetően az egyes leány sejtekben eltérő lehet. A mitochondrialis genom mutációi lehetnek germ-line és szomatikus mutációk. A germ-line mutációk mindig átörökítődnek, ezek képezik az alapját az egyes etnikai csoportok közötti polymorphizmusnak és a primer mitochondrialis betegségeknek. A szomatikus mutációk az élet során keletkeznek és az életkor előrehaladtával számuk a posztmitotikus szövetekben felhalmozódik (Shoubridge és Molnar 2002). Az mtDNS germ-line mutációi lehetnek egyes nagy deléciók, multiplex deléciók, és egyes (single) nukleotid polymorphizmusok (SNP-k, vagy más néven pontmutációk). A deléciók általában sporadikusak, bár beszámoltak maternalisan öröklődő formákról is. A deléciók mérete 1.3 és 11 kb között ingadozik, lokalizációjuk változó lehet. Leggyakrabban a 4.9 kb nagyságú ún. „common deletion” írták le, mely az I.-IV. komplexet és a közbeeső tRNS-eket kódoló génszakaszt érinti. A mitochondrialis genom egyes delécióinak leggyakoribb előfordulását Kearns-Sayre szindrómában, progresszív ophthalmoplegia externában (PEO) és Pearson szindrómában írták le. Vannak multiplex mtDNS deléciók is, melyek általában másodlagosak, a nDNS károsodása következtében

alakulnak ki. Az mtDNS pontmutációi gyakran a tRNS génekben alakulnak ki. Ez utóbbi következtében több protein működése is károsodhat. Egy mitochondrialis pontmutáció sokféle neurológiai tünetcsoportot eredményezhet, melyek némelyike jól körülhatárolt szindrómaként ismert.

#### *Az mtDNS károsodása következtében kialakuló kórképek*

##### Az mtDNS tRNS-asszociált betegségei

A tRNS gének az mtDNS-nek csupán 1/10-ét teszik ki, az ismert pontmutációk 42%-a mégis erre a régióra lokalizálódik (2.1. Táblázat), ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)). Gyakori tRNS-asszociált betegségek: myopathia, encephalomyopathia, cardiomyopathia, süketség, ophthalmoplegia externa, ataxia, myoclonus, demencia, depresszió, diabetes mellitus+süketség, terhelési intolerancia, myoglobinuria, Leigh szindróma, MELAS, MERRF, perifériás neuropathia, Parkinson-kór, vashiányos anaemia és diabetes mellitus (Molnar, 2010). A mitochondrialis tRNS mutációk többek között az aminoacyláció zavara következtében eredményezik a mitochondriumban a hibás fehérjeszintézist. Ha a mutáns tRNS-ek mRNS-hez való kötődésének hatékonysága csökken, a molekula konformációja megváltozhat, stabilitása csökkenhet, így az fragilissá válhat. Ha a mutáció evolúciósan konzervált, – másodlagos, harmadlagos kötésben részt vevő – nukleotidot érint, súlyosabb következményekkel járhat a bázispár csere. A mutáció fenotípusos megjelenését a mutáns tRNS-ek heteroplasmia-aránya is befolyásolja. Ha a tRNS-ek funkcionális szintje a normális 15-50%-ra csökken patológiás fenotípust kapunk (Levinger et al. 2004). A tRNS mutációk leggyakrabban a *tRNS<sup>Leu</sup>*, *tRNS<sup>Lys</sup>*, *tRNS<sup>His</sup>* és a *tRNS<sup>Ser</sup>* géneket érintik. A *tRNS<sup>Leu</sup>* gén több mint 30 patogén mutációjával a legismertebb mutációs hot spotja a mtDNS-nek (Moraes et al. 1993, [www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)). Ezek közül a patogén mutációk közül a leggyakoribb a *tRNS<sup>Leu</sup>* gén A3243G mutációja, amely többek között a jól ismert MELAS szindrómát (mitochondrialis encephalomyopathia laktát acidózis stroke szerű tünetekkel) okozza (Goto et al. 1990). Ez a mutáció számos más klinikai tünetet is eredményezhet, mint pl. alacsonynövés, sensorineurális hallásvesztés, hypertrophiás cardiomyopathia, ataxia, ophthalmoplegia externa, epilepsia és diabetes mellitus (Gál et al. 2008, Finsterer 2007). A mutáció prevalenciáját különböző beteg-beválasztási kritériumok alapján világszerte



számos tanulmányban vizsgálták. A legtöbb vizsgálat diabetes mellitus-os betegeken történt. Sensorineurális hallásvesztés, fiatalkori ischaemiás stroke szindróma, myopathia és ataxia háttérében a mutáció előfordulási gyakoriságát eddig hat tanulmány vizsgálta, amelyekben a mutáció frekvenciája 0,07% és 6,5% között volt (Klemm et al. 2001, Majamaa et al. 1998, Salles et al. 2007, Léveque et al. 2007, Majammaa et al. 1997, Sternberg et al. 2001). A legnagyobb mutációs frekvenciát a finn népesség körében találták, ahol a vizsgált területre vonatkoztatott prevalencia 16,3:100.000 (Majamaa et al. 1998).

A *tRNS<sup>Lys</sup>* génben eddig 14 patogén mutációt azonosítottak. Ezek közül legfrekvenciáltabban az A8344G szubsztitúciót írták le, amelyet először a MERRF (Myoclonus Epilepsia Ragged Red rostokkal) szindróma háttérében azonosítottak. Az elmúlt 20 évben számos más fenotípussal való társulásáról is olvashattunk (Wiedemann et al. 2008; Mancuso et al. 2008).

#### Az mtDNS rRNS-asszociált betegségei

A mitochondrialis genomban két gén kódolja a riboszómális RNS-eket (*RNR1* - 12S rRNS és *RNR2* - 16S rRNS). A 12S rRNS-t kódoló génben az irodalomból 13 patogén mutáció ismert, amelyek legnagyobb számban aminoglycosidase indukálta süketiséget eredményeznek, de 1-2 szubsztitúciót sensorineurális hallásvesztés és egyéb nagyothallás háttérében is leírtak (Bindu és Reddy 2008). A 16S rRNS-t kódoló mt *RNR2* génben talált 4 különböző nukleotid csere eredményezhet cardiomyopathiát, diabetes mellitust, hyperthyreosist, Rett szindrómat, MELAS-t, Alzheimer- és Parkinson kórt (Cardaioli et al. 1999, Hsieh et al. 2001, Shoffner et al. 1993).

#### Az mtDNS protein kódoló génekhez kapcsolt betegségei

A mitochondrialis légzési transzportlánc felépítésében kb. 80 fehérje vesz részt. Ezek közül a mitochondrialis genomban csak 13 kódoló gén található, melyek a légzési transzportlánc egyes alegységeit kódolják (Molnar 2010). Az mtDNS protein-kódoló génjeiben több mint 200 patogén mutáció ismert (www.mitomap.org). A legtöbb mutáció a NADH dehydrogenase (*ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND4L*, *ND5*, *ND6*) és a cytochrom-c oxidase (*CO1*, *CO2*, *CO3*) különböző alegységeit kódoló génekben található. Emellett kisebb számban találhatóak mutációk a cytochrom oxidase-b és az ATP-ase 6, ill. 8-as alegységeit

kódoló génekben is. A protein-kódoló gének mutációi leggyakrabban a Leber-féle optikus neuropathia (LHON), Leigh szindróma, prosztataraák, terhelési intolerancia, NARP, MELAS szindróma hátterében állhatnak (Wong 2007). Néhány nukleotid szubsztitúciót motoneuron betegség, ataxia, Kearns-Sayre szindróma, vashiányos anaemia hátterében is leírtak (Wong 2007, Bykhovskaya és mtsai 2007).

### *A nukleáris DNS mitochondrialis génjei és azok mutációi következtében kialakuló betegségek*

A mitochondrialis funkciót a sejtmag és a mitochondrium DNS molekuláinak koordinált működése határozza meg. A mitochondrium működését befolyásoló nukleáris gének az alábbiak szerint csoportosíthatók: 1.) légzési transzportlánc alegységeit kódoló, 2.) az intergenomiális szignalizációban szerepet játszó, 3.) a mitochondrialis dinamikát befolyásoló, 4.) a lipid milieu-ért felelős, valamint 5.) egyéb a mitochondrium működését befolyásoló fehérjéket kódoló gének (Molnár 2010). A mitochondrialis transzlációs gépezet több nukleárisan determinált polypeptidet és mitochondrialisan kódolt rRNS-t, tRNS-t is tartalmaz, illetve a nagy respiratorikus komplexek mindkét genom által kódolt alegységekből állnak (Shoubridge és Molnar 2002). A nDNS kb. 1000 mitochondrialis proteint kódol, melyek közül mindössze 67 játszik szerepet a légzési lánc működésében. Ezek a cytoplasmában szintetizálódnak és specifikus transzport rendszer segítségével importálódnak a mitochondriumba. A mitochondriumok azon kívül, hogy a sejtek energia metabolizmusában alapvető szerepet játszanak számos egyéb celluláris folyamatban is részt vesznek. Biogenezisükben, ill. működésükben a nukleáris és mt genom közötti párbeszéd alapvető fontosságú. Az intergenomikus szignál károsodása a mtDNS-t mind mennyiségileg (mtDNS depléción), mind minőségileg érintheti (mtDNS deléciós szindrómák). Multiplex deléciókat tartalmazó mtDNS molekulák nagyon kis mennyiségben az egészséges felnőtt szövetekben is megfigyelhetők. Normális feltételek mellett az átrendeződött és vad típusú mtDNS-ek aránya egyensúlyban van, az átrendeződés folyamatosan elvész és újonnan kialakul, de soha nem emelkedik a fiziológiásan még tolerálható küszöb fölé. Az eddig ismert nukleáris DNS rendellenesség következtében kialakuló mitochondrialis betegségeket a 2. 2. Táblázat tartalmazza. A nukleáris genom

	<b>Klinikai fenotípus</b>	<b>gén</b>
<b>Légzési transzportlánc rendellenességei</b>	<b>Komplex I betegségek</b>	
	Gyermekkori encephalopathia	<i>NDUFS1</i>
	Encephalopathia, cardiomyopathia	<i>NDUFS2, NDUFV2</i>
	Multiszisztémás komplex I deficiencia	<i>NDUFS4</i>
	Letális neonatális komplex I deficiencia	<i>NDUFS6</i>
	Leigh szindróma	<i>NDUFS3, NDUFS4</i> <i>NDUFS7, NDUFS8</i>
	Leukodystrophia, myoclonusos epilepsia	<i>NDUFV1</i>
	<b>Komplex II betegségek</b>	
	Leigh szindróma	<i>SDHA</i>
	Örökldő paraganglioma, pheochromocytoma	<i>SDHB, SDHC</i>
	<b>Komplex III betegségek</b>	
	GRACILE szindróma	<i>BCS1L</i>
	<b>Komplex IV betegségek</b>	
	Encephalomyopathia, renalis tubulopathia	<i>COX10</i>
	Infantil cardioencephalomyopathia	<i>COX15, SCO2</i>
	Hepatoketoacidotikus kóma	<i>SCO1</i>
	Leigh szindróma	<i>SURF1</i>
	Leigh szindróma - francia, kanadai típus	<i>LRPPRC</i>
	Ethylmalonsav encephalopathia	<i>ETHE-1</i>
<b>Intergenomiális szignál hibák</b>	CPEO, myopathia	<i>ANT1</i>
	CPEO, myopathia, IOSCA	<i>Twinkle</i>
	CPEO, SANDO, ALPERS szindróma, MIRAS	<i>POLG1</i>
	CPEO	<i>POLG2</i>
	MNGIE	<i>TP</i>
	SMA-szerű myopathia	<i>TK</i>
	Hepatoencephalopathia	<i>dGK</i>
<b>Mitochondriális dinamika defektusai</b>	Charcot Marie-Tooth II típus	<i>MNF2</i>
	Hereditær spasticus paraplegia	<i>KIF5A</i>
	Opticus atrophia	<i>OPA1, OPA2</i>
<b>Lipid milieu zavarok</b>	Barth szindróma	<i>Tafazzin</i>
<b>Egyéb nDNS által determinált mitochondriális betegségek</b>	Retardált fejlődés	<i>Fumarate hydrolase, pyruvate carboxylase</i>
	Dilatatív cardiomyopathia és ataxia (DCMA)	<i>DNAJC19</i>
	Epilepsia, epizodikus ataxia, encephalopathia	<i>Pyruvate dehydrogenase</i>
	Encephalopathia, hepatomegalia	<i>HMC-CoA-lyase</i>
	Epilepsia, encephalopathia	<i>HMGCS2</i>
	Friedreich ataxia	<i>FXN</i>
	Hepatopathia, hypotonia	<i>DGUOK</i>
	Hereditær spasticus paraplegia	<i>SPG7</i>
	Hypocarnitinaemia, hypolysinaemia	<i>DCAR</i>
	Menkes betegség, occipitális-szarv szindróma	<i>ATP7A</i>
	Mohr-Tranebjaerg szindróma	<i>DDP1/TIMM8A</i>
	Myopathia, retinopathia, hepatomegalia	<i>HADHA</i>
	Wolfram szindróma	<i>WFS1</i>
	Parkinson kór	<i>PINK1</i>

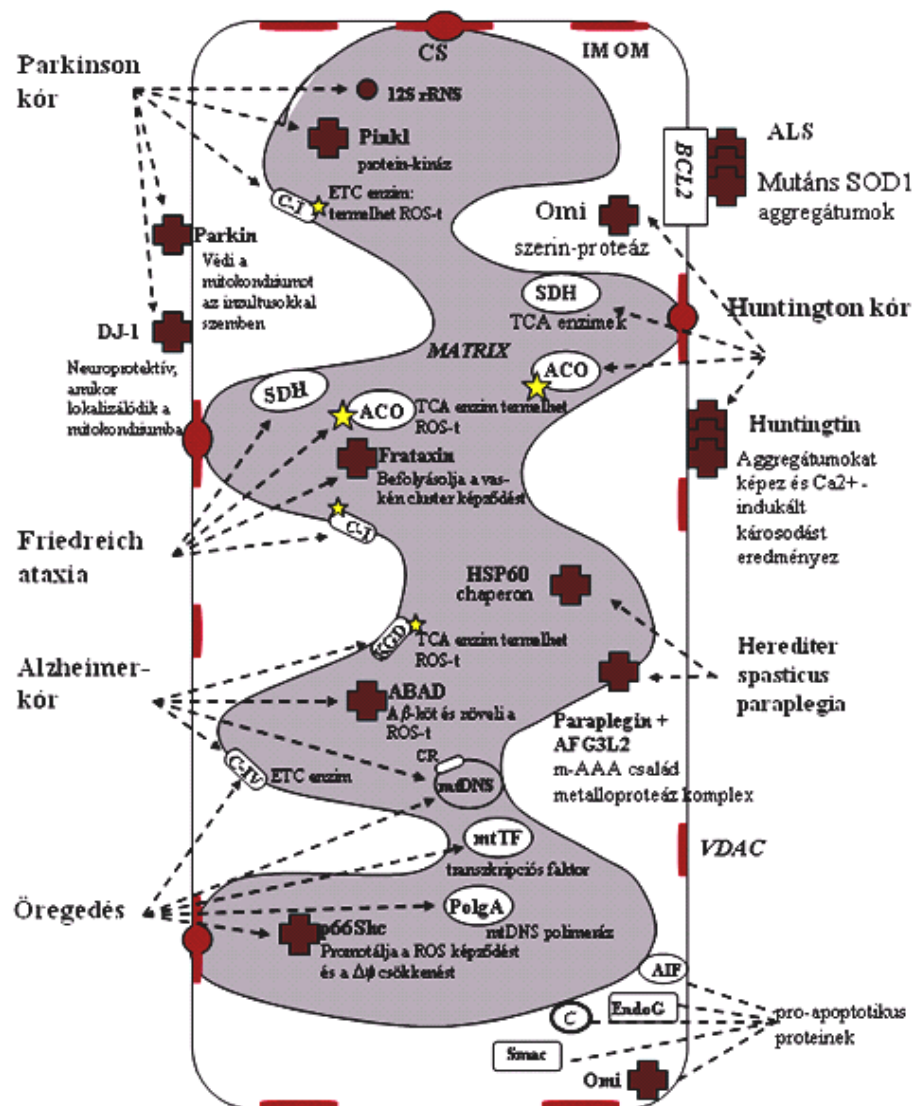
2.2. Táblázat: A nDNS mutációk okozta betegségek (Molnar, 2010)

több mutációja izolált légzési lánc komplex deficienciát okozhat. Ezek közül néhány szövet specifikus, mint pl. a *SURF1* rendellenesség agy specifikus a Leigh szindrómában, a *SCO2* és *COX15* deficiencia szívizom és agyszövet specifikus az infantilis cardiomyopathiában és cerebrális betegségekben. A COX 10 deficiencia vese betegség, *SCO1* hiány májbetegség formájában jelentkezhet. A mitochondrialis defektus a mitochondrium membrán struktúráját károsítja a Barth Szindrómában, a mitochondrialis protein importot „Süketség és Dystonia” Szindrómában (DDP protein), a mitochondrialis motilitást az „Optikus Neuropathiában” (OPA1).

### ***A mitochondriumok szerepe a neurodegeneratív kórképek kialakulásában***

A mitochondriumok központi szerepet játszanak a sok esetben multifaktoriális polygén etiológiájú neurodegeneratív betegségek kialakulásában is, mint pl. Alzheimer, Parkinson, Huntington kór, valamint az ALS (2.1. Ábra). Ezekben a betegségekben jól ismertek a mitochondriumok morfológiai, biokémiai és molekuláris eltérései (Petrozzi et al. 2007). Valamennyi fenti kórképben a mitochondriumok diszfunkciójának következtében csökken az ATP termelés, a  $Ca^{2+}$  tárolás zavart szenved, a reaktív oxidatív szabadgyökök (ROS) mennyisége megemelkedik (Beal et al. 2005). A megnövekedett ROS mennyiség hatására a fokozott lipid-peroxidáció miatt a membrán sérül, az mtDNS-ben másodlagos hibák halmozódnak fel. Az mtDNS mutációinak következtében felgyorsul az öregedés, csökken az energiatermelés, amely tovább fokozza a ROS termelődését. A központi idegrendszer különösen érzékeny az oxidatív szabadgyökök károsító hatásával szemben, ugyanis a könnyen peroxidálható zsírsavak aránya rendkívül magas, fokozott az  $O_2$  fogyasztás, az antioxidáns enzimek relatíve alacsony mennyiségben vannak jelen (Nunomura et al. 2006). A túlzott oxidatív stressz és a magas  $Ca^{2+}$  szint a mitochondrium permeábilis pórusainak nyitását eredményezi, így segíti a cytochrom-c kiáramlását, amely a caspase-függő apoptózist indukálja (Stavrovskaya és Kristal 2005). Az mtDNS-ben a szomatikus mutációk mellett számos olyan nem patogén polymorfizmus ismert, amely a mitochondrialis funkciót csak minimális mértékben változtatja meg. Ezen polymorfizmusok határozzák meg az egyes haplocsoportokat (Petrozzi et al. 2007). Bizonyos haplocsoportok hajlamosíthatnak neurodegeneratív betegségek kialakulására (van der Walt et al. 2004). Érdekes módon a mitochondrialis útvonal nem csak a

neuronok degeneratív folyamataiban játszik fontos szerepet, hanem az időskor leggyakoribb autoimmun eredetű gyulladásos myopathiájában, az inclusios testes myositisben is. Ebben a betegségben a ragged red rostok és az ultrastrukturális mitochondrialis rendellenességek relatíve gyakori előfordulása utal arra, hogy a mitochondrialis funkció károsodhat (Oldfors et al. 1993). Az azonban még nem ismert, hogy az autoimmun folyamatok milyen patomechanizmussal károsítják a mitochondriumokat



2.1. **Ábra:** A neurodegeneratív betegségek és a mitochondrium kapcsolata - M. Flint Beal után (Beal, 2005)

### 2.1.2. A mitochondrialis betegségek molekuláris genetikai diagnosztikai lehetőségei

Néhány esetben már a klinikai kép is jellegzetes az illető mitochondrialis betegségre (MELAS, MERRF, LHON, stb.) és a diagnózishoz elegendő a vérből izolált DNS molekuláris genetikai tesztje (Molnár és Karpati 2001). A legtöbb esetben azonban nem ilyen könnyű a helyzet és több diagnosztikus procedurát is be kell iktatni a genetikai vizsgálat elé, mint pl. ENG vizsgálat, **(14. Közlemény)** multimodális elektrofiziológiai vizsgálatok **(7. Absztrakt)** vér/liquor laktát szint vizsgálat, képalkotó eljárások, cardiológiai vizsgálat, az izombiopszia hisztológiai, hisztokémiai és biokémiai feldolgozása és a DNS analízis **(8. Absztrakt)**. A molekuláris genetikai tesztek az mtDNS Southern blotját, a Real Time PCR-el történő kvantitatív mtDNS mennyiség meghatározást, SNP screeninget, a teljes mitochondrialis genom vagy a gyanús nukleáris gén szekvenálását foglalják magukban.

### **2.1.3. Genetikai tanácsadás, prenatális diagnosztika a mitochondrialis betegségekben**

Az mtDNS betegségekben az mtDNS jellegzetességeinek köszönhetően a genetikai tanácsadás lehetetlen. A női ivarsejtek embryogenezise során az mtDNS transzmisszióját az „üvegnyak-hatás” következtében kialakuló random genetikai draft determinálja, így nem tudhatjuk, hogy az mtDNS betegségben szenvedő betegek egyes oocytáiban mennyi a vad és mutáns mtDNS molekulák aránya (Jenuth et al. 1996). Így a következő generációban a betegség ismétlődésének valószínűsége nem becsülhető. Prenatális diagnosztikára a terhesség 12. hete után van lehetőség. Ilyen esetekben a 20-30%-nál magasabb heteroplasmia arányú foetusok esetén a terhesség terminációja javasolt. Figyelembe véve, hogy az mtDNS betegségben szenvedő anyák sok esetben nehezen vagy spontán nem esnek teherbe, mivel a betegség endokrin rendszerüket is érintheti további új megoldások iránti igény vetődött föl. Számukra új lehetőségként kínálkozik a preimplantációs genetikai diagnosztika (PGD), melynek validálására irányultak vizsgálataink. Sok esetben etikai, vallási megfontolások vezetnek ez utóbbi diagnosztika felé a betegeket. A PGD során farmakológiai ovuláció stimulációt követően in vitro történik a megtermékenyítés. A korai stádiumú (általában 8 sejtés blastomer stádium) embryok 1-1 blastomer sejtjét választják le. A blastomer sejtek PCR alapú genetikai diagnosztikája nyújt információt az embryo genotípusáról. Így az implantációra kerülő egészséges embryok szelektálhatók.

## **2.2. Az izomdystrophiák**

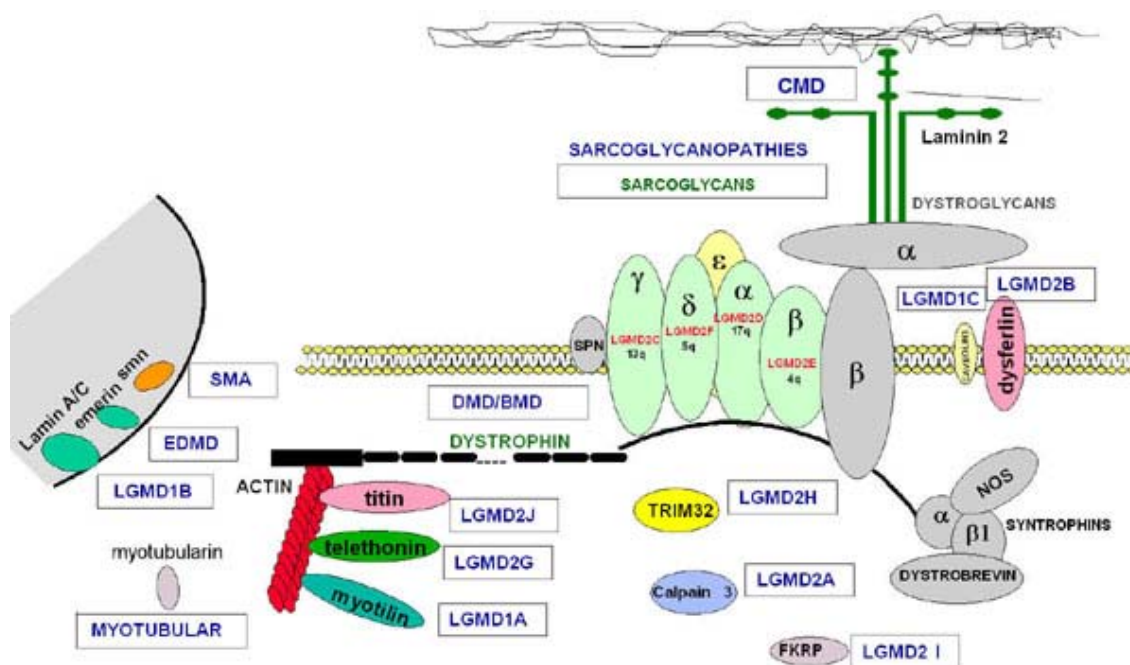
### **2.2.1. Az izomdystrophiák molekuláris alapjai**

Az izomdystrophiák klasszikus osztályozása, mely szerint megkülönböztetünk Duchenne/Becker, Emery-Dreifuss, végtag öv típusú, facioscapulohumeralis és congenitalis izomdystrophiát ma egyre inkább átalakul a molekuláris neurológia bővülő ismeret anyagának köszönhetően. A Duchenne/Becker típusú izomdystrophia elnevezést a dystrophinopathia cserélte föl, a végtag öv típusú és congenitalis izomdystrophiák csoportjaiban is a genetikai defektus alapján azonosítjuk a kórképet (Molnár et Karpati. 1999). Az izombetegségeket a molekuláris patomechanizmus alapján az alábbiak szerint klasszifikálhatjuk (Worton et al. 2001).

1. Sarcolemma és extracellularis matrix rendellenességek
2. Myonukleáris rendellenességek
3. Lysosomális rendellenességek
4. Myofibrilláris és cytoskeletális deformitások
5. Ioncsatorna betegségek
6. Developmentális betegségek
7. Az energia metabolizmus zavarai
8. Komplex molekuláris rendellenességek

A sarcolemma és extracellularis matrix protein rendellenességek klinikailag a Duchenne/Becker típusú izomdystrophia (DMD/BMD) és a végtag öv típusú izomdystrophia (LGMD) formájában jelentkeznek (2.2. Ábra). A fiatal korban kezdődő, gyors progressziójú, korán tragikusan végződő DMD-t az X kromoszómán elhelyezkedő dystrophin gén hibája okozza. A betegség incidenciája 1:3500 fiú újszülött (Molnár és Karpati 1999). A DMD klinikai megjelenése, kórlefolyása sztereotipizált, annak ellenére, hogy a motorika, a légzésfunkció és a cardialis érintettség interindividuális különbségeit már a dystrophin gén felfedezése előtt is jól ismerték. Relatív kevés közlemény vizsgálta az identikus mutációk következtében kialakuló fenotípus variabilitást (Sifringer et al. 2004). Egyesek a központi idegrendszer érintettségéről, a retina károsodásáról, is beszámolnak (Muntoni et al. 2003). Olvashatunk olyan feltételezésről is, amely az X kromoszómához kötötten öröklődő halláskárosodás hátterében is a dystrophin gén hibáját véli (Bushby et al 1995). A dystrophin deficienciában az intracelluláris

Ca<sup>2+</sup> tartalom megváltozik, amelyet jól magyarázhat a dystrophin hiány következtében kialakuló sejtmembrán károsodás (**2. Közlemény**). Napjainkban a súlyos betegség kezelésére ígéretes gén és sejterápiás technikák sorakoznak, ezért elengedhetetlenné vált a betegség természetes lefolyásának mélyebb megismerése. Desquerre et al (2009) saját beteganyaguk követése alapján 4 csoportba sorolja a DMD betegeket: A.) korai infantilis DMD: súlyos intellektuális és motoros deficittel járó forma. B.) klasszikus DMD: közepesen súlyos intellektuális károsodás, súlyos motoros tünetek C.) közepesen súlyos tisztán motoros tünetek: normális intelligencia, meglassult motoros fejlődés; D.) súlyos tisztán motoros DMD: normális intelligencia rossz motoros kimenetel. Az enyhébb eseteket a klinikai megjelenés alapján Becker típusú izomdystrophiának hívjuk, amely formában a csonkolt dystrophin molekula okozza a tüneteket. X kromoszómához kötötten öröklődő izomdystrophiák még az Emery Dreifuss szindróma, a Danon betegség (LAMP2 deficiencia) és az excessive autophagiával járó izomdystrophia (VMA21 deficiencia). Az Emery Dreifuss szindrómát okozó emerin deficiencia a myonukleáris rendellenességek közé tartozik, míg az utóbbi 2 betegség a lysosomalis rendellenességek közé sorolható (Worton et al. 2001)



2.2. Ábra: Az izomdystrophiák hátterében álló protein defektusok és ezen proteinek lokalizációja az izomsejtben



Az végtagöv típusú izomdystrophia (LGMD) a progresszív izombetegségek genetikailag heterogén csoportja, melynek autoszomalis domináns (LGMD1) és autoszomalis recesszív (AR) formái (LGMD2) ismertek (Bushby et al. 1995, Mercury et al. 2009). A dominánsan öröklődő forma háttérében eddig három gén (myotilin (*LGMD1A*), lamin A/C (*LGMD1B*), caveolin-3 (*LGMD1C*), és négy lókuszt (6q 23 (*LGMD1D*), 7q35 (*LGMD1E*), 7q31.1-31.2 (*LGMD1F*), 4p21 (*LGMD1G*)) hibáját igazolták (Finsterer 2004). A recesszív formánál eddig tizennégy gén szerepét írták le (LGMD2 A-N) (Manzur et Muntoni 2009). A recesszíven öröklődő gének determinálhatnak sarcolemmához kapcsolódó fehérjéket, mint a négy féle sarcoglycant; extracelluláris matrix proteineket, mint a merosint; egyéb plasma membrán proteineket, mint a caveolin3-t, dysferlint; sarcomerikus proteineket, mint a telethonint és titint. Az  $\alpha$ -dystroglycan ( $\alpha$ -DG) glycosylatiojában szerepet játszó enzimek, mint a *TRIM32*, *POMT1*, *POMT2*, fukutin related protein (*FKRP*) rendellenessége is okozhat izomdystrophiát. Az  $\alpha$ -DG hypoglycosylatioját figyelték meg különböző congenitalis izomdystrophiában (MDC), nevezetesen a „Muscle-Eye-Brain” betegségben, a Fukuyama congenitalis izomdystrophiában, MDC1C-ben (fukutin related protein deficiencia), MDC1D (Large deficiencia) és Walker-Warburg szindrómában (Karpáti et Holland 2002, Schachter et al. 2004). Nemrég  $\alpha$ -DG csökkent glycosylatioját figyelték meg néhány LGMD esetben is (Brown et al. 2004). A csökkent  $\alpha$ -DG glycosylatiót mutató LGMD2I az MDC1C allélikus variánsa. Az LGMD ebben a típusában is a fukutin related protein (*FKRP*), egy putative glycosyltransferase mutációja igazolódott (Brockington et al. 2001)]. LGMD2I relatíve gyakorinak tűnik az európai eredetű LGMD betegek között (Sveen et al. 2006, Walter et al. 2004, Boito et al. 2005). Egy nagy Észak-Amerikai LGDM-kohortban az izombiopsziák 15 %-ban találtak csökkent hyperglycosylatált  $\alpha$ -DG expressziót (Moore et al. 2006). Ezek 37 %-a rendelkezett a gyakori *FKRP* mutációval. Ezek alapján a dystroglycanopathiák döntő többségében a háttérben álló molekuláris defektus még azonosítatlan. A fent említett proteinek deficienciájának rutin diagnosztikus igazolása immunhisztokémiai és genetikai tesztekkel ma már egyre több helyen elérhető. A jó diagnosztikus lehetőségek ellenére azonban számos LGMD etiológiája felderítetlen marad. Saját tapasztalataink szerint is az LGMD betegek kb. 40%-nál a részletes átvizsgálás ellenére sem születik meg a specifikus molekuláris

diagnózis. Ez a tény további új metodikák klinikai diagnosztikába való bevezetését teszi szükségessé.

A jelen bevezetőben a fenti proteinek közül az -DG mellett a calpain és dysferlint tárgyaljuk részletesen mivel vizsgálataink során ezek bírnak kiemelt jelentőséggel. Az LGMD 2A, a calpain 3 genetikai hibája következtében alakul ki, AR módon öröklődik, a medenceöv, a scapula és a törzsizmok atrophijával, gyengeségével kezdődik. Fokozatos progresszió következtében a betegség kezdete után 10-20 évvel a beteg gyakran tolószékbe kényszerül. A calpain 3 a calpain család (nem-lysosomal cysteine proteaseok családja) vázizom specifikus tagja (Laval 2002). A calpain deficiencia lehet elsődleges vagy másodlagos. Ez utóbbit eddig leggyakrabban a dysferlin deficienciával együtt írták le, de 2q-kapcsolt izom dystrophiában és facioscapulohumeralis izomdystrophiában (FSH) is találtak szekunder calpain deficienciát (Anderson et al. 2000). A másodlagos calpain hiány kialakulásának patomechanizmusa nem ismert. Indukált calpain deficiencia időnként akár terápiás hatású is lehet. Waheed et al (2005) azt tapasztalták, hogy a proinflammatorikus cytokinek gátolják a proteolitikus aktivitású, a celluláris jelátviteli rendszerben fontos szerepet betöltő izom specifikus calpain-3 aktivitását és ezzel egyidejűleg fokozzák a dystrophin „surrogate” molekula az un. utrophin expresszióját ami a dystrophinopathiák kezelésében kívánatos.

A dysferlin a ferlin-család tagja, konzervált struktúrájú transzmembrán fehérje, mely a sarcolemma és a cytoplasmikus vesiculák membránján lokalizálódik, deficienciáját a *DYSF* gén hibája okozza (Bashir et al. 1998). Az AR öröklődésű betegség két különböző szindrómában (LGMD2B vagy Miyoshi típusú distalis myopathia) jelentkezhet. A klinikai kép egy családon belül is változhat (Bashir et al. 1998, Liu et al. 1998), a két betegség egymás allélikus variánsának tekinthető (Illarioshkin et al. 2000). A Miyoshi-myopathiában az izomgyengeség az alsó végtag hátsó kompartmentjében kezdődik, és csak később terjed át a proximális végtagizomokra (Molnár és Karpati 2001). Az LGMD első tünetei a kacsázó vagy lábujjhegyen való járás, a lépcsőn járási nehezítettség. Idővel fokozott lumbális lordosis, feszes Achilles-ín, scapula alata vádli hypertrophia alakulhat ki a proximális túlsúlyú progresszív izomgyengeség mellett. A distalis izmok és a szívizomzat csak a betegség késői stádiumában károsodnak. A betegség molekuláris alapja a dysferlin gén homozygota vagy compound heterozygota mutációja.

Két autoszomalis domináns öröklődésű komplex patomechanizmusú izomdystrophia, a facioscapulohumeralis izomdystrophia (FSHD) és dystrophia myotonica részletes molekuláris alapjait jelen bevezető nem érinti, mivel ezeket a betegségek nem témái a disszertációnak.

### **2.2.2. Az izomdystrophiák state of art diagnosztikája**

LGMD esetén az izombiopszia elengedhetetlen a diagnózis felállításához. A szövettani vizsgálat az izomdystrophia nem specifikus jeleit mutatja: az izomrost kaliberek kóros mértékű ingadozását, a belső magok és az endomysialis kötőszövet felszaporodását, számos nekrotikus és regenerálódó rostot. Az oxydatív enzimreakció fokálisan csökkenhet, lobularis rostok jelenhetnek meg. Az immunhisztokémiai vizsgálattal számos protein jelenlétét kell vizsgálnunk, mint a dystrophin komplex tagjai: dystrophin, alpha-, beta-, gamma-, delta-sarcoglycan; egyéb plasma membrán proteinek: caveolin3, dysferlin, alpha7integrin; az extracellularis matrix fehérjék: merosin, collagen VI; a belső nukleáris membrán proteinek: laminA/C, emerin; sarcomerikus proteinek: telethonin. A calpain 3 és a myotilin deficienciát csak Western blottal lehet igazolni (Worton et al. 2001). A glycosylációs defektusokra (fukutin, *FKRP*, *POMGnT*, *POMT1*, *LARGE* deficiencia) a glycosylált -DG hiánya utal, melyet mind immunhisztokémiai vizsgálat, mind Western blot igazolhat. A *TRIM32* mutáció által okozott sarcotubularis myopathiára az elektronmikroszkóppal látott tágult sarcotubulusok hívják fel a figyelmet. Genetikai vizsgálatot minden esetben csak célzottan érdemes végezni, azaz, ha az előzetes szövettani vizsgálat és Western blot alapján sikerült identifikálni a protein deficienciát. Duchenne/Becker típusú izomdystrophia esetén a jellegzetes klinikai kép segítheti a klinikust, hogy a dystrophin gén analízisét válassza elsőként az invazív izombiopsziát elkerülve. Amennyiben a genetikai vizsgálat nem igazol a dystrophin génben deléciókat csak akkor szükséges az izombiopszia immunhisztokémiai feldolgozása. Amennyiben a dystrophin festés egyenetlen az izomrostok felszínén és extrajunctionalis utrophin expresszió figyelhető meg, minden esetben kötelezően elvégzendő a dystrophin Western blot a dystrophin deficiencia igazolására. Esetenként az egyes sarcoglycanok hiánya is okozhatja a sarcolemmalis dystrophin festés egyenetlenségét.

Az FSHD és a dystrophia myotonica esetén annyira jellegzetes a klinikai kép és ez EMG lelet, hogy minden esetben a molekuláris genetikai teszt az elsőként választandó vizsgálat. FSHD esetén a 4q35 deléciója, dystrophia myotonica esetén a *DMPK* génben levő trinukleotid repeat expansio igazolja a betegséget (Worton et al. 2001).

### 2.2.3 Izomdystrophiák molekuláris terápiája – státusz 2009

Az izomdystrophiák kezelése során jelenleg csak az életminőséget javító tüneti terápiák állnak rendelkezésünkre (**21. Közlemény**). A genetikusan determinált betegségekben a genetikai hiba 4 féle módon vezethet a betegség kialakulásához (Karpati et al. 2002). 1.) A genetikai defektus és az eredményeként kialakuló „downstream” genetikai mechanizmusok zavara. 2.) A fehérje termék teljes vagy részleges hiánya, vagy funkcionális rendellenessége. 3.) A kóros proteinek expresszáló sejtek, szövetek rendellenessége. 4.) A kóros sejt-, ill. szövetszintű károsodás következtében olyan klinikai tünetek jelennek meg, amelyek nem minden esetben specifikusak egy adott betegségre. A molekuláris terápiák a fenti 4 domén bármelyikére irányulhatnak (**9. Közlemény**). A molekuláris terápiák főbb kategóriái:

- A direkt gén replacement (GR)
- A génexpresszió módosítása
  - Az elsődleges transzkript módosítása
  - Gén csendesítés RNSi és ribozymok segítségével
- A genomikus DNS módosítása vagy kijavítása
- A mutáns mRNS translációjának gátlása
- Funkcionális homológok upregulációja

Kísérleteinkben a direkt gén replacement (GR) módszert alkalmaztuk, így annak részleteit ismertetem bővebben. A GR során a mutáns gént cseréljük normálisra. Ez a módszer alkalmazható a recesszív géndefektusok következtében kialakuló betegségek kezelésére (pl. Duchenne típusú izomdystrophia). A hatékony GR-hez számos faktor optimalizálendő, mint pl. a bejuttatandó gén, a promóter, a terápiás gént hordozó vektor és a vektor bejuttatásának módja. Általában a teljes kódoló cDNS-t bejuttatjuk, bár egyes gének cDNS-e teljes hosszúságban mérete miatt alkalmatlan a génterápiára. Ilyen esetekben csonkolt cDNS-el is lehet próbálkozni. A promóter, a cDNS és a polyA szignál együttesen alkotja az

expressziós kazettát. A promotereknek effektívnek, az illető sejtre specifikusnak kell lennie és nem árt, ha inaktiválható is. Több hatékony promotor is ismert az izombetegségek molekuláris terápiájában. A dystrophinopathiák génterápiájára irányuló preklinikai kísérletekben a CMV, RSV vagy a hybrid CB (csirke beta-actin promotor és human CMV enhancer) volt a legeredményesebb (Karpati és Molnar 2006). Vektorként virális és nem virális vektorok használhatók. A vírusok az érett izomrostokat hatékonyabban transzfektálják, mint a nem virális vektorok. Egyes vírusoknak kicsi az insert kapacitásuk, és drága a megfelelő minőségben és mennyiségben való előállításuk. A kapacitás növelésére olyan vírus konstrukciókat dolgoztak ki, melyek nem tartalmazzák az eredeti virális DNS-t (ún. „guttet” vírus) (Cao et al. 2004). A dystrophinopathiák kezelésében az állatkísérletekben eddig a legsikeresebbnek a teljes dystrophin cDNS-t tartalmazó modern ún. „guttet” adenovírus konstrukció bizonyult. Hátrányai: nehéz előállítani, tisztítani és az érett izomrostokat rossz hatékonysággal transzfektálja. Az adenoasszociált vírus insert kapacitása sokkal kisebb, mint az adenovírusé, de könnyebb előállítani és az érett izomrostokat is jó hatékonysággal transzfektálja. Mindkét vírus erősen immunogén. A nem virális vektorok, mint pl. a plazmidok könnyen és költséghatékonyan előállíthatók, nem toxikusak, nem immunogének, azonban önmagukban alkalmazva rossz a transzfekciós effektivitásuk (Herweijer et al. 2003). A transzfekció hatékonyságát fizikai módszerekkel, elektroporációval (Lu et al. 2003), sonoporációval (Schratzberger et al. 2002) lehet javítani. Az elektroporáció és sonoporáció során is az izomrost membrán permeabilitása növekszik, és ez teszi lehetővé a vektorok izomsejtekbe való könnyebb diffúzióját. A sonoporáció hatékonyságát a vektorral egyidejűleg bejuttatott speciális microspherák tudják fokozni (Newman et al. 2007). Az ultrahang és a micropshera együttese az alábbi bioeffektusok révén segíti a géntranszfert: 1.) az UH hatására a kezelt szövetek hőmérséklete lokálisan emelkedik (Wu 1998); 2.) reaktív oxygen gyökök keletkeznek (Misik et al. 2000); 3.) a microsphera oszcillációja a szomszédos folyadékokat mozgásba hozza, és ezáltal a sejt membrán mentén mikroáramlások keletkeznek (Van Wamel et al. 2004); 4.) a túlfűtött microspherák robbanása a sejtfelszíni membránban folytonosság hiányokat eredményez. Ezeknek a mechanizmusoknak köszönhető a sejtfelszíni membrán permeabilitásának fokozódása, a vektor/transzgén konstrukt effektívbe bejutása. Sonoporációs mdx egér kísérletek kollaterális károsodás nélkül relatíve

jó transzfekeciós hatékonyságot találtak (Danialou et al. 2002). A terápiai gén bejuttatásához szükséges cavitatio indukcióra az <1MHz tűnik a legalkalmasabbnak (Wu et al. 2008). Kísérleteink során mind az elektroporációval, mind a sonoporációval kombinált plazmid mediálta géntszferet befolyásoló faktorokat és a beavatkozások humán alkalmazhatóságát vizsgáltuk.

Az egyéb génterápiai módszerek irányában is intenzívek a kutatások. Ezek közül az ún. morpholino segítségével kivitelezett „exon skipping” és a stop kodon átolvasását lehetővé tevő PTC1,2,4 kezelések klinikai vizsgálatai jelenleg zajlanak. Ezek a génterápiai beavatkozások a személyre szabott orvoslás klasszikus példái, hiszen nem alkalmazhatóak valamennyi DMD-s kisfiúban, mivel csak bizonyos gén defektusok korrekcióját teszik lehetővé. Az exon skipping az antisense oligonukleotidok (AO) által mediált terápia, mely segítségével a dystrophin gén „out-of-frame” mutációját „in-frame” mutációvá lehet alakítani. Ezáltal a súlyos DMD fenotípusból kevésbé súlyos Becker fenotípus lesz. A beavatkozás következtében csokkolt dystrophin molekula keletkezik. A klinikai vizsgálatba olyan betegek kerültek beválasztásra, akiknél a dystrophin gén deléciója az 51. exon előtt volt közvetlenül, mert az alkalmazott metodika az 51. exon kivágásával javítja az olvasókeret csúsztatásával az „out of frame” deléciót in frame delécióvá (Goyenvalle et al. 2009). A DMD molekuláris terápiaájában másik áttörést ígérő módszer a PTC1,2,4 molekula alkalmazása. Ez a molekula a stop kodon „átolvasását” teszi lehetővé. Azokban az esetekben van ennek a kezelési formának jogosultsága, ahol a dystrophin fehérje rendellenességét egy pontmutáció következtében keletkező káros stop kodon alakította ki. A transzláció során a hibás stop kodon átugrása teljes hosszúságú protein keletkezését tenné lehetővé. A metodika klinikai kipróbálás előtt áll mind DMD-ben, mind cystas fibrózisban (Linde és Kerem 2008).

### **2.3. A hereditér sensomotoros neuropathiák jellegzetességei**

A hereditér neuropathiák (HN) a perifériás idegrendszer heterogén csoportját képezik, előfordulási gyakoriságuk 1:2500. Klinikailag a distalis izomcsoportok atrophiaájával, gyengeségével és gyakran az ehhez gyakran társuló distalis típusú érzészavarral jellemezhetők. Az ENG alapján a hereditér neuropathiák két csoportba oszthatók: 1.) meglasztult vezetési sebességgel jellemezhető

demyelinizációs típus. 2.) alacsony amplitúdóval jellemezhető axonalis típus. A klinikai kép, az ENG paraméterek és a n. suralis morfológiai jellegzetességei alapján az örökletes neuropathiák között a következő fenotípusok különböztethetők meg (Boerker et al. 2002): 1.) Charcot-Marie-Tooth betegség (CMT), 2.) Herediter kompressziós paresisekre hajlamosító neuropathia (herediter neuropathia with liability to pressure palsies – HNPP), 3.) Dejerine- Sottas neuropathia, 4.) Congenitalis hypomyelinizációs neuropathia, 5.) Roussy-Levi Szindróma. A HN mendeli módon, azaz vagy AD, vagy AR, vagy X kromoszómához kötötten öröklődhet (Nelis et al. 1999), bár ismerünk maternalisan öröklődő formákat is. A molekuláris medicina fejlődésének köszönhetően az utóbbi években rendkívül felgyorsult a HN genetikai hátterének feltérképezése. Ma kb. 28 gént és 35 lókuszt azonosítottak az örökletes neuropathiákban. Ez rendkívül nehezíti a klinikai gyakorlatban a hereditár neuropathiák genetikai differenciáldiagnosztikáját.

### **2.3.1. A hereditár neuropathiák genetikai háttere**

A neuropathiák hátterében álló genetikai rendellenességek érinthetik: a myelin hüvely felépítésében játszó struktúr proteineket kódoló géneket (pl. *PMP22*, *MPZ*); a myelin transzportjában aktív fehérjéket (*GJB1*); az axonalis transzport fehérjék génjeit (*NFL*, *GAN1*); a myelinizáció kezdetéért felelős transzkripciós faktorokat (*EGR2*); szignál transzdukciós proteineket (*PRX*, *MTMR2*, *SBF2*, *NDGRI*, *GDAP1*); mitochondrialis transzport proteineket (*MFN2*), endosomához kapcsolódó proteineket (*SIMPLE*, *RAB7*); chaperonokat (*HSP 22*, *27*); a DNS egyes lánc repairért felelős faktorokat (*TDPI*); a DNS replikációban szerepet játszó géneket (*LMNA*); és még most pontosan nem ismert funkciójú fehérjéket (*GARS*, *DNM2*). A feno-genotípus korreláció nem szoros, de az axonalis, demyelinizációs és kevert formákban az egyes génhibák dominálhatnak (2.3. Táblázat).

#### **1. Struktúrproteinek**

Perifériás Myelin Protein 22 (PMP22) – fontos membrán protein. Génje dózis szenzitív, duplikációja demyelinizációs típusú neuropathiát eredményez, deléciója a myelinhüvely megvastagodásával az ún. tomacula képződésével jellemezhető

Demyelinizációs domináns	Demyelinizációs recesszív	Axonális domináns	Axonális recesszív	Intermediér domináns	Intermediér recesszív
CMT 1A PMP-22	CMT 4A GDAP1	CMT 2A1 KIF1B;	AR-CMT2A Lamin A/C;	CMT DIA 10q24	CMT RIA GDAP1
CMT 1B MPZ	CMT 4B MTMR2	CMT 2A2 MFN2;	AR-CMT2B MED25	CMT DIB DNM2	
CMT 1C LITAF	CMT 4B2 SBF2	CMT 2B RAB7	AR-CMT + Pyramis jelek (CMT 2H)	CMT DIC tyrosyl-tRNA synthetase;	
CMT 1D EGR2	CMT 4C SH3TC2 (KIAA1985)	CMT 2C 12q23-q24	AR-CMT + Hoarseness (CMT 2K): DAP1	CMT DI3 MPZ	
CMT 1E MPZ	CMT 4D (Lom) NDRG1	CMT 2D GARS	AR-CMT Súlyos, korai kezdet:NEFL	CMT-X (Semi- domináns) Cx32	
CMT 1F NEFL	CMT 4E EGR2	CMT 2E NEFL	AR- CMT/Distalis HMN: HSPB1	CMT 2E NEFL	
HNPP PMP-22 deléció	CMT 4F Periaxin	CMT 2F/ Distalis HMN HSPB1;			
HMSN 3 (Dejerine-Sottas)	HMSN-Russe (4G): HK1	CMT 2G 12q12			
	CMT 4H FGD4	CMT 2I MPZ			
	CMT 4J FIG4	CMT 2J MPZ			
		CMT 2K GDAP1;			
		CMT 2L HSPB8			

**2.3. Táblázat:** Az egyes demyelinizációs, axonális és intermediér neuropathiák háttérében álló genetikai hibák összefoglalása

HNPP (herediter neuropathia liability pressure palsy) kialakulásáért felelős (27. Közlemény). A PMP22 gén pontmutációi CMT1, DSN és CHN fenotípust okozhatnak. Az AD öröklődésű HN formák kb. 70%-a PMP22 duplikációval magyarázható. Myelin protein zero (MPZ) a myelin kompaktációért felelős, kizárólagosan a Schwann sejtekben expresszálódik. AD öröklődésű mutációi leggyakrabban CMT-1B típusú demyelinizációs neuropathiát okoznak, de axonális CMT háttérében is írták már le. Néhány mutáció súlyos korai kezdetű neuropathiát okoz, mint a Dejerine-Sottas betegség, míg mások klasszikus CMT fenotípust alakítanak ki.

## 2. Myelin transzport fehérjék



A Connexin 32 (GJB1) egy gap junction fehérjét kódol, ami a myelinizáló Schwann sejtekben a paranodus és a Schmidt-Lanterman incisurák közelében a nem-kompakt myelinben expresszálódik. Feladata az adaxonalis és perinukleáris cytoplasma közötti radiális diffúzió elősegítése. XR módon öröklődő mutációi a CMT fenotípusok kb. 10-20%-ért felelősek.

### 3. Axonalis transzport fehérjék

A neurofilamentum könnyű lánc (NEFL) a neurofilementum egyik alegységét kódolja, mutációja AD módon öröklődik. A „kinesin family member” 1B (KIF1B), egyes organellek microtubularis transzportjért felelős. Eddig egy AD módon öröklődő CMT2 fenotípusú családot publikáltak. Giant axonal neuropathy (GAN1): a cytoskeletalis broad-komplex, tramtrack és bric-a-brac domén (BTB)/kelch repeat család tagját kódolja. AR módon öröklődő mutációja gyermekkorban kezdődő jellegzetes lábtartással és göndör hajjal járó krónikus neuropathiát eredményez.

### 4. Mitochondriális transzport proteinek

A mitofusin (MFN2) hibája az egyik leggyakoribb oka az AD módon öröklődő axonalis típusú HN-nak. A mitochondriumok külső membránjában elhelyezkedő mitofusin a mitochondriális network fenntartásában, a mitochondriumok fusiójában játszik kulcs szerepet.

### 5. Endosomal proteinek

A Simple (endosomal/lysosomal membrán protein) AD öröklődésű CMT I-ért, a RAB7 (guanosin trifoszfát kötő fehérje, a vesicularis transzport szabályozója a késői endocytosisban), axonalis típusú CMT2B-ért lehet felelős.

### 6. Transzkripciós faktorok

Az „Early Growth Response” 2 (EGR2): Cys2-His-típusú cink-ujj tartalmú fehérje, ami a Schwann sejtekben expresszálódik. AD öröklődő mutációit CMT1, DSN, CHN fenotípusokkal összefüggésben írták le. SRY-related HMG-Box-containing Gén 10 (SOX10): egy high-mobility-group (HMG) domént tartalmazó transzkripciós faktort kódol. A SOX10 mutációját perifériás neuropathia és demyelinizációs leukodystrophia háttérben írták le.

## 7. Sznál transzdukciós proteinek

A periaxin (PRX) nukleáris lokalizációs sznál domén. AR mutációja DSN és CMT4F-et eredményez. Ezek a betegek gyakran panaszkodnak fájdalmas neuropathiáról. A myotubularin-related protein 2 (MTMR2): univerzálisan expresszáldó foszfátzt kódol, AR mutációja CMT1, CMT4B1 és CHN-nel hozható összefüggésbe. SET Binding Factor 2 (SBF2): a perifériás idegekben és a gerincvelőben expresszáldó myotubularin pseudofoszfátz csoport egy tagját kódolja. AR mutációja főleg CMT4B2 fenotípust eredményez. N-myc Downstream Regulated Gene 1 (NDRG1): universalisan expresszáldó foszfátzt kódol. A 7 exon homozgota C-T tranzíciója (R148X) roma alapító mutációkat ismert a Lom típusú neuropathia háttérében. GDAP1: a gangliosin-indukálta differenciáció asszociált proteint kódolja, ami a neuronális fejlődés sznál transduktiójában játszik szerepet. AR mutációja axonális típusú CMT2-t okoz.

## 8. Chaperonok

Heat shock protein 22 és 27 (HSP22 és HSP27): mindkét gén okozhat distális motoros neuropathiát és CMT fenotípust is. A neuropathia kialakulásának patomechanizmusa nem ismert.

## 9. DNS repair faktor

Tyrosyl DNA Phosphodiesterase (TDP1): az abortív egyes szálú DNS break-et (SSB) javítja. Mutációja AR öröklődésű spinocerebellaris ataxiát okoz, amelyhez axonális típusú neuropathia társul.

## 10. DNS replikációban szereplő gének

Lamin A/C (LMNA): a nukleáris membrán alkotórésze. AD mutációja az AR öröklődésű CMT2 mellett okozhat Emery-Dreifuss szindrómát, LGMD-t, dilatatív cardiomyopathiát és familiáris lipodystrophiát.

11. Egyéb proteinek: a fentiek mellett még a kalium és klorid csatorna kotranszporter (KCC3) a glycyl tRNS synthetase (GARS) és a dynamin (DNM) gének mutációi is okozhatnak örökletes neuropathiákat.

## Roma neuropathiák Magyarországon

Európa roma populációja kb. 8-10 millió. Jelenleg Magyarországon a romák lélekszáma csaknem 1 millióra tehető. A romák népességtörténetét genetikailag alapító (ún. founder) mutációk jelenléte illetve a „genetikai üvegnyak” effektus jellemzi. Bizonyítást nyert, hogy az endogám házasodási hagyományok következtében kialakuló korlátozott genetikai diverzitás miatt számos olyan polygénés és monogénés genetikai betegség iránt veszélyeztetettek, melyek a többi európai népcsoportban nem, vagy ritkán fordulnak elő. Becslés szerint minden tizedik európai roma hordoz valamilyen AR módon öröklődő neuromusculáris betegséget (Navarro et al. 2003). Ez az adat jelzi, hogy a neuromuscularis betegségek fontos népegészségügyi kérdést jelentenek a roma etnikai csoportban. A romák körében eddig három herediter perifériás neuropathia formát fedeztek fel: a herediter motoros és sensoros neuropathia Russe és Lom formáját illetve a congenitális cataracta facialis dysmorphia neuropathia (CCFDN) szindrómát (Kalaydijeva et al. 2005). Ezeket gyakran egyedi roma alapító mutáció okozza (Kalaydijeva et al. 1998, Angelicheva et al. 1999, Tournev et al. 1999). A mutációk gyakoriságában jelentős különbséget találtak bizonyos roma csoportoknál, ami jelzi a genetikai divergenciát. Bulgáriát kivéve Európában eddig nem történtek a roma neuromusculáris betegségekre vonatkozó átfogó epidemiológiai vizsgálatok. Vizsgálatainkkal a fent említett roma neuropathiák hazai feltérképezését céloztuk.

### **2.3.2. A herediter neuropathiák *state of art* genetikai diagnosztikája**

Az örökletes perifériás neuropathiák genetikai diagnosztikájában ma az alábbi stratégia követése ajánlható. Az ENG és a klinikai kép alapján történő klasszifikáció az elsődleges, ami a betegek többségét a CMT1 (demyelinizációs) és CMT2 (axonális) vagy intermediér típusba sorolja. A CMT1 típusú betegeket elsőként a *PMP22* génre és a *GJB1* mutációra teszteljük. Ezek negatív tása esetén az *MPZ* és *EGR2* géneket szekvenáljuk. A CMT1 fenotípus háttérében jelen ismereteink szerint kb. 79% -ban a *PMP22* duplikációja vagy a *GJB1* pontmutációja áll. CMT2 fenotípusnál az *MFN2* gén vizsgálata választandó elsőként. Roma populációban a klinikai tünetektől függően keressük a *CDTP1* ill. *NDRG1* gének alapító mutációit. A többi ritkán előforduló gén rutin tesztelése nem várható el a gyakorló neurológustól, Egyes esetekben a klinikai tünet segíthet

a target gén kiválasztásában, mint pl. periaxin mutáció - kifejezett sensoros tünetek, heves fájdalom utal rá; hypacusis – *PMP22* duplikáció esetén, *GJB1*, *NDRG1* mutáció - diplopia- *EGR2* mutáció, opticus atrophia – *MFN2* mutáció, hangszalag bénulás – *GDAP1* mutáció stb.

A HN differenciáldiagnosztikájában fontos szerepet kap a szerzett immun neuropathiák elkülönítése is. A *PMP22* proteint overexpresszáló egerekben a demyelinizált idegekben a CD8<sup>+</sup> sejtek és a macrophagok overexpresszióját is megfigyelték. Ezek a gyulladós sejtek a myelin hüvely közvetlen közelében helyezkedtek el. *MPZ*, valamint *Cx32* mutáns egerek és immundeficiens egerek keresztezése következtében olyan egerek születtek, amelyek neuropathiája enyhébb lefolyást mutatott, mint a nem keresztezett egerek betegsége. Mindezek arra utalnak, hogy egyes genetikailag determinált neuropathiák patomechanizmusában bizonyos immunológiai folyamatok is szerepet kapnak. A klinikai gyakorlatban arra kell odafigyelnünk, hogy amennyiben az immunológiai eredetűnek vélt CMT1 fenotípus nem javul az immunszuppresszív kezelés hatására a genetikai eredetű neuropathia minden esetben kizárandó. Az is igaz azonban, hogy egyes a szokottnál rapidabb vagy shubokban rosszabbodó HN esetén az immunrendszer vizsgálata tanácsos, mert ha együttesen jelenlevő autoimmun betegség igazolódik, az immunmoduláló kezelés a betegség progresszióját lassíthatja (Wang et al. 2006).

Az autoimmun eredetű betegségek közül részletesebben foglalkoztunk a gyulladós myopathiák egyik nagy csoportjával, a sporadikus inclusio testes myositissel (IBM). A betegség pontos patomechanizmusa még nem tisztázott. Kialakulásában a polymyositishez hasonló immunbiológiai mechanizmusok fedezhetőek fel, de annál komplexebb a kép, mert az izomsejtekben számos intracelluláris multi-protein inclusio figyelhető meg. A betegséget konformációs betegségnek is hívják, mert több protein kóros „foldingja” is igazolódott (Askanas et al 2009). Hasonló klinikai és hisztopatológiai képet eredményez a hereditér forma is. Sajnálatos módon nem csak a hereditér forma, de az immunológiai eredetű IBM sem reagál az immunszuppresszióra, a betegség gyors progressziója miatt néhány éven belül elveszítjük a betegeket (Argov és Mitrani-Rosenbaum 2008).

### **2.3.4. *NOTCH3* gén mutációhoz társuló neuropathia**

Perifériás neuropathia egyes genetikailag determinált betegségekben szekunderen is kialakulhat. Erre irányultak vizsgálataink a CADASIL (cerebralis autoszomalisan domináns arteriopathia subcorticalis infarktussal és leukoencephalopathiával) szindrómában. A CADASIL rekuráló cerebrális ischaemiás epizódokkal, demenciával, pseudobulbaris paresissal, migránnal és pszichiátriai tünetegyüttesel jellemezhető kórkép (Dichgans et al. 2002). A betegségért a *NOTCH3* gén mutációja a felelős (Joutel et al. 1997). A *NOTCH3* pontos szerepe pontosan még nem ismert. Feltételezzük, hogy az embryonalis korban bizonyos apoptotikus feladatokban játszik szerepet. A betegségre jellegzetes a bőr, az izom és a perifériás idegek kis véredényeinek simaizom sejtjei környezetében levő granularis osmiophil anyag (GOM) jelenléte (Goebel et al. 1997). Irodalmi adatok arra utalnak, hogy a CADASIL-ban mitochondrialis rendellenességek is lehetnek (de la Pena et al. 2001, Finnila et al. 2001, Malandrini et al. 2002). Vizsgálatainkkal arra szeretnénk volna választ kapni, hogy CADASIL-ban milyen strukturális változások alakulnak ki a n. suralisban és az izomban, és hogy ezek az elváltozások közvetlenül a *NOTCH3* gén mutációja eredményeként keletkeznek vagy esetleg a mitochondrialis genom rendellenessége okozza azokat.

### **3. BETEGANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

A vizsgálatok vagy a rutin diagnosztika részét képezték, vagy hatályos etikai bizottsági engedély állt rendelkezésünkre. Az alábbiakban a vizsgált beteganyagot és az alkalmazott vizsgáló módszereket foglaljuk röviden össze.

#### **3.1 Vizsgált betegek**

Valamennyi esetben részletes családi anamnézist vettünk föl, családfát készítettünk, a szokásos részletes neurológiai, egyes esetekben pszichiátriai vizsgálatok mellett laboratóriumi, neuroradiológiai, Doppler, elektrofiziológiai, morfológiai és genetikai vizsgálatok történtek. A vizsgálatok elvégzésébe és azok eredményeinek tudományos célú felhasználására a betegek beleegyező nyilatkozatot töltöttek ki. A cerebrális rezerv kapacitást 15 mitochondrialis betegben mértük (életkor: 24-66 év, átlag életkor: 43.3 év) és 18 egészséges kontroll személyben (életkor: 20-61 év, átlag életkor: 38.47 év. A fenti mitochondrialis kohortból 5 betegnél készült PET vizsgálat. Az mtDNS tRNS<sup>Lys</sup> mutációkat elemző vizsgálatainkban 334 (210 nő és 124 férfi) beteg és 150

kontroll személy DNS mintáját elemeztük. A betegek átlagéletkora 39,4 év volt (nők: 40,2 év, ffi: 32,5 év). A mitochondrialis tRNS<sup>Leu(UUR)</sup> genetikai epidemiológiai vizsgálatok során 3243G szubsztitúcióját 631 (361 nő és 270 férfi) betegen vizsgáltuk. A betegek átlagéletkora 36,3 év volt (nők: 38,1 év, ffi:34,4 év). A mintagyűjtést 1999. január és 2007. december között végeztük. A vizsgálatba Baranya, Borsod-Abaúj-Zemplén, Hajdú-Bihar, Szabolcs-Szatmár-Bereg megye valamint Budapest ismeretlen etiológiájú ischaemiás stroke, ataxia, maternalisan öröklődő sensorineuralis hallásvesztés, myopathia, vagy hypotonia miatt genetikai vizsgálatra küldött betegeket vontuk be, akiknél a multiszisztémás tünetegyüttes, a családi anamnézis és egyes laboratóriumi értékek felvetették a mitochondrialis betegség lehetőségét. Az A8344G mutáció elfordulási gyakoriságának vizsgálata során 513 beteget (302 nő és 211 férfi) vizsgáltunk. A kohortba Borsod-Abaúj-Zemplén, Hajdú-Bihar, Szabolcs-Szatmár-Bereg megye valamint Pest megye és Budapest feltételezetten mitochondrialis betegségben szenvedő betegeket vontuk be. A betegek átlagéletkora 39 év volt. Mind a betegek, mind az egészséges kontroll személyek a vizsgálat előtt részletes felvilágosítás kaptak, amely alapján a genetikai vizsgálatba, a minták további kutatási célú megőrzésébe és az eredmények szakirodalmi publikálásba beleegyeztek. A minták tárolása az Európai Unió követelményeknek megfelelően az Országos Pszichiátriai és Neurológiai Intézet Molekuláris Neurológiai Osztály, majd későbbiekben a Semmelweis Egyetem Neurológiai Klinika, Molekuláris Neurológiai Központ neurológiai és pszichiátriai biobankjában történt, amely a NEPSYBANK részét képezi (23. Közlemény). A vizsgálatokhoz az intézeti etikai bizottságok bocsájtottak ki engedélyt.

A Fázis I sonoporációs vizsgálatok során 5 egészséges férfi önkéntest vizsgáltunk. Az önkéntesek írásban nyilatkoztak, hogy semmilyen betegségben nem szenvedtek, gyógyszert nem szedtek és önként vállalták a vizsgálatban való részvételt. A vizsgálatot az ETT-TUKEB engedélyezte.

## **3.2. Alkalmazott módszerek**

### **3.2.1 PET és Doppler vizsgálat**

Az FDG (2-(18F)-fluoro-deoxy-D-glucose) felvételt PET segítségével 5 betegben (3 férfi 2 nő), átlagéletkor  $35 \pm 7$  év vizsgáltuk. A PET méréseket GE 4096 Plus teljes test pozitron camera segítségével végeztük. Az FDG tracert 30 perccel a

mérés előtt ív. adtuk be, dózisa:  $4.35 \pm 2.33$  mCi, vagy  $59 \pm 27$  (Ci/tskg) volt. A PET felvételeket Hanning filterrel rekonstruáltuk, az eredményeket kontroll csoporthoz hasonlítottuk. A betegek eredményeit egy 4 nőből és 1 férfiból álló kontroll csoport eredményeihez hasonlítottuk. Átlagéletkoruk  $33 \pm 9$  év, beadott FDG dózis  $4.35 \pm 2.33$  mCi vagy  $59 \pm 27$  Ci/tskg volt. A kontroll egyének nemzetközi etikai elvárásoknak megfelelő (a Helsinki Deklarációt elveinek is megfelelő) vizsgálatát. a Debreceni Orvostudományi Egyetem etikai bizottsága engedélyezte. A PET vizsgálatok sensoros deprivatíóban készültek, az adatgyűjtés 30 percig tartott. Minden PET képet a komputerezált Human Brain Atlas (HBA) rendszerbe továbbítottuk. (Roland et al. 1994). Első lépésben az individuális PET felvételeket mind méret, mind alak szerint illesztettük a standard HBA agy konturhoz (stereotaxiás standardizálás) ld. [www.dhbr.neuro.ki.se/Hba/index.html](http://www.dhbr.neuro.ki.se/Hba/index.html). A mitochondrialis betegek állapota miatt szándékosan hagytuk el az arteriális vérvétellel járó kvantitatív PET méréseket, helyette az agyi radioaktivitási adatokat normalizáció technikával pszeudokvantifikáltuk. Az egyes sugárzási arányt felvételenként normalizáltuk a Roland által leírt módszer szerint (1993). A cerebrális CMRglu metabolizmus arányát (mol/100g/min) az egyes központi idegrendszeri régiókban a kontroll csoport átlag sphericus volumen-of interest-jéhez (VOI) hasonlítottuk 10 mm-es átmérőben. Az anatómiai régiók azonosítása a HBA standard agy és adatbázis alapján történt. A cerebrovascularis reserve kapacitást (CRC) transcranialis Dopplerrel (TCD) vizsgáltuk 15 mitochondrialis betegségben szenvedő betegben és 18 egészséges kontrollban. A betegeket 3 csoportba osztottuk (1) interictalis mitochondrialis encephalomyopathia, lactacidosis és stroke-szerű epizódok (MELAS), (2) chronikus progresszív ophthalmoplegia externás betegek (CPEO), és (3) mitochondrialis myopathiás, neuropathiás betegek (MM). A diagnózis a klinikai fenotípuson, hisztokémiai és molekuláris genetikai vizsgálatokon alapult. Az a. cerebri mediák cerebrális vérátáramlási sebességét (CBV) TCD-vel mértük 1 g intravénás acetazolamide adása előtt és után. Az MCAV-t, a pulsatilitási indexet (PI) 45, 50, 55 mm mélységben mértük nyugalomban és 20 perccel az acetazolamide adását követően 5 perces intervallumokban. Minden csoportban mindkét a. cerebri mediában az átlagos sebességet értékeltük. Mindhárom csoport MCAV értékeit egymáshoz, illetve az egészséges kontrollhoz hasonlítottuk. A variancia analízist az egyes csoportok közötti különbség megállapítására használtuk ( $p < 0.05$ ). A

cerebrovascularis reaktivitást (CR) és cerebrovascularis reserve kapacitást (CRC) a következők szerint kalkuláltuk:  $CR=100(v_t-v_0)/v_0$ ;  $CRC= 100(v_{max} -v_0)/v_0$ , ahol  $v_0 = v$  sebesség acetazolamide adminisztráció előtt,  $v_t =$  sebesség acetazolamide adminisztráció után,  $v_{max} =$  maximalis sebesség acetazolamide injekció után.

### **3.2.2. Morfológiai vizsgálatok: fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok**

Az izom- és ideg biopszia értékelésekor a rutin standard hisztológiai, hisztokémiai, immunhisztokémiai fény- és elektronmikroszkópos metodikákat alkalmaztuk. Az izomdystrophiák immunhisztokémiai/Western blot vizsgálataihoz a következő monoclonalis antitesteket (Novocastra) használtuk: dystrophin (NCL-DYS1,2,3),  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$  -sarcoglycan (NCL-SARC) hyperglycosylált  $\alpha$  -DG (VIA4-1), merosin, laminin, dysferlin, collagen VI, dysferlin (NLC-Hamlet) caveolin-3, calpain (NCL-CALP-2C4) a gyártók által javasolt kondíciók szerint. Néhány szelektált LGMD esetben a növényi lektinek, mint a búzacsíra agglutinin (WGA 1:100), és mogyoró agglutinin (PNA 1:100) jelenlétét is vizsgáltuk immunhisztokémiai módszerrel. A primer ellenanyaggal történő inkubálás után egér-ellenes biotinnal (DAKO) és streptavidinnel (DAKO) kezeltük a mintákat, majd azt diaminobenzidin (DAB) segítségével vizualizáltuk. A lektin kötést tormaperoxidáz streptavidin-DAB reakcióval vizualizáltuk. A Western-blot során az izomprotein-homogenizátumot 8%-os polyacrylamid gélen szeparáltuk, majd PVDF membránra (BioRad) blottoltuk, és az elsődleges ellenanyagokkal inkubáltuk. Szekunder antitestként anti egér biotint (DAKO) és streptavidint (DAKO) használtunk. A blot detektálása ECL Plus kittel (Amersham) történt a cég által javasolt feltételek mellett.

#### **N. suralis morfometria**

A neuropathia súlyosságát komputerezált morfometriás program segítségével állapítottuk meg (Video Image Processing Evaluation and Recording System - VIPER, Gesotec Darmstadt, Németország). A myelin felület/endoneuralis felület százalékos arányát, a myelinizált rostok  $mm^2$ -kénti számát, az axonok felületének és a teljes idegrost felületének arányát határoztuk meg.

#### **Elektronmikroszkópos vizsgálatok és morfometria**



Az ultravékony metszeteket uranyl acetáttal és ólomcitráttal kontrasztoltuk és Philips T 400 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. A n. suralis és az izomszövet kis véredényeinek endothel sejtjeiben, pericytáiban és simaizom sejtjeiben számoltuk a mitochondriumok számát, 20-20 mitochondrialis betegben és 4-2 kontroll esetben. Két egymástól független vizsgáló végezte a számolást. A mitochondriumok keresztmetszetének felületét és az azt tartalmazó sejt felületét mértük, valamint azok arányát számítottuk szemiautomatikus komputerezált morfometriás rendszerrel. A statisztikai analízis a Wilcoxon teszttel történt.

### **3.2.3. Molekuláris biológiai metodikák**

#### **Mitochondrialis betegségek vizsgálata során alkalmazott módszerek**

##### *DNS izolálás*

A DNS-t vérből, ill. 50 beteg esetében vázizomból, izoláltuk Qiagen Blood (Qiagen) valamint Qiagen Tissue Kit segítségével a gyártó által megadott instrukciók szerint. A DNS koncentrációt UV spektrofotométer segítségével 260 nm abszorbananciánál mértük. A tisztasági fokot a 260 nm-es és a 280 nm-es abszorbanancia értékek hányadosával határoztuk meg.

##### *PCR-RFLP vizsgálat*

Az mtDNS leggyakoribb mutációit PCR-RFLP módszerrel vizsgáltuk. Az mtDNS patogén mutációs hot spot régióit, az nt 3160-3296, nt 8155-8367, nt 8345-10011, nt 8105-8536 PCR segítségével amplifikáltuk. A reakcióhoz a primereket 300 nmol/L végkoncentrációban használtuk, 100 nmol/L MgCl<sub>2</sub>-ot, és 1 unit Taq polimerázt (Immolase, Bioline GmbH, Németország) hozzáadva, a reakcióelegyet RNáz-mentesített desztillált vízzel (RT-PCR grade water, AMBION) 50 µl végtérfogatra egészítettük ki. A primerek szekvenciái a [www.molneur.eoldal.hu](http://www.molneur.eoldal.hu) honlapon olvashatók. A PCR reakciók során a következő programot használtuk: kezdeti denaturáció 94°C-on 5 perc, 35 ciklus (denaturáció 94°C 30 másodperc, anelláció 50-60°C 30 másodperc, szintézis 72°C 30 másodperc), majd a végső szintézis 72°C-on 7 perc. Az A3243G, A8344G, T8356C, T8993C, T8993G szubsztitúciók kimutatására a kapott PCR terméket 37°C-on restrikciós endonukleázokkal (HaeIII, BanII, HpaII, AvaI) emésztettük. A restrikciós mintázatot 2%-os agaróz vagy 12%-os polyacrylamid gélen analizáltuk. A géleket

etídium-bromiddal festettük, majd a kapott band-ek nagyságát a hasítatlan mintához viszonyítva Quantity One Software (BIO-RAD) segítségével határoztuk meg.

#### *DNS bidirekcionális szekvenálás*

Az mtDNS tRNS-eit és azokat a protein kódoló géneket, ahol az irodalomban gyakran találtak patogén mutációkat PCR-rel amplifikáltuk. A primerek szekvenciái a [www.molneur.eoldal.hu](http://www.molneur.eoldal.hu) honlapon olvashatók. A PCR terméket Sure Clean Plus kit (BIOLINE) segítségével tisztítottuk. A tisztított PCR termékhez 1 unit 3.1. Big Dye Terminator enzimet adtunk (Big Dye Terminator v 3.1 cycle sequencing RR-24, Applied Biosystems), valamint ugyanennyi térfogat Big Dye puffert, amely a fluoreszcensen jelölt didoexinukleotidokat is tartalmazta. A szekvenáló reakciót az illető régióra specifikus reverz primerekkel végeztük el. A szekvenáló PCR elvégzése után a termékeket NucleoSeq kit (BIOLINE) segítségével tisztítottuk. A kérdéses régiót ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer szekvenátorral vizsgáltuk. A kapott szekvenciákat is az NCBI Blast program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) segítségével a humán mitochondrialis referencia genom nukleotid és aminosav sorrendjével hasonlítottuk össze. A nukleáris genom RRM2B gén szekvenálás primereinek szekvenciái is a [www.molneur.eoldal.hu](http://www.molneur.eoldal.hu) honlapon olvashatók.

*Fibroblast tenyésztés:* A bőrbioptatum fibroblasztjait izolálást követően Dulbecco által módosított Eagle mediumban (DMEM) tenyésztettük (GIBCO, Invitrogene GmbH, Austria) 20% foetalis marha serum (GIBCO), 0.5% penicillin-streptomycin (GIBCO), és 0.3% Fungisone (GIBCO) jelenlétében 37 °C –on 5% CO<sub>2</sub> 95% levegőt tartalmazó légtérben.

*Légzési lánc komplex aktivitás meghatározás:* A mitochondrialis komplex I aktivitást Enzyme Activity Microplate Assay Kit (MitoScience, Eugene, Oregon, USA) segítségével mértük a gyártó által megadott instrukciók szerint. A Komplex I aktivitás mérés alapját a NADH-nak a NAD<sup>+</sup>-á oxidációja és a jelölő anyag szimultán redukciója képezte. A jelölő anyag redukcióját a 450 nm-en észlelt fokozott adszorbancia jelezte.

### *Linkage analízis*

A linkage analízis genom-wide scannel készült a 6,090 SNP-t tartalmazó Illumina Infinium HumanLinkage-12 panel (Illumina Inc, San Diego, CA) alapján. A MERLIN program segítségével végzett multipoint LOD score analízisbe 9 beteg és 3 egészséges családtagjainak mintája került be. Az analízis során autoszomalis domináns öröklődésmenetet, teljes penetranciát és a fenokópiák hiányát tételeztük föl. A betegség allél frekvenciáját 0.001-nek adtuk meg. Valamennyi marker allél frekvenciáját azonosnak becsültük.

### *A heteroplasmikus nőstény egerek genotípezálása*

A heteroplasmikus egerek Dr. Eric Shoubridge laboratóriumából származtak és Jenuth et al. (1996) metodikája alapján keletkeztek. Az egerek az NZB és BALB egerek mtDNS-it tartalmazták. A 2 genotípus 101 nukleotidban különbözik egymástól. A genotípezálás RFLP metodikával történt, az *RsaI* hasítási helye a 3691nt-nél az ND1 génben csak a BALB típusban van jelen, az NZB egérben hiányzik. Az egyes egerek heteroplasmia arányát a farokbiopszia mintából határoztuk meg. A teljes DNS-t a következő primerekkel amplifikáltuk: forward primer MT9 nt3571–3591, 5'-AGCATCTTATCCACGCTTCC-3'; reverse primer MT10 nt4079–4059, 5'-CTGCTTCAGTTGATCGTGGGT-3'. A PCR összeállításnál és a ciklus kondíciók beállításánál Jenuth et al (1996) módszerét követtük. Röviden: a PCR reakció volumene 50 µl volt, mely 1x kalium mentes PCR puffert (100 mmol/l Tris-HCl, pH 8.3), 2.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>-t, valamennyi dNTP-ből 200 µmol/l-t, az MT9 and MT10 primerek 0.4 µmol/l-t és 1.25 IU *Taq* polymeraset (Gibco, Canada) tartalmazott. A PCR- Perkin Elmer 9600 thermocycleren futott a következő módon: 5 min denaturáció - 94°C, majd 30 ciklusban 30 - 94°C, 30 s - 55°C és 30 s - 72°C. Az utolsó ciklusban 1.5 µCi of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP-t adtunk a PCR termékhez radiotív jelölés céljából. A reakció elegy 15 µl-ét emésztettük 10 U *RsaI*-val 37°C-on egy éjszakán át és azt követően 10% nem-denaturáló polyacrylamid gélen futtattuk.

*A heteroplasmikus egér oocyták és az embryok izolálása*  
Hat hetes – 4 hónapos egerek ovulációs metafázis II oocytáit izoláltuk. A munkát a McGill University „Animal Care Committee”-je engedélyezte. Ismert heteroplasmia arányú nőstényeket intraperitonealisan 7.5 IU terhes kanca szérum

gonadotropinnal (Sigma, Canada) szuperovuláltuk, majd 5 IU hCG-t (Sigma) adtunk 44–48 órával később. Az oviductusokat 16-18 óra múlva eltávolítottuk és az oocytákat az oviductus duzzadt ampullájából HEPES-pufferrel és káliummal optimalizált médiumba (H-KSOM) juttattuk ki. Az oocyták körül levő cumulust rövid Hyaluronidase (300 µg/ml) inkubációval tüntettük el. Korai stádiumú embryok nyéréséhez a szuperovulált egereket CB1 egerekkel pároztattuk egy éjjelen át. A 2-, 4- és 8-sejtes embryokat a terhes egerek oviductusának átfújásával a megtermékenyítést követő 1.5, -2 és -2.5. napon nyertük. Az embryokat 1 vagy 2 napon át in vitro tenyésztettük mielőtt szétválasztottuk a blastomereket. A tenyésztés re-equilibrált friss KSOM médiumban történt paraffin olaj alatt 37°C-on 5% CO<sub>2</sub>-ban.

#### *Blastomer kollekción*

Az oocyták és az embryok zona pellucidáját savas Tyrode oldattal (pH 2.5) történő inkubációval oldottuk, majd H-KSOM-ben mostuk azokat. Minden oocyta első poláris testjét óvatosan aspiráltuk és 5 µl of alkalikus lysis puffert tartalmazó PCR csőbe transzferáltuk. Az ooplasma egy szeparált csőbe került. A zona mentes embryokat 5 percig Ca<sup>2+</sup>- and Mg<sup>2+</sup>-mentes médiumban inkubáltuk, majd a szeparált blastomereket lysis puffert tartalmazó PCR csőbe helyeztük. A blastomer lysis 15 percig 65°C- ra melegítéssel történt, melyet követően 5 µl neutralizáló puffert adtunk a DNS-t tartalmazó oldathoz.

#### *Az oocyták, poláris testek és blastomerek mtDNS genotípusának meghatározása*

Az egyes sejttípusokból más és más mennyiségű lysatumot használtunk a PCR reakcióhoz. Az oocytákhoz 1 µl, a poláris testekhez 3 µl, a szeparált blastomerekhez 2 µl-t lysis puffert adtunk. Minden kísérletben volt negatív kontroll, amely 5 µl bideszt. vizet jelentett. Minden mérés duplikátumban történt. A mérés során az egerek genotípusának meghatározásánál leirt módszert követtük. Az RFLP és a gélelektroforézis a "Heteroplasmikus nőstény egerek genotípusának meghatározása" fejezetben leírtak szerint történt.

#### *A blastomerek, oocyták, poláris testek radioaktív géljeinek értékelése*

A szárított géleket Storm PhosphorImagerrel (Molecular Dynamics) értékeltük. Az NZB mtDNS százalékos arányát az RFLP hasítási mintázatból kalkuláltuk. Az

mtDNS NZB heteroplasmia %-os arányát minden sejtre kiszámítottuk, a duplikátumhoz hasonlítottuk és ezt követően variációs koefficienszt számítottunk (CV). Ha a duplikátum CV-je <10 volt, az eredményt elfogadtuk, ha a CV-je >10 volt, triplikátum is készült. Ha a triplikátum CV-je is >10 volt, a mintát kizártuk az elemzésből.

#### *PMP22 gén duplikáció/deléción meghatározás*

A *PMP22* gén duplikációját Real-Time PCR módszerrel határoztuk meg (ABI 7300) standard metodika szerint (Aarskog et al 2000). Röviden: teljes vérből izolált DNS-t vizsgáltunk, referencia génként albumint használtunk. A primerek szekvenciáját Aarskog et al (2000) közleményéből vettük át. Minden mintát mind az albumin, mind a *PMP22* esetében triplikátumban futtattuk le. A PCR reakció 2x TaqMan Universal PCR Master mixet, 900 nM forward primert, 900 nM reverse primert, 200 nM próbát és 100 ng DNS-t tartalmazott reakciókként. A PCR az ABI Prism 7700 Sequence Detection System-en (Applied Biosystems) futott. A bevezető PCR ciklus kondíciói: 2 min 50°C és 10 min 95°C. Ezt követően 40 cikluson át a következők voltak a paraméterek: 15 sec 95°C, és 1 min 65°C. A *PMP22* duplikációt a komparatív Ct módszerrel határoztuk meg.

#### *Roma neuropathiák vizsgálata*

A Lom neuropathiában az *NDRG1* gén alapító (R148X) mutációját PCR –RFLP módszerrel Echaniz-Laguna et al. (2007) metodikája szerint végeztük el. A CCFDN neuropathiában a genetikai analízis PCR-alapú restrikciós enzim hasítással történt a Varon et al. (2003) által leírt metodika szerint. A mutáció következtében *CTDPI* (karboxiterminális domén, RNS-polimeráz II, polipeptid A foszfátáz, 1 alegység) génben a 6. exon-6. intron junctiótól 389. bp-ral az intron irányába C-T szubsztitúció következtében az Nlalll restrikciós enzim hasítási helye elveszett.

#### *Az FKRK mutációk vizsgálata*

Az immunhisztokémiai reakció során csökkent alpha DG jelenlétét mutató betegek izomszövetéből izolált genomiális DNS mintán először a fukutin related protein (*FKRP* gén) hot spotját (cC826A) zártuk ki Walter et al. (2004)

metodikája szerint. Amennyiben ez a mutáció nem igazolódott az *FKRP* gén teljes kódozó régióját szekvenáltuk a standard szekvenálási metodikával.

#### **3.2.4. Immunszerológiai vizsgálatok**

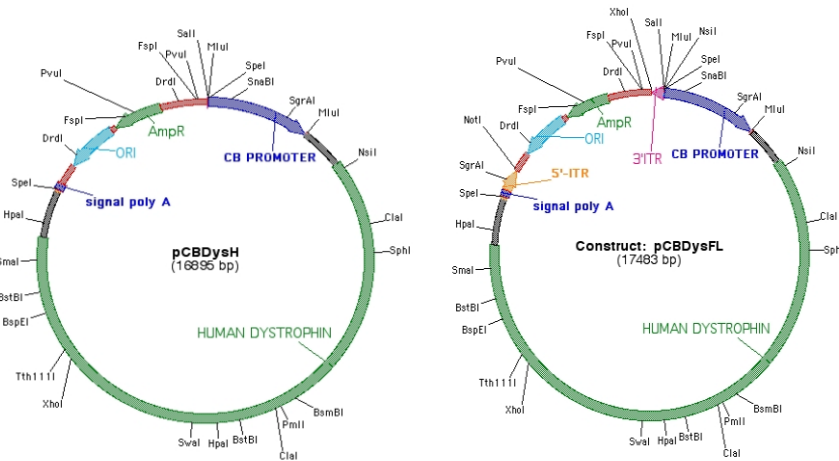
Az egyes leukocyták arányát FACS módszerrel detektáltuk. Az antikoagulált vér leukocytáit monoclonalis egér anti-human CD4-, CD8-, CD3-, CD56, CD19-FITC antitestekkel festettük. A vörösvértestek lízisének követően a festődött leukocytákat paraformaldehyddel fixáltuk és FACS - Calibur flow cytométerrel analizáltuk. Az egyes fehérvérsejt típusok méretük és granulációjuk alapján különültek el egymástól. A különböző CD markerekkel rendelkező sejtek százalékos arányát 5000 lymphocytáértékelése alapján számítottuk. A serum IgG and autoantitestek szintjeinek meghatározása ELISA módszerrel történt. Az antinuklearis antitest (ANA) meghatározására HEp2 sejt vonal indirekt immunfluorescens assay-t használtunk. A complement factor 3 (C3) és 4 (C4) koncentrációk meghatározása nefelométerrel történt.

#### **3.2.5. Génterápiás vizsgálatok**

##### *Electroporációs (EP) vizsgálatok*

Beta galactosidaset (beta-gal, pCBLacZ), a teljes hosszúságú dystrophint (pCBMuDys) vagy utrophint (pCBVUtrFl) tartalmazó plazmid volt a vektorunk (3.1. Ábra), melyeket a hybrid cytomegalovirus (CMV) és  $\beta$ -actin promoter (CMV promoter) szabályozott. A plazmid pCBLacZ előállításánál pCMV $\beta$  -nak a  $\beta$ -gal-t kódozó szekvenciáját távolítottuk el (Clontech Laboratories, Palo Alto CA, USA) Not1 emésztéssel. Ezt követően a DNS fragmentet XhoI linkerrel (New England, Biolabs) kapcsoltuk, majd a pCAGGS XhoI helyére illesztettük be. A pCAGGS egy olyan plazmid, amely CB promoterrel és SV40 poly(A) adenylációs szignállal rendelkezik. A plazmid pCBmuDYS a teljes hosszúságú rágcsáló dystrophin, a pCBVUtrFl a teljes utrophin cDNS-t tartalmazza. Mindkettőben a CB a promoter, amelyet a CMV enhancer szabályoz. Az utrophint tartalmazó plazmidban az aminoterminálison egy rövid nukleotid „FLAG tag” lánc kapcsolódik. A pCMVMicroDys microdystrophint tartalmaz, amelyből hiányzik a teljes rod domén, kivéve a 2 spectrin szerű repeatet és az első és utolsó „hinget”. A plazmidokat EndoFree plazmid maxi tisztító kittel (Qiagen

Inc, Mississauga, Canada) szabadítottuk meg az endotoxinoktól a gyártó instrukciói szerint. A végső plazmid koncentráció 1-3ug DNS/ul volt.



### 3.1. Ábra: Az elektroporációs kísérletek során alkalmazott plazmidok felépítése

**Rövidítések:** AmpR : ampicillin-resistance gene for antibiotic selection in bacteria, ORI: ColE1 az amlifikációhoz a replikáció kezdete az E.Coli-ban. Signal polyA: a nyúl b-globin polyA signal, 5'-ITR: bal (5') az adenovirus 5 típus invertált terminalis repeatje és packaging signalja, 3'-ITR: jobb (3') az adenovirus 5 típus invertált terminalis repeatje, CB Promoter: hybrid CMV enhancer és b-actin promoter, HUMAN DYSTROPHIN: a human dystrophin teljes cDNS szekvenciája

Kezelt állatok, plazmid injekciók és euthanasia: valamennyi állkísérletet a McGill Egyetem állatkísérlet szabványait követve végeztük. Újszülött (4-6 napos) és felnőtt (6-8 hetes) normális (CD1 and C57BL/6), immunodeficiens (SCID) és mdx egereket használtunk a vizsgálatokhoz. Minden csoportban 4-8 állat volt. A m. tibialis anteriort (TA) vagy a gastrocnemiumot injektáltuk a fenti plazmidok egyikének 50 vagy 20  $\mu$ l-vel (életkortól függően). Egy kohortban a plazmid injekciót megelőzően 0,4 U/ $\mu$ l Hyaluronidaset (Sigma Aldrich) is injektáltunk. Egy további kohortban 100  $\mu$ l PBS-ben hígított Evans Blue-t (10 mg/ml) fecskendeztünk intraperitonealisán mielőtt a plazmidot injektáltuk. Minden csoportból 4-6 állatot altattunk el 10, 30, 90, 180 és 360 nappal a kezeléseket követően.

Electroporáció (EP): Az injektált izmokat transzkután EP-val kezeltük (felszíni elektród, 8 db négyszög impulzus, 175-1800 v/cm feszültség, 0, 2-20 msec közötti változó időtartam).

A mintavétel és a végpontok meghatározása: altatást követően a teljes TA-t és gastrocnaemiust eltávolítottuk, majd fagyasztott metszeteket készítettünk. A hisztológiai elemzés során az alábbi paramétereket analizáltuk: a transzferkált rostok száma és aránya ( $\beta$ -gal, dystrophin és utrophin pozitívítás), az Evans Blue pozitív rostok száma és aránya, a nekrotikus rostok prevalenciája, a  $\beta$ -gal szint (luminometriás mérés homogenizált izomból) 10, 90, 180 és 360 nappal az EP után. A plazmid partikulumok mennyiségi meghatározása Real-Time PCR-al történt. A DNS-t a fagyasztott metszetekből izoláltuk.

**Real-Time PCR:** valamennyi szövettanilag is analizált izomból. 70 db 10um vastag cryostatos metszetből izoláltuk standard metodika szerint a DNS-t. A Real-Time PCR-t a QuantiTect Probe PCR kit segítségével végeztük el (Taqman próba, Qiagen, Valencia USA) a CB promoter régióhoz kötődő FAM és TAMRA jelölt primerekkel. A rágcsáló adiposin gén szolgált kontroll géneként. A reakciót a SmartCycler (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) készüléken futtattuk az alábbi paraméterek szerint: 50°C -2 min és 95 °C - 15 min, majd 45 ciklusban 94 °C - 15 sec, 58 °C – 30 sec és 72 °C - 30 sec.

**Statisztika:** Az Evans blue,  $\beta$ -gal, dystrophin, vagy utrophin pozitív rostok, és a nekrotikus rostok teljes számát számoltuk minden kezelt izomban. Minden csoportban az aritmetikus átlagot és a standard hibát kalkuláltuk, majd a Student és GLM ANOVA 2 tail T tesztjét alkalmaztuk.

#### *Sonoporációs vizsgálatok*

A vizsgálat során az önkéntesek bo. m. biceps brachii-jába 0.75-1.5 ml fiziológiás sóoldatot injektáltunk, a jo. m. biceps brachii-ba, pedig előzetes Vialmixxel történő rázással történő aktivációt követően 0.75 ml azonos térfogatú fiziológiás sóval hígított Definity (microbubble) oldatot fecskendeztünk. Az injekciókat követően azonnal alkalmaztuk a sonoporációt (SonoEnGene), mely paraméterei a következők voltak: felszíni 5 cm átmérőjű elektród, frekvencia: 1 MHz, időtartam: 2 min, duty cycle: 30%, intenzitás: 2-3 W/cm<sup>2</sup>. A sonoporációt követően klinikailag figyeltük a kezelt régiókat. Harminhat órával később szérumban CK



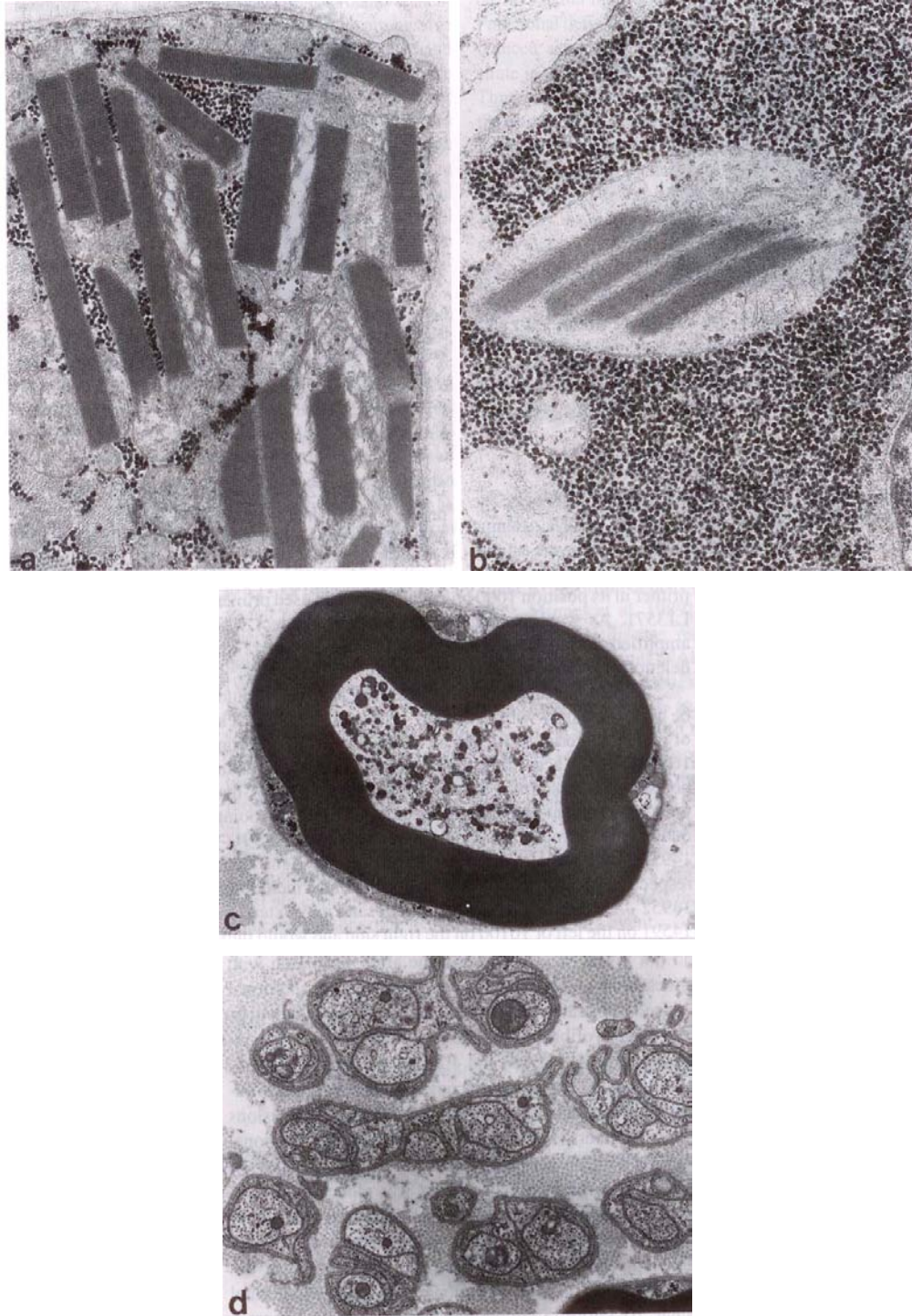
kontroll és mindkét m. biceps brachii-ből izombiopszia történt, melyet a fentiekben leírt morfológiai módszerekkel vizsgáltunk.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. Mitochondriális betegségek

#### 4.1.1. Új mtDNS rendellenességek, új mtDNS betegségek leírása

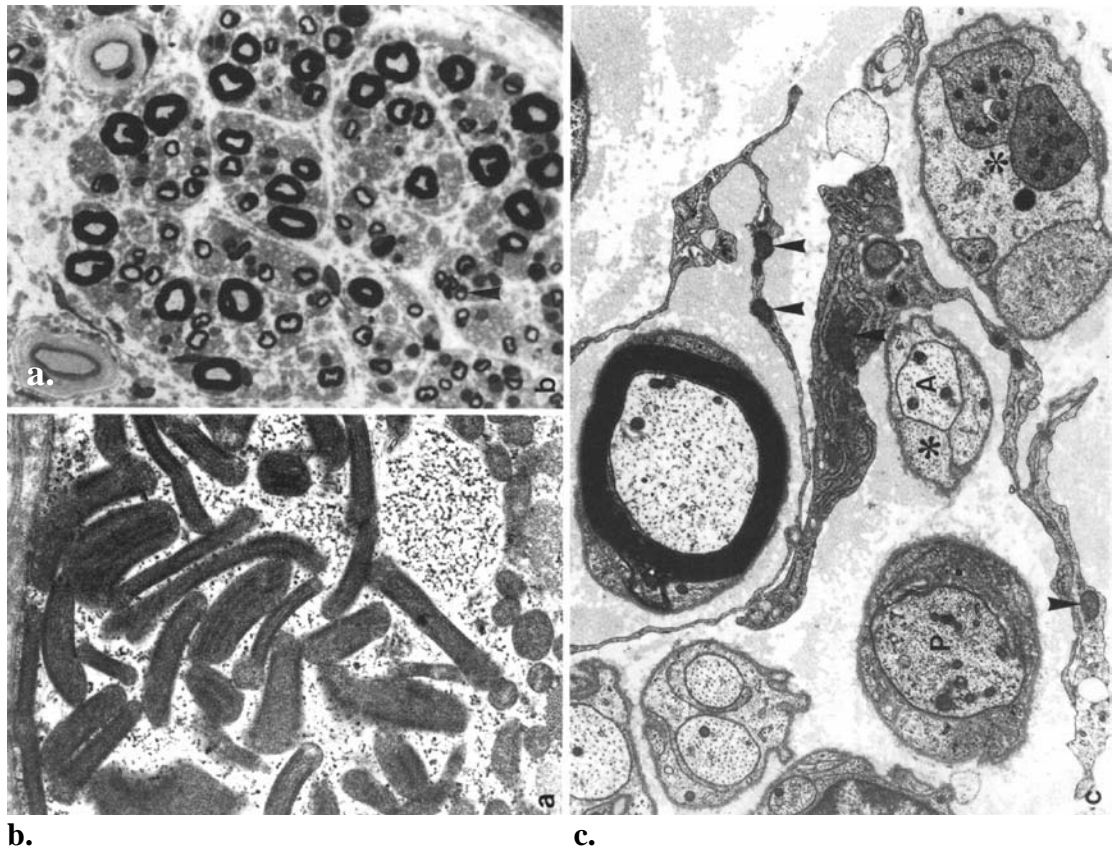
1. Huszonnyolc éves Kearns-Sayre szindrómás betegünknek gyermekkor óta volt szemmozgás-zavara, melyhez 20 éves korában bilaterális ptosis és látászavar társult. Myasthenia gravis kizárását követően izombiopszia készült, mely mitochondrialis betegségekre jellegzetes szövettani képet (ragged red rostok és az EM felvételeken kóros mitochondriumokat) talált (4.1. Ábra). Az mtDNS analízis során a WISP-PCR-rel a H 16569 and L 14571 primer pár alkalmazásakor egy 0.8 kb nagyságú mtDNS szakaszt amplifikálódott, az illető régióban egyes nagy deléció jelenlétét jelezve. Annak bizonyítása céljából, hogy a PCR termék deléciós „junction fragment”, a forward primer pozícióját 1000 bp-ral 5' irányban előrébb választottuk meg L 13571-nél. Várakozásunknak megfelelően egy 1800 bp nagyságú mtDNS szakasz amplifikálódott. Így az 1.2 kb kiterjedésű deléció jelenlétét primer shift PCR-al verifikáltuk. A „junction fragment” legalább 750 bp nagyságúnak mutatkozott, a deléciós töréspont baloldalon a 14591-14952 bázispárok közé, jobb oldalon pedig a 15739-16100 nukleotidok közé volt lokalizálható. Ennek megfelelően a deléció magában foglalta a *CYTB* gén 70 %-át, az I. komplex 5. alegység (*ND5*), a *tRNA<sup>Glu</sup>*, a *tRNA<sup>Thr</sup>*, *tRNA<sup>Pro</sup>* génjeit. A közleményben elsőként írtunk le egyes nagy deléciót az mtDNS ezen régiójában (**8. Közlemény**).



**4.1. Ábra:** a.) Az izombioptátumban számos intramitochondriális paracrystallin inclusio volt jelen. x 23.000 b.) Nagy mennyiségű glycogen vette körül a kóros mitochondriumokat X 30.000 c.) Intraaxonalisan számos mitochondriumok száma megnőtt X18.000. d.) A nem myelinizált axonok mitochondriuma X 9.800

2. Hatvenegy éves férfi betegünk évek óta súlyos izomgörcsökről számolt be, mely háttérében az elektrofiziológiai vizsgálattal polyneuropathia igazolódott.

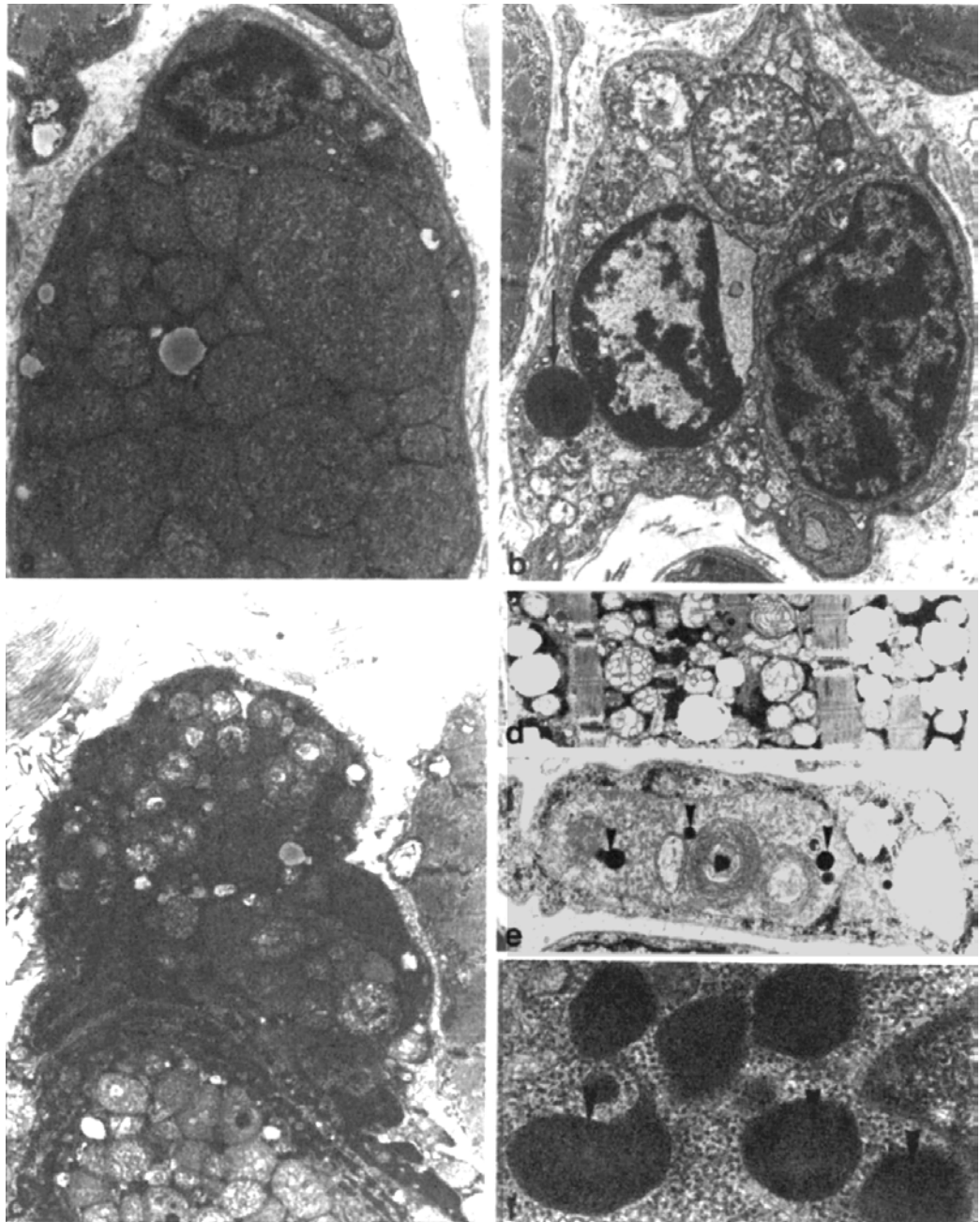
Súlyos polyneuropathiája következtében neurogén hólyag és szekunder anuria is kialakult. A szövettani vizsgálat az izomban neurogen károsodást és klasszikus mitochondrialis eltéréseket, a n. suralisban axonalis típusú neuropathiát talált (4.2. Ábra). Az mtDNS analízise WISP-PCR analízissel és primer shifting-el a 6570 és 14150 nt között egyszeres óriás deléciót detektált. A heteroplasmia foka 30% volt. A deléciót egy 400 bp nagyságú ún. „bridging fragment” hidalta át. Az irodalomban először igazoltunk heteroplasmikus egyes nagy deléciót mitochondrialis neuropathia hátterében (5. Közlemény).



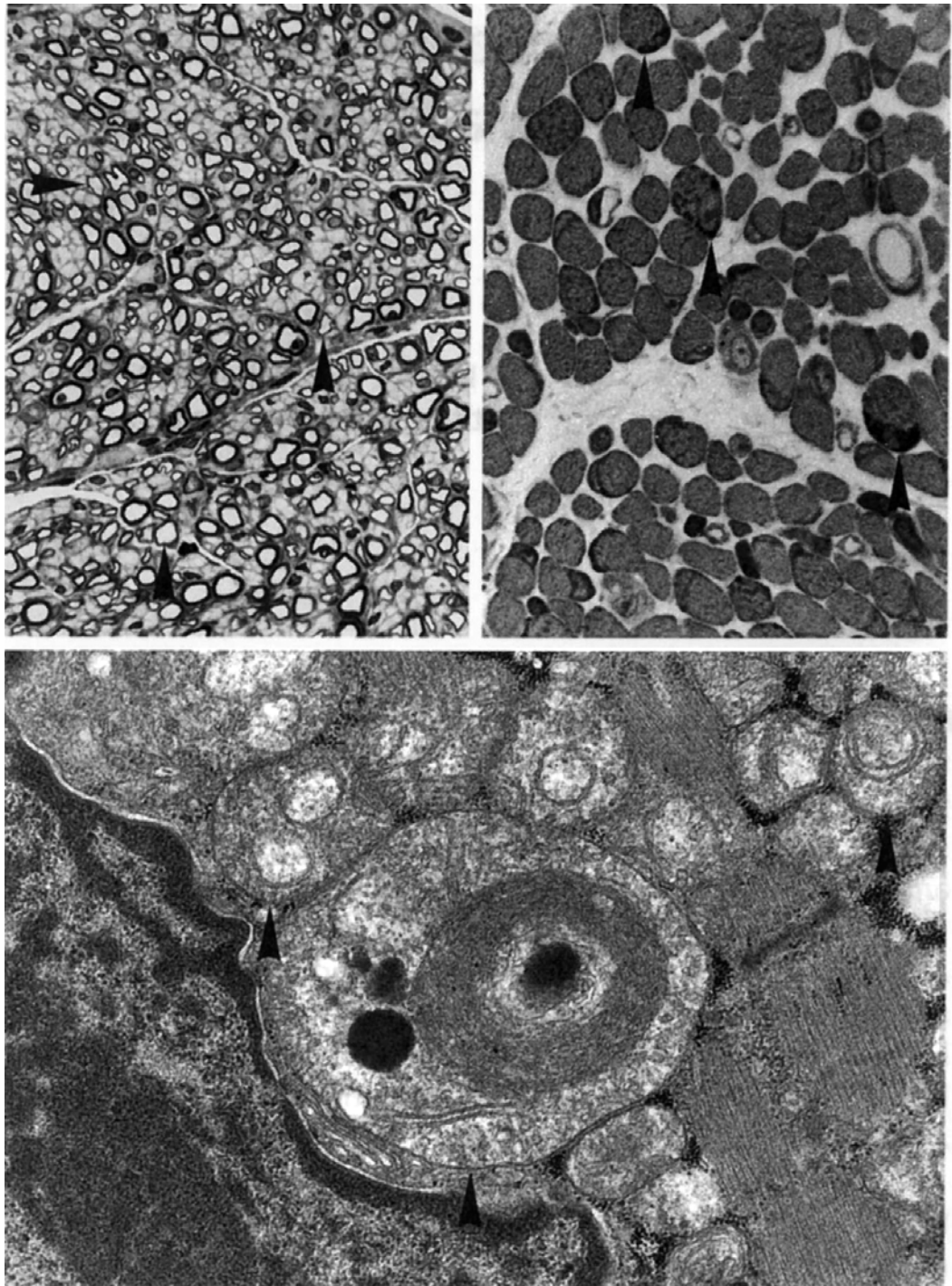
**4.2 Ábra:** Izom és idegbiopszia műgyantába ágyazott metszetei. a.) A nagy myelinizált rostok száma közepes fokban csökkent. Egy kis regenerálódó axonsoport is feltűnik. x 714 b.) Subsarcolemmalis paracrystallin inclusiokat tartalmazó kóros mitochondriumok. x 15.000 c) Büngner szalagok regenerálódó axonokkal (A) és azok nélkül. Egy paranodus (P) is van a képen és egy fibroblastban sok mitochondrium tűnik föl x 11.000

3. Egy infantilis myopathiában szenvedő gyermek *tRNS<sup>Leu(UUR)</sup>* génjében több pontmutációt is detektáltunk. A gyermek légző izmait is érintő generalizált izomgyengesége miatt élete 4. napjától kezdve állandó asszisztált lélegeztetésre szorult. Tetrahypotoniája volt, saját reflexei csaknem hiányoztak. Mozgásfejlődése rendkívül lassú volt, járni soha nem tanult meg. Öt éves korára a

hypotonia csökkent, mozgásai javultak, kezeit használta, megült, de légző izmai változatlanul elégtelenül működtek. A gyermek mentálisan retardált volt. A hisztológiai vizsgálat súlyos mitochondrialis myopathiát talált. Több degenerált rostot a myofibrillaris hálózatot destruáló patológiás szerkezetű mitochondriumok töltöttek ki (4.3, 4.4. Ábra).



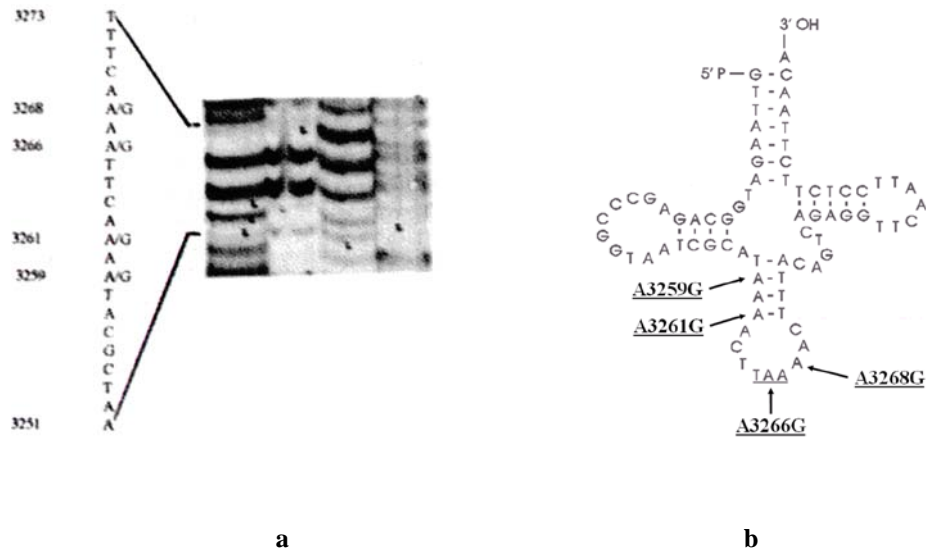
**4. 3. Ábra:** Izombiopszia EM képe. a.) Számos megnagyobbodott mitochondrium látható fragmentált cristával és amorf anyaggal kitöltve. X 9.000 b.) Egy degenerált rostban óriás mitochondriumok (csillag). A nyíllal jelölt lysosoma osmiophil globoid inclusiot tartalmaz. X9.000 c.) Egy atrophias izomrostot kóros mitochondriumok töltenek ki X 8.000. d.) Intermyofibrillaris mitochondriumok torzult cristákkal x 9.000 e.) Extrém nagy mitochondriumok osmiophil inclusiókkal kitöltve, f.) Néhány lysosomában paralell lamellaris struktúrák vannak (nyílhegyek) X 13.000.



**4.4. Ábra:** a.) A n. suralis biopszia a megtartott axon denzitást talált, de a legtöbb kis idegrost myelinhüvelye aránytalanul vékony az axon átmérőjéhez képest (nyílhegyek). Toluidinkék X 440. b.) Az izombiopszia félvékony metszete. Subsarcolemmalisan osmiophil anyag felhalmozódása tünt föl. X 300, c.) Subsarcolemmalis óriás mitochondrium koncentrikus cristázattal és osmiophil intramitochondrialis inclusioval. X25.000

A n. suralisban csak enyhe aspecifikus eltérések voltak. Az izomból izolált mitochondrialis genomban csaknem homoplasmikusan találtunk pontmutációt a *tRNS<sup>Leu(UUR)</sup>* génben a 3259, 3261, 3266 és 3268 nukleotidoknál. A mutációk

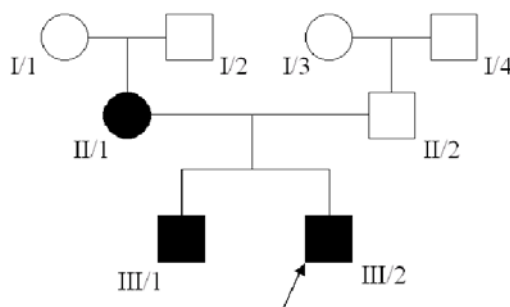
közül kiemelendő a *tRNS<sup>Leu(UUR)</sup>* gén anticodonjában az A3266G báziscsere, mivel ez egy erősen konzervált hely és a pontmutáció következtében a Leu(UUR) genetikai kód Ser(UCN)-né alakult át (4.5. Ábra). A mutációk csak a gyermek izomszövetében voltak jelen. A vérből izolált DNS vizsgálata során egyik mutációt sem találtuk meg, mint ahogy azokat nem találtuk a gyermek maternalis ági felmenőinek vérében sem (6., 11., Közlemény, 4. Absztrakt).



**4.5. Ábra:** a.) 3266. nukleotid pár közvetlen határoló régiójának direkt szekvenálása. Az A nukleotid a betegben a 3266, 3268, 3261 és 3259 pozícióban G-re változott a beteg izomból izolált mtDNS-ben. b.) A talált patogén SNP-k lokalizációjának sematikus ábrázolása a tRNS anticodon karjában

4. Tizenhat éves súlyos dystoniában szenvedő fiú betegünk klinikai tünetei 9 éves korában felsőlégtüneti infekciót követően kezdődtek. Akkor szérumban magas volt a laktát szintje, lumbális liquorában emelkedett fehérje szintet találtak. Jelenleg a dystonia miatt anarthriás, a végtagokban jelentkező dystonia mozgásában súlyosan korlátozza. Neurológiai vizsgálatok a nyelvre és a végtagokra kiterjedő generalizált dystoniát, anarthriás beszédet, diffúz vázizom atrophit és hiányzó reflexeket találtak. EMG vizsgálata neurogén károsodást igazolt. Az EEG, ENG és a koponya MRI kóros eltérést nem talált. Az izombiopszia során enyhe neurogén károsodást láttunk, a rostok 6%-ban módosított SDH festéssel ragged blue-nak, COX festéssel COX negatívnak bizonyult. Az elektronmikroszkópos vizsgálat számos izomrostban subsarcolemmális mitochondriális akkumulációt talált. Édesanyjának kisgyermekkorában stroke szerű epizódja volt, jelenleg hypoacusis, egyensúlyzavara van és a felső végtagjaiban enyhe dyskinesia

látható, mely csak 40-es éveiben jelent meg (4.6. Ábra). Audiológiai vizsgálata sensorineurális hallásvesztést, az ENG axonalis neuropáhiát igazolt. A proband idősebb testvérének is volt gyermekkorában stroke szerű tünete, amely során hemiparesist, magas laktát és ammónia szintet észleltek. Jelenleg az ő végtagjaiban is enyhe dystonia észlelhető, emellett 11 éves kora óta epilepsiás és viselkedészavara van. EEG vizsgálata a bal fronto-centralis régióban epileptiform jeleket írt le. A család klinikai tüneteit a 4.1. Táblázatban mutatjuk be.



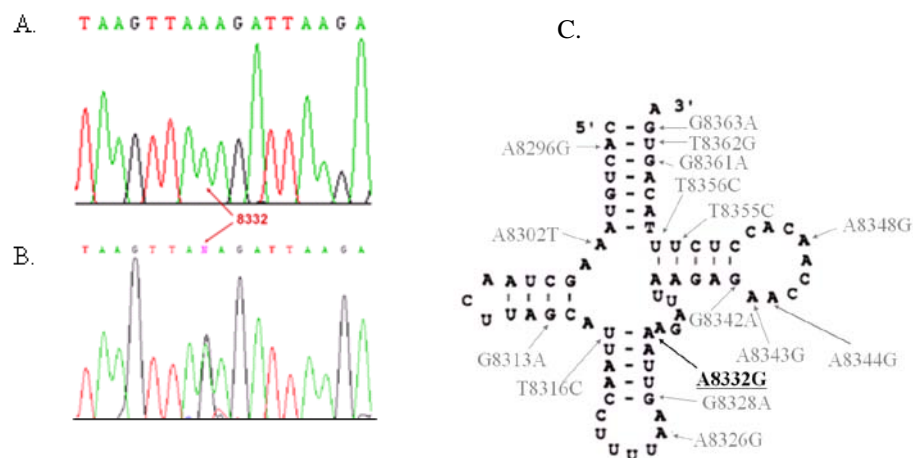
**4.6. Ábra:** A dystoniás beteg családfája

Nem	Életkor	Klinikai tünetek	Laboratóriumi eredmények	Heteroplasmia arány A8332G
Nő I/1	49 év	Hypacusis, dysarthria, ataxia, enyhe dyskinesis, anxietas, gyermekkori ischaemiás stroke	Anaemia	35%
Ffi II/1	19 év	Négy évesen bal hemiparesis, dyskinesis, dystonia, epilepsia, IQ 81	Magas szérum ammónia, laktát és piruvát, emelkedett lumbális liquor összfehérje	17%
Ffi II/2	16 év	Infekció után járászavar, anarthria, hypotrophás izomzat, súlyos generalizált dystonia	Magas liquor összfehérje, vizeletben magas glycin	55%

**4.1. Táblázat:** A dystonia és fiatal kori stroke tüneteit mutató család klinikai tünetei és fontosabb laboratóriumi adatai

A proband szekvencia analízise során a *tRNS<sup>Lys</sup>* génben heteroplasmikus formában a 8332. nukleotid pozícióban adenin guanin csere igazolódott (4.7. Ábra). A mutáció a tRNS antikodon karjában helyezkedik el. Emellett a vizsgált régióban két polymorphizmus (9-bp-os deléción nt 8271-8280 és C8270T) valamint egy részben tisztázatlan jelentőségű SNP (A8347C) is jelen volt. A tRNS-ek, a proteinkódoló és a hipervariábilis régió 1 (HSV1) szekvencia analízise során további 13 SNP igazolódott (4.2., 4.3. Táblázat). A családi szegregációs vizsgálat

során a beteg édesanyjánál és az idősebbik testvérénél is megtaláltuk a fenti eltéréseket. Az érintett család részletes haplocsoport analízisét elvégezve kiderült, hogy az anya és gyermekei a kelet-ázsiai populációra jellemző B haplocsoportba tartoznak. Az A8332G mutáció az irodalomból nem ismert, a 150 kontroll személy vizsgálatakor ezt a szubsztitúciót nem tudtuk kimutatni, így ezt patogénnek feltételezzük. A NADH dehidrogenáz 6. alegységét kódoló génben talált heteroplasmikus C14520G SNP sem ismert az irodalomban, de ezt az SNP-t az általunk vizsgált 150 kontroll közül 13 esetben megtaláltuk, így ezt polymorphizmusnak minősítjük (**31. Közlemény, 25. Absztrakt**). Az A8332G mutáció hatását funkcionális vizsgálattal is igazoltuk. A mitochondriális légzési lánc legnagyobb multi-protein enzim komplex, a Komplex I aktivitása a betegek fibroblasztjaiban szignifikánsan csökkent az egészséges kontrollokhoz viszonyítva (1. beteg: 42%, 2. beteg: 47%, 3. beteg: 65%, az egészséges kontroll: 100%).



**4.7. Ábra:** A.) normális, B.) heteroplasmikus A8332G mutáció szekvenogramja, C.) Az A8332G mutáció lokalizációja a tRNS<sup>Lys</sup> anticodonban és a régió már ismert patogén mutációi



Gén	Nt. pozíció	Nt. csere	A.sav csere	Forma	III/2	III/1	II/1	Minősítés	Irodalom
<i>HVS1</i>	16126	T>C	-	Homopl.	+	+	+	Polymorphizmus	<i>Dirienzo és Wilson, 1991</i>
<i>HVS1</i>	16140	T>C	-	Homopl.	+	+	+	Polymorphizmus	<i>Horai és Hayasaka, 1990</i>
<i>HVS1</i>	16183	A>C	-	Homopl.	+	+	+	Polymorphizmus	<i>Lahermo et al., 1996</i>
<i>HVS1</i>	16189	T>C	-	Heteropl.	+	+	+	Polymorphizmus	<i>Horai és Hayasaka, 1990</i>
<i>HVS1</i>	16209	T>C	-	Homopl.	+	+	+	Polymorphizmus	<i>Horai és Hayasaka, 1990</i>
<i>HVS1</i>	16294	C>T	-	Homopl.	+	+	+	Polymorphizmus	<i>Horai és Hayasaka, 1990</i>
<i>HVS1</i>	16296	C>T	-	Homopl.	+	+	+	Polymorphizmus	<i>Horai és Hayasaka, 1990</i>
<i>HVS1</i>	16311	T>C	-	Homopl.	+	+	+	Polymorphizmus	<i>Horai és Hayasaka, 1990</i>

**4.2. Táblázat:** Az mtDNS HVS1 régióban talált eltérései a vizsgált dystoniás családban

Gén	Nt. pozíció	Nt. csere	A.sav csere	Forma	III/2	III/1	II/1	Minősítés	Irodalom
<i>ND1</i>	4216	T>C	Tyr/His	Homopl.	+	+	+	Nem szinonim szubsztitúció	<i>Torroni et al., 1999</i>
<i>NC7</i>	8270	C>T	-	Homopl.	+	+	+	Szinonim szubsztitúció	<i>Ruppert et al., 2004</i>
<i>NC7</i>	Del. nt. 8271-8280	-	-	Homopl.	+	+	+	Szinonim szubsztitúció	<i>Lorenz és Smith, 1994</i>
<i>tRNS Lys</i>	8332	A>G	-	Heteropl.	55%	17%	35%	Patogén mutáció	
<i>tRNS Lys</i>	8347	A>C	-	Homopl.	+	+	+	Nem szinonim szubsztitúció	<i>Coon et al., 2006</i>
<i>ATP6</i>	8697	G>A	-	Homopl.	+	+	+	Szinonim szubsztitúció	<i>Rieder et al., 1998</i>
<i>tRNS Arg</i>	10463	T>C	-	Homopl.	+	+	+	Nem szinonim szubsztitúció	<i>Houshmand et al., 1994</i>
<i>ND4</i>	11812	A>G	-	Homopl.	+	+	+	Szinonim szubsztitúció	<i>Howell et al., 1995</i>
<i>ND6</i>	14520	C>G	Gly/Arg	Heteropl.	40%	25%	15%	Nem szinonim szubsztitúció	

**4.3. Táblázat:** Az mtDNS tRNS és protein kódoló génjeiben talált eltérések a dystoniás családban

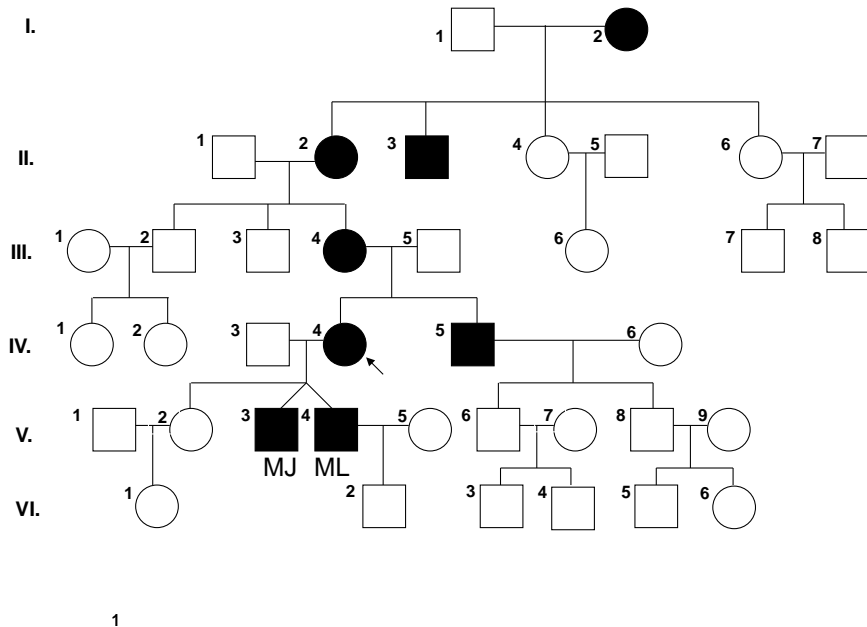
#### 4.1.2. Fenotípus variációk MERRF (myoclonus epilepsia, ragged red fiber) szindrómában

A MERRF szindróma jellegzetes klinikai tünete a myoclonus epilepsia, mint ahogy a betegség elnevezése is mutatja. Az általunk vizsgált jellegzetes A8344G MERRF mutációt hordozó betegek csak kis hányadának volt myoclonus epilepsiája, klinikumuk rendkívül változatos volt. Két MERRF szindrómás család 2 ikerpárját vizsgáltuk (egyik egypetűjű, másik kétpetűjű ikerpár). A kétpetűjű ikerpár kapcsán új fenotípust találtunk a jellegzetes MERRF mutációval

kapcsolatban. Az egyetétű ikerpárnál a betegség a jellegzetes MERRF szindróma formájában jelentkezett. Az ő esetük érdekessége, hogy az életkor előrehaladtával az eleinte csaknem identikus fenotípus egymástól egyre jobban eltért, mint ahogy eltért alaptünetük kezelési stratégiája is.

*a. Új fenotípus (depressziós tünetegyüttes) társítása ismert mitochondrialis mutációkkal*

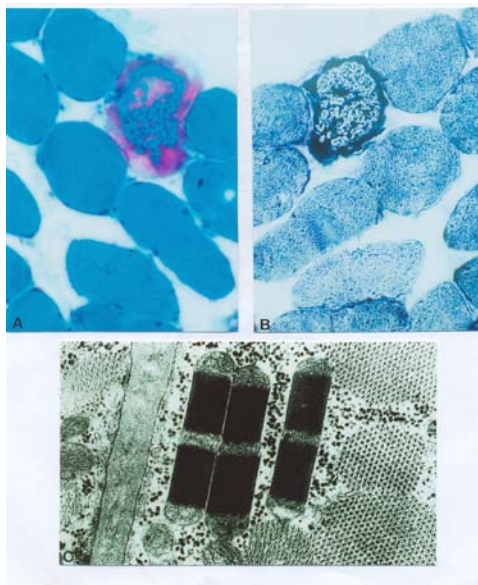
Egy magyar családban a 63 éves probandnak két érintett heterozygota ikreit valamint panasz és tünetmentes lányát vizsgáltuk. Elmondása szerint bátyjának, anyjának és nagybátyjának voltak hasonló pszichiátriai és neurológiai tünetei (4.8. Ábra).



**4.8. Ábra:** az A8344G mutációt hordozó súlyos pszichiátriai tüneteket is mutató betegek családfája

A probandnak húszas éveiben 3 alkalommal súlyos depressziós tünetekkel járó posztpartum pszichózis volt. Ötvenhét és 60 éves korában súlyos major depresszió, anxietas, testsúlycsökkenés, suicid készletés miatt hospitalizáltak. Ötvenes éveiben végtag öv típusú izomgyengeséget észlelt, amely lassú progressziót mutatott. Fizikális vizsgálata generalizált lipomatosist, hypacusist, valamennyi végtagövben enyhe izomatropiát és gyengeséget, csökkent sajátreflexeket és törzsataxiát talált. Kognitív diszfunkciója, depresszív hangulata (Hamilton Score 35, ami súlyos depressziót jelzett), közepesen súlyos anxietas

volt. Szérum CK-ja enyhén emelkedett (250 U/l). Az EMG kevert myopathiás és neurogen eltéréseket észlelt. A koponya MRI normális volt. A n. suralis biopsziában enyhe axonalis neuropathiát láttunk, az izombiopsziában számos ragged red és COX negatív rost ábrázolódott (4.9. Ábra). Az elektronmikroszkópia intramitochondriális paracrystallin inclusiákat detektált (4.9. Ábra). A 2. beteg (a proband iker fiainak egyike) fiatal felnőttkorától kezdve kifejezett szorongással járó depresszív állapotokról számolt be. Az elmúlt években enyhe kognitív diszfunkció is kialakult. Harminc éves korától progresszív végtagöv típusú izomdystrophiája van.



**4. 9. Ábra:**

- A.) Típusos ragged red rost. Gömöri-Trichrome festés x 200,
- B.) Típusos ragged blue rost. Módosított SDH festés x200.
- C.) Elektronmikroszkópia: típusos intramitochondriális paracrystallin inclusio x 10.00

Vizsgálatakor hypacusist, dysarthriát, súlyos végtagöv típusú izomatropiát és gyengeséget, csökkent sajátreflexeket, distalis típusú érzészavart, ataxias járást találtunk. Időnként agitált, kritikátlan, máskor depressziós (Hamilton Score: 18).

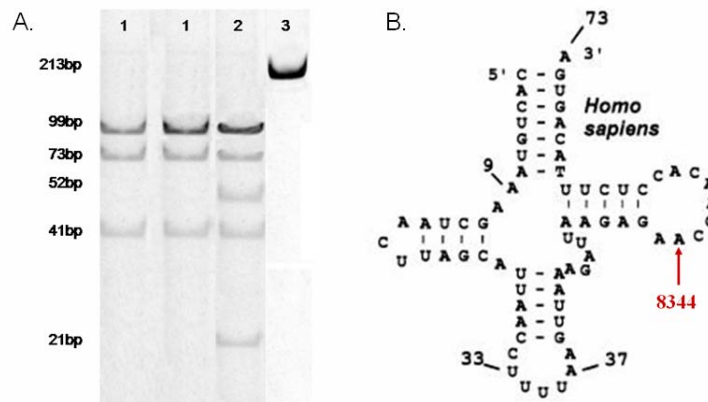
A szérum CK 550U/l, a szérum laktát 6,1 mmol/l (norm $\leq$ 1,8 mmol/l). Az ENG axonalis típusú polyneuropathiát, az EMG kevert típusú károsodást írt le.

Izombiopsziája mitochondrialis betegségre utalt. A 3. beteg (a proband másik iker fia) 18 évesen súlyos szorongás és fóbiás manifesztációk miatt került kórházba.

Vizsgálatakor tünetmentes. Az mtDNS mutáció analízis PCR amplifikációt követő Ban II enzimatis emésztést követően A8344G pontmutációt talált valamennyi fent leírt betegben. A heteroplasmia arány az izomban a következő volt: 82 % az 1. betegben, 79 % a 2. betegben, 63% a 3. betegben (4.10. Ábra).

Ábra). A heteroplasmikus mutáció valamennyi beteg vérében is jelen volt, míg az

ikrek egészséges lánytestvérnek a vérében nem találtunk mutáns mtDNS molekulákat (**28. Közlemény, 10. Absztrakt**).



**4.10. Ábra:** A.) A MERRF mutációra (A8344G) és a normál genotípusra jellegzetes RFLP mintázat. Az emésztetlen termék 213bp hosszú (3 band), a vad 99, 73 és 41bp-os fragmentekre hasad (1-el jelölt bandek). A mutáció miatt a 73bp-os fragment még kétfelé hasad: 52 és 21bp-ra (2-vel jelölt bandek). B.): az A8344G mutáció lokalizációja a tRNS<sup>Lys</sup>-ben

*b. Fenotípus variáció MERRF mutációval rendelkező egypetéjű ikrekben*

A két 30 éves férfi normális ikerterhességből született. 17 éves korukban néhány hónap különbséggel myoclonus absence-ok jelentkeztek. Neurológiai vizsgálatuk akkor a gracilis izomzaton kívül egyéb kórjelet nem talált. Laboratóriumi vizsgálatuk mindkettőjükénél thrombocytopeniát igazolt. Valproat és clonazepam mellett az 1. beteg gyakorlatilag rohammentessé vált, míg a 2. betegnél a testvérével azonos dózisban beállított gyógyszerek mellett is gyakran jelentkeztek a myoclonusok. A 2. beteg testsúlya 29 éves korától fokozatosan csökkent, progresszív ataxia, kognitív hanyatlás jelentkezett, majd banális infekciót követő hőemelkedést követően 2 napig tartó myoclonus státusz epilepticus alakult ki a jobb oldali végtagokban. A myoclonusok megszűnése után jobb oldali hemiparesis alakult ki, mely miatt a beteg hetekre járásképtelenné vált. Jelenleg clonazepam, valproat, leviracetam, phenobarbital adása mellett csak ritkán jelentkeznek a myoclonusok, enyhe jo-i hemiparesise javult, súlyos ataxiája, fej és végtagtremora van, beszéde dysarthriás. Évente 1-2 alkalommal vannak metabolikus krízisei, amikor az ataxia oly mértékűvé válik, hogy segítséggel is járásképtelen. Az elmúlt 2 évben kognitív hanyatlást is észleltünk, hangulata mélyen fekvő. Ikertestvére clonazepam és valproat szedése mellett rohammentes és munkaképes, mindössze gracilis izomzatot, enyhe végtagtremort talált

neurológiai vizsgálata. Mindkét beteg genetikai vizsgálata során az mtDNS 8344. nukleotidjánál A-G pontmutáció igazolódott a *tRNS<sup>Lys</sup>* génben 60 és 55 %-os heteroplasmia arányban. A mutációt neurológiai tünetekkel nem rendelkező édesanyjuk is hordozza. Monozygota iker státuszukat polymorph DNS markerekkel történő genetikai vizsgálat igazolta. A vizsgálatot a SE I. Női Klinikáján Dr. Nagy Bálint végezte el (**21. Absztrakt**).

#### *MERRF mutáció következtében kialakuló MELAS szindróma*

Egy 22 éves férfi betegünk anamnézisében jobb oldali n. abducens paresis szerepelt gyermekkor óta. Egy maternalis ági unokatestvérét epilepsia miatt kezelik. A beteg kórházi felvételére súlyos fejfájás, a jobb oldali végtagok gyengesége, érthetetlen beszéd, és meglassult psychomotilitás miatt került sor. Neurológiai vizsgálata során diplopia, harmadfokú nystagmus, bal oldali perifériás n. facialis lesio, dysarthria, jobb oldali hemiplegia és hemihypasthesia igazolódott. Sajátreflexei jobb oldalon fokozottak voltak, iniciatíva szegény, soporosus volt. Akut koponya CT-je nem talált eltérést, míg a 24 órával a rosszullét kezdetét követően készült koponya MRI 2x1.5 cm ischaemiás lesiot talált a pons bal oldali paramedian régiójában. Az MRA az intracraniális ereken nem talált eltérést, de az arteria basilaris kanyargós volt. A rutin laboratóriumi eredmények (haemostasis vizsgálatok is) normálisak voltak. Protein S, protein C deficiencia, Leiden mutáció, antithrombin III deficiencia, prothrombin G20210A variáció) nem igazolódott. Immunserológiai vizsgálata az antiphospholipid syndromát kizárta. Echocardiographia embóliaforrást nem talált. A carotisok és intracranialis erek Doppler vizsgálata normális eredménnyel zárult. Genetikai vizsgálata során az mtDNS A8344G MERRF-re jellegzetes mutációja igazolódott a beteg vérében relatíve alacsony 35 % heteroplasmia arányban. A beteg állapota spontán javult, jelenleg tünetmentes. Édesanyja és testvérei vérében a szegregációs vizsgálat során a patogén mutációt az alkalmazott PCR-RFLP technikával nem találtuk meg. Ezt magyarázhatja az alacsony heteroplasmia arány is, de a mutáció tényleges hiánya is.

#### **4.1.3. Az mtDNS *tRNS<sup>Lys</sup>* mutációinak elemzése mitochondrialis betegségekben**

Az mtDNS-ben talán tRNS-ekben fordulnak elő leggyakrabban patogén mutációk. Az irodalmi adatok szerint a tRNS<sup>Leu</sup> a leggyakrabban vizsgált mtDNS szakasz. A tRNS<sup>Lys</sup> is mutációs hot spotnak számít, de ezt ennek ellenére kevesebben vizsgálták. Ezért azon betegeinknél, ahol felvetődött a mitochondriális betegség gyanúja szisztematikusan elemeztük az mtDNS *tRNS<sup>Lys</sup>* génjét és a határoló szomszédos régiót. A vizsgálatot az A8344G mutáció elemzésére alkalmas RFLP technikával kezdtük. Azon betegek esetén, akiknél az RFLP vizsgálatok nem mutattak eltérést, de a klinikai tünetek, a laboratóriumi eltérések, valamint az izombiopszia során látott morfológiai változások során a mitochondriális betegség alapos gyanúja továbbra is fennállt, a fenti pontmutációk elemzését és a mitochondriális tRNS gének szekvencia analízisét posztmitotikus szövetből (vázizom) is elvégeztük. A mutációk analízise során az A8344G szubsztitúcióra jellegzetes RFLP hasítási mintán kívül 5 egyéb különböző hasítási mintázatot észleltünk. Ezeket a fenti nukleotidot is magában foglaló *tRNS<sup>Lys</sup>* gén és határoló régiók szekvenálásával vizsgáltuk tovább. A szekvencia analízis során összesen 54 esetben 10 különböző mtDNS variációt találtunk. A talált mtDNS SNP-eket és azok klinikai jelentőségét az alábbiakban ismertetjük.

### *1. Az irodalomból ismert, bizonyítottan patogén mutációk*

Az mtDNS A8344G szubsztitúciója

A klasszikus MERRF szindrómára tipikus A8344G mutációt (Shoffner et al 1990) 15 esetben találtuk meg **(28. Közlemény, 10., 21., 26. Absztrakt)**. A mutáció izolált előfordulását 9 esetben igazoltuk, valamint egy család (3 fő) esetében az A8344G nukleotid szubsztitúció mellett a vizsgált régióban további két mtDNS SNP (G8251A, A8347C) is kimutatható volt. A patogén A8344G a tRNS<sup>Lys</sup> T-loopjában helyezkedik el a tRNS 55. nt pozíciójában (4.10. Ábra). A mutációt hordozó egyéneknél a BanII restrikciós enzimnek egy plusz kötőhelye alakul ki (4.10. Ábra). A PCR–RFLP vizsgálattal kapott eltérést szekvencia analízissel validáltuk (4.11. Ábra). Az A8344G mutációt hordozó betegek klinikai tünetei változatos képet mutattak, a myoclonus epilepsia mellett okozott myopathiát, nagyothallást, progresszív ophthalmoplegia externát (PEO), fiatalkori ischaemiás stroke-ot, és mentális hanyatlást (4.4. Táblázat).

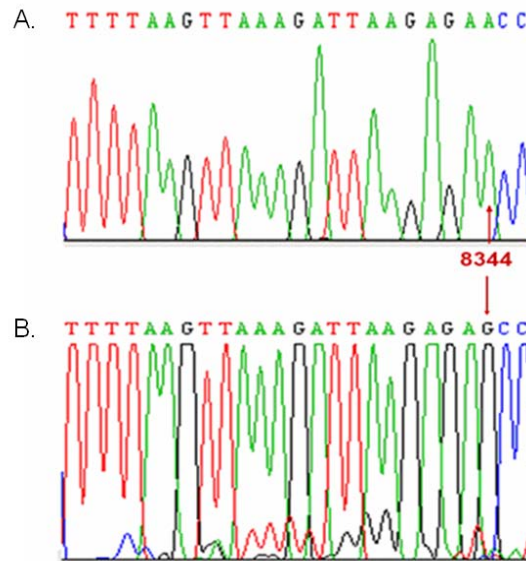
Nem	Életkor	Klinikai tünetek	Myopathológiai lelet	HP % vérben	Családi anamnesis
Ffi	33 év	Myoclonus epilepsia, fejtremor, dysarthria, ataxia, kognitív hanyatlás, depresszió thrombocytopenia	COX negatív és ragged red rostok, megaloclonalis mitochondriumok	60%	Ikerestvér myoclonus epilepsia
Ffi	33 év	Myoclonus epilepsia, végtag tremor, depresszió, thrombocytopenia	Nem történt biopszia	55%	Ikerestvér myoclonus epilepsia
Nő	59 év	Tünetmentes	Nem történt biopszia	30%	Ikerfiai: myoclonus epilepsia
Ffi	48 év	Myopathia, cardiomyopathia, polyneuropathia, ataxia, mentális hanyatlás, depresszió, szorongás	Myopathia, ragged red és COX negatív rostokkal, paracrystallin mitochondriális inklúziók	58%	Mater: súlyos myopathia, ataxia, depresszió Ikerestvér: súlyos anxiétás
Ffi	48 év	Súlyos anxiétás, fóbia	Minimális nem specifikus elváltozások	44%	Mater: súlyos depresszió, myopathia, ataxia, Ikerestvér: depresszió, ataxia, myopathia
Nő	68 év	Depresszió, myopathia, nagyothallás, ataxia	Ragged red és COX negatív rostok, paracrystallin inklúziók	46%	Ikerfiai: ataxia, myopathia, depresszió, szorongás
Nő	51 év	TIA	Nem történt biopszia	30%	Maternalis ágon: colon tumor, diabetes mellitus csecsemőhalálzás, vesebetegség
Ffi	24 év	Ischaemiás stroke	Nem történt biopszia	30%	Maternalis ági unokatestvér epilepsias
Ffi	45 év	Ptosis, myopathia, krónikus PEO, hypothyreosis	Myopathia, ragged red rostok,	40%	Negatív
Ffi	45 év	Myopathia, izomgörcsök	Myopathia, COX negatív rostok, subsarcolemmális mitochondrium halmozódás	35%	Negatív
Nő	17 év	Myalgia	Polymyositisre emlékeztető szövettani kép	43%	Anyja mutációt hordozó tünetmentes
Nő	41 év	Tünetmentes	Nem történt biopszia	25%	Lánya: myalgia
Ffi	32 é	Migrén, depresszió polyneuropathia, beszűkült vesefunkció,	Nem történt biopszia	38%	Anyai ágon halmozódó depresszió, migrén

**4.4. Táblázat:** A *tRNS<sup>Lys</sup>* gén vizsgálata során talált A8344G patogén mutációval rendelkezők klinikai tünetei és a vérben talált heteroplasmia arányok

*Az irodalomban eddig még le nem írt új patogén mtDNS mutáció A8332G szubsztitúció*

A dystonia, stroke-szerű tünetekkel rendelkező család klinikumát és részletes genetikai eredményeit 4.1.1 fejezetben ismertettük (**31. Közlemény, 25.**

**Absztrakt)**



**4.11 Ábra:** A.) Az A8344G szubsztitúciót mutató szekvenogram, B.) Normális szekvencia

*Az irodalomból SNP-nek ismert, feltehetően neurodegeneratív betegségekre hajlamosító nem szinonim szubsztitúció: az mtDNS A8347C szubsztitúciója*

A szekvencia analízis során a tRNS<sup>Lys</sup> T-loopjába lokalizálódó A8347C szubsztitúciót 19 esetben találtuk meg a betegek vizsgálata során. Ebből izoláltan négy esetben, a G8251A SNP-vel kombinálva három esetben, míg további 11 esetben patogén mutációkkal együtt fordult elő. Ezt az SNP-t Coon et al. (2006) Alzheimer-kóros betegekben szignifikánsabban nagyobb arányban találták meg, mint az egészséges kontroll egyéneknél. Az egészséges kontroll egyéneinkben ez a szubsztitúció nem volt jelen. Az általunk vizsgált betegek körében ennek a mutációnak a meglétét nem gondoljuk patogénnek, de nem zárjuk ki annak lehetőségét, hogy egyéb gének mutációival együtt előfordulva degeneratív központi idegrendszeri valamint izom betegségekre hajlamosíthat.

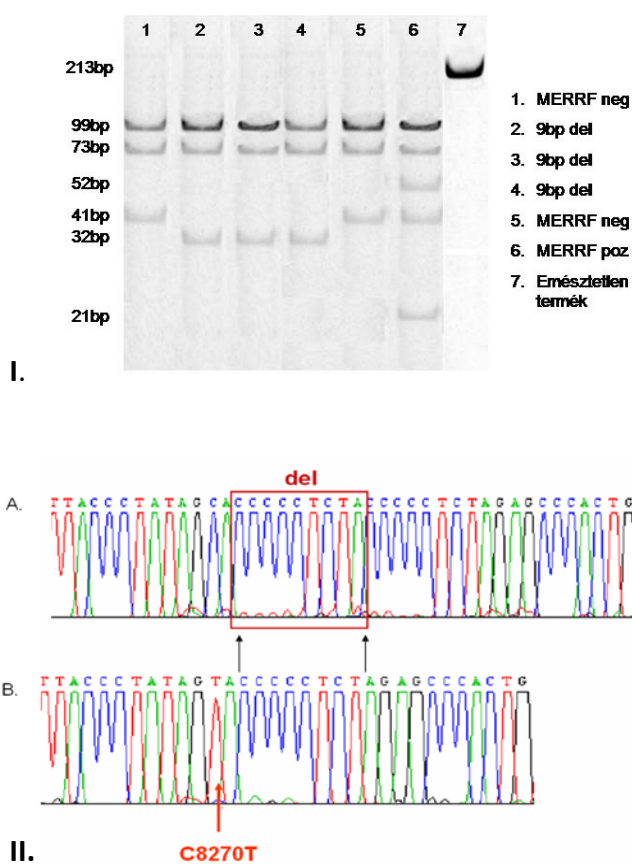
*Az irodalomból ismert polymorphizmusok jelenléte*

1. A 9 bázispáros deléció (del8271-8280)

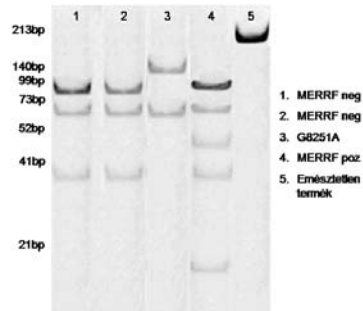
Az mtDNS nt 8271-8280 közötti szakaszában – a *COII* és tRNS<sup>Lys</sup> gének közti hipervariábilis intergénikus régióban - egy 9bp-os deléciót öt betegben találtunk meg (4.12. Ábra), amely minden esetben a szinonim C8270T szubsztitúcióval és a homoplasmikus A8347C nem szinonim szubsztitúcióval társult. A korábban már ismertetett dystoniás család három tagjában emellett heteroplasmikus formában az



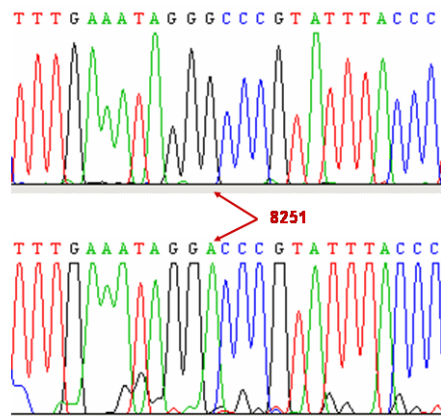
A8332G nukleotid cserét is ki tudtuk mutatni (**31. Közlemény, 25. Absztrakt**). A deléció kelet-ázsiai antropológiai markerként ismert az irodalomban, melyet Európában eddig nagyon ritkán írtak le. A C8270T SNP is az irodalomból polymorphizmusként ismert (Ruppert et al. 2004). Az mtDNS haplotípus analízise (a vizsgálatot végezték Dr. Raskó István és mtsai.) 3 beteg az ősi B haplocsoportba, 1 beteg a dél-kelet-Európára és a közép-mediterrán vidékre jellemző HV, 1 pedig észak-nyugat-Európában jellemző U5a1 haplocsoportba tartozott.



**4.12. Ábra:** I. A 9bp deléció: PCR, majd BanII emésztést követő polyacrylamid elektroforézis képe. A 2.,3., és 4. oszlopban látható a 9 bp deléció jelenléte, a 6. oszlopban A8344G mutáció igazolódott. II. Az mtDNS 8271-8280 régiójában látható 9 bp deléció és a közvetlen előtte elhelyezkedő C8270T mutáció szekvenogramja (A: normális szekvencia, B: a 9bp deléciót és a C8270T SNP-t tartalmazó szekvenogram)



I.



II.

**4.13. Ábra:** A G8251A szubsztitúció. I. PCR, majd BanII emésztést követő polyacrylamid elektroforézis képe: 1. és 2. oszlop: normális RFLP mintázat, 3. oszlop: G8251A szubsztitúció, 4. oszlop A8344G szubsztitúció. 5. oszlop: emésztetlen PCR termék- II. A G8251A szubsztitúciót mutató szekvenogram

#### mtDNS G8251A szubsztitúció

Vizsgálataink során a *COII* terminális szakaszában lokalizálódó G8251A szubsztitúciót 19 esetben találtuk meg. A restriktív mintázatban a BanII enzim egyik felismerő helye kiesett, így a normálistól eltérő gélképet kaptunk (4.13. Ábra). A mutáció pontos helyét bidirekcionális szekvenálással határoztuk meg (4.13. Ábra). Ez az SNP az irodalomból polymorphizmusként ismert (Brandstätter et al. 2003), az ősi L és N haplocsoportokra jellemző eltérés. A szubsztitúció 13 esetben izoláltan, 3 esetben az A8344G és A8347C mutációkkal együtt, míg újabb 3 esetben az A8347C mutációval kombináltan fordult elő. A kontroll szekvenciák vizsgálata során ezt a polymorphizmust három esetben találtuk meg.

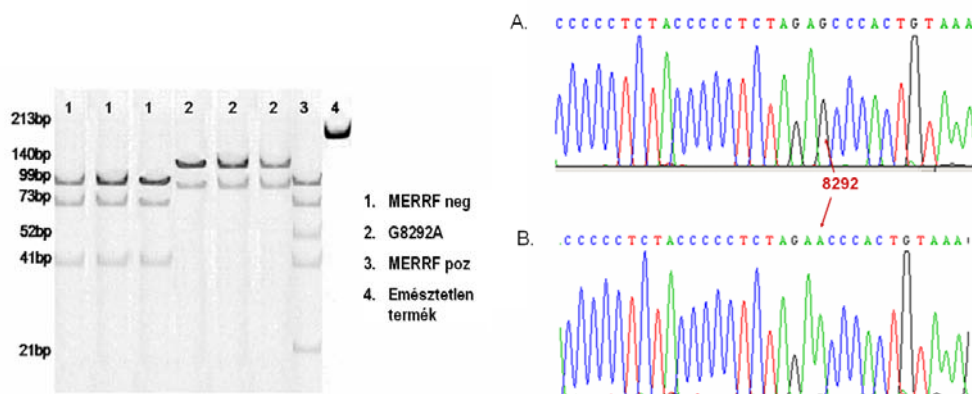
#### mtDNS G8269A szubsztitúció

A *COII/trNS<sub>Lys</sub>* régió szekvenálása során a G8269A szubsztitúció egy beteg és egy kontroll személy esetében volt kimutatható. Ez az SNP az irodalomból

polymorphizmusként ismert (Rieder et al. 1998), elfordulása a nyugat-európai H4a és J1b haplocsoportokban gyakori.

#### mtDNS G8292A szubsztitúció

Három beteg vizsgálatakor a restriktíós mintázatban a BanII enzim egyik hasítási helye kiesett, így a normálistól eltérő gélképet kaptunk (4.14. Ábra). A szekvencia analízis során ennek háttérében a G8292A szubsztitúció igazolódott, amely a *tRNS<sup>Lys</sup>* és a *COII* közti intergénikus régióban helyezkedik el. A hátréből két esetben volt lehetőség családi szegregációs vizsgálatra, amelynek során további 5 esetben tudtuk kimutatni a kérdéses mtDNS variációt. Mindkét családban maternalis halmozódású migrént találtunk. Az egyik vizsgált családban a proband tünetei közül a migrén megléte mellett kiemelendők az ismétlődő tranzienis ischaemiás attackok, a hypothyreosis és mélyvénás thrombosis. A beteg testvérének és édesanyjának epilepsiás rohamai voltak. A másik családban egy 16 éves komplikált migrénben szenvedő leány vizsgálata kapcsán derült fény az mtDNS G8292A szubsztitúcióra. A beteg szintén migrénes édesanyja is hordozza a mutációt. Az irodalomból ez a szubsztitúció polymorphizmusként ismert (Kleinle et al. 1998), amely az R0 haplocsoportot határozza meg. A G8292A szubsztitúció és a migrain kapcsolatát eddig még nem vizsgálták.



I. **4.14. Ábra:** A G8292A szubsztitúció. I.) PCR, majd BanII emésztést követő polyacrylamid elektroforézis képe. 1. oszlopok: normális RFLP mintázat, 2. oszlopok: G8292A szubsztitúció, 3. oszlop A8344G szubsztitúció. 4. oszlop: emésztetlen PCR termék. II.) A.) a G8292A szubsztitúciót mutató szekvenogram B. Normális szekvencia

#### Egészséges kontroll egyének *tRNS<sup>Lys</sup>* génjének vizsgálata

Az irodalomból nem ismert újonnan talált mtDNS variációk patogenitásának

vizsgálatára az adott régió szekvencia analízisét 150 kontroll személyen végeztük el (67 ffi és 83 nő). Ezen csoport átlagéletkora 43,7 év volt (férfiak: 41,1 év, nők: 45,7 év). Az egészséges kontroll csoport szekvenciáit hasonlítottuk össze a cambridge-i referencia szekvenciával, majd a betegek szekvenciáival. A G8251A polymorphizmust 4 esetben, míg a G8269A SNP-t 2 személynél tudtuk kimutatni. A kontroll csoportban a szekvencia analízissel egyéb mtDNS eltérés nem volt detektálható.

### **tRNS<sup>Lys</sup> és határoló régióinak vizsgálatokor talált eltérések összefoglalása**

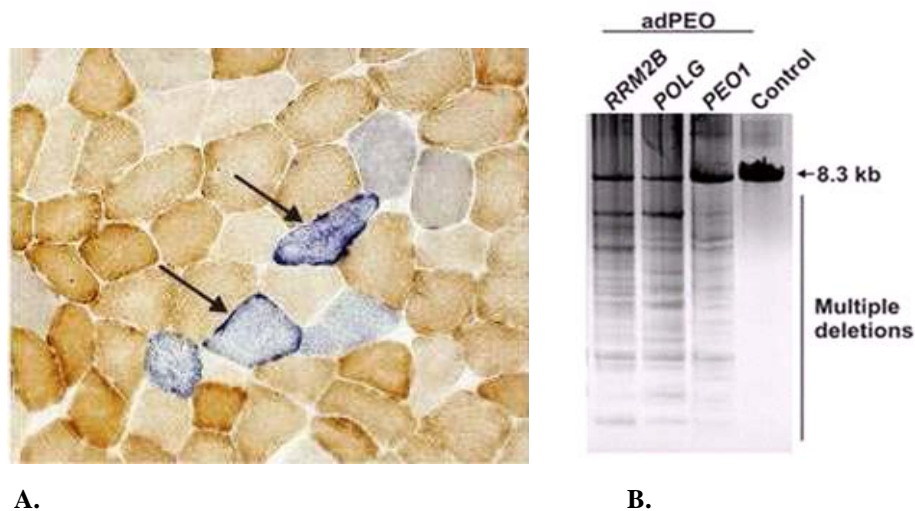
A vizsgált régió egy heteroplasmikus mutációját elsőként írtunk le, egy ismert patogén mutáció jelenlétét 11 betegben és 2 hozzátartozóban igazoltuk, egy valószínűleg neurodegeneratív betegségekre hajlamosító SNP-t (A8347C), valamint 5 polymorphizmust és antropológiai markert találtunk (4.5 Táblázat). Az egyes eltérések nem csak egyedileg fordultak elő, hanem a betegekben ezek kombinációját is megtaláltuk (**26. Absztrakt**).

<b>Mutáció</b>	<b>Lokalizáció</b>	<b>Beteg (Össz/kombinált)</b>	<b>Kontroll</b>	<b>Minősítés</b>	<b>Irodalom</b>
<b>A8344G</b>	tRNS Lys T-loop	12/5	0	Patogén	Shoffner et al., 1990
<b>A8332G</b>	tRNS Lys antikodon-kar	3/3	0	Új patogén	Gál et al. 2009
<b>A8347C</b>	tRNS Lys T-loop	19/15	0	Polymorphizmus (szuszeptabilitási faktor?)	Coon et al., 2006
<b>G8251A</b>	<i>COII</i>	19/6	4	Polymorphizmus	Brandstätter et al. 2003
<b>G8269A</b>	<i>NC7</i>	1/0	2	Polymorphizmus	Rieder et al. 1998
<b>C8270T</b>	<i>NC7</i>	4/4	0	Polymorphizmus	Ruppert et al. 2004
<b>Del 8271-8280</b>	<i>NC7</i>	4/4	0	Antropológiai marker (polymorphizmus)	Horai et al. 1996
<b>G8292A</b>	<i>NC7</i>	8/0	0	Polymorphizmus	Kleinle et al. 1998

**4.5. Táblázat:** A tRNS<sup>Lys</sup> és határoló régióiban talált mtDNS eltérések összesítése

#### **4.1.4. Az RRM2B gén heterozygota mutációjának új klinikai megjelenése: autosomalis domináns progresszív ophthalmoplegia externa**

A mitochondrialis betegségek nemcsak maternalisan, hanem mendeli szabályokat követően is öröklődhetnek. A PEO autoszomalisan domináns öröklődésű változata (adPEO) hátterében eddig az *SLC25A4*, *POLG*, *POLG2*, *PEO1* és *OPA1* gének mutációit írták le. Egy európai származású nagy észak-amerikai család (13 érintett egyén) vizsgálata tette lehetővé, hogy egy finn kutatócsoporttal együttműködve linkage analízissel keressük a betegség hátterében álló további hibás géneket. Az észak-amerikai család mellett egy magyar adPEOs nagy családnál is az izombiopszia egyértelműen igazolta a cytochrome c oxidase festés hiánya alapján a mitochondrialis diszfunkciót (4.15. Ábra)

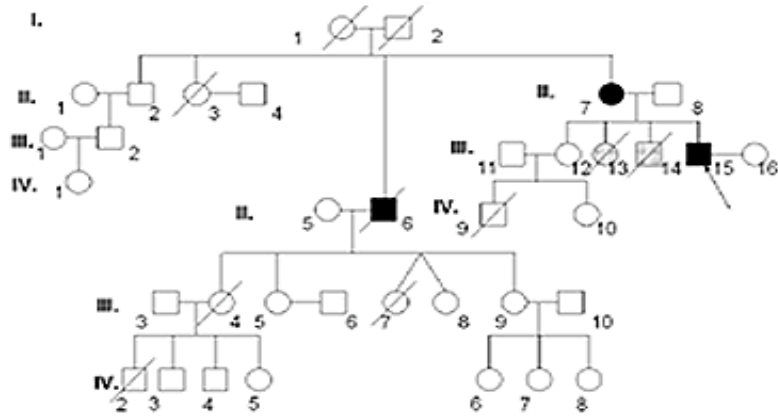


**4.15. Ábra:** A.) Ragged blue rostok az izombiopsziában. Módosított SDH festés x 300. B.) A hosszú PCR analízis multiplex mtDNS deléciókat mutat az egyik adPEOs beteg izommintájában. (8.3 Kb fragmentet amplifikáltunk)

A genetikai vizsgálat mindkét esetben multiplex mtDNS deléciókat talált (4.16. Ábra). A *POLG*, *POLG2*, *PEO1* génekből, egyik családban sem találtunk eltérést. Az amerikai család 12 családtagjának (9 érintett, 3 egészséges) linkage analízise 8. kromoszóma RS874643 és RS1019603 SNP-k közötti 16 MB régiójában szignifikáns linkage-t talált (8q22.1-8q23.39). A 17 SNP marker által mutatott maximum multipoint LOD score 3.6 volt. Nem volt linkage viszont az adPEO hátterében korábban már igazolt 10q24, 2 4q35, 15q25, 17q23 és 3q28-q29 lokuszokhoz. A 8q22.1-8q23.3 pozitív linkage régió 59 ismert és prediktált gént tartalmazott. Ezek közül az *RRM2B*-ről már ismert volt, hogy az mtDNS kópia szám szabályozásában szerepe van, ezért ezt vizsgáltuk először. Az általunk vizsgált családokban az mtDNS kópia szám normális volt (4.15. Ábra). Az

RRM2B-nek 9 exonja van, amely 35kb nagyságú régiót fed le a 8-as kromoszómán. A teljes hosszúságú mRNS-e 4,955 bp és az egy 351 aminosav hosszúságú fehérjét, a p53R2-t kódolja. Az érintett családok *RRM2B* génjének szekvenálása során heterozygota a c.C979T mutáció igazolódott mindkét családban (4.15 Ábra). A mutáció következtében egy arginin helyére korai stop kodon épült be (p.R327X), ami kb. 25 aminosavval rövidebb fehérje keletkezését eredményezte (4.17 Ábra). A magyar probandnak a PEO mellett (4.16. Ábra) cardiomyopathiája volt, a neuropszichológiai vizsgálata cognitív hanyatlást jelzett. Testvére súlyos alkoholista volt, mely háttérben depresszív hangulat, anxietas igazolódott. Neurológiai vizsgálata a PEO mellett hypoacusist, renyhe sajátreflexeket, polyneuropathiát, enyhe törzsataxiát és cognitív hanyatlást talált. Édesanyjuk a PEO mellett egyéb tünettől nem rendelkezett. Testvérük malignus hematológiai betegség következtében exitált. Maternalis nagybátyjuk, annak lánya és nagynénjük szintén PEO tüneteit mutatja. (4.16. Ábra). A 2 család közötti rokonsági kapcsolatot haplotípus analízissel zártuk ki. A patogenitás igazolására 380 európai eredetű kontroll kromoszómát vizsgáltunk meg és ezek közül egyikben sem volt jelen a mutáció. További 5 adPEO tüneteit mutató, multiplex szekunder mtDNS delécióval rendelkező, de még tisztázatlan etiológiájú családban nem találtunk rendellenességet az *RRM2B* génben.

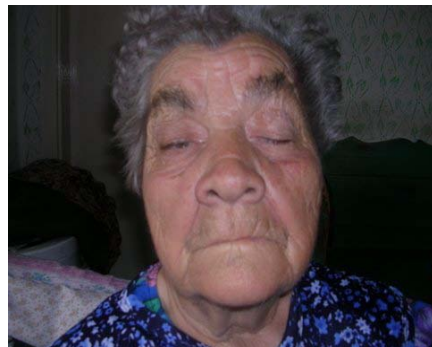
Annak vizsgálatára, hogy a nukleotid készlet érintettsége fokozza-e az mtDNS-ben a mutagenezist az 1. család egyik klinikailag érintett tagjának izombiopsziás anyagában meghatároztuk a mutációs load-ot. A szekvenálás során az mtDNS-ben nem találtunk több SNP-t, mint az egészséges korban illesztett kontroll izomban. A 36 éves beteg mtDNS-ben a kontrol régióban 0.96 pontmutáció/10kb-t találtunk, míg a *CYTB* gén régiójában 0.34 mutáció/10kb igazolódott. Így megállapíthattuk, hogy az *RRM2B* gén R327X variánsának (c.C979T mutáció) hatására az mtDNS-ben csak multiplex mtDNS deléciók alakultak ki, a nukleotid készlet érintettsége nem eredményezte az mtDNS pontmutációk frekvenciájának növekedését (**30. Közlemény**).



a.

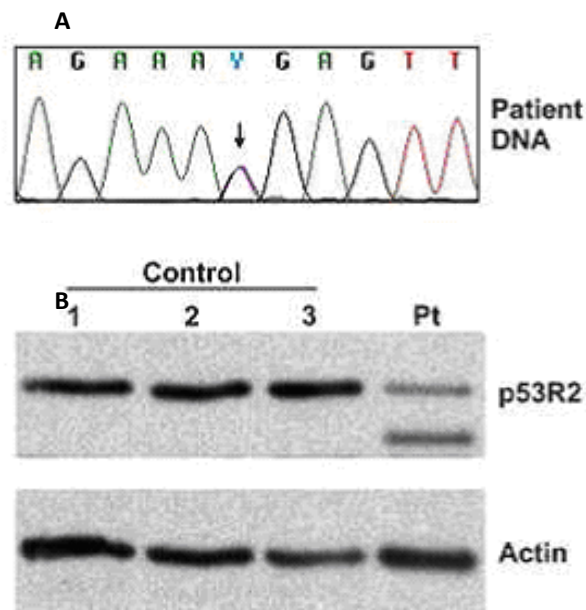


b.



c.

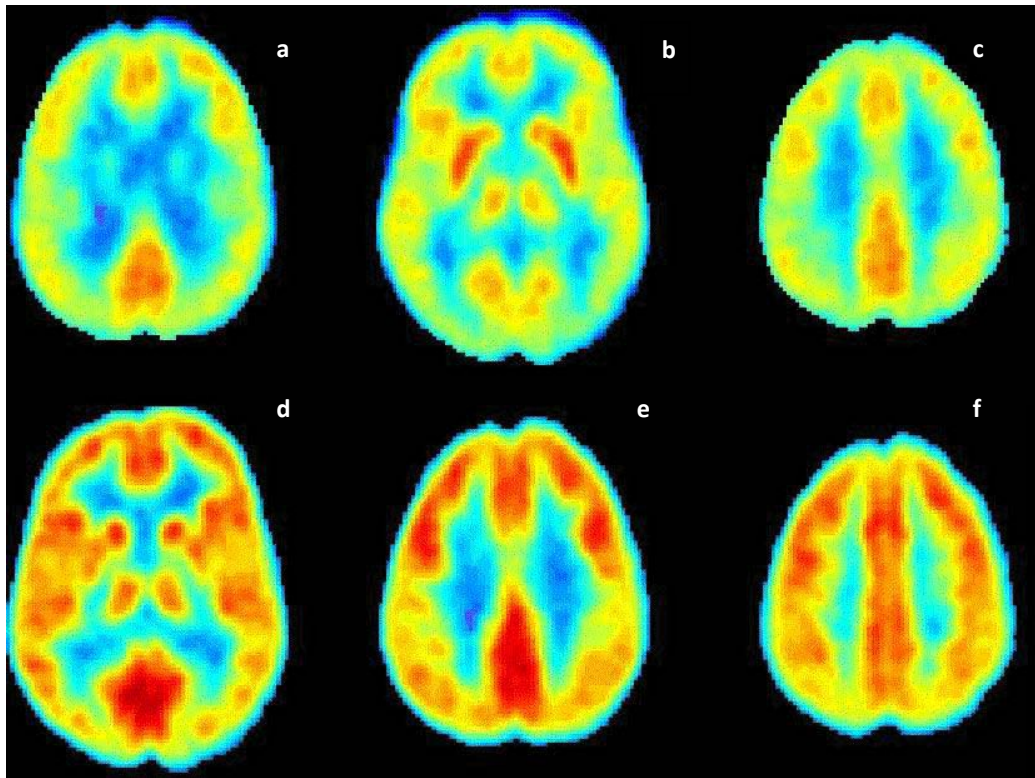
**4.16. Ábra:** a.) Az adPEO-s magyar család családfája. b.) A magyar család 2 érintett tagja ( II. 1 és I.1) a proband és édesanyja. Mindkettőjüknek kifejezett ptosisa volt.



**4.17. Ábra:** A.) Az *RRM2B* gén c.C979T mutációját ábrázoló szekvenogram, B.) A p53R2 protein Western blotja igazolta a csonkolt fehérjét (Pt band), kontrollként az actin szolgált, mely mind a kontroll egyéneknél, mind az adPEO-s betegnél normális nagyságúnak bizonyult.

#### 4.1.5.A cerebrális vérátáramlás és glükóz metabolizmus jellemzése mitochondrialis betegségben

A transcranialis Doppler sonographia az MCA átlagsebességeiben nem talált szignifikáns különbséget a 15 mitochondrialis betegben és a 17 kontroll egyénben.. A kis arteriolák acetazolamidra adott reaktivitása nem különbözött számottevően a betegek és az egészséges kontrollok között. Mind a betegekben, mind a kontrollokban szignifikás cerebrális vérátáramlás fokozódást mértünk. A cerebrovascularis reserve kapacitás nem mutatott szignifikáns különbséget a szisztolés vérátáramlási sebesség átlagértékében a betegek és a kontrollok között, de a reaktivitás mértéke 15 perc után csökkent a mitochondrialis betegekben. A cerebrális glükóz felvétel valamennyi betegben károsodott, akár volt központi idegrendszeri tünetegyüttesük, akár nem (4.18. Ábra). A globális  $CMR_{Glu}$  minden betegben a normális szintnél alacsonyabb volt. A  $CMR_{Glu}$  (cerebral glucose metabolism rate) csökkenése a temporális régióban és az occipitalis póluson volt a legkifejezettebb (12. Közlemény, 5., 6. Absztrakt).



**4.18. Ábra.** Három különböző szintben levő transverzális agyi szeleteken láthatjuk a mitochondrialis betegekben a kontrollokhöz képest a csökkent FDG felvételt (a,b,c.). A felvételek a kontroll egyének (d,e,f) és a betegek (a,b,c) átlagolt FDG felvételeit mutatják stereotaxiás standardizált formában



#### **4.1.6. Az mtDNS A3243G és A8344G mutációinak epidemiológiai elemzése Magyarországon**

##### **4.1.6.1. Az mtDNS *tRNS<sup>Leu(UUR)</sup>* gén A3243G mutáció genetikai epidemiológiai vizsgálata (32. Közlemény, 27. Absztrakt)**

A Pécsi Tudományegyetem (PTE) ÁOK Orvosi Genetikai Intézetével közösen összesen 631 beteg (361 nő és 270 férfi) DNS mintáját analizáltuk. A mintagyűjtés 1999. januártól 2007. december végéig történt. A vizsgálatba Baranya, Borsod-Abaúj-Zemplén, Hajdú-Bihar, Szabolcs-Szatmár-Bereg Megye valamint Budapest ismeretlen etiológiájú fiatalkori (45 évnél fiatalabb) ischaemiás stroke-os, valamint ismeretlen etiológiájú ataxia, maternalisan öröklődő sensorineuralis hallásvesztés, myopathia, és hypotonia miatt vizsgált betegeit vontuk be, amennyiben a klinikai átvizsgálás során felmerült a mitochondrialis betegség lehetősége. Valamennyi betegnél a molekuláris biológiai vizsgálat diagnosztikai célból történt. A betegek átlagéletkora 36,3 év (nők: 38,1 év, férfiak: 34,4 év) volt. A vizsgált betegekből mindössze 5 nő és 1 férfi betegnél igazolódott az A3243G mutáció. A betegek családtagjainak szűrése során további 8 esetben derült fény az A3243G mutációra. Minden érintett családtagnál a klinikai vizsgálat a mitochondrialis betegségekre jellemző tüneteket talált. Egy család esetében a kiskorú gyermekeket tünetmentességükre való tekintettel etikai megfontolások miatt nem vizsgáltuk. Az A3243G mutáció frekvenciája a vizsgált időszakban 2,22 % volt. A betegek klinikai tüneteit az alábbiakban ismertetjük: Egy 33 éves nőbetegnél 12 éves korában kétoldali ptosis jelentkezett, majd 19 évesen szülést követően generalizált izomgyengeség, terhelési intolerancia és inzulin dependens diabetes mellitus alakult ki. Vizsgálatakor alacsony termetet (testmagasság: 145 cm), kétoldali súlyos ptosist, m. rectus medialis gyengeséget, kétoldali hypacusist, myopathiás arcot, nasalis színezetű beszédet találtunk. A beteg 15 éves lányát csecsemőkorában enyhe cardiális tünetekkel gondozták, 12 éves kora óta észlelik kétoldali enyhe fokú ptosisát, egy éve izomgyengeséget panaszolt. Három éves kislánya izmai csecsemőkorában hypotoniásak voltak, majd fokozatosan terhelési intoleranciája lett. Most 8 hónapos kisfia légzési elégtelenséggel született, átmenetileg gépi lélegeztetésre szorult. Jelenleg mozgásfejlődése meglassult. A proband édesanyja súlyos cardiomyopathiában szenved, cukorbeteg, nagyot hall és általános izomgyengeséget panaszol (Gál et al. 2008). Az A3243G mutáció a proband izmában 45%-os, míg a vérében 35%-os

heteroplasmia arányban volt kimutatható. A gyermekek heteroplasmia arányai: 30%, 60%, és 65%. Egy betegünknel a mutációt a súlyos klinikai tünetek ellenére csupán az izomból izolált DNS-ből 20%-os heteroplasmia arányban tudtuk kimutatni. A beteget születést követően azonnal újraélesztették, kisgyermekkorban gyakori infekciói, collaptiform rosszullétei, voltak. Gyermekkorában kezdődött egyensúlyzavara, mely miatt gyakran elesett. Jelenleg menstruációs zavarai vannak, hypertoniás. Vizsgálatakor extrem fokú abdominalis típusú obesitas, dysmorph arc, micrognathia, mko. tekintésirányú horizontorotatoros nystagmus, diplopia, enyhe dysarthria, törzs- és végtagataxia, súlyos ízületi helyzet érzészavar és akciós tremor volt észlelhető. A proband édesanyja vérében mutációt nem találtunk. A beteg nővére 20 éves korában ismeretlen eredetű központi idegrendszeri betegségben hunyt el. Egy fiatalkori ischahemiás stroke szindróma miatt vizsgált 35 éves nőbetegnél vérében a mutációt 35%-ban detektáltuk. A betegnek az agyi ischaemia mellett súlyos psychotikus depressziója is volt. Suicidium miatt elvesztettük, így esetében családi szegregációs vizsgálatra nem volt lehetőség. Egy évtizedek óta progrediáló leukoaraiosis miatt vizsgált 45 éves nőbeteg esetében a mutáció 30%-os heteroplasmia arányban volt kimutatható. A beteg astheniás alkatú, kétoldali ptosis, hypacusis van, izomzata hypotrophiás és hanyatló kognitív funkciókról számol be. Maternalis ági rokonai nincsenek, így szegregációs vizsgálatot esetében sem végeztünk. További 2 a PTE-en vizsgált beteg klinikai fenotípusát Komlósi et al. írták le 2004 és 2005-ben. A mutációt egy MELAS-szindrómára jellegzetes tünetekkel vizsgált 9 éves kislány és egy sensorineurális hallásvesztéssel vizsgált 13 éves fiú esetében mutatták ki. A családi szegregációs vizsgálatokkal további négy esetre derítettek fényt (Komlósi et al. 2004, Komlósi et al. 2005).

#### **4.1.6.2. Az mtDNS *tRNS<sup>Lys</sup>* gén A8344G mutáció genetikai epidemiológiai vizsgálata**

A *tRNS<sup>Lys</sup>* gén A8344G mutáció molekuláris genetikai vizsgálata a PCR-RFLP technikával összesen 513 betegen (302 nő és 211 férfi) történt meg. A beválogatás időtartama 1999 és 2009. július 31. között történt. Valamennyi olyan beteg bekerült a vizsgálatba, akinek a klinikai tünetei, laktát terheléses vizsgálata illetve az izombiopsziája alapján felvetődött a mitochondrialis betegség gyanúja. A leggyakoribb klinikai tünetek a következők voltak: myoclonus epilepsia,

ismeretlen etiológiájú stroke, progresszív ophthalmoplegia externa, ataxia, myopathia, myalgia, terhelési intolerancia, neuropathia, maternális öröklődésű lipomatosissal. Ezek a tünetek gyakran társultak pajzsmirigy betegséggel, hypacusissal, pszichiátriai tünetekkel. A beválogatás Heves, Borsod-Abaúj Zemplén, Szabolcs-Szatmár, Hajdú-Bihar és a közép-magyarországi régiót foglalta magába. A vizsgálat során 11 betegnél (2 nő és 9 férfi) igazolódott az mtDNS mutációja. A szegregációs vizsgálat során, további 2 tünetmentes mutáció hordozóra derült fény, akiknek klinikai tünetei nincsenek. Az egyes betegek klinikai tüneteit a 4.4. Táblázatban soroltuk fel. Az epidemiológiai számítások alapján az adott időszakban a vizsgálatba beválogatott betegek között a mutáció gyakorisága: 2.53 %.

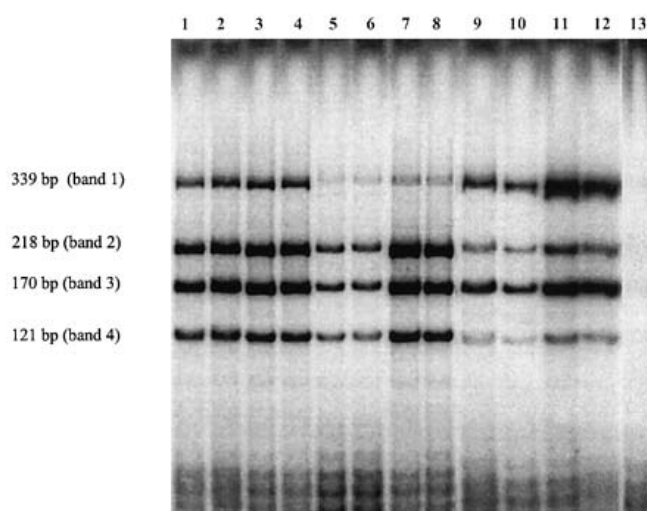
#### 4.1.7. Új diagnosztikai módszer validálása az mtDNS betegségek prenatalis felismerésére

A random genetikai drift következtében az mtDNS következtében kialakuló betegségekben szenvedő nőknek nem áll módunkban genetikai tanácsot adni. Ezért különösen fontos, hogy olyan metodika álljon rendelkezésünkre, mellyel segíthetünk ezeknek a betegeknek is a családtervezésben, hiszen a genetikai hiba súlyos klinikai képet is eredményezhet. Kísérleteink során heteroplasmias egér modellen validáltuk a preimplantációs genetikai diagnosztika alkalmazhatóságát mtDNS pontmutáció okozta kórképekben. Az ooplasma és annak poláris testjének heteroplasmia arányának meghatározására 6 heteroplasmias egér 29 oocytáját és azok poláris testjeit vizsgáltuk meg (4.19. Ábra). Az egyes oocyták heteroplasmia aránya 17.0 és 67.7% között volt. Nyolc oocyta alkalmatlan volt a

%NZB anya	Sejt	1. band (339bp)	2 band (218bp)	4band (121bp)	%NZB	Átlag	CV
67.5	Oocyta	8816	14022	6647	29.9	29	3.9
		10429	17280	9150	28.3		
	Poláris test	4720	7835	4436	27.8	28.5	3.5
		4100	6348	3504	29.2		
39.7	Oocyta	12199	2506	942	77.9	78.3	0.7
		14245	2658	1195	78.7		
	Poláris test	5525	1440	466	74.4	76.3	3.7
		4608	888	388	78.3		

**4.6. Táblázat:** Az átlagérték és a variációs koefficiens számításához használt kísérleti eredmények példája. A band 1, 2 és 3 intenzitás értékei a Phosphimagerrel mért radioaktivitás intenzitásának értékei. A Táblázatban bemutatott oocyták és a polár testek 2 különböző egérből származtak

vizsgálatra: 5 –ben germinális vesiculumok voltak jelen, 3 pedig vagy I. metafázisban volt, vagy a poláris testek eltűntek. Az eredmények értékelésének menetét 4.6. Táblázatban szemléltetjük. Az előre megszabott kritériumokat 22 oocyta és annak poláris testje teljesítette. A kumulatív adatokat a 4.7. Táblázat tartalmazza. Az egyes oocyták ooplasmájának és poláris testjének a heteroplasmia meghatározásának koefficiense 0.99 volt, míg a gaméta (ooplasma és poláris test átlaga) a maternalis genotípushoz viszonyítva 0.32. Az egyes blastomerek analíziséhez 15 egér 55 embryóját vizsgáltuk meg. A heteroplasmia aránya az egerek farokbiopsziájában 7 és 74% között mozgott, míg az embryoké 3 és 73% között változott. Az egyes embryok egyes blastomerjeinek heteroplasmia aránya gyakorlatilag azonos volt. Az egyes egerek embryoinak a heteroplasmia aránya azonban várakozásainknak megfelelően eltérő volt (4.8. Táblázat). A vizsgálatból 2 embryot kellett kizárni, mivel az egyes blastomerek vizsgálata során a duplikátumok nagy szórást mutattak. Az érett oocyták 24%-a (7/29)(1 ooplasma, 5 poláris test és 1 teljes oocyta) nem adott megbízható eredményt. A hiba ráta a blastomerek esetében 1.4% volt (2/211). Triplikátum futtatásra az oocytáknál 59.1%-ban került sor. A 203 vizsgálatba bevont blastomer esetében 5 triplikátumot kellett futtatni (**17. Közlemény, 9. Absztrakt**).



**4.19. Ábra:** Reprezentatív gélfotó: 3 oocyta és azok poláris testjéből származó PCR, majd az azt követő RFLP az NZB és BALB mtDNS arányának meghatározására. A heteroplasmia arány (HP) az NZB mtDNS arányt adja meg. Az 1. band kizárólagosan csak NZB mtDNS-re jellegzetes, a 2. és 4. band a BALB mtDNS emésztett termékei, a 3. band mindkét mtDNS amplifikáció során megjelenik. Minden reakció duplikátumban készült. 1.-2. oszlop: 1. poláris test 21.5% HP, 3.-4. oszlop 1. oocyta 22.1% HP, 5.-6. oszlop: 2. polár test 9.2% HP, 7.-8. oszlop 2. oocyta 4.9% HP, 9.-10. oszlop: 3. poláris test 64.1% HP, 11.-12. oszlop 3. oocyta 64.2% HP, 13. oszlop: víz kontroll.

Anyai %NZN	Oocyta átlag %NZN	CV	Polár test átlag %NZN	CV
17.0	1.0	6.5	4.0	4.7
	17.0	0.6	14.5	5.5
17.0	10.0	1.5	4.5	4.9
39.7	55.7	4.4	53.4	1.1
	55.9	1.1	57.0	3.8
	59.1	1.8	62.1	3.4
	64.5	0.3	65.1	9.4
	69.8	1.3	74.4	5.9
	78.3	0.7	76.3	3.7
40.6	4.9	3.6	9.2	
	20.6	0.7	25.9	
	22.1	0.4	21.5	
67.5	29.1	3.9	28.5	
	30.1	5.6	25.4	
	50-3	4.6	56.4	
	53.1	0.4	50.2	
	54.0	5.3	57.5	
	64.2	1.1	64.1	
	77.4	1.2	74.0	
67.7	21.9	7.4	21.4	
	27.0	3.0	26.7	
	43.6	8.7	43.9	

**4.7. Táblázat:** Hat egér 22 oocytájának azok poláris testjeinek heteroplasmia arányai. Az értékek az NZB arányt jelentik százalékos értékben kifejezve, Az anyai genotípus a farokbioptátum heteroplasmia arányát jelenti. Az oocyta és poláris test heteroplasmia arányok 2 vagy 3 minta átlagából származnak. A CV-t ezekből a duplikátumokból számítottuk minden sejt esetében.

## 4.2. Izomdystrophiák

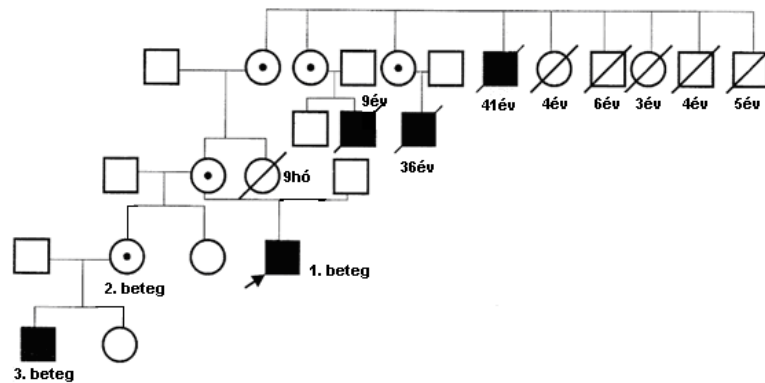
### 4.2.1. Dystrophin deficienciához társuló szekunder calpain deficiencia

A 40 éves probandnak (1. beteg) enyhe quadriceps gyengesége és myalgiaja volt 32 éves kora óta. Az EMG myopathiát talált, a szérum CK aktivitás a normális 15x-e volt. Lánytestvére (2. beteg) aszimptomás, CK értéke 329 U/l. A 2. beteg fia (3. beteg, 4.20. Ábra) mindig darabos járású volt, 6 éves korában enyhe alsóvégtag gyengeséget észlelt. Tíz éves koráig panaszai nem progrediáltak. CK szintje a normális 20x-a. Az 1. és 3. beteg izmának szövettani vizsgálata enyhe dystrophiás elváltozásokat talált néhány nekrotikus rosttal, az endomysialis kötőszövet felszaporodásával. A 2. beteg izmában csak igen enyhe rost kaliberengadozás tűnt föl. Az 1. és 3. beteg izmának immunocytokémiai vizsgálata a DYS1 és DYS3 antitestekkel a szokottnál halványabb és egyenetlenebb festődést talált az izomrostok felszínén kivéve néhány rostot, amelyek revertant rostoknak tűntek (4.21. Ábra). A DYS2 antitest minden rostban normális reakciót mutatott. A 2. beteg izma mind a 3 dystrophin ellenes antitesttel normális

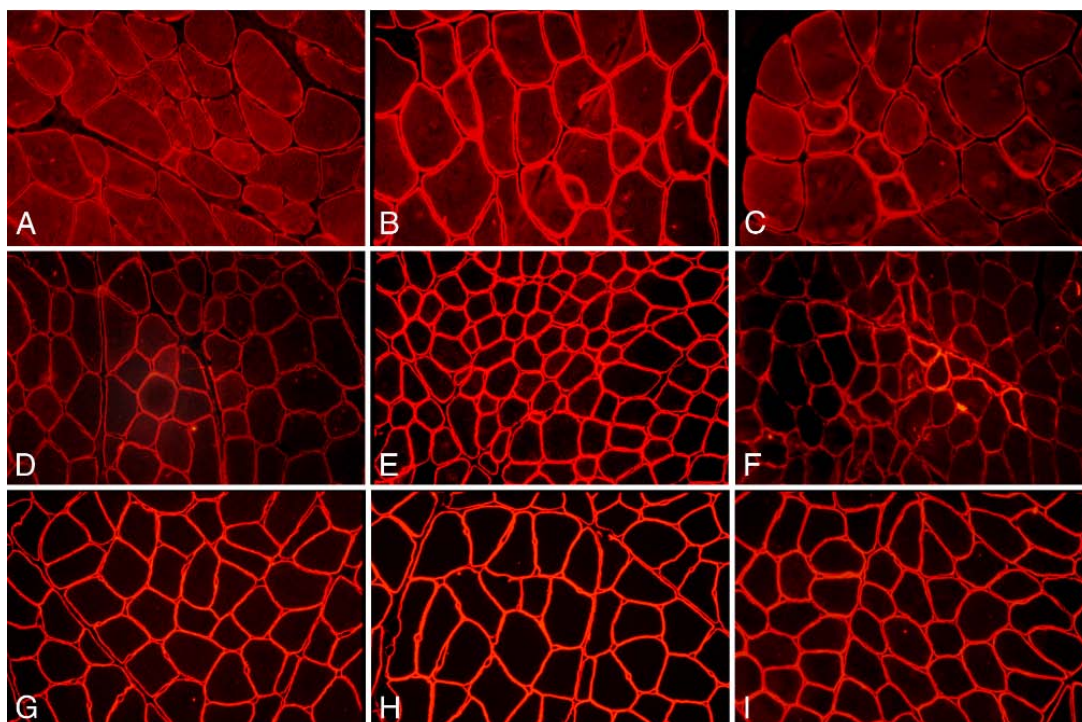
festődésű volt. Extrasynaptikusan néhány nem nekrotikus izomrostban az 1. és 3. betegben utrophin expressziót találtunk (4.21. Ábra), míg a 2. beteg csak az endomysialis kapillárisoknál és a véglemezeknél mutatott pozitív szignált. Calpain 3 ellenes antitesttel végzett Western blot analízissel az 1. betegnél a calpain teljes hiánya igazolódott, a 2. és 3. betegnél a calpain mennyisége csökkentnek bizonyult (4.23. Ábra). A primer antitest a teljes nagyságú 94kDa calpain-3 protein és a társuló 30 és 60kDa nagyságú band-eket mutatja ki. A

Anyai %Nzb	Fejlődési állapot (embryok száma)	Vizsgált blastomerek száma	Az Nzb HP arányok az egyes embryókban					
			1	2	3	4	5	
33.2	2 cell (1)	2	23					
40.0	2 cell (3)	6	44-45	55-58	45-50			
	4 cell (1)	4	9-11					
47.0	2 cell (4)	8	21-22	18	72-73	46-47		
	4 cell (1)	4	44-47					
58.0	2 cell (2)	4	43-47	28				
46.0	2 cell (2)	4	17-18	33-37				
64.0	2 cell (3)	6	53	61-62	38-40			
	4 cell (2)	8	59-61	69-71				
37.0	2 cell (4)	8	46	46-47	31-32	34-36		
	4 cell (1)	3	31-32					
	6 cell (1)	6	43-46					
	8 cell (1)	5	42-48					
74.0	3 cell (1)	3	56-57					
08.0	4 cell (1)	4	08-10					
17.0	4 cell (1)	4	14-16					
7.0	4 cell (2)	8	03	02-04				
	8 cell (2)	11	07-09	04-05				
20.0	8 cell (1)	8	16-18					
33.0	4 cell (1)	4	04-05					
	6 cell (1)	6	29-31					
	8 cell (1)	8	14-19					
28.0	4 cell (2)	8	41-42	35-37				
	6 cell (1)	5	20-22					
26.0	3 cell (2)	6	29-33	10-12				
	4 cell (3)	11	26-27	25-28	29-33			
	6 cell (3)	15	19-23	31-35	18-23			
	8 cell (5)	34	31-36	10-12	11-14	30-35	26-28	

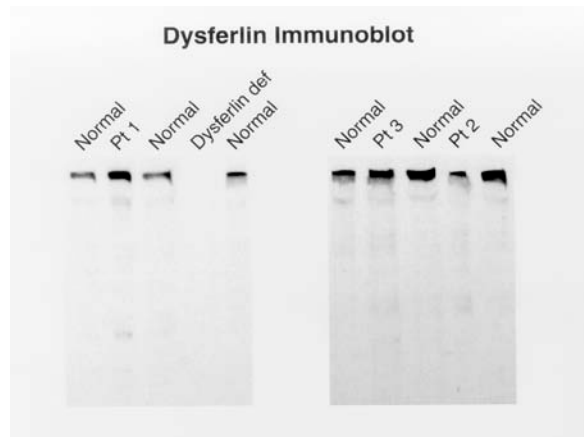
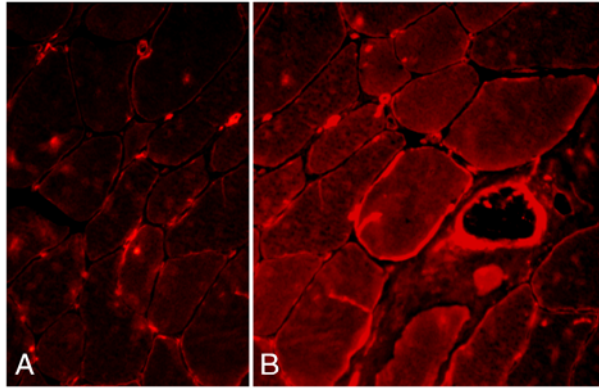
**4.8. Táblázat:** A vizsgált 15 egérből származó 53 embryo egyes blastomerjeinek HP aránya. A HP arány az NBZ/NZM mtDNS százalékos arányát jelenti. Az anyai genotípust a farok bioptátumokból határoztuk meg. Az egyes embryóknál a legkisebb és legnagyobb mért értékeket adtuk meg.



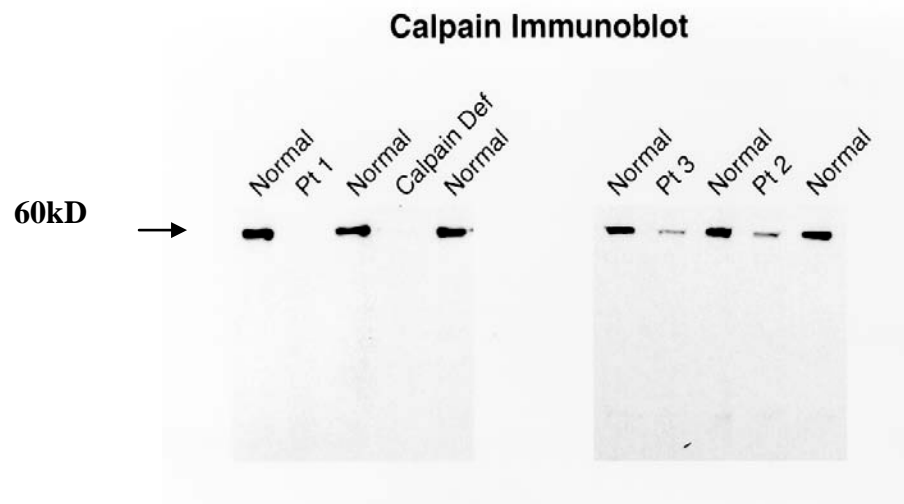
4. 20. **Ábra:** A dystrophinopathiához társuló calpain deficienciával járó család családfája



4.21. **Ábra:** A cryostátos metszetek immunhisztokémiai festése. A.) D.),G.): DYS1, B.),E.),H.):DYS2, C,F,I: DYS3. A.),B.),C.): 1 beteg, D.),E.),F.): 3. beteg, G.),H.),I.): 2 beteg. A DYS1 és DYS3 ellenes antitestekkel az 1. és 3. betegben egyenetlenebb halványabb reakciót látunk (A, D, C, F), míg a DYS2 tökéletes festődést adott minden betegben (B, E, F).X 200.



**4.22. Ábra:** A.) Normális izom utrophin festése. Csak extrasynaptikus utrophin expresszió látható. x300 B.) Egyes izomrostok felszínén kóros utrophin expresszió tűnik föl x 300. C.) A dysferlin Western blot minden vizsgált betegben normális volt



**4. 23. Ábra:** Calpain Immunoblot. Az 1. betegben (Pt1) a calpain teljes hiányát találtuk, míg a 2. és 3. betegnél (Pt2 és Pt3) a calpain mennyisége csökkent.

polyclonalis dystrophin ellenes antitesttel végzett Western blot a 3 betegben nem talált eltérést a dystrophin nagyságában és mennyiségében. A dysferlin Western blot analízis valamennyi betegben normális szignálokat talált, amellyel kizártuk

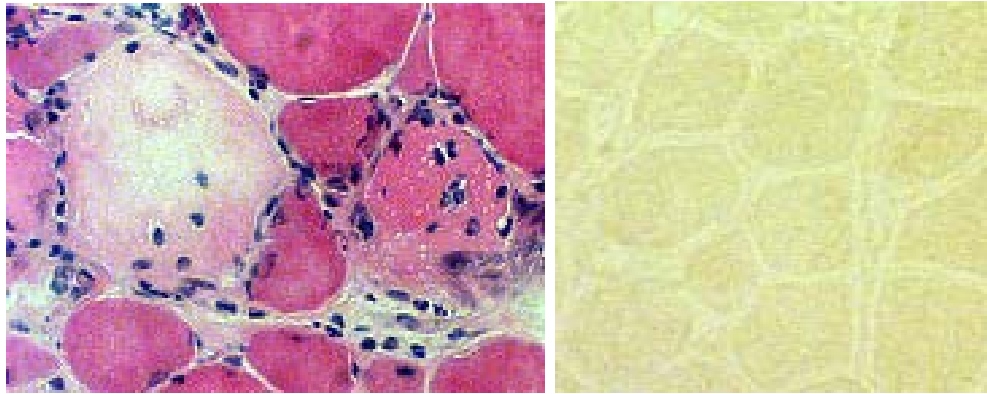


annak lehetőségét, hogy a protein degradálódott volna (4.22. Ábra). Az 1. beteg calpain mRNS mutáció analízise nem talált mutációt. A dystrophin gén multiplex PCR-al történő analízise a vizsgált régiókban nem talált deléciót. A dystrophin gén SCAIP (single condition amplification/internal primer) szekvenálása a 946. aminosav pozícióban egy 3bp nagyságú deléciót talált (c.2836-2838GAG deléció) a 22. exonban, amely, a Glu kiesését eredményezi a dystrophin molekula 6. spectrin repeatjében. (A vizsgálatot Dr. Kevin Flanigan végezte University of Utah, Department of Neurology – Metodika: Flanigan et al. 2003). A calpain cDNS-ének szekvenálása során nem találtunk patogén mutációt az 1. betegben. Feltételezzük, hogy betegeinknél a dystrophinopathia nagy valószínűséggel azért okozott enyhe klinikai tüneteket, mert az egyidejűleg jelenlevő calpain deficiencia védelmet jelentett az izomsejtek számára (**18. Absztrakt**).

#### **4.2.2. A siketség, mint a dystrophin deficiencia allélikus variánsa**

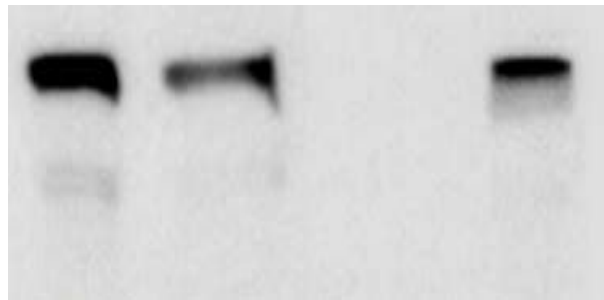
Egy 10 éves kislány gyermekotthonból került emelkedett szérumban GOT (81 U/l), GPT (250 U/l), LDH (1576 U/l) miatt a SE I. Gyermekklinikára átvizsgálás céljából. Vizsgálatakor súlyos halláskárosodást, a végtagok proximális izomcsoportjaiban enyhe paresist és enyhe vádli hypertrophiát lehetett találni. Az elvégzett hasi UH: kórosat nem talált, a hepatotrop víruszserológiai vizsgálatai negatívak lettek. Autoimmun panelje normális volt. CK vizsgálata magas értéket (6559U/l) talált. Az EMG myogen károsodást igazolt. ENG-vel a motoros és sensoros idegek vezetési sebességei megtartottak voltak. Kardiológiai vizsgálata cardiomyopathiát nem igazolt. Az otoacusticus emissiót regisztrálni nem lehetett, a BAEP vizsgálat a sikettség miatt technikailag értékelhetetlen volt. Közép és belső fül CT-je ép középfület, hallócsont láncolatot, szabályos belső hallójáratot és csigát talált. A siketség hátterében idegi eredetű halláscsökkenést valószínűsítettek. Izombiopszia történt, mely izomdystrophiára jellegzetes képet talált. Az izomrostok átmérővariabilitása nagy volt, sok nekrotikus rostot láttunk, phagocytózissal (4.24. Ábra) Az immunhisztokémiai vizsgálatok során (4.23. Ábra) az izomrostok többségében dystrophin deficienciát találtunk, amely egyértelműen igazolja a dystrophinopathiát (**1. Közlemény**). Ezt a dystrophin Western blot vizsgálat is megerősítette. A genetikai vizsgálat multiplex PCR-al nem talált a dystrophin génben deléciót. SCAIP (single condition amplification/internal primer) szekvenálás során a dystrophin génben a 68. exont

követő intron 3. pozíciójában c.A99743G splice mutáció igazolódott. A vizsgálatot Dr. Kevin Flanigen végezte, University of Utah, Department of Neurology (Metodika: Flanigan et al. 2003). A beteg családtagjainak felkutatását követően kiderült, hogy proband 2 testvére és 2 anyai ági unokatestvére is izombetegség miatt állt gondozás alatt (4.25. Ábra). A testvéreket volt alkalmunk vizsgálni, klinikai adataikat a 4.9. Táblázat tartalmazza.



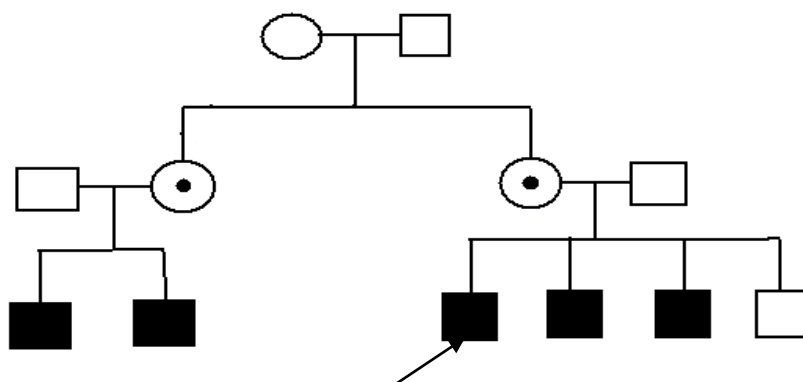
**A.**

**B.**



**C.**

**4.24. Ábra:** A siket kisfiú izombiopsziájában izomdystrophiára jellegzetes elváltozások igazolódtak. A.) Számos nekrotikus rostot és phagocytosist láttunk a cryostatos metszetek értékelésekor, HE x400. B.) Az immunhisztokémiai vizsgálat dystrophint az izomrostokban nem detektált., X 200. C.) A dystrophin Western blot vizsgálata során dystrophin specifikus band nem ábrázolódott.



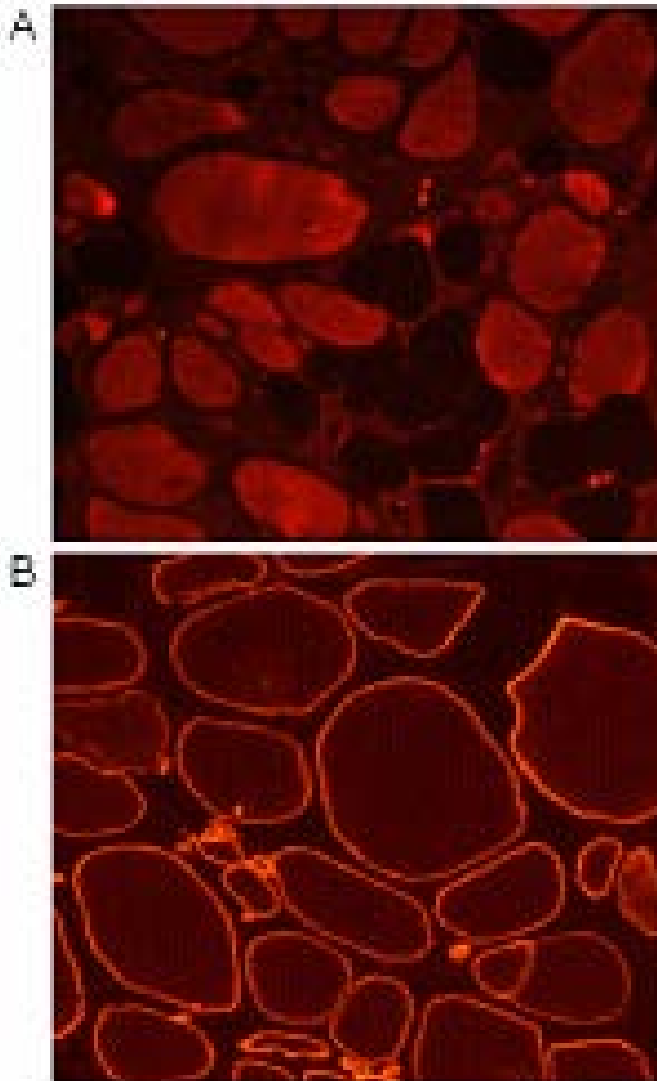
4. 25. Ábra: A siket dystrophinopathiás kisfiú családfája

Klinikum	B1 (10 év) - Proband	B2 (7 év)	B3 (6 év)
Hallás	Siket	Normális	Normális
Vádli hypertrophia	Enyhe	Kifejezett	Kifejezett
Izomgyengeség	Enyhe	Közepesen súlyos	Enyhe
Serum CK	6559 U/l	10435U/l	16566 U/l
Izomszövettan	DMD-re jellegzetes	DMD-re jellegzetes	DMD-re jellegzetes
Immunhisztokémia	Dystrophin expresszió nincs	Dystrophin expresszió nincs	Dystrophin expresszió nincs

4.9. Táblázat: A siket dystrophinopathiás kisfiú és testvérei klinikai adatai

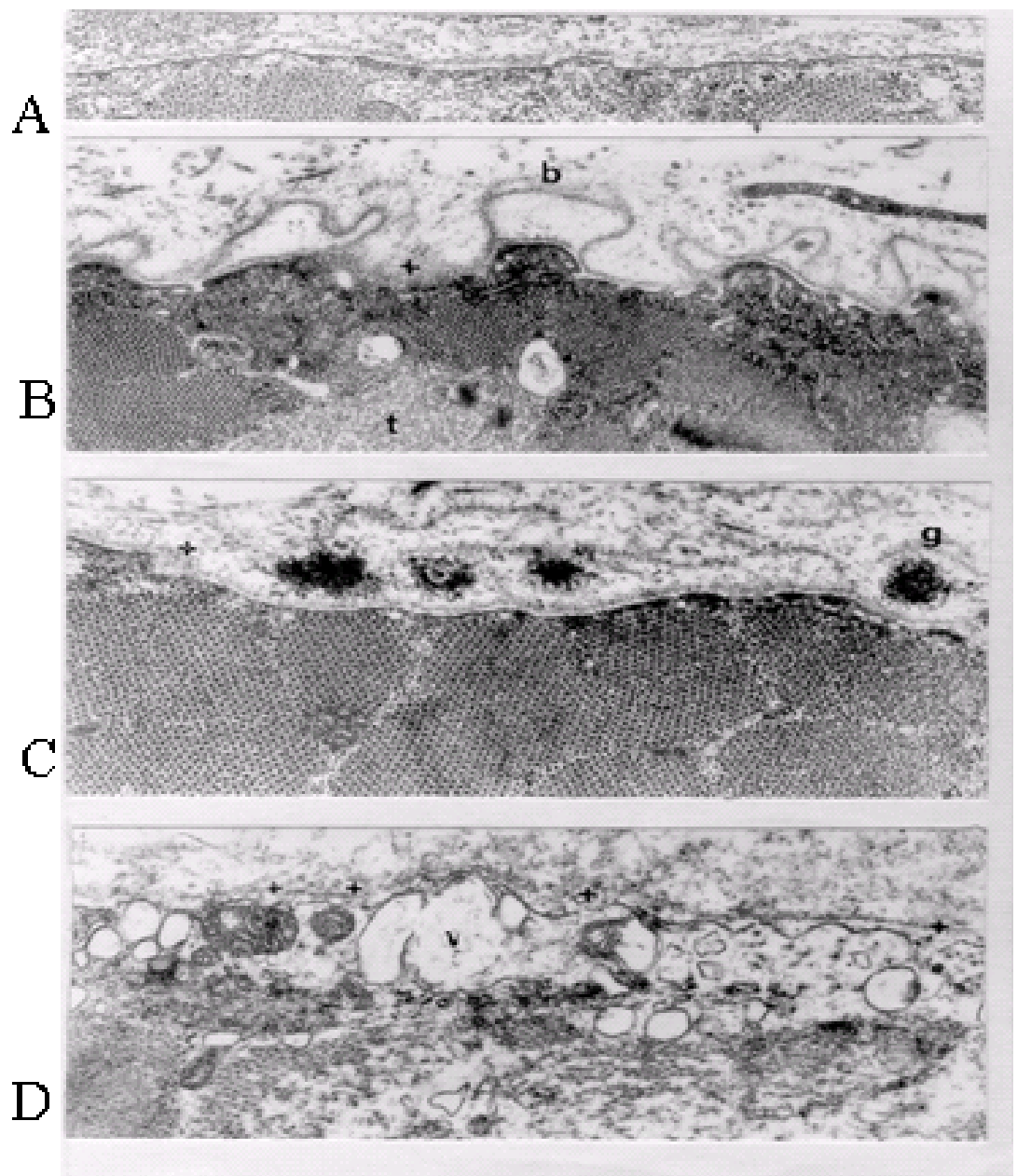
#### 4.2.3. Compound heterozygota dysferlin gén mutáció

A harminchét éves férfi először 20 éves korában észlelte lépcsőn járási, futási nehezítettségét. Ekkor már a guggolásból való felállás is gondot jelentett számára. Familiáris anamnézise az izombetegségekre nézve negatív. Neurológiai vizsgálatokor medenceöv túlsúlyú, de a vállövet is érintő közepesen súlyos izom atrophiat és gyengeséget észleltünk. Az alsóvégtagban a distalis izomcsoportok is sorvadtak és közepes fokban gyengültek. Guggolásból felállni nem tudott. A szérum CK 3600 U/l volt. Az EMG myogén károsodást igazolt Cardiomyopathiája nem volt. Az izombiopsziában számos nekrotikus rostot, helyenként endomysialis mononukleáris infiltrációkat lehetett detektálni. Elvértve regenerálódó rostok is feltűntek. Az izomrostok átmérő variabilitása igen nagy volt. Néhány izomrostban finom subsarcolemmalis vakuolizáció tűnt föl. Elektronmikroszkóppal a nem nekrotikus rostok membránján helyenként



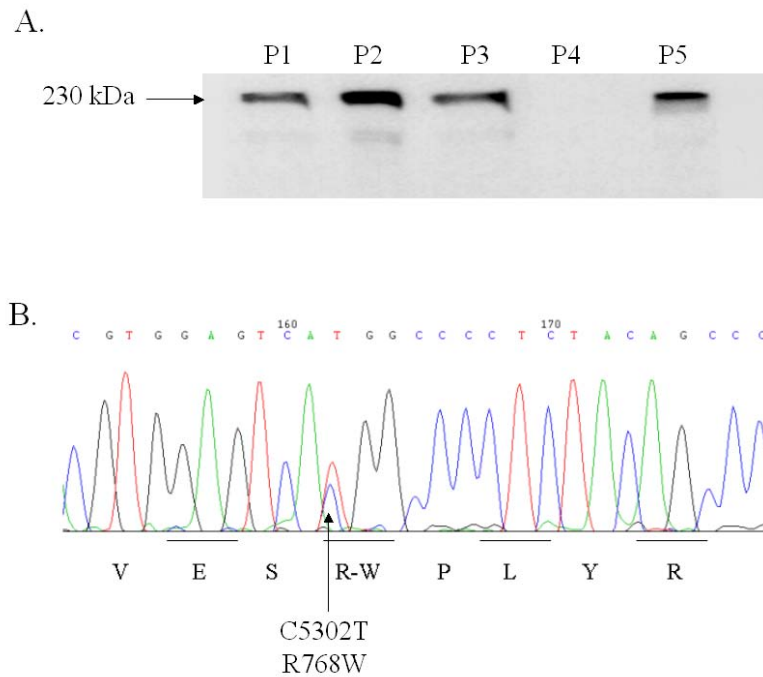
**4.26 Ábra:** Az izombiopszia fagyasztott metszetei. A.) Hiányzó subsarcolemmalis és egyenetlen cytoplasmikus dysferlin immunfestés x 350. B.) A subsarcolemmalis vakuolizációt mutató izomrostokban erős sarcolemmalis caveolin expresszió látható x 350.

folytonossági hiány ábrázolódott, subsarcolemmálisan vezikula aggregáció, papilláris projekció, bazális lamina kacsok, a kacsokban degenerált globuláris denz anyag volt (4.27. Ábra). Immunhisztokémiai vizsgálattal a dystrophin, a 4 sarcoglycan, a merosin, caveolin expressziója normális volt. A dysferlin immunhisztokémiai vizsgálata hiányzó sarcolemmalis és egyenetlen cytoplasmikus fehérje expressziót mutatott. A caveolin expresszió a vacuolizált izomrostokban intenzívebb volt. A dysferlin Western blot során dysferlin hiány mutatkozott. A calpain-3 normálisan expresszálódott az izomszövetben.



**4.27. Ábra:** Az izombiopszia elektronmikroszópikus feldolgozásának eredménye, A.) normális izomrost sarcolemmája x 23.000, B.), C.) D.) a dysferlinopathiás beteg izomrostjai x 25.000. B.) A basalis lamina (b) a rost felszine felé papillarisán benyúlik. C.) electrondens testek láthatók a basalis lamina duplikált rétegei között. D.) multiplex, rövid plasmalemmalis hiányok és pleiomorph subsarcolemmalis vesiculak láthatók.

A dysferlin cDNS-ének RT-PCR-rel végzett vizsgálata során a dysferlin génben Arg1768Trp cserét okozó C5302T pontmutáció igazolódott heterozygota formában (4. 28. Ábra).



**4.28. Ábra:** A.) Dysferlin Western blot. Az 1, 2, 3 és 5. betegben a dysferlin specifikus band normális volt. A 4. betegben (P4) a dysferlin nem mutatható ki. B.) a dysferlin cDNS szekvencia analízise során heterozygota C-T szubsztitúció igazolódott a DYSF 5302 pozíciójában, ami Arg768Trp aminosavcserét eredményezett.

A C5302T mutáció szegregációs vizsgálata során a proband édesanyjában, nővérében és kislányában is megtaláltuk a patogén mutációt heterozygota formában. A beteg édesapja nem hordozta a mutációt. Klinikai tünete egyik családtagnak sem volt, szérumban CK-juk a normális tartományon belül volt (**26. Közlemény, 20., 22. Absztrakt**).

#### 4.2.4 A glycosylációs rendellenességek szerepe a végtagöv típusú izomdystrophiákban

A szűrt 53 végtagöv típusú izomdystrophiás beteg közül 6 esetben találtunk hiányzó vagy csökkent immunoreaktivitást az  $\alpha$ -DG hyperglycosylált doménjének immunohisztokémiai és Western blot vizsgálata során. Mind a 6 esetben a WGA csökkent kötődését és erős PNA festődést találtunk az izomszövetben. Mind a 6 beteg benignus LGMD szindróma tüneteit mutatta. A FKRP genetikai vizsgálata során se a gyakori c.C826A mutáció, sem egyéb patogén mutáció nem igazolódott a kódoló régióban. A vizsgálatok egyértelműen igazolták az  $\alpha$ -dystroglycanopathiát, de a háttérben álló genetikai defektusra nem derült egyik esetben sem fény (**24. Absztrakt**).

## 4.2.5. A dystrophinopathiák molekuláris terápiája

### 4.2.5.1. Elektroporáció (EP)

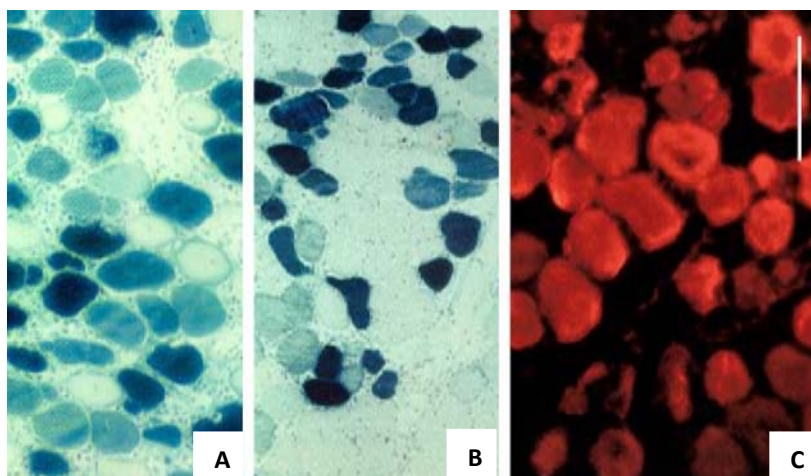
Eredményeinket az alábbi 5 szempont szerint csoportosítottuk:

1. *Az feszültség, az egértörzs és életkor hatása a transzfekeció effektivitására és a kollaterális károsodásra*

A leghatékonyabb EP kombináció a 175 V feszültség, 20 msec impulzus tartam volt a CD1 egerekben (4.10. Táblázat). Ez a kombináció csak kevés nekrotikus rostot eredményezett. Az mdx egerekben ugyanez a kombináció kevésbé volt előnyös, a transzfektált rostok száma alacsonyabb, a nekrotikus rostok száma magasabb volt. A feszültség emelésére, a transzfekeció effektivitása csökkent, a nekrotikus rostok száma nőtt. Az idős és fiatal egerek transzfekeciós rátájában lényeges különbség volt. Az eredmények statisztikailag szignifikánsan különböztek (18. Közlemény, 12., 13., 14., 19. Absztrakt).

2. *Az Evans Blue tracerrel történő kollaterális károsodás becslése*

Intraperitonealisan (i.p.) adott Evans Blue tracerrel céloztuk a kollaterális károsodás mértékének becsülését. Az EP-t egy órával megelőzve adtuk az i.p. Evans Blue-t, majd EP után egy órával vizsgáltuk annak az izomrostokba jutását. Az izom morfológiai feldolgozása során számos Evans Blue pozitív rostot láttunk (4. 29. Ábra). A csaknem egyidőben kivett HE-al festett mintában a nekrotikus rostok száma lényegesen kisebb volt, mint az Evans Blue pozitív rostok száma (18. Közlemény).



4.29 Ábra: Kollaterális károsodás az EP után. Felnőtt mdx egér TA A és B.X 200 )Hyaluronidase majd pCBLacZ injekcióját követő EP 8 200V/cm ingerléssel, 20 usec tartam.c.) Evans blue festés

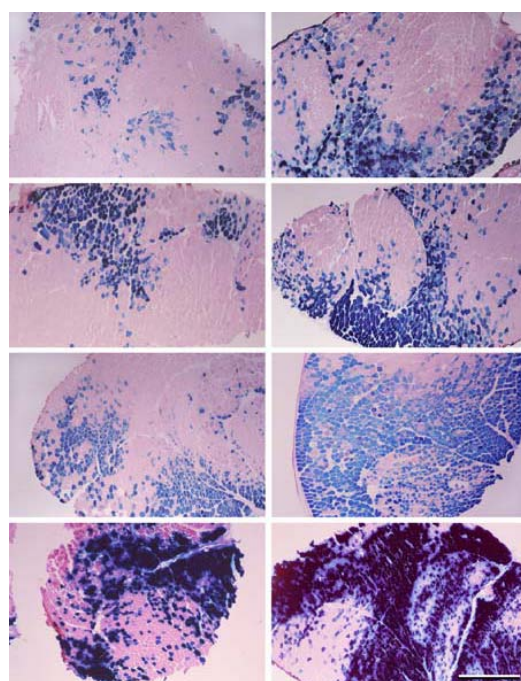
Faj/szám/egér életkor	Volt (V/cm)	Tartam	$\beta$ gal transzfektált rostok száma izmonként	Nekrotikus rostok száma izmonként
CD1/N=10/felnőtt	175(A)	20ms	414.3 $\pm$ 88.1	19 $\pm$ 8.9
CD1/N=11/felnőtt	200 (A)	20ms	434 $\pm$ 51.3	101.2 $\pm$ 19.5
CD1/N=6/felnőtt	4000-600 (K)	200-600us	70.9 $\pm$ 28.9	22.1 $\pm$ 14.5
CD1/N=4/felnőtt	1800 (M)	100us	50.7 $\pm$ 24.9	270 $\pm$ 160.5
Mdx/N=11/elnőtt	175 (A)	20us	168.7 $\pm$ 28.9	57.8 $\pm$ 16.1
Mdx/N=4/felnőtt	200 (A)	20us	243.1 $\pm$ 61.1	75.9 $\pm$ 31
Mdx/N=4/felnőtt	1800 (M)	100us	44 $\pm$ 16.7	91 $\pm$ 12.5
Mdx/N=4/fiatal	600 (K)	100us	2.8 $\pm$ 6.6	29.3 $\pm$ 36
Mdx/N=4/fiatal	175 (A)	20ms	5 $\pm$ 5	0

Felnőtt: 6 hetes, Fiatal: 15-21 napos, A: alacsony, K: közepes, M: magas feszültségű

**4.10. Táblázat:** A különböző paraméterekkel történő EP-t követő transzfekció hatékonysága és a kollaterális károsodás mértéke a különböző életkorú és törzsű egerekben

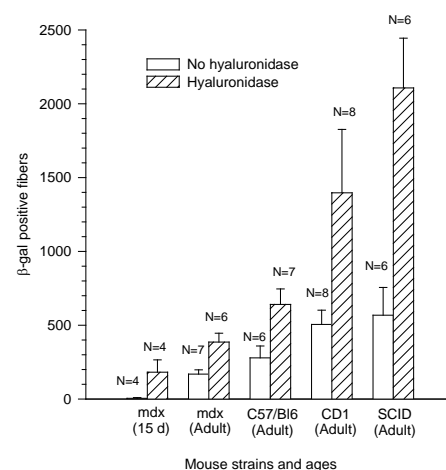
### 3. A hyaluronidase (Hyase) hatása a transzfekcióra

Az EP-asszisztált plazmid mediálta gén transzfer során a legoptimálisabb EP paraméterek alkalmazása előtt marha hyaluronidaset injektáltunk a kezelendő izomba. A Hyase szignifikánsan, 15-370 %-al emelte a  $\beta$ -gal-pozitív rostok számát valamennyi egértörzsben. A növekedés a legkifejezettebb a SCID a legkisebb a CD1 egérben volt (4.30. Ábra) (**18. Közlemény, 14. Absztrakt**).



A.

**Influence of hyaluronidase, ages and strains of mice on the transfection level after electrotransfer**



B.

**4.29. Ábra:** Az egértörzs és Hyase hatása a transzfekcióra. A felnőtt egér TA vagy kezeltük (Hya), vagy nem kezeltük (-Hya) Hyaseval mielőtt a pCBLacZ-t befecskendeztük és az izmot elektroporáltuk (175V/cm). 6-10 nappal később az izom cryostatot metszeteit festettük  $\beta$ -gal histochemiával. A.)

Reprezentatív  $\beta$ -gal festődés. Bar: 710um. B.) Quantitative trans szintmérés. A középértékeket tüntettük föl  $\pm$  SD. N= analizált izomrost szám. \* szignifikánsan magasabb Hyase jelenlétében ( $p < 0.05$ )



*4. A plazmid méretének hatása a transzfekció effektivitására (az optimális EP paraméterek használata és hyaluronidase adása mellett)*

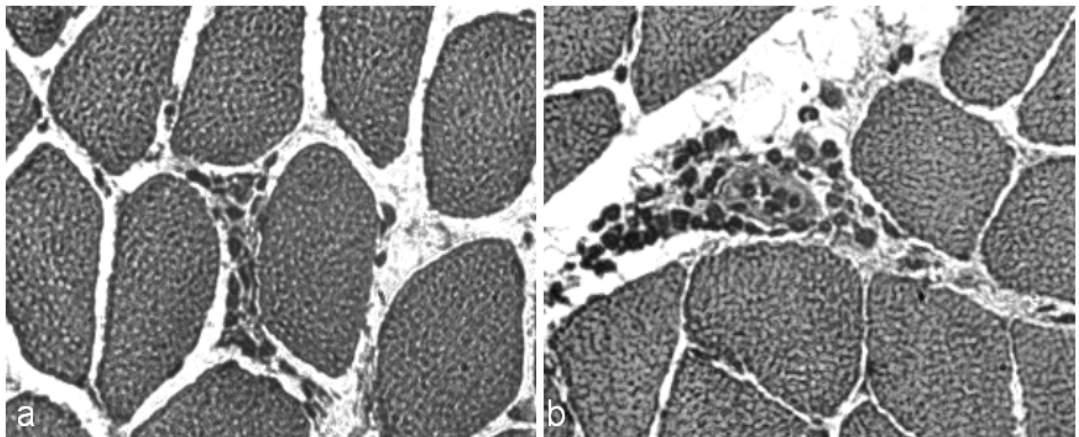
A dystrophin és utrophin expressziót a következő injekciók adását követően tanulmányoztuk: a teljes hosszúságú egér dystrophin vagy utrophin cDNS tartalmú plazmid injektálása mdx izomba. A cDNS N terminusához egy FLAG epitop kapcsolódott az utrophin esetében, hogy azt az endogen utrophintól megkülönböztesse. Tíz nappal az injekciót követően a FLAG ellenes vagy a dystrophin ellenes antitesttel készült immunhisztokémiai festés, hogy a transzfekció szintjét vizualizáljuk. Az utrophin és dystrophin pozitív rostok száma alacsonyabb volt, mint a pCBLacZ pozitív rostok száma azonos kondíciók mellett. A plazmid koncentráció emelése nem emelte szignifikánsan a dystrophin pozitív rostok számát. Ezen adatok azt igazolják, hogy a nagyobb molekulákkal történő transzfekció kevésbé hatékony (*18. Közlemény, 19. Absztrakt*).

*5. Az izomban a transzgén expresszió és a plazmid DNS partikulák számának változása*

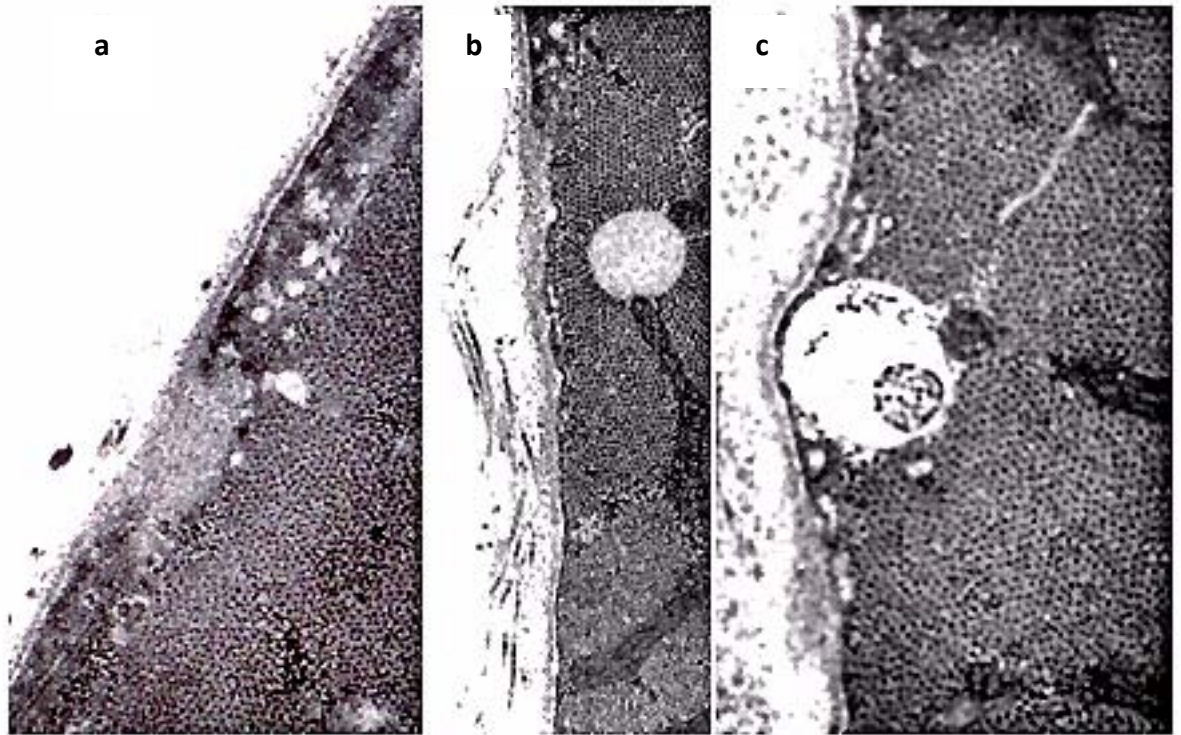
Az immunokompetens és immunodeficiens izmokban Hyase adásával kombináltan vizsgáltuk a teljes hosszúságú dystrophin és a pCBLacZ expresszió élettartamát a fentiekben legoptimálisabbnak bizonyult elektroporációs paraméterekkel. A transzfekció szintet a kezelést követő 10, 180, 360. és 460. napon mértük. Az mdx izomban a dystrophin pozitív rostok száma progresszíven csökkent. Mivel a végső időpontban talált dystrophin pozitív rostok száma nem volt magasabb, mint a revertant rostok száma, a kezeletlen mdx egerekben, azt mondhatjuk, hogy 6 hónap után nem volt expresszió. A SCID egérben, az immunválasz hiánya következtében 360 napig nem volt csökkenés a transzfektált rostok számában. Bár a plazmid DNS szint 92%-os csökkenését és a  $\beta$ -gal 67%-os csökkenését láttuk a 10. és 180. nap között, ami azt jelezte, hogy minden rost kevesebb  $\beta$ -galt expresszált. A 180. és 360. napok között nem volt további redukció a plazmid DNS szintet illetően. Ezek az adatok azt igazolják, hogy a plazmid DNS szignifikáns csökkenése ellenére is van még egy év múlva is transzgén expresszió (**18. Közlemény, 15., 17., 19. Absztrakt**).

#### 4.2.3.2. Sonoporáció

Az intramuscularis injekció és az azt követő sonoporáció után az önkéntesek nem észleltek sem korai, sem késői fájdalmat. Az 5 önkéntesből mindössze kettőnél lehetett a jobb karon az injekció helyének megfelelően enyhe bőrreakciót (rubort) látni. A beavatkozást követően 36 órával a szérum CK nem emelkedett meg. A szintén 36 órával a beavatkozás után a jobb m. biceps brachii-ból vett izombiopsziában valamennyi esetben enyhe sarcolemma károsodást lehetett megfigyelni fénymikroszkóppal és 3 esetben diszkrét endomysialis mononukleáris infiltráció is jelen volt (4. 31. Ábra). Már fénymikroszkóppal is lehetett látni valamennyi biopótumban, hogy néhány izomrostban a sarcolemma alatt optikailag üres vacuolák jelentek meg. Az ultrastrukturális vizsgálat a plasma membrán rövid fokális gapjeit, helyenként fragmentációját találta (4. 32. Ábra), anélkül, hogy a mélyebb struktúrák károsodtak volna (23., 27. Absztrakt). A bo. m. biceps brachiiiban csak minimális apsecifikus elváltozásokat láttunk.



**4.31. Ábra:** Definity injekciót/sonoporációt követő fénymikroszkópos izombiopsziás képek. a.) Elvéve endomysialis, mononukleáris inflammatorikus infiltrátumok is láthatók, melyek parciális invasio nélkül jelennek meg az izomrostok mellett. HE; x200. b.) Diszkrét perivascularis inflammatorikus infiltráció van jelen az interfascicularis septumban. HE; x200

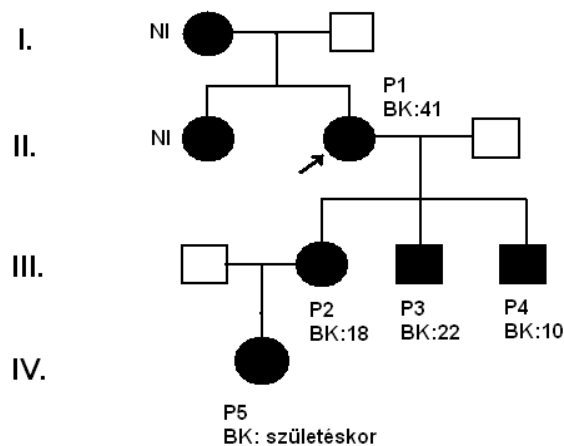


**4.32. Ábra:** Definity injekciót és sonoporációt követő elektronmikroszkópos szövettani kép. a-b.) Rövid fokális plazma membrán folytonossághiányok és fragmentáció a plazmalemma alatt fekvő struktúrák károsodása nélkül. a.) x 35.000. b,) x25.000. c.) Optikailag üres subsarcolemmalis vesiculák az izomrostban. x 45.000

### 4.3. Herditer perifériás neuropathiák

#### 4.3.1. Új mutációk leírása örökletes neuropathiákban

A proband (1. beteg) első tünetei 41 éves korában kezdődtek a lábak, alszárak gyengeségével (4.33. Ábra). Klinikai vizsgálatkor pes cavus, peronealis típusú izomatrophia, paresis igazolódott, saját reflexei renyhék voltak, distalis típusú hypaesthesiát jelzett. Lánya (2. beteg) 18 évesen jelzett először fájdalmat alsóvégtagjaiban (4.33. Ábra). Neurológiai vizsgálata 26 éves korában pes cavust, renyhe sajátreflexeket, distalis típusú hypaesthesiat talált. A proband unokája (5. beteg) hypotoniás csecsemő volt, motoros fejlődése lassult. Két éves korában történt vizsgálata során pedes planit, hyperflexibilis ízületeket, kétoldali peronealis típusú gyengeséget észleltünk. Öt éves korában nem észleltünk progressziót. A proband idősebb fiának (3. beteg) soha nem volt panasza, 22 évesen enyhe bal oldali peronealis gyengeség észlelhető atrophia nélkül, renyhe sajátreflexekkel érzészavar nélkül. A fiatalabb gyermek (4. beteg) 10 éves korától darabosan fut, pes cavusa van, a láb distalis izmai atrophizáltak, enyhe bilaterális preonealis paresist és az alsóvégtagok sensoros deficitjét észleltük.



4.33. Ábra: A teljes penetranciájú új *MPZ* mutációval rendelkező betegek családfája

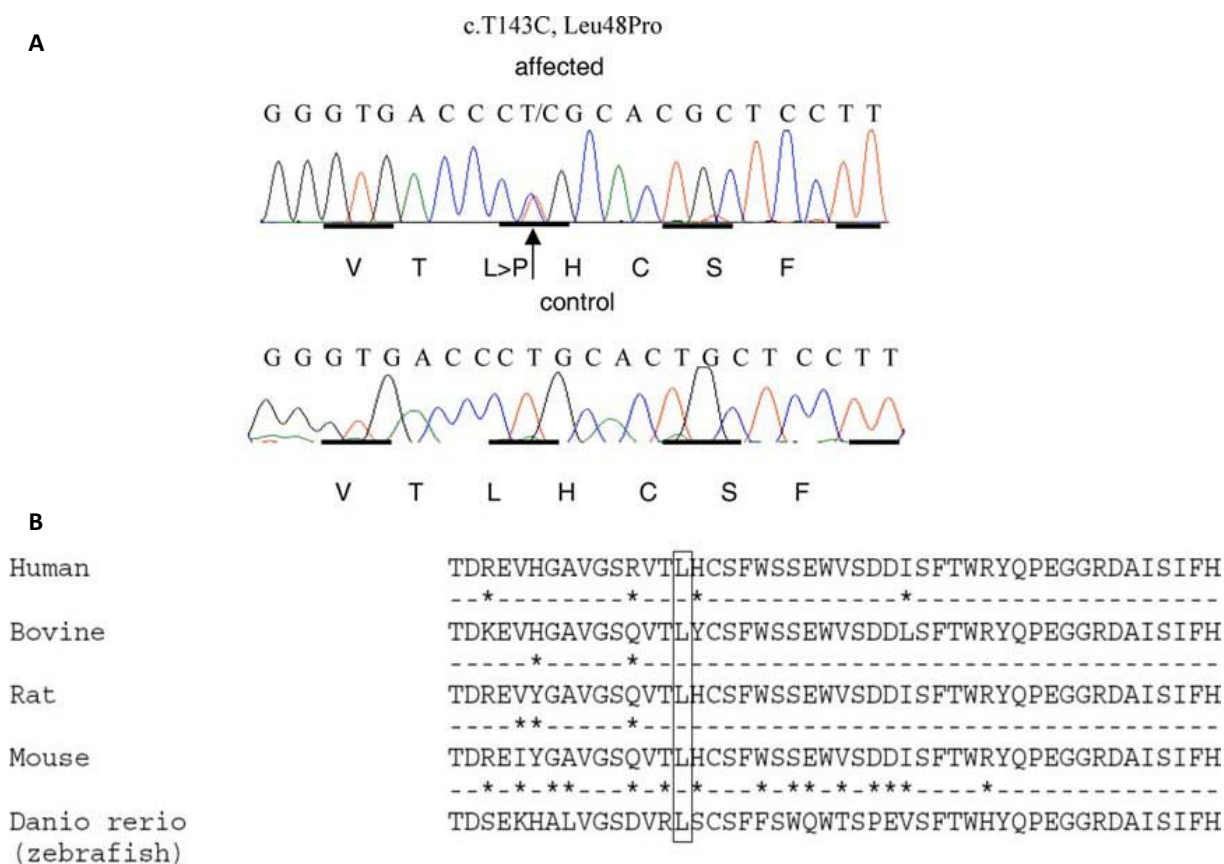
Az ENG a probandban kifejezett, a 2. betegben közepesen súlyos, a 3. betegben enyhe demyelinizációs típusú neuropathiát regisztrált. A 4. betegben a probandhoz hasonló súlyosságú demyelinizációs típusú neuropathia igazolódott. A legkifejezettebb mértékben csökkent motoros vezetési sebességeket a legfiatalabb beteg (5, beteg) ENG vizsgálata találta (4. 11. Táblázat)

Idegvezetési vizsgálatok					
Beteg	Jobb n. medianus, motoros		Jobb n. peroneus, motoros		Jobb n. suralis
	Ampl (mV) Norm $\geq 5$	CV(m/s) Norm $\geq 48$	Ampl (mV) Norm $\geq 3$	CV(m/s) Norm $\geq 40$	Ampl (mV) Norm $\geq 5$
<b>Beteg 1</b>	7.5	33.6	3.2	22.3	Nincs válasz
<b>Beteg 2</b>	7.0	40	3.6	30	3.06
<b>Beteg 3</b>	3.68	43	8.4	32	3.5
<b>Beteg 4</b>	4.1	34.4	2.2	26.1	8.4
<b>Beteg 5</b>	4.3	19.3	1.9	20.5	Nem vizsgáltuk

4.11. Táblázat: Az *MPZ* mutációval rendelkező család tagjainak ENG vizsgálati eredményei

A n. suralis morfológiai vizsgálata során mind a nagy és kis myelinizált axonok denzitása csökkent. Néhány axon myelinhüvelye vékony volt. Egy-egy myelinhüvely koncentrikus és excentrikus módon megvastagodott, számos kis regenerálódó axon volt jelen. Az elektronmikroszkópia komplex myelin gyűrődéseket, dekompektált myelin lamellákat és alkalmanként fokálisan begyűrődött myelint detektált. Az *MPZ* gén analízise a 2. exonban T->C tranzíciót (c.T144C) detektált (4.34. Ábra), amely következménye leucin - prolin szubsztitúció lett (Leu48Pro). A mutáció a protein extracellularis doménjében

van. A mutáció valamennyi érintett családtagban szegregálódott, és azt 182 egészséges kromoszómán nem tudtuk kimutatni (20. Közlemény, 16. Absztrakt).



**4.34. Ábra:** A.) Heterozygota T>C szubsztitúció az *MPZ* gén c.143 pozíciójában, amely a leucin helyett a prolin translációját eredményezi a 48. pozícióban. A mutáció nem volt jelen 96 egészséges egyén 182 kromoszómáján. B.) Az érintett aminosav a Leu48 az *MPZ* génben erősen konzervált számos fajban. A szekvenciák az All Entrez protein adatbázisból származnak.

### 4.3.2. Roma neuropathiák diagnosztikája Magyarországon

#### 4.3.2.1. Lom típusú neuropathia

Négy család 8 tagját vizsgáltuk. A klinikai tünetek mindegyik betegünkönél már az első évtizedben megjelentek (4. 12. Táblázat). Az első markáns tünet a lassan progrediáló járászavar volt. A kézizmok gyengesége a második évtizedben vált nyilvánvalóvá. A vázizom tünetekkel párhuzamosan ízületi deformitásokat is észleltünk (leggyakrabban a kéz kisízületeinek elváltozásai, az alsó végtagokon kalapácsujj, pes cavus és equinovarus volt megfigyelhető). Bár a neurológiai képet a motoros tünetek dominálták, betegeink zöménél mérsékelt fokban distalis típusú felszínes- és mélyérzészavar is kimutatható volt. Két 20 évnél idősebb betegünknek hypacusisa is volt. . A perifériás idegek érintettsége mellett 2

betegünkönél egyéb neurológiai tünetek is voltak, mint dysphonia, egyoldali ptosis, fejtremor. Enyhe mentális retardációt betegeink kétharmadánál találtunk.

Beteg/ életkor (év)	Tünet kezdet (év)	Tünetek	Mentális retardatio	MRI	BAEP
1./21	6	Kis termet, kalapácsujj, pes equinovarus, súlyos distalis izomatrophia és paresis, enyhe avt-i proximalis paresis, distalis érzészavar	Enyhe	Normális	Enyhe perifériás működészavar
2./12	4	Kalapácsujjak, súlyos distalis izomatrophia és gyengeség, nincs érzészavar.	Nincs	Nem készült	Normális
3./24	9	Kalapácsujjak, pes cavus, scapula alata, fej tremor, jobb oldali túlsúllyal súlyos distalis izomatrophia és gyengeség, distalis típusú érzészavar	Enyhe	Nem készült	Enyhe perifériás és centrális működészavar
4./21	7	Hypacusis, dysphonia, bal oldali ptosis, kalapács ujjak, pes equinovarus, distalis típusú érzészavar	Enyhe	Normális	Enyhe perifériás működészavar
5/24	6	Hypacusis, dysphonia, súlyos distalis izomatrophia és gyengeség, alsó végtagi distalis típusú érzészavar.	Nincs	Enyhe cerebellaris atrophia	Mérsékelt perifériás és centrális működészavar
6/13	8	Kalapácsujjak, pes cavus, súlyos distalis izomatrophia és gyengeség, distalis típusú érzészavar.	Enyhe	Nem készült	Nem készült

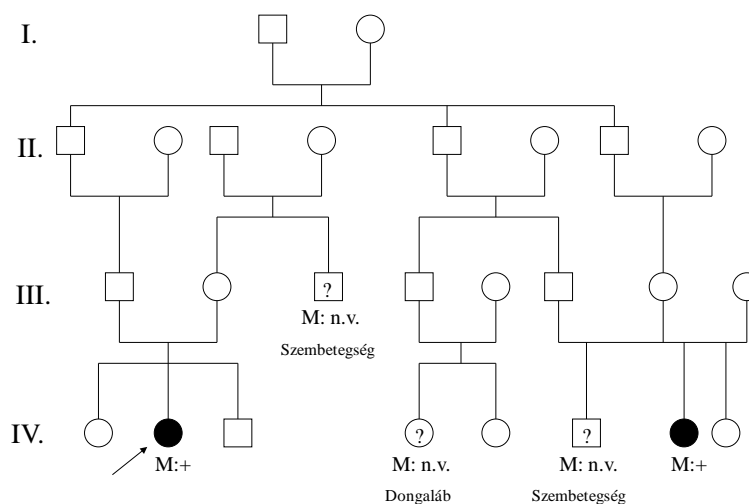
**4.12. Táblázat** : A Lom típusú neuropathiás betegek klinikai tünetei

A műszeres diagnosztikai vizsgálatok közül a BAEP 5 betegből négy esetben talált működészavart. Elsősorban a nervus acusticus volt érintett, egy esetben a centrális hallópálya is károsodott. A koponya MR egy esetben volt kóros, enyhe kisagyi atrophiat jelezve. Az ENG mindegyik betegnél súlyos demyelinizációs motoros és szenzoros polyneuropathiát igazolt. Jellegzetes módon a szenzoros idegek ingerlésekor nem nyertünk válaszpotenciált, illetve a motoros idegekben súlyos vezetési zavart észleltünk (4.13. Táblázat). Két esetben szövettani vizsgálat is történt. A n. suralisban a myelinhüvellyel rendelkező rostok kifejezett számbeli redukcióját láttuk. Aktív myelinhüvely degenerációra és regenerációra utaló jeleket nem figyeltünk meg, de egy esetben myelintörmelék is sikerült a Schwann sejtek cytoplazmájában kimutatni. A molekuláris genetikai vizsgálat során valamennyi esetben az *NDRG1* génben (N-myc downstream-regulated gene

1) homozygota R148X pontmutációt lehetett igazolni. Az egyik beteg családtagjának szűrése is megtörtént. A beteg édesanyjánál és annak testvérénél is igazolódott heterozygota formában a founder mutáció (15, 24. Közlemény, 11. Absztrakt).

#### 4.3.2.2. CCFDN szindróma

A roma nagycsaládban apai ágon egy dongalábbal született betegről illetve két szembetegről tudnak (4.35. Ábra.). Az index beteg terminuson túl, congenitális cataractával, microcorneával, bal oldali divergens strabismussal született leány. Mozgásfejlődése lassú volt, 8 éves korában kezdett segítséggel járni. Hat évesen észlelték először kezeiben a choreiform mozgászavart. Menstruációs ciklusa rendszertelen, de a másodlagos nemi jelleg normálisan kifejlődött. Jelenleg 31 éves, termete alacsony (145 cm).



4.35. Ábra: A CCFDN típusú neuropathiás beteg családfája

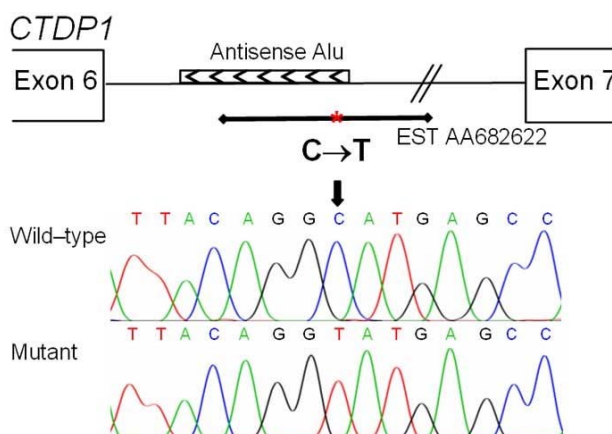
Neurológiai státuszából kiemelendő: microcephalia, facialis dysmorphia (a hajas fejbőr mélyen a homlokban, prominens arcközép, nagy orr, előre álló felső fogak, hypognathia), mko. cataracta műtét utáni állapot, mko. heves horizontális I. fokú nystagmus, microcornea, súlyos jobbra convex thoracalis scoliosis, hypotrophiás kéz és láb (4.36. Ábra). A csukló flexióban és ulnár deviációban, a kezujjak flektált helyzetben, a lábfejek korrigált pes equinovarus tartásban. A felső végtag proximalis izomcsoportjainak ereje megtartott, az alsó végtag proximalis izmainak ereje bal túlsúllyal közepes fokban csökkent. A felső és alsó végtag distalis izomcsoportjaiban közepesen súlyos paresis. Testszerte hiányzó

mélyreflexek. Érzészavart nem jelez. A vállakban és a felső végtag distalis részén diszkrét choreiform mozgások. Enyhe törzsataxia. Intellektusa megtartott, jól kooperál. A szérum CK 300 U/l (normál tartomány: <100 U/l) volt. Az EEG, a VEP és BAEP vizsgálatok nem találtak rendellenességet. EMG-vel neurogén izomatropiát, ENG-vel demyelinizációs túlsúlyú kevert típusú sensomotoros perifériás neuropathiát találtunk. Az izombiopszia neurogén károsodásra jellegzetes anguláris atrophias rostokat írt le kiscsoportos elrendeződésben. A n. suralisban a vastag velőhüvelyes rostok denzitása kb. 50%-kal csökkent, több axon myelinhüvelye az axon átmérőkhöz képest aránytalanul vékony volt. Regenerációt jelző kis axon csoportokat, hagymalevél rajzolatot nem detektáltunk. Az ideg elektronmikroszkópos vizsgálata hypomyelinizációt és kifokú axonelfajulást talált. A velőtlen rostok száma normális volt. Aktív myelin szétesést csak a 22 éves korban vett második idegbiopsziás mintában találtunk. Koponya MRI: a bal oldali hátsó occipito-laterális régióban a gyrus rajzolat elsimult, a cortex kissé vaskosabb (polymicrogyria). A sella MRI-n a hypophysis jobb lebenyében microadenoma ábrázolódott. A molekuláris genetikai vizsgálattal a *CTDPI* gént analizáltuk PCR-t követően az NlaIII enzimmel való restrikciós enzimhasítással. A restrikciós fragmentek analízise igazolta a *CTDPI* gén homozigota mutációját, melyet a génszakasz szekvenálása is megerősített (4.35. Ábra). A családtagok közül egy apai másod-unokatestvérben is igazolódott a mutáció (16., 25. Közlemény, 11. Absztrakt).

#### **4.3.3. Mitofusin mutáció következtében kialakuló ultrastrukturális elváltozások**

A 35 éves nő panaszai 14 éves korban kezdődtek a lábfejek mozgásainak gyengülésével. Neurológiai státuszában jobb oldali starbismus konvergens, a kiskézizmok és az alszárok hypotrophiaja és enyhe paresise emelhető ki. Az alsóvégtagokban a paresis a hátsó kompartmentben a kifejezettebb, lábujjhegyre állni nem tud, sarokra állása nehezített. Saját reflexei renyhék, a végtagokban distalis típusú hypaesthesiát jelez. Az ENG szenzoros dominanciájú axonalis típusú neuropathiát igazolt. A n. suralis fénymikroszkópos vizsgálata során az axonszám kifejezett redukcióját figyeltük meg, néhány kis regenerálódó axoncsoporttal kísérve (4.37. Ábra). Az ultrastrukturális vizsgálat elsősorban a nagy myelinizált



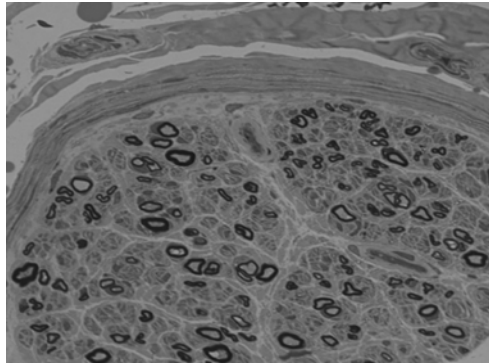


**B**

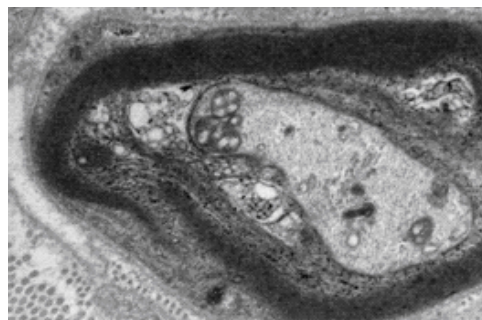
**4.36. Ábra:** A.) A CCFDN-ben szenvedő beteg facialis dysmorphiája, skeletalis deformitásai és distalis izomatropiája. B.) a *CTDP1* génben a x C-T mutáció jelenléte homoplasmikus formában.

rostok kiesését találta. Nem láttunk hagymalevél rajzolatot, myelin bomlásterméket A mitochondriumok helyenként megnagyobbodtak, de bennük se paracrystallin inclusiokat, se dense anyagot nem lehetett látni (4.38. Ábra). Helyenként az adaxonalis kompartmentben kis mitochondriumok felszaporodását lehetett megfigyelni a Schwann sejtekben. Az endoneuralis fibroblasztokban is helyenként fokalis mitochondrium szaporulat tűnt föl. Molekuláris genetikai

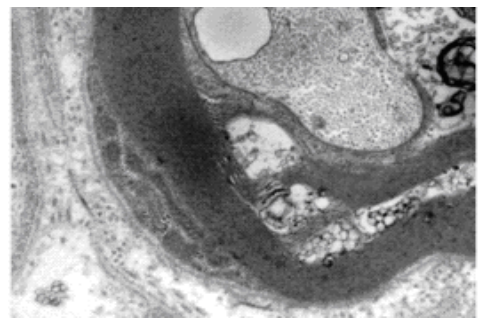
vizsgálata a mitofusin génben c.G839A cserét igazolt a 9. exonban, ami R280H aminosav cserét eredményezett (4.39. Ábra). Hasonló mutációt eddig olasz és belga betegekben írtak le.



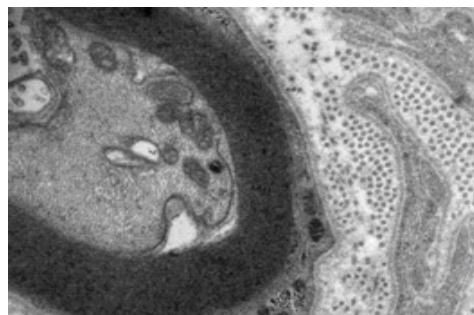
**4.37. Ábra:** A n. suralis félvékony metszete. Az axonok számának kb 40%-os redukciója látható. Elvértve kis regenerálódó axons csoportok tűnnek föl. X 400



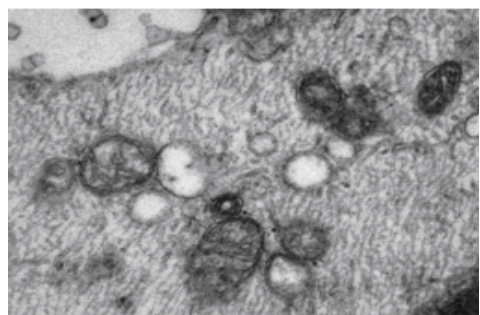
a



b

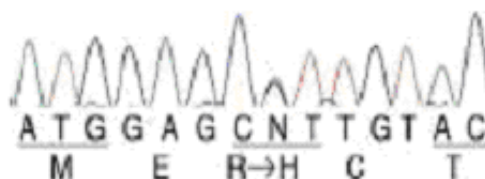


c



d

**4.38. Ábra:** Az *MFN2* mutációval rendelkező beteg n. suralis elektronmikroszkópiája. A.)-B.) Az adaxonalis rés megnagyobbodott, benne kifejezett mitochondrium és glycogen szaporulat látható x15.000, C.)-D.) az axonon belül is megszorodtak a megaclonalis mitochondriumok. C). Ezek helyenként szorosan egymáshoz tapadnak. X 25.000



**4.39. Ábra:** A mitofusin 2 gén szekvenciája: c.G839A szubsztitúció a 9. exonban, R280H aminosavcserével

#### 4.3.4. Primer és szekunder mitochondrialis diszfunkcióhoz társuló neuropathia

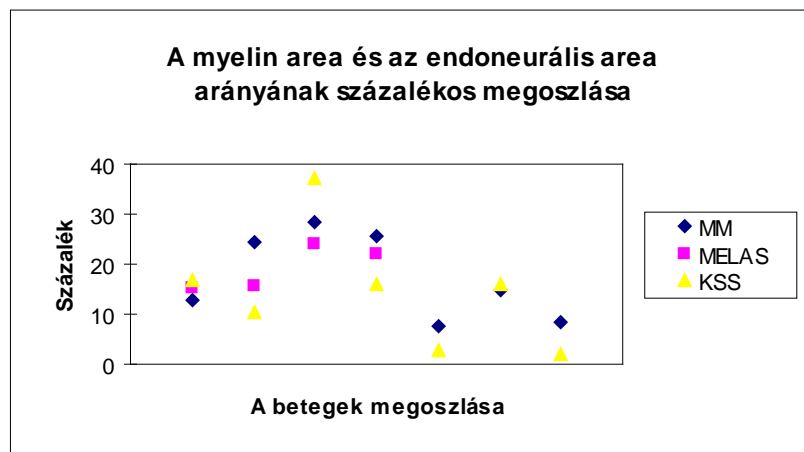
##### 4.3.4.1 Fénymikroszkópos vizsgálatok és n. suralis morfometria mitochondrialis betegségekben

Az általunk vizsgált valamennyi mitochondrialis betegségcsoportban (mitochondrialis myopathia, Kearns Sayre szindróma és MELAS – a klinikai tüneteket a 4.14. Táblázat tartalmazza) a myopathológiai vizsgálat kis csoportokban, ill. elszórta döntően anguláris, helyenként lekerekített atrophias izomrostokat talált. Az atrophia mindkét rosttípust érintette. Számos rostban subsarcolemmálisan fokozott volt az oxidatív enzimreakció és a Gömöri-trichrom festéssel az izomrostok kb. 3-5%-a bizonyult „ragged red” rostnak (4. Közlemény, 1. 2. Absztrakt).

Eset-szám	Diagnózis	Betegség kezdete (év)	Biopszia ideje (kor)	Tünetek
1	MM	24	26	Általános izomgyengeség, kimerültség
2	MM	35	39	Polyneuropathia, myopathia, gluteális izomatrophia
3	MM	26	45	Optikus neuropathia, hypacusis, dysarthria, polyneuropathia
4	MM	5	53	Általános gyengeség, kimerültség, mellkasi fájdalom, myopathia
5	MM	?	60	Avt-i distalis paresis, neuropathia, myopathia
6	MM	45	61	Polyneuropathia, izom atrophia
7	MM	?	70	Kis kézízmom atrophia, myopathia
8	KSS	20	28	Ophthalmoplegia, retinitis pigmentosa, EKG: rövid PQ idő
9	KSS	?	42	Epilepsia, tapetoretinalis degeneráció, dementia, hypacusis
10	KSS	?	43	Ophthalmoplegia externa, anacusis, alexia
11	KSS	46	54	Ophthalmoplegia externa, ptosis, retinitis pigmentosa
12	PEO	?	56	Ptosis, amblyopia, ataxia, avt-i proximalis paresis
13	PEO	?	61	N. III. paresis, hypacusis, opticus neuropathia, polyneuropathia
14	PEO	40	66	Ophthalmoplegia externa, ptosis, avt-i proximalis paresis
15	PEO	?	41	Ptosis, apraxia, agraphia, amnesticus aphasia, alexia
16	PEO	?	67	Ptosis, ataxia, dysarthria, bal hemiparesis
17	MELAS	4 nap	6 hónap	Általános izom hypotonia, epilepsia, tetraparesis, dysphagia
18	MELAS	21	23	Visszatérő hemiparesis, avt-i akut paraparesis
19	MELAS	38	39	Visszatérő hemiparesis, myalgia, migraine
20	MELAS	?	52	Hemiparesis, ataxia, pszicho-organikus tünetek

4.14. Táblázat: Az elektronmikroszkópos morfometriai elemzésben résztvevő betegek klinikai adatai.

A n. suralisban a myelinizált axonok száma átlagosan kb. 20-40%-al csökkent. Némely beteg anyagában Buengner szalagokat és regenerálódó axonokat is láttunk. Elvértve egy-egy vastagon myelinizált atrophias axon is feltűnt. Szegmentalis demyelinizáció csak ritkán volt látható. A n. suralis morfometriai értékelése során a myelin area és az endoneurális area aránya csökkent a kontroll egyének értékeihez képest (4.40. Ábra). A myelinizált rostok mm<sup>2</sup>-re vonatkoztatott száma redukálódott, ami egyértelműen bizonyítja a perifériás neuropathiát. A numerikus értékeket ld. a 4.15. Táblázat foglalja össze.



**4.40. Ábra:** A mitochondrialis betegek n. suralis fénymikroszkópos morfometriás eredményeinek grafikus ábrázolása (Myelin area/endoneurális area: normális > 25%).

#### 4.3.4.2 Fénymikroszkópos vizsgálatok és n. suralis morfometria inflammatorikus myopathiákban.

A gyulladós myopathiák, különösen az inclusios testes myositis (IBM) vizsgálata során feltűnt, hogy ezekben a kórképekben a mitochondriumok károsodása sokkal gyakoribb, mint egyéb nem mitochondrialis betegségekben. A gyulladós myopathiákban a mononukleáris infiltrációk mind az IBM-ben és a polymyositisben jelen voltak. Valamennyi esetben Gömöri trichrom festéssel a rostok 2-3 %-a bizonyult „ragged red”-nek. Az oxidatív enzimreakció egyetlen aktivitást talált a rostok többségében. A félvékony metszetekben intermyofibrillárisan és subsarcolemmálisan osmiophil anyag felhalmozódását láttuk. Az IBM esetekben egy kivétellel valamennyi betegnek volt enyhe-közepesen súlyos polyneuropathiája (**13. közlemény**) (4. 16. Táblázat, 4.41. Ábra). Az IBM betegek adatait normális n. suralis biopszia morfometriás adataival hasonlítottuk össze.

Esetszám	Myelin area (%)	Myelinizált idegrostok/mm <sup>2</sup>	A/M arány
1	12,9	5990	0,38
2	24,5	7556	0,27
3	28,5	6902	0,34
4	25,8	5198	0,34
5	7,8	3980	0,36
6	14,7	5592	0,38
7	8,6	6450	0,53
8	17,0	7270	0,31
9	10,3	5380	0,55
10	37,3	1039	0,28
11	16,1	1333	0,31
12	2,8	5290	0,51
13	16,2	5861	0,26
14	2,2	3780	0,51
15	24,7	6253	0,41
16	9,9	6820	0,37
17	15,1	11163	0,69
18	15,8	9540	0,35
19	24,1	7573	0,25
20	22,1	6354	0,47

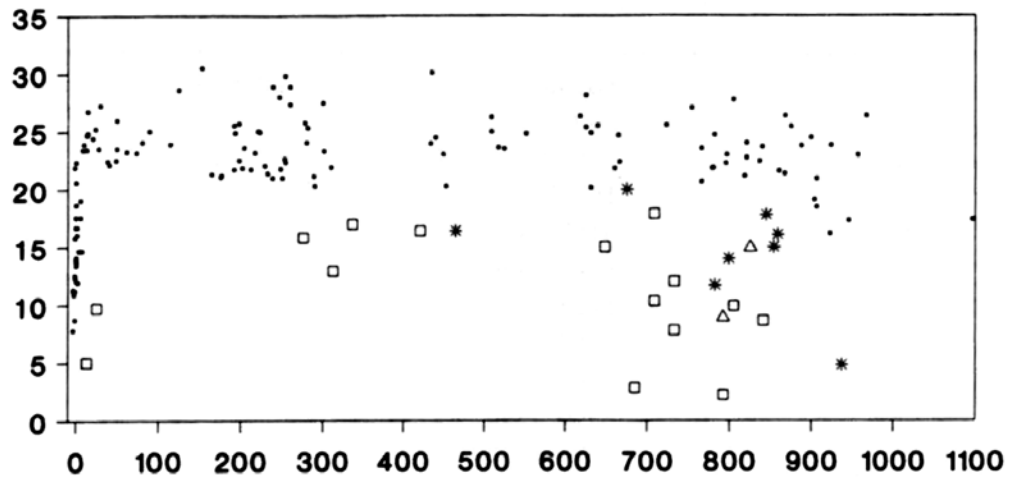
**4.15. Táblázat:** A mitochondrialis betegek n.suralis morфомetriai elemzésének értékei. A: axon átlag területe (µm), M: myelinhüvely átlag területe (µm)

Eset-szám	Kor (év)	Myelin/endoneurialis terület (%)	Myelinizált rostok száma	Neuropathia típusa, diagnózis
1	43/M	16**	3947***	Axonalis/neuronális; T-sejtes lymphoma
2	60/M	20	4727	Enyhe axonalis
3	62/F	21	6368	Axonalis, regenerációval; mitochondrialis defektus
4	66/F	12	3742	Axonalis/neuronális, krónikus; mitochondrialis defektus
5	66/M	14	5126	Ritka, axonalis/neuronális
6	72/F	16	5558	Axonalis/demyelinizációs, regenerációval, proximális
7	74/F	15	3179	Axonalis/demyelinizációs; mitochondrialis defektus
8	82/M	5	3758	Ritka, axonalis/neuronális

**4. 16. Táblázat:** Az IBM betegek n. suralis morфомetriájának eredményei

\*\* Normál tartomány: 20-30%,\*\*\* 6000-9000 myelinizált rostok

Ebben az esetben csak enyhe neuropathiát találtunk, melyet számos regenerálódó axoncsoport kompenzált. A molekuláris genetikai vizsgálat során valamennyi vizsgált gyulladásoos myopathiában, ahol a morfológiai vizsgálat patológiás mitochondriumokat talált az mtDNS multiplex deléciója alakult ki (7. Közlemény).



Jelölések: • • kontroll, Δ: hereditér IBM, □ mitochondrialis myopathia, \* sporadikus IBM ,

4. 41. Ábra: A n. suralisban a myelinizált rostok denzitásának (myelinhüvely area az endoneurialis area százalékos arányában megadva) diagramja a mitochondrialis betegekben és az IBM-ben. A 133 kontroll egyén denzitása 20-30% között mozog.

#### 4.3.4.3 Elektronmikroszkópos vizsgálatok és elektronmikroszkópos morfometria mitochondrialis betegekben

Az izom elektronmikroszkópos vizsgálata során valamennyi mitochondrialis myopathiás betegben talált patológiás mitochondriumokat. Ezek közül sok tartalmazott paracrystallin vagy osmiophil inclusiákat, esetleg amorph anyagot. A n. suralis axonjaiban soha nem találtunk zárványokat tartalmazó mitochondriumokat, míg ezek a Schwann sejtekben gyakran voltak patológiás szerkezetűek, homogen anyaggal, paracrystallinnal kitöltöttek.

A mitochondriumok számának és felületének növekedését észleltük valamennyi vizsgált esetben az izomszövet és a n. suralis kis arterioláinak és capillárisainak a falában levő endothel és perivascularis sejtekben (sima izomsejtek, pericyták)

4.18.- 4. 19. Táblázat.

Diagnosis	Mito No/EC	Mito area/EC	Mito No/PC	Mito Area/PC
KSS/PEO	3,97±1,47*	3,55±0,55*	4,89±1,24	8,10±1,20*
MELAS	3,66±0,52	5,60±1,45*	6,80±2,75*	11,2±1,80*
MM	4,20±1,33*	3,65±0,55*	5,00±1,52*	7,37±1,07*
Minden beteg	3,54±1,23*	4,26±1,75*	5,56±1,88	8,89±4,20*
Kontrollok	2,15±0,14	2,20±0,80	3,30±1,15	2,40±0,71

**4. 17. Táblázat:** A n. suralis kapillárisainak falában levő mitochondrium felületek átlag értékei. EC: endotheliális sejt, PC: pericyta. \* statisztikailag szignifikáns a kontrollhoz viszonyítva  $p \leq 0.05$

Az emelkedés statisztikailag szignifikáns volt a kontroll csoporthoz viszonyítva. Nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a központi idegrendszer érintettségével és a csak perifériás tünetekkel járó mitochondriopathiák között (**4. Közlemény, 1, 2. 3.Absztrakt**).

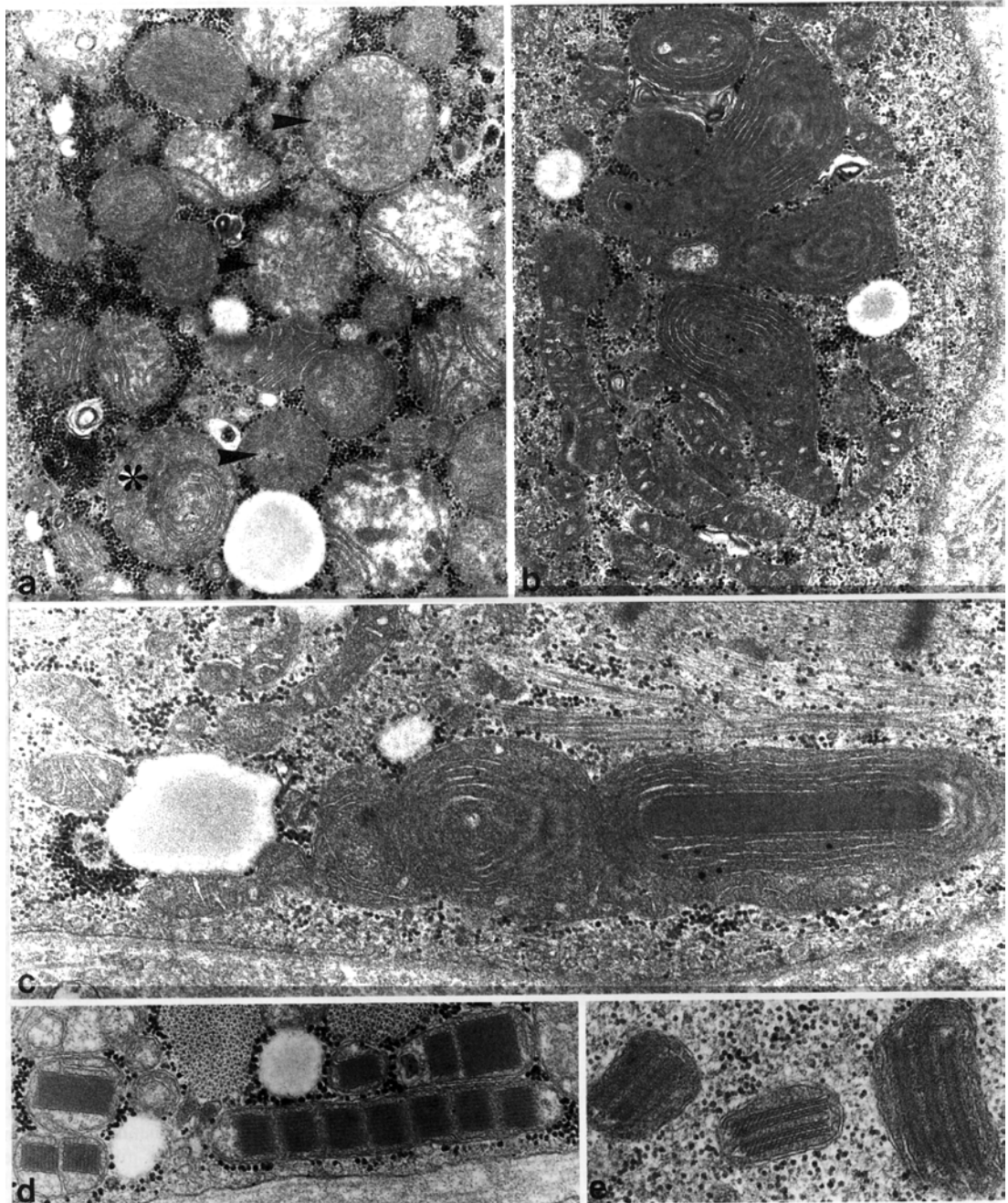
Diagnosis	Mito No/EC	Mito area/EC	Mito No/SMC	Mito Area/SMC
KSS/PEO	4,38±0,98*	5,10±2,32*	9,00±1,93*	5,20±1,55*
MELAS	4,95±1,90 *	5,13±1,45*	10,9±3,10*	10,8±1,70*
MM	5,69±1,22*	6,00±2,99*	7,50±1,95	6,90±1,25*
Minden beteg	4,99±1,44*	5,40±2,21*	9,13±1,39*	7,64±2,50*
Kontrollok	2,78±0,23	1,99±0,28	4,84±0,09	4,10±0,92

**4. 18. Táblázat:** A n. suralis falában levő arteriolák mitochondrium felületének átlag értékei. EC: endotheliális sejt, SMC: simaizomsejt, \* statisztikailag szignifikáns a kontrollhoz viszonyítva  $p \leq 0.05$

#### 4.3.4.4 Elektronmikroszkópos vizsgálatok és elektronmikroszkópos morfológia inflammatorikus myopathiás betegekben

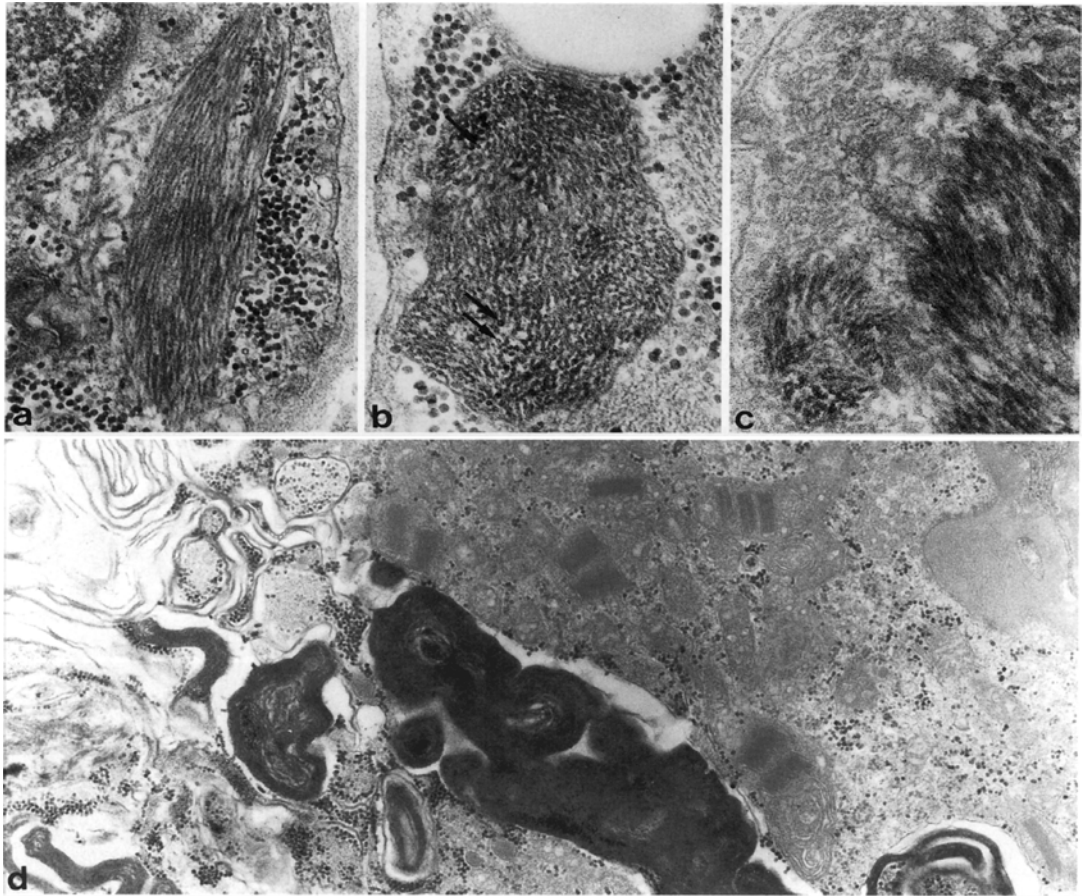
Az idiopathiás inflammatorikus myopathiás betegek izmában számos subsarcolemmális és intermyofibrilláris mitochondriumot találtunk. Ezeknek vagy az alakjuk, vagy cristázatuk volt rendellenes, időnként paracrystallin inclusiók töltötték ki azokat (4. 42. Ábra). A kóros mitochondriumok mellett valamennyi IBM esetben patológiás filamentumokat észleltünk (4.43. Ábra). Lokalizációjuk alapján a filamentumok vagy nukleárisak, vagy cytoplasmikusak voltak. Az intranukleárisak mindig tubularis megjelenést mutattak, míg a cytoplasmikus inclusiók filamentosus ill. tubularis szerkezettel rendelkeztek. Alakjuk és szerkezetük alapján a cytoplasmikus inclusio testek 3 csoportba sorolhatók: (1) klasszikus tubulofilamentosus, (2) fusiform megjelenésű páros helicális

szerkezetű, (3) kompakt membránnal határolt tubulofilamentosus inklúziók. Ezeket a zárványtesteket mindig valamilyen fokú izomrost degeneráció, glycogen szaporulat, irreguláris myeloid struktúrák megjelenése kísérte (7. Közlemény).



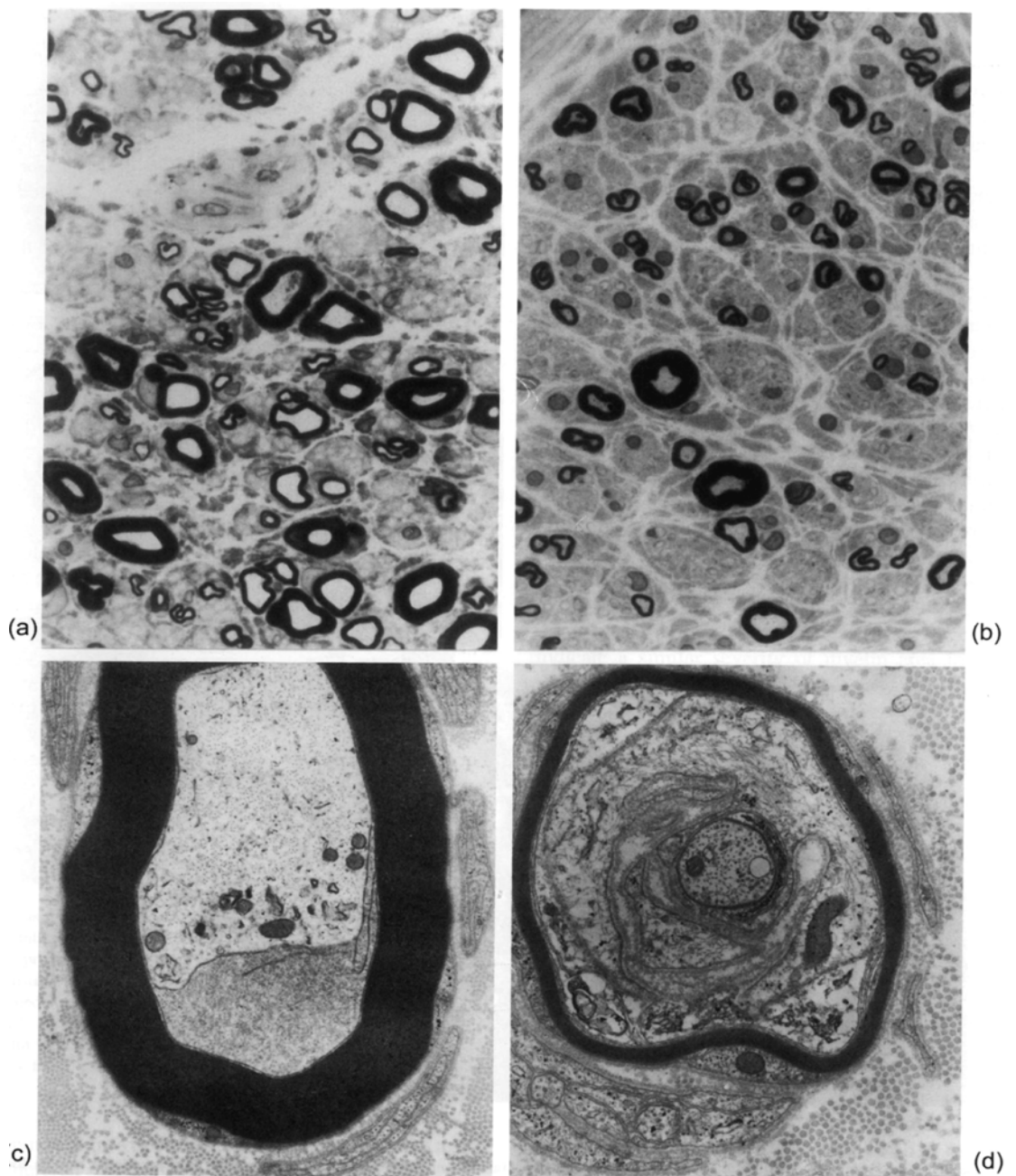
**4.42. Ábra:** Polymyositises beteg izommintája a.) Megnagyobbított intermyofibrilláris mitochondriumok koncentrikus cristázattal (csillag), vagy homogén anyaggal kitöltve (nyíl) b., c.) Subsarcolemmális kóros mitochondriumok koncentrikus cristákkal, vagy elektrondens inklúzióval, d.) e.) Paracrystallin inklúziókkal kitöltött mitochondrium. a.- b.) x24.000, c.) x 32.000, d.) x26.000, e.) x39.000



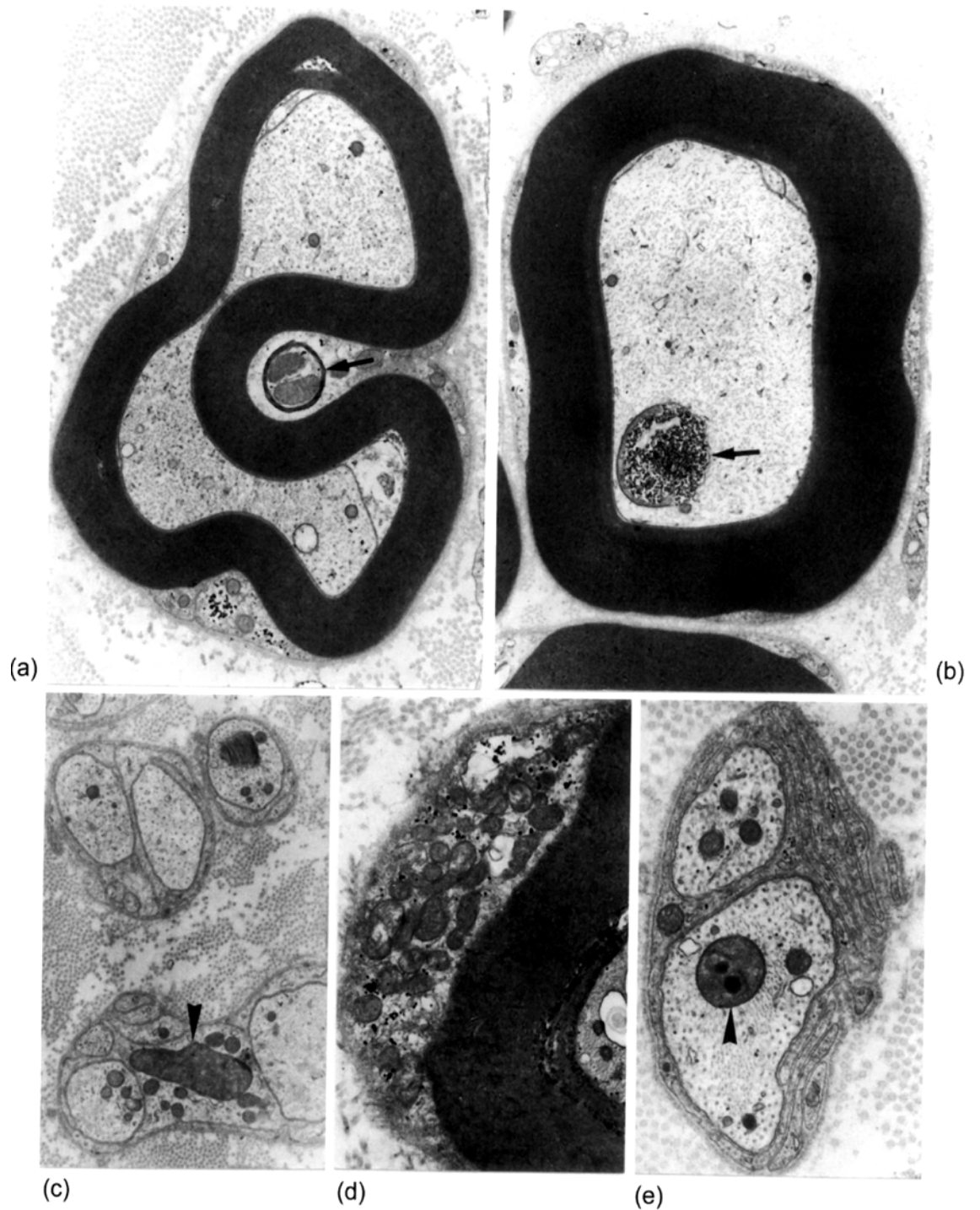


**4.43. Ábra:** Az IBM-e beteg izommintájában talált patológiás inklúziók. **a.)** Helicalisan elrendeződött filamentumok paranukleáris fusiform kötege x 66.000. **b.)** Centrális lumennel rendelkező random módon elhelyezkedő tubulofilamentosus struktúrák membránnal határolt kötege, x 40.000. **c.)** Részben random, részben párhuzamosan rendeződött tubulofilamentosus struktúrák. x 40.000. **d.)** Myelin-szerű membranosus test a paracrystallin inklúziókkal kitöltött kóros mitochondriumok szomszédságában. X26.000

A 14 kombinált ideg és izombiopsziával rendelkező esetből, ahol az izombiopszia igazolta az IBM diagnózist 7 esetben enyhe, 5 esetben közepesen súlyos és 2 esetben súlyos mértékben csökkent a n. suralisban a myelinizált axonok száma. Valamennyi esetben kis regenerálódó axonokat láttunk. Atrophiás axonokat és aktív Waller típusú degeneráció jeleit észleltük 3 esetben. (4.43. Ábra), myelin bomlásterméket a 14-ből 10 alkalommal láttunk. A myelinhüvely szokatlanul vékony volt az axon átmérőjéhez képest 11 betegben. A n. suralisban nem voltak mononukleáris sejtek jelen. A Schwann sejtekben, a myelin hüvelyben és az axonokban pleiomorph elváltozásokat láttunk (4.44 és 4.45. Ábra).



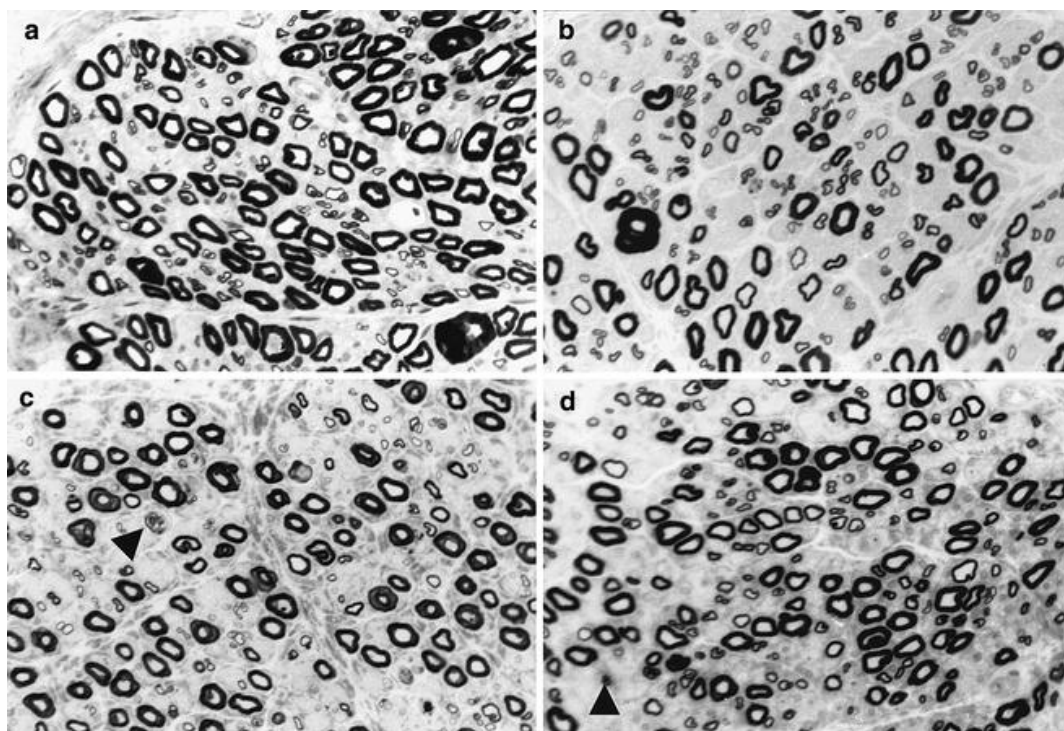
**4.44 Ábra:** **a.)** A 10. IBM beteg. A myelinizált rostok száma kis mértékben redukálódott. Kis regenerálódó axonok és helyenként vékony myelinhüvellyel rendelkező axonok tűnnek föl x 340. **b.)** A 7. IBM eset. A nagy myelinizált rostok száma nagymértékben csökkent. x 340. **c.)** Amorph vagy granuláris depositumok a Schwann sejt adaxonalis régiójában x 10.700. **d.)** Az 1. beteg egy vékony myelin hüvellyel körülvett kis axonja körül szokatlanul rendeződött Schwann sejt nyúlvány, basalis lamina és collegén rostok transnodalis remyelinizációt jeleznek. X 18.000



**4.45 Ábra:** a.) A 11. eset, egy  $\mu$ -granula szerű képletben 2 mitochondrium van a Schwann sejt cytoplasmájában a paranodalis myelin loop régiójában (nyíl) x 9900. b.) 1. eset, a mitochondrium külső és belső membránja között glycogen granulák szaporodtak föl (nyíl) x 9.900. c.) 2. eset, a Schwann sejt megnagyobbodott mitochondriuma homogen anyagot tartalmaz (nyílhegy) x 9.100. d.) A 10. eset, paranodalis mitochondrium akkuláció. X 15.700. e.) Egy nagy csupasz axon (nyílhegy) nagy mennyiségű homogen matrix anyagot tartalmaz. X 14.900.

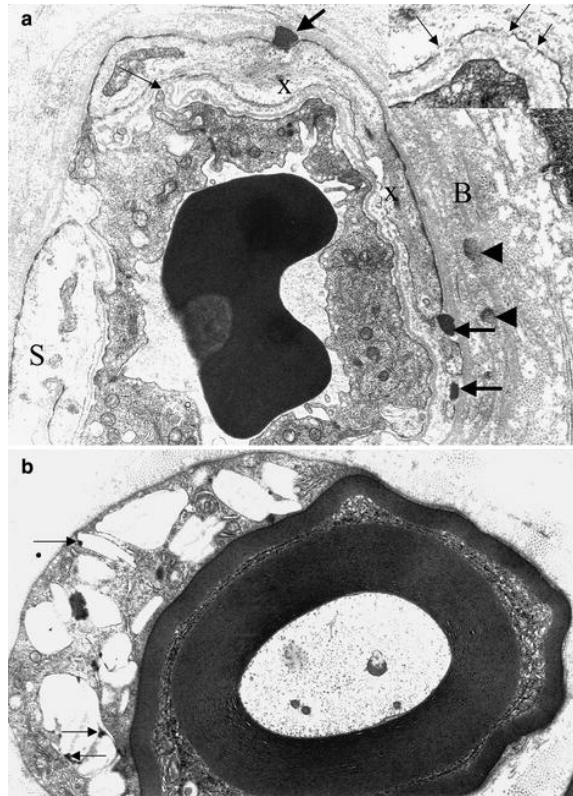
#### 4.3.5. *NOTCH3* mutációhoz társuló neuropathia és myopathia

A genetikailag igazolt CADASIL-os betegek n. suralis biopsziájának analízise során a perifériás idegek degenerációját és regenerációját jelző eltéréseket találtunk (4.46. Ábra).



**4.46. Ábra:** Az 1.-4.. eset n. suralis biopsziájának félvékony metszetei toulidinkékkel festve. **a.)** és **b.)** tomaculous rostok és aránytalanul vékony myelin hüvelyek láthatók a relatíve nagy axonok körül. **a–d.)** degenerált rostok és myelin bomlástermék **c.)** és **d.)-ben** (nyílhegy). A **b.)** és **c.)-ben** az idegrostok száma kissé csökkent, az **a.)-ban** nem. **a–d**  $\times 390$

Az elektronmikroszkópia során helyenként megnagyobbodott túszerű calcium kristályokat tartalmazó mitochondriumok tűntek föl. A vázizomban neurogen atrophíára jellegzetes eltérések mellett társuló myopathiát is találtunk, ami ragged red rostokban, kórosan megnagyobbodott mitochondriumokban, fokális tubularis aggregatumokban, kórosan megnagyobbodott terminális cysternákban és myofibrillaris anomáliákban nyilvánult meg. Két esetben az endothelium sejtekben pinocytotikus vacuolák tűntek föl.

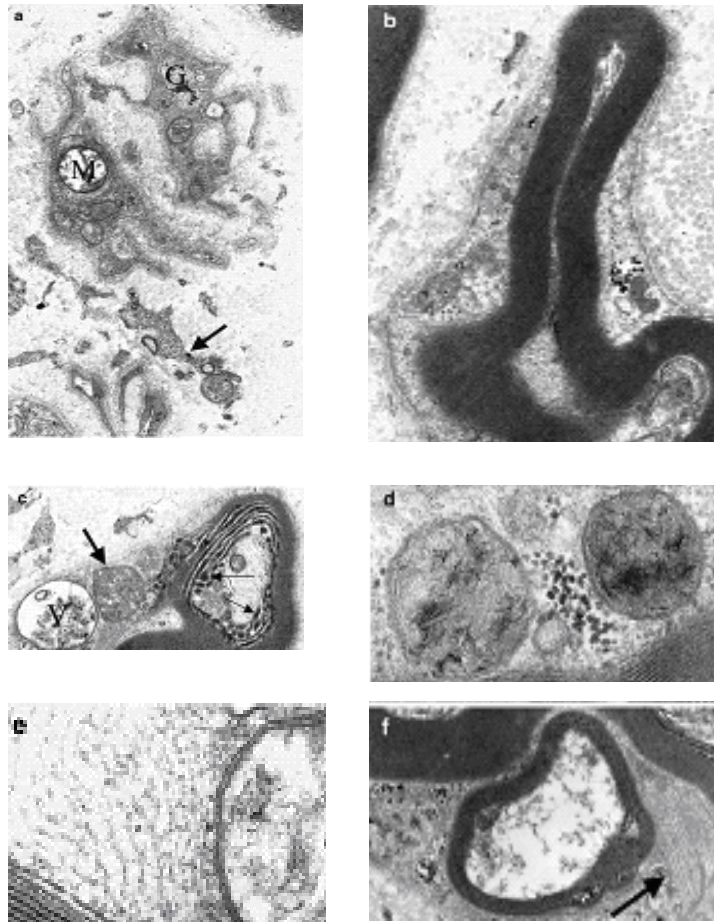


**4.47. Ábra:** Finom strukturális elváltozások a 2. eset n. suralisában a.) Típusos GOM a simaizomsejt felszínén (nyíl) és a basalis lamina rostjai között feltehetően degenerált epineurális arteriola simaizomsejte körül (nyílhegy),  $\times 15,700$  b.) számos  $\pi$  granulára emlékeztető vacuola és osmiophil anyag (nyilak) vannak jelen a myelinizált Schwann sejt cytoplasmájában a Schmidt-Lanterman incisura magasságában.  $\times 13,000$

Egy beteg mitochondrialis genomját végig szekvenáltuk. A molekuláris genetikai vizsgálata során a következő mutációkat találtuk: T2352C, T6776C, A8860G, T12957C, A15326G. Az T12957C báziscsere az *MTND5* gén új mutációja, ami nem eredményez aminosav cserét. A többi mtDNS variáció polymorphizmusnak minősült, melyek közül az A8860G, A1438G, A15326G ritka polymorphizmus (Andrews et al. 1999) (**19. Közlemény**).

#### **4.3.6. Hereditær neuropathia (PMP22 duplikáció) és autoimmun betegségek együttes előfordulása**

A proband (1. Beteg) tünetei harmincas évei elején kezdődtek deréktáji fájdalommal, a lábak gyengeségével és zsibbadásával, mely miatt járása nehezítetté vált. Harminchét évesen polyarthritise és immunserológiája alapján SLE-t igazolódott tünetei háttérében. Ezt követően másodlagos sicca szindrómája, autoimmun thyreoiditise és utricariája alakult ki. Neurológiai vizsgálata 44 éves



**4.48. Ábra.** Intramusculáris ideg EM felvétele a.) Schwann sejt nyúlványok egy degenerált fibroblast szomszédságában (*nyíl*). Egy duzzadt mitochondrium a kis myelinhévely nélküli axonban (*M*). Egy másik axonban a glycogen granulák szaporodtak föl (*G*). b.) Egy kis kollabált Schwann sejt myelin hüvelyben levő atrophias axon, melyben túszerű precipitátumok vannak. Ugyanez látható nagyobb nagyításban a d. ábrán. c.) Myelinizált rost paranodusa kóros, kondenzált adaxonalis terminális myelin loopokkal (*vékony nyílak*). A Schwann sejt abaxonalis cytoplasma mitochondriuma elektron-dens granularis precipitátumokat tartalmaz és degenerálnak tűnik (*vastag nyíl*). Egy szomszédos autophag vacuola (*V*) is látható. d.) A b-ben mutatott mitochondriumban nagyobb nagyítással finom túszerű struktúrák fedezhetők fel. e.) Egy kis intra-axonalis myelinizált rost mitochondriumban is látható néhány túszerű precipitátum. f.) Egy myelinizált ideg  $\mu$  granulája mellett is feltűnik egy kóros mitochondrium túszerű precipitátummal bal oldalon, jobb oldalon szokatlan membránnal határolt lineáris struktúrák vannak (*nyíl*). a  $\times 25,000$ ; b  $\times 28,000$ ; c  $\times 26,000$ ; d  $\times 72,000$ ; e  $\times 93,000$ ; f  $\times 27,000$

korában pes cavust, a végtagok distalis izomcsoportjaiban atrophiat és súlyos paresist talált, sajátreflexei hiányoztak, súlyos distalis típusú érzészavara volt. A beteg húga (2. Beteg) húszas éveiben észlelte először a kezek és lábak zsibbadását, ügyetlenségét. Az alsóvégtagjaiban kifejezett neuropathiás fájdalom jelentkezett. Neurológiai vizsgálata a végtagok distalis izmaiban közepesen súlyos

paresist, renyhe sajátreflexeket és enyhe distalis típusú érzészavart talált. Mindkét esetben relatíve gyors progressziót észleltünk, ezért n. suralis biopszia történt, amely mindkét betegben vasculitis fennállását igazolta. Az 1. betegnél időközben szisztémás vasculitis is kialakult. Mindkét beteg nagy dózisú methylprednisolont, cyclophosphamidot, IvIg-t kapott és plasmapheresisben is részesült. Az alkalmazott kezelések mellett a klinikai tünetek javulást mutattak. Bátyjuknak (3. Beteg) gyermekkor óta darabos volt a járása. Vizsgálatakor 46 évesen az alszáraiban kifejezett hypotrophiát lehetett látni, mindkét oldalon pes excavatusa volt, a lábak dorsalflexiója mko gyengült erővel történt és a végtagokban distalis típusú hypaesthesiát jelzett. A családban az ő tünetei voltak a legenyhébbek. ENG vizsgálat a nőbetegekben súlyos, a férfi betegben közepesen súlyos demyelinizációs túlsúlyú neuropathiát igazolt. A n. suralis biopszia mindhárom betegben demyelinizációt mutatott, melyhez másodlagos axonalis károsodás is társult. A morfológiai kép CMT1A-ra jellegzetes volt. Az 1. és 2. betegben endoneurális lokalizációban mononukleáris sejtek tűntek föl. A gyulladásos sejtek többsége CD8 ípozitív volt. Immunserológiai vizsgálatok: a vérvétel minimum 2 hónappal az immunmodulációs kezelést követően történt. Az 1. Betegnél anti-Smith, anti-cardiolipin IgG és ANA pozitivitás igazolódott homogen ANA festődési mintázattal. Az eredmény SLE-re jellegzetes volt. Érdekes módon a 2. betegnek is emelkedett anti-SS-A, anti-SS-B anti-ENA autoantitest títtere volt. Bátyjuknál nem találtunk autoantitesteket, viszont mindhárom beteg serum IgG szintje csökkent volt és a CD19+ sejtjeik számát is a normálisnál kisebbnek találtuk. A 2. beteg immunmodulációs kezelése közül az IVIG volt a leghatásosabb, ami jól magyarázható a beteg laboratóriumi leleteivel (**22. Közlemény**). A CD4+, CD8+ és CD56+ sejtek aránya, a serum IgM, IgA szintje és a complement 3 and 4 koncentrációja megtartott volt mindhárom esetben. Mivel mindhárom családtagnál relative korán jelentkezett a neuropathia, lábukban már korán észlelték a kis lábizmok atrophiját genetikai vizsgálatot végeztünk a *PMP22* gén deléciójának és duplikációjának kimutatására. A Real-Time PCR-el végzett molekuláris genetikai vizsgálat mindhárom betegnél igazolta a *PMP22* gén duplikációját. Így megállapíthattuk a vizsgált család 2 tagjában a *PMP22* duplikáció autoimmun mechanizmusokkal való coextenciáját. A 2 etiológia szinergisztikusan súlyosbította a betegek klinikai tüneteit (**29. Közlemény**).

## 5. MEGBESZÉLÉS

### 5.1. A neurológiai és pszichiátriai tünetek és a genotípus összefüggéseinek elemzése mitochondrialis betegségekben

A mitochondrialis betegségek elsősorban a nagy energiaigényű szerveket érintik, így a központi és a perifériás idegrendszer valamint a vázizom gyakrabban érintett szervek. PET vizsgálataink igazolták, hogy a glükóz uptake valamennyi vizsgált mitochondrialis betegünk cerebrumában érintett volt, attól függetlenül, hogy a betegnek volt-e központi idegrendszeri károsodásra utaló klinikai tünetegyüttese vagy sem. Az egyes régiók érintettsége eltérő volt, a legkifejezettebben az occipitalis és a temporalis régiók károsodtak. Felvetődik a kérdés, hogy vajon az érintett régiókban az eltérő cerebrális perfúciónak vagy az egyes régiók különböző metabolikus rátájának, vagy esetleg mindkettőnek köszönhető az eltérő mértékű oxidatív foszforiláció zavar. A kontroll egyéneknél a striatumban volt a legmagasabb a  $CMR_{Glu}$ , amit jól magyaráz a régió nagy szinaptikus denzitása. De vajon miért érintett leginkább a temporalis lebeny? Azt tudjuk, hogy a hippocampus stresszre nagyon érzékeny (Magarinos et al. 1998) és hogy egyes neurodegeneratív betegségekben és bipoláris kórképekben a temporalis neocortexben a deletált mtDNS mennyisége magasabb az azonos korátlagú kontroll csoporténál (Kato et al. 1997). A bipoláris betegek hippocampusában az oxidatív foszforilációt és az ATP-dependens proteoszoma degradációt szabályozó enzimek expressziójának kifejezett csökkenését is leírták (Konradi et al. 2004). A fentiek alapján feltételezhetjük, hogy a mitochondrialis diszfunkció befolyásolja a mitochondriumok „calcium-kezelő” képességét és ez a monoaminerg rendszer hyperszenzitivitását eredményezi depressziós tünetegyüttest okozva (Kato et al. 2000). A károsodott energia metabolizmus stressz-indukálta energia-hiányt, laktát szaporulatot, pH csökkenést okoz az agyban, ami túlstimulálja a monoaminerg rendszert. Ez utóbbi alapján nem meglepő, hogy mitochondrialis deficit nem csak depressziókban, hanem schizopheniában is előfordulhat. Ezt igazolja, hogy strukturális és funkcionális rendellenességeket is írtak le schizophren betegek oxidatív foszforilációs rendszerében (Marchbank et al. 1995, Rollins et al. 2009), valamint hogy a microarray vizsgálatok a mitochondrialis malate shuttle rendszer



és a transcarboxylacid ciklus génjeinek érintettségét találták (Middleton et al. 2002). Mi is figyeltünk meg pszichiátriai tüneteket mtDNS betegség következtében. A kétpetéjű ikerpár családjában a maternalisan öröklődő A8344G mutáció új fenotípus, affektív betegség formájában jelentkezett, ahol az mtDNS heteroplasmia aránya a pszichiátriai tünetek súlyosságával korrelált. Ez a mutáció leginkább MERRF szindrómát okoz, mint ahogy az általunk vizsgált egypetéjű ikerpárban is, de leírták ataxia, myopathia, nagyot hallás, neuropathia és diabetes mellitus háttérében is (Shoffner et al. 1990). Az egypetéjű ikerpárunk anamnézisében is szerepelt depressziós epizód, de nem az dominálta a klinikai képet. A depresszióról, mint szimptomáról számos mitochondrialis betegségben beszámoltak, legyen a betegség mtDNS vagy nDNS mutáció által okozott (Campos et al. 2001, Koene et al. 2009), de soha nem korrelált a tünet súlyossága a mutáns mtDNS arányával. Az irodalmi adatok szerint az MR spektroszkópia is igazolja bipoláris depresszióban az agyi metabolizmus érintettségét, a nagy energiájú foszfátok csökkent szintjével, a frontális és temporalis lebenyben a csökkent pH-val, és az emelkedett szürke állomány laktát szinttel, (ld. irod Kato et al. 1998). Emelkedett laktát szintet írtak le első pszichotikus epizódban is (Renshaw et al. 2003). Az emelkedett agyi laktát szint a mitochondrialis érintettség szenzitív markerének is tekinthető. TCD vizsgálataink eredményei jól korrelálnak azokkal a megfigyelésekkel, hogy az oxidatív metabolizmus károsodása és az anaerob glycolysis relativ fokozódása miatt a mitochondrialis betegségekben enyhe agyszöveti lactacidozis alakul ki. A lactacidozis a cerebrális véredények enyhe dilatációját eredményezi. Ez lehet az oka, hogy az acetazolamide teszt csak enyhe, nem szignifikánsan csökkent reserve kapacitás változást detektált a kontroll egyénekhez képest.

A MELAS szindróma patogenezise még mindig rejtély. Korábbi morfológiai tanulmányokban a MELAS-os betegek piális és intracerebrális arterioláiban mitochondriumok felszaporodását írták le (Sakuta et Nonaka 1989). Tokunaga és mtsi (1993) feltételezték, hogy a MELAS-os esetekben a véredényekben felszaporodott mutáns mtDNS játszhat fontos szerepet a stroke-szerű tünetek kialakításában. Más szerzők véleménye szerint, a mutáns/normális mtDNS arány fluktuációja okozhat energia krízist a MELAS-os betegek központi idegrendszerében (Byrne et al 1991). Így a klinikai tünetek nem a mitochondrialis microangiopathia közvetlen következményeként jönnek létre, hanem szisztémás

mitochondriális cytopathia okozza azokat. Ez utóbbi véleményt támasztják alá saját elektronmikroszkópos morfometriai vizsgálataink, melyek során nemcsak MELAS-ban igazoltuk a vázizomzat kis véredényeiben levő és a n. suralis vasa nervorumában elhelyezkedő mitochondriumok megnagyobbodását és felszaporodását, hanem a központi idegrendszeri tünetekkel csak ritkán járó CPEO-ban és MM-ban is (4. Közlemény, 1 és 2, Absztrakt). E mellett szólnak TCD vizsgálataink is, melyek az acetazolamide teszt alkalmazásakor a cerebrális arteriolák vasoreaktivitásának enyhe csökkenését igazolták valamennyi mitochondriális csoportban (MM, MELAS, KSS/PEO) a kontroll egyénekhez képest. Az acetazolamid teszt eredménye jól korrelál Kodaka et al. (1996) eredményével, akik 13 mitochondriális encephalomyopathiás betegben mérték transcraniális Dopplerrel a cerebrovasculáris CO<sub>2</sub> reaktivitást és annak csökkenését találták. Szintén a mitochondriális cytopathia tényét támasztja alá a szöveti glükóz és oxigén metabolizmus zavarára utaló luxus perfúzió jelensége is, amit egy MELAS-os betegben detektáltak PET segítségével (Yokoi et al. 1990). Feltételezésünket később igazolta Betts et al. (2006), ui. a MELAS betegekben a corticalis és leptomeningealis véredények falában mitochondriális diszfunkciót jelző kifejezett COX aktivitás csökkenést találtak. Saját eredményeink arra is utalnak, hogy a véredények falában levő mitochondriális cytopathia fontos szerepet játszhat a mitochondriális megbetegedések esetén a perifériás neuropathia kialakításában is. Elektronmikroszkópos vizsgálataink során a neuronok perikaryonjaiban talált kóros mitochondriumok pedig azt jelezték, hogy a neuropathia nagy valószínűséggel nem csak a vasa nervorum érintettsége miatt alakul ki.

A mitochondriális betegségek fenotípusa rendkívül változatos. Nem csoda, hogy az 1990-es évek elején leírt klasszikus mutációkkal járó kórképek mai ismereteink szerint csak töredékét teszik ki az mtDNS betegségeknek. Egy klinikai tünetet számos mtDNS mutáció eredményezhet, de egy bizonyos mutáció számos klinikai tünet formájában is megnyilvánulhat. Jól példázza ezt az A3243G és az A8344G mutációk epidemiológiai vizsgálata is. A tünetek intrafamiliarisan is különbözhetnek. Egyik MERRF mutációt hordozó családuk érintett családtagjaiban a heteroplasmia aránya különböző volt és ezzel a pszichiátriai és neurológiai tüneteik súlyossága is jól korrelált. A legmagasabb heteroplasmia arányú betegeknél myopathia is jelentkezett, a kisebb mutáns mtDNS arányú csak

pszichiátriai tüneteket okozott. Az egypetűjű MERFF mutációt hordozó ikreknél a heteroplasmia aránya közel azonos volt, neurológiai tüneteik súlyossága már fiatal korukban is eltért. Egyikük súlyos, terápiára rosszul reagáló myoclonus epilepsiában szenvedett, melyhez ataxia, és depressziós tünetegyüttes is társult, míg testvére jó terápiás responsivitást mutató myoclonus epilepsiában szenvedett, társuló enyhe átmeneti depressziós epizóddal. A monozygota ikrek eltérő fenotípusa és gyógyszer reaktivitása egyértelműen igazolja az mtDNS mutáció mellett epigenetikai faktorok szerepét is a mitochondrialis betegségek klinikai tünetegyüttesének kialakításában.

A disszertációban elemzett patogén mtDNS mutációk kivétel nélkül tRNS génekben helyezkednek el. A tRNS mutációk nagy része általában a mitochondrialis protein szintézist csökkenti. Ennek hátterében leginkább a rendellenes aminoacyláció áll. A tRNS-eket az aminoacyl tRNS synthetase nagyon specifikusan ismeri fel, egyetlen báziscsere is "noncharging"-ot okozhat (Schimmel 1977). A kóros aminoacyláció igazolása azonban (különösen, ha ez heteroplasmikus formában történik) bonyolult. Sissler et al. (2004) egy olyan in vitro transkripció modellet hoztak létre, mely segítségével jól követhető az egyes tRNS mutációk következménye. A súlyos mitochondrialis myopathiában szenvedő kislányban 4 mutációt detektáltunk a  $tRNS^{Leu(UR)}$ -ben. Ezek közül az anticodonban, az 3266. nt-nál levő mutáció a legfontosabb, ui. következtében az UAA kód UGA-ra változott. Az UGA triplet normálisan a  $tRNS^{Ser(UCN)}$ -t kódolja. Így az A-G tranzíció következtében a tRNS alapfunkciója változott meg. Homoplasmikus formában ez az étellel összeegyeztethetetlen. A gyermek esetében a mutáció csak az izomszövetben fordult elő csaknem homoplasmikusan, a vérben az nem volt kimutatható. A protein szintézis zavara a kóros aminoacyláció mellett kialakulhatott az anticodon kar destabilizációja miatt (még abban az esetben is, ha a normális aminosav töltődik be, a 3261. és 3259. nt-nál levő pontmutációk az anticodon törzs destabilizációját okozhatják). Ezt igazolja, hogy szintén az anticodon törzsben levő T3271C szubsztitúció súlyos csecsemőkori myopathiát eredményez (Goto et al. 1990), míg a 3260. nukleotid pozícióban levő mutáció felnőttkori cardiomyopathiát és myopathiát hoz létre (Zeviani et al. 1991). Esetünkben a többes mtDNS mutációk együttes hatását valószínűsítjük a klinikai tünetek hátterében.

Hasonlóan több mtDNS variáció szinergisztikus hatásának gondoljuk a dystoniát és fiatalkori stroke-ot a közölt 3 tagú családban, ahol a súlyos dystoniában szenvedő fiúban, testvérében és édesanyjában heteroplasmikus A8332G mutáció igazolódott. A kontroll egyének vizsgálata és az irodalmi adatok ismeretében ez a mutáció patogénnek minősíthető, mert maternalis szegregációt mutat, heteroplasmikus formában volt jelen, és a vizsgált 150 egészséges kontroll magyar személynél nem igazolódott. A 8332. nt pozícióban elhelyezkedő „A”, evolúciósan nem erősen konzervált, azonban a mutáció a tRNS 38. nukleotidját érinti, amely mindig a 22. nukleotiddal áll H-kötésben. Ez a kötés viszont már evolúciósan konzerváltnak tekinthető, amely ember esetében a 8316. és a 8332. nt között helyezkedik el (Campos et al. 2000). A T8316C szubsztitúció az irodalomból myopathia, laktacidózis és stroke-szerű tünetek háttérében patogénként ismert (Campos et al. 2000). Hatására az tRNS<sup>Lys</sup> anticodon törzs első bázispárjai közötti H-kötés oldódik fel (4.7. Ábra). Ennek következtében az anticodon törzs dupla helixe és a tRNS másodlagos struktúrája károsodik. A mutáció hatását a betegek fibroblasztjainak csökkent Komplex I. aktivitása is igazolta. Az enzimaktivitás legkifejezettebben az 1. betegben csökkent, akinek a klinikai tünetei a legsúlyosabbak voltak, és akinek a heteroplasmia aránya 65% volt. Ebben a családban az új patogén mutáció mellett 16 további polymorphizmust találtunk az mtDNS-ben. A *COII-tRNS<sup>Lys</sup>* közötti nem kódoló intergénikus (*NC7*) régióban egy 9 bp deléció és a C8270T szubsztitúció is jelen volt. Ezt a deléciót kelet-ázsiai antropológiai markernek gondolták (Horai et al. 1996), mely a replikáció során „slipped-stranded mispairing” (SSM) miatt instabilitást eredményezhet. A C8270T szubsztitúciót eleinte ischaemiás szívbetegségben gyakran előforduló polymorphizmusnak minősítették (Ruppert et al. 2004), majd azt Gonzalez (2007) és Thangaraj (2008) vizsgálatai a 9-bp-os delécióval együtt az M szubhaplocsoport determinánsának vélelmezték. A tRNS<sup>Lys</sup> pseudouridin loopjában (T-loop) talált nt8347 szubsztitúciót Coon et al. MitoChip resequencing array-el Alzheimer-kóros betegekben szignifikánsan magasabb arányban találta meg, mint az egészséges kontroll személyekben (Coon et al. 2006). Az általunk talált 3 szinonim (a 9bp deléció, G8697A és az A11812G), és 1 nem szinonim szubsztitúció (T10463C a tRNS<sup>Arg</sup>-ben) maternalis öröklődésű sensorineuralis nagyothallásban szenvedő betegekben is előfordult (Lehtonen et al. 2003). Ezen kohort egy betegében a T haplocsoport specifikus

G8697A szubsztitúció és a T10463C nem szinonim SNP a mi családukhöz hasonlóan együtt volt jelen. Ez alapján úgy véljük, hogy ezeknek a szekvencia variációknak a szinergisztikus hatása szerepet játszhat a sensorineurális hallásvesztésben.

Nem csak pontmutációk, hanem az mtDNS egyes és többes deléciói is okozhatnak klinikai tüneteket. A Kearns-Sayre szindrómás betegünk esetében ismertetett, a mitochondriális genom utolsó szakaszára lokalizálódó kis kiterjedésű deléciók ritkák. Ez az 1.2 kb terjedelmű deléció a cytochrome b gént és egy határoló tRNS-t foglal magába. Feltételezzük, hogy a deléció hatására a Komplex IV. működése nem károsodott szignifikánsan, hiszen cytochrom c jelenlétében a COX reakcióval nem detektáltunk COX negatív izomrostot. A Komplex III. azonban károsodott, mert az extra szubsztrát hozzáadása nélkül a Komplex IV. aktivitás csökkent.

A felnőttkori kezdetű mitochondriális myopathia-neuropathia háttérében általunk leírt egyes nagy mtDNS deléció irodalmi ritkaság. Kizárólagosan perifériás tünetekkel járó mitochondriális myopathia háttérében közlésünk előtt csak mtDNS pontmutációkat írtak le, (Bindoff et al. 1993, és Moraes et al. 1993). Az irodalomban elsőként közöltünk olyan mitochondriális myopathiát-neuropathiát melynek háttérében egyes nagy deléció igazolódott (**5. Közlemény**). A 8.5 kb-nál nagyobb deléciók csak ritkán fordulnak elő és azokat más klinikai tünetekkel összefüggésben írták le. Ballinger et al. (1992) maternalisan öröklődő diabetes mellitusban találtak heteroplasmikus 10.4 kb nagyságú deléciót, amely a nehéz lánc replikációjának kiindulási helyét is érintette. A mi esetünkben nem károsodott a replikáció origója és a transzkripció promoter régiója, a deléció 9 polypeptid gént és 9 tRNS gént (többek között a *tRNS<sup>Leu(UUR)</sup>*-t) érintett. Mint KSS szindrómás betegünknel már említettük, ez a tRNS domináns szerepet játszik a különböző mitochondriális betegségek patogenezisében. A tény, hogy relatíve nagy génszakasz deletált, de a klinikai tünetek mégis enyhék, azzal magyarázható, hogy a deletált genomok száma alacsony volt. Megfigyeléseink alapján a tünetek súlyosságát nem a deléció lokalizációja és mérete határozza meg, hanem a heteroplasmia mértéke. Ezt a feltételezést támasztják alá Shoffner et al. adatai is (1995), miszerint a *tRNS<sup>Leu(UUR)</sup>* génben egyetlen nukleotid pár deléciója is okozhat mitochondriális encephalomyopathiát.

## 5.2. A mitochondrialis *tRNS<sup>Lys</sup>* gén és határoló régióiban talált eltérések jelentősége

Az mtDNS egyes szakaszain a mutációk előfordulásának gyakorisága különböző. A tRNS gének mutációs rátája rendkívül magas, így ezek a mitochondriális genomon belül hot spot régióknak tekinthetők ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)). A legtöbb mutációt a *tRNS<sup>Leu(UUR)</sup>* génben találták. Második helyen áll a *tRNS<sup>Lys</sup>* gén, amelynek eddig 14 különböző patogén mutációját és 8 polymorfizmusát írták le ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)). Munkánk során a mitochondrialis *tRNS<sup>Lys</sup>* gén és annak közvetlen közelében levő gén szakaszok variabilitását és a variabilitás következtében keletkező szubsztitúciók következményét tanulmányoztuk mitochondrialis betegség gyanúja miatt vizsgált és egészséges kontroll egyéneknél. Vizsgálataink során a kérdéses régióban 10 különböző mtDNS variációt találtunk. A cytochrom oxidáz-c II. alegysége, és *tRNS<sup>Lys</sup>* gén közötti szakasz az irodalomból is hypervariábilis régióként ismert. Ebben a régióban három magyar családnál az nt 8271-8280 között egy 9 bp-os deléciót találtunk, amelyet kelet-ázsiai antropológiai markerként tartottak nyilván (Horai et al. 1996). Kaukázusi populációban ez az eltérés rendkívül ritka, eddig három esetben írták le Skóciában (Thomas et al. 1998), Spanyolországban (Barrientos et al. 1995) és Finnországban (Lehtonen et al. 2003). Ezzel szemben a 9 bp deléció előfordulási gyakorisága Kínában 14,7% (Yao és mtsai 2000); Taiwanban 21% (Liu et al. 2005); Thaiföldön 18-45% (Fucharoen et al. 2001); Indiában 2,15% (Thangaraj et al. 2006); Afrikában 0,9% (Soodyall et al. 1996) míg a venezuelai indián populációban 3,39% (Vona et al. 2005). Az amerikai indiánok között is relatíve gyakran találták meg (Wallace et al. 1992). A hypervariábilis génszakasz deléciója a korábbiakban diszkutált módon feltehetően a „slipped-stranded mispairing” mechanizmussal okoz instabilitást és így további mtDNS hibák kialakítására hajlamosít. Ezt igazolja a megfigyelés, hogy Taiwanban az A8344G patogén szubsztitúcióval bíró betegek 67%-ában találták meg a deléciót (Liu et al. 2005), míg az egészséges népességnek mindössze 21%-ában volt jelen. Az 5.1. pontban diszkutált dystoniás magyar család esete is igazolja ezt a feltételezést, hiszen mtDNS-ükben a kérdéses régióban a 9 bp deléció mellett a 8270. és 8347. nukleotid SNP-je és az A8332G patogén mutációja igazolódott.

A 9 bp deléció jelenléte miatt a család mtDNS-t haplotipizáltuk (Dr. Raskó István) és ősi, ázsiai populációra jellemző B haplocsoportot találtunk. A

honfoglaló magyarok csontjainak haplotípus elemzése azonban 70-ből csak 1 esetben találta meg a fenti haplotípust (Tömöry et al. 2007), amely alapján nem valószínű, hogy az általunk vizsgált magyar család közvetlen rokonsági kapcsolatban áll a honfoglaló magyarokkal. Úgy gondoljuk, hogy a kelet-ázsiai antropológiai marker (9 bp deléció) jelenléte a magyar betegekben származhat a magyarság történelméből, de nem zárható ki azonos lokalizációjú rekurrens deléció megjelenése sem. A másik két 9 bp delécióval rendelkező családnak ui. nem ősi haplocsoportba tartozik. A Taiwanban talált korrelációk és az általunk vizsgált esetek alapján feltételezzük, hogy a 9-bp-os deléció jelenléte az mtDNS hipervariábilis szegmensében a mitochondrialis genom instabilitását eredményezi és hajlamosíthat patogén mutációk kialakulására is.

Az ismert A8344G MERRF mutációt 13 esetben találtuk meg a betegekben. A betegek klinikai tünetei rendkívül változatosak voltak és a várt klasszikus tünet csak az esetek 20%-ában volt jelen. Egy típusos MERRF szindrómás család esetében ehhez a mutációhoz az A8347C és a G8251A polymorfizmusok is társultak. Tüneteik súlyosságát nem befolyásolta a társuló SNP-k jelenléte. A fenti eltéréseken kívül a vizsgált régióban további öt polymorfizmust (G8251A, G8269A, C8270T, del. 8271-8280, G8292A) találtunk, amelyek mindegyike antropológiai markernek minősült.

Vizsgálataink során egy az irodalomban eddig még le nem írt patogén mutációt (A8332G) azonosítottunk a korábban már leírt a MERRF szindróma hátterében jól ismert A8344G mutáció mellett. A patogén mutációk a tRNS<sup>Lys</sup> működéséhez fontos pozíciókban helyezkedtek el, H-kötésben, illetve konzervált pozíciókban. Megállapítottuk, hogy bizonyos mutációk hajlamosíthatnak más mtDNS rendellenességek kialakulására. Az egyes esetekben, a betegség hátterében társuló patogén mutációk hatását az egyébként nem patogén mutációk módosíthatják. Az mtDNS hipervariábilis szakaszai nem csak a klinikai genetikai diagnosztikában, de a populációgenetikai vizsgálatokban is fontosak, hiszen az általunk talált polymorfizmusok nagy része valamely haplotípust vagy szubhaplotípust jellemzi.

### **5.3. Az mtDNS A3243G és A8344G mutációinak genetikai epidemiológiai vizsgálata**

A neurológiai betegségek háttérében az mtDNS A3243G és A8344G mutációjának előfordulási gyakoriságát munkacsoportunk vizsgálta elsőként közép-kelet Európában.

Az A3243G mutációt 631 valószínűleg mitochondrialis betegségben szenvedő beteg közül 14 esetben (6 beteg és 8 családtag) tudtuk kimutatni, mely alapján a kohortban az előfordulás frekvenciája 2,22%. Az A8344G mutáció 513 betegből 11 betegben és 2 családtagban igazolódott, így ennek a mutációnak a frekvenciája a vizsgált kohortban 2.53%.

Mutációs frekvencia	Vizsgált betegek száma	Az A3243G mutációk száma	Beválasztási kritériumok	Ország	Irodalom
9.09 *	22	2	DM2	Horvátország	<i>Martin-Kleiner et al., 2004</i>
3.33	90	3	DM	Kína	<i>Wang et al., 2009</i>
3.01	133	4	DM2	Kína	<i>Ng et al., 2000</i>
2.92	240	7	DM	Japán	<i>Ohkubo et al., 2001</i>
2.61	115	3	Korai kezdetű DM	Svéd- és Finnország	<i>Lehtonen et al., 1999</i>
2.03	148	3	DM1, DM2	Portugália	<i>Salles et al., 2007</i>
0.72	138	1	DM1	Katalónia, Spanyolország	<i>Francisco et al., 2005</i>
0.47	428	2	DM2	Kína	<i>Zhang et al., 2004</i>
0.41	244	1	DM2	Kína	<i>Zhao et al., 2006</i>
0.41	733	3	DM1, DM2, MIDD, hallásvesztés	Portugália	<i>Salles et al., 2007</i>
0.07	1460	1	DM, hallásvesztés	Németország	<i>Klemm et al., 2001</i>
0.00	129	0	DM2	Lengyelország	<i>Malecki et al., 2001</i>
0.00	184	0	DM2	Kína	<i>Tang et al., 2006</i>

**5.1. Táblázat:** Különböző országokban a mtDNS A3243G mutáció frekvenciájának megoszlása diabetes mellitus-os betegek körében (\* Pilot study: szájnnyálkahártyából izolált DNS mintákból, \*\* a betegszelekció a Mitochip microarray eredmények alapján történt)

A mitochondrialis betegségek össz prevalenciáját egy spanyol tanulmány a 14 év feletti populációban relatíve magasnak találta (5.7:100.000) (Arpa et al. 2003), ahol a diagnózist a klinikai tünetek mellett a morfológiai és molekuláris biológiai



vizsgálatai alapján állították fel. Az A3243G mutáció több közlemény szerint is az mtDNS betegségek közül a leggyakoribb. Pang et al. (1999) vizsgálatai is ezt a feltételezést támasztják alá, ugyanis 177 mitochondrialis betegből 32-nél találták meg ezt a mutációt és 9 esetben A8344G szubsztitúció igazolódott. Chinnery et al. (2004) a patogén mitochondrialis mutációk jelenlétét 1:8.000-re becsülte. A mitochondrialis etiológiát (A3243G mtDNS mutációt) a fiatalkori stroke szindrómákban Majamaa et al. 38 occipitalis területi ischaemiás stroke-os betegnél összesen 2 esetben, azaz az esetek 5,26%-ában talált A3243G mtDNS mutációt (Majamaa et al. 1997). Az A3243G mutáció frekvenciája különböző országokban nagy variációt mutat, amely függ a kohortba való beválasztás kritériumától. A legtöbb tanulmány a mutáció előfordulását diabetes mellitus-os betegekben vizsgálta (5.1 Táblázat).

Az irodalomból hat olyan tanulmány ismert, ahol az A3243G mutáció gyakoriságát multiszisztémás tünetekkel bíró mitochondrialis fenotípusok háttérében vizsgálták, és a beválasztási kritériumoknál figyelembe vették a morfológiai eredményeket. A mutáció frekvenciája ezekben az esetekben 0% és 44,33% között volt (Mkaouar-Rebai et al. 2007; Majamaa et al. 1998; Wang et al. 2008; Sternberg et al. 2001; Rodriguez-Hernández et al. 2000; Chae et al. 2004). Ezek közül 3 tanulmányban a betegeket az izombiopszia eredménye alapján előszűrték és csak azon betegeknél történt genetikai vizsgálat, akiknél a biopszia mitochondrialis betegségre utalt. Ezekben az esetekben a mutációs frekvencia 12,5% és 44,33% között volt (Wang et al. 2008; Chae et al. 2004; Rodriguez-Hernández et al. 2000). Vizsgálatunkhoz hasonló beválasztási kritériumot 3 munkacsoport alkalmazott. Az eredményeket összehasonlítva a finn népesség körében az A3243G mutáció előfordulása lényegesen nagyobb (6,5%) (Majamaa et al. 1998), míg Franciaországban (1,2%) (Sternberg et al. 2001) és Taiwanban (3,39%) (Pang et al. 1999) a magyar népesség körében talált mutációs frekvencia értékekhez (2,22%) hasonló eredményt kaptak (5.2. Táblázat).

Gondolkodásunkban mind a MELAS szindróma, mind az annak háttérében álló leggyakoribb mtDNS mutáció, az A3243G szubsztitúció is, leginkább a fiatalkori stroke-kal kapcsolódik össze és a maternális öröklődésű egyéb mitochondrialis betegségekre utaló tünetek, mint nagyothallás, ataxia, alacsony termet, endokrin zavarok, basalis ganglion meszesedés, diabetes mellitus már nem asszociálódnak az mtDNS ezen nukleotidjának mutációjával. A finn adatokhoz képest az általunk

vizsgált időszakban az A3243G mutáció előfordulása alacsonynak bizonyult. Nem zárható ki, hogy a finn népességben ténylegesen nagyobb a valószínűsége az mtDNS A3243G mutáció előfordulási gyakoriságának, de az egyéb európai molekuláris epidemiológiai vizsgálatok alapján ennek valószínűsége kicsi. Az A3243G mutáció frekvenciája nagymértékben függ a betegek szelekciójától (5.1. Táblázat, 5.2. Táblázat).

Ország	Beválasztási kritériumok	Vizsgált betegek száma	A3243G mutációval rendelkező betegek száma	Mutációs frekvencia	Irodalom
Kína	Mitochondriális encephalomyopathia	97	43	<b>44.33</b> *	<i>Wang et al., 2008</i>
Korea	Mitochondriális encephalomyopathia, psychomotoros meglassultság, cardiomyopathia, stroke-szerű epizódok, sensorineurális hallásvesztés, DM, vesebetegség	85	19	<b>22.35</b> *	<i>Chae et al., 2004</i>
Kuba	Mitochondriális encephalomyopathia, CPEO	8	1	<b>12.50</b> *	<i>Rodriguez-Hernández et al., 2000</i>
Finnország	DM, sensorineurális hallásvesztés, epilepsia, ataxia, occipitalis stroke, CPEO, cerebrális calcificatio, fehérállomány betegség, hypertrophiás cardiomyopathia	615	40	<b>6.5</b>	<i>Majamaa et al., 1998</i>
Ausztrália	KSS, CPEO	1184	73	<b>6.17</b>	<i>Marotta et al. 2004</i>
Taiwan	CPEO, DM	177	6	<b>3.39</b>	<i>Pang CY et al., 1999</i>
Franciao.	Sensorineurális hallásvesztés	29	1	<b>3.45</b> **	<i>Léveque, 2007</i>
Japan	Sensorineurális hallásvesztés	230	4	<b>1.74</b>	<i>Nagata et al. 2001</i>
Franciao.	Mitochondriális encephalomyopathia	166	2	<b>1.2</b>	<i>Sternberg et al. 2001</i>
Kína	Leigh- betegség,	124	1	<b>0.81</b>	<i>Zhang et al. 2007</i>
Tunézia	Mitokondriális betegség - MIDD, MELAS, MERRF, CPEO, hypertrophiás cardiomyopathia, Leigh-szindróma	128	0	<b>0</b>	<i>Mkaouar-Rebai et al. 2007</i>
UK	Idiopathiás cardiomyopathia	52	0	<b>0.00</b>	<i>Turner et al. 1998</i>
Taiwan	Ataxia, SCA	265	0		<i>Lee et al., 2007</i>
USA (NY)	Insulin dependens DM	270	0	<b>0.00</b>	<i>Abad et al. 1997</i>

**5.2. Táblázat.** Az egyes országokban a mtDNS A3243G mutáció frekvenciájának megoszlása a mitochondriális betegek körében (\* A betegek szelekciója az iombiopszia eredménye alapján történt, \*\* a betegszelekció a Mitochip microarray eredmények alapján történt)

Az A8344G mutáció gyakoriságát eddig 6 országban vizsgálták. Finnországban 621 olyan beteget választottak be, akiknek klinikai tünete mitochondriális betegségre utalt. Meglepő módon egy pozitív beteget sem találtak. Ezzel szemben Texasban 2%, Észak-Kelet-Angliában 3,85%, Koreában 4,62% és Taiwanon 5% volt a mutációs frekvencia a kiválasztott betegekben. Csaknem minden munkacsoport a mitochondriális betegség gyanús teljes kohortot vizsgálta változó szigorúságú kritériumok mellett. Ha a kritérium nagyon szigorú volt, azaz csak bizonyítottan OXPHOS betegek kerültek be a vizsgálatba a mutációs frekvencia megemelkedett 23%-ra (5.3. Táblázat).

Ország	Beválogatási kritériumok	Vizsgált betegek száma	A8344G mutációt hordozó betegek száma	Mutációs frekvencia	Referencia
Korea	Feltételezett mitochondriális betegség	65	3	4,62%	Kwon et al, 2009
Texas	Definitív mitochondriális betegség (Walker kritérium)	102	2	2%	Scaglia et al, 2004
Taiwan	Mitochondriális betegség	177	9	5%	Pang et al, 1999
Észak-Kelet-Anglia	Feltételezett mitochondriális betegség	104	4	3,85%	Chinnery et al, 2000
Észak-Finnország	Ataxia, epilepsia, lipoma, myopathia, PEO, optikus atrophia, neuropathia, hypoacusis	621	0	0%	Remes et al, 2003
Miami, Brazília	OXPHOS defektus, mitochondriális betegség	13	3	23%	Tengan et al, 1997

**5.3. Táblázat.** Az egyes országokban talált A8344G mutációs frekvencia

Az mtDNS epidemiológiai vizsgálatokban nem csak a betegbeválogatási kritérium jó megválasztása, hanem a heteroplasmia miatt a vizsgált szövetek és a metodika is befolyásolják az eredményt. Horvátországban közöltek egy

tanulmányt, melyben az A3243G mutáció csak a buccalis nyálkahártyából izolált mtDNS mintából volt kimutatható, míg a vérből izolált DNS minta elemzése nem érzékelt annak jelenlétét (Martin Kleiner et al. 2004). A mi betegek között is volt egy, akinek csak izomszövetében tudtuk detektálni az A3243G szubsztitúciót, a vérben az nem volt kimutatható. Ez a tény felveti annak lehetőségét, hogy a vérben levő igen alacsony szintű heteroplasmia arány miatt nem kerül a pontmutáció felismerésre. Ennek alapján a mutáció legbiztosabban posztmitotikus szövetből mutatható ki. A szájnyálkahártya sejtszövetjei nem posztmitotikus sejtek, de ezek turnovere kisebb, mint a perifériás vér elemeié, ami meggátolja a mutáció ún. kimosódását. Posztmitotikus szövet hiányában ez is alkalmas lehet a mutáció analízisre.

A két tanulmány alapján elmondhatjuk, hogy az mtDNS pontmutációk epidemiológiai vizsgálatainak eredménye, a kapott frekvencia érték nagymértékben függ a vizsgált betegek beválasztási kritériumától és a vizsgált szövetről. Az általunk kapott mutációs frekvenciák hasonlóak más európai országok közölt adataival.

#### **5.4. A molekuláris biológiai vizsgálatok szerepe az mtDNS betegségek diagnosztikájában és prenatális diagnosztikájában**

A genetikai betegségben szenvedő pároknak sok esetben lehetőségük van prenatális diagnosztikára és a foetus érintettsége esetén a terhesség terminációjára. Több mint 40 monogénes betegségben ma már alternatív diagnosztikus lehetőség a preimplantációs genetikai diagnosztika (PGD). A mendeli betegségektől eltérően, ahol a cél a mutáció jelenlétének vagy hiányának a megállapítása az embrióban, a mitochondriális betegségekben a mutáns mtDNS heteroplasmia arányának meghatározása a cél. Így mielőtt az mtDNS betegségekben ajánlanánk a PGD-t, fontos a mutáns mtDNS szegregációs mintázatának megértése a női ivarsejtekben. A heteroplasmikus mtDNS transzmisszió vizsgálatára két neutrális mtDNS polymorfizmust tartalmazó egértörzsset használtunk (Jenuth et al. 1996). Ebben az egértörzsben az mtDNS polymorfizmus utódokba való transzmisszióját a random genetikai drift határozza meg (Jenuth et al. 1996), hasonlóan a human mtDNS betegségekhez (Chinnery et al. 2000). A PGD az oocyta vagy a zygota poláris testjéből, vagy a korai embrió egyes blastomerjéből is kivitelezhető. A poláris test vizsgálata etikai szempontok miatt előnyösebb lehet, hiszen elkerüli a

human embryoval való manipulációt. Vizsgálataink alapján az első poláris test és az érett oocyta ooplasmájának heteroplasmia (HP) aránya gyakorlatilag identikus. Ez azt bizonyítja, hogy még a poláris testben jelen levő kis mennyiségű mtDNS is jól reprezentálja a teljes oocytát. Az ugyanazon egér egyes oocytáinak HP aránya azonban nagyon különböző volt, és eltért az anyai HP aránytól is, feltehetően az mtDNS genetikai „üvegnyak hatás” elvén kialakuló transmissziójának köszönhetően (Jenuth et al. 1996). A korai embryok egyes blastomerjeinek HP aránya csaknem azonos volt. A 2-, 4-, 6- és 8-sejtes embryok egyes blastomerjeinek mtDNS tartalma nagyon különböző, de ez nem befolyásolta a diagnosztikus vizsgálat kivitelezhetőségét. Annak ellenére, hogy Van Blerkom et al. (2000) a human embryo pronukleáris állapotában aszimmetrikus mitochondrialis megoszlást figyelt meg, vizsgálataink alapján úgy gondoljuk, hogy az egyes blastomerekben jelen levő össz mitochondrium szám nem befolyásolja az egyes sejtekben a különböző genotípusok arányát. Megfigyeléseink szerint mind a kis mtDNS tartalmú poláris test és a nagyobb mtDNS tartalmú blastomerek vizsgálata alkalmas a PGD-ra, de a blastomer biopszia nagyobb biztonsággal alkalmazható. A poláris test vizsgálatakor ui. a hiba ráta 21% volt, míg a blastomerek esetében az csak 2%-ot tett ki. A poláris test mtDNS gyengébb amplifikációját okozhatta a kisebb cytoplasma és következményesen alacsonyabb mtDNS mennyiség, de nem zárható ki az sem, hogy a poláris test mtDNS molekulái degradálódtak. Irodalmi adatok utalnak arra, hogy mind az egér és a human embryok első poláris testjeiben az in vitro inkubáció során gyors degeneratio figyelhető meg (Munné et al. 1995). A prediktív PGD adatok interpretációja során hasonló elveket követhetünk, mint a mitochondrialis betegségek prenatalis diagnosztikája során, azaz  $\leq 30\%$  alacsony mutáns tartalomnak (loadnak),  $> 80 - 90\%$  nagy mutáns loadnak minősül, míg a közti „szürke zóna” értelmezése nehéz. Az intermedier HP arány mellett nem zárható ki, hogy a foetus érintett lesz és ez már a terhesség terminációját indikálja. A rendelkezésünkre álló adatok alapján ma azt javasoljuk, hogy a 0% vagy alacsony mutáns HP tartalmú embryok alkalmasak az embryo transzferre, az intermedier vagy nagy mutáns load-ú embryok transzfere elkerülendő. Nem szabad figyelmen kívül hagyni Poulton és Morten megfigyelését sem (1993), miszerint még az embryo alacsony HP aránya sem zárja ki azt, hogy a későbbiekben egyes mtDNS mutációk esetén szignifikáns szövet-specifikus

szegregáció alakulhat ki az egyedben. Természetesen ezek csak irányelvek, minden egyes PGD egyéni megítélést igényel (Bredenoord et al. 2009). Kísérleteink validitását Stefann et al. (2006) human PGD vizsgálatai igazolták, ui. ők alkalmazták először a PGD-t human mitochondrialis betegségben az mtDNS T8993G kimutatására.

Összefoglalva azt mondhatjuk, hogy mtDNS betegségekben a PGD megfelelő technikai felkészültség mellett biztonsággal kivitelezhető módszer. A vizsgálathoz a 8 sejtes embryo blastomer biopsziáját javasoljuk, és két blastomerból a molekuláris biológiai teszt parallel elvégzését. Az 1. polártest HP aránya ugyan egyezik az ooplasma HP arányával, de alacsony DNS koncentrációja, esetleges degradációja miatt nagy a hiba lehetőség, így annak vizsgálata a rutin diagnosztika számára nem optimális.

### **5.5. A nukleáris *RRM2B* gén heterozygota mutációja, mint az autoszomalisan domináns ophthalmoplegia externa új etiológiája**

A DNS replikációjához és repairjéhez a dNTP-vel való optimális ellátás elengedhetetlen. A sejtek dNTP-je a ribonukleozid-difoszfátok de novo deoxyribonukleozid-difoszfáttá redukálódása következtében keletkezik. Ezt a feladatot a cytoplasmikus ribonukleotid reduktáz enzim (RNR) látja el (Nordlund and Reichard 2006), amely R1 és R2 alegységekből áll. A postmitotikus sejtekben dNTP-re a DNS repair és mtDNS replikáció során van szükség, melyet az R1 és p53R2 alegységek komplexe szolgáltat (Guittet et al. 2001, Hakansson et al. 2006, Pontarin et al. 2007, Pontarin et al. 2008). A p53R2-t eredetileg a nDNS károsodására adott válaszbán (Nakano et al. 2000, Tanaka et al. 2000), illetve a tumor szupresszióban gondolták aktívnak (Byun et al. 2002, Smeds et al. 2002, Deng et al. 2005). Időközben a DNS repairben való szerepe megkérdőjeleződött (Tanaka et al. 2000, Nordlund and Reichard 2006). Az viszont biztos, hogy a differenciált sejtekben fontos szerepe van az mtDNS-ek fenntartásában (Pontarin et al. 2008). Ezt támasztja alá az a tény, hogy az *RRM2B* homozygota „loss-of-function” mutációja súlyos mtDNS depléciós szindrómát (MDS) okoz (Bourdon et al. 2007). Az *RRM2B* knockout egér általános gyengeség miatt életképtelen, mtDNS kópia száma lényegesen csökkent (Kimura et al. 2003, Bourdon et al. 2007). Az általunk vizsgált adPEO betegek izomszövetének mtDNS kópia száma

Real-Time PCR-el vizsgálva a kontroll egyénekéhez hasonló volt, viszont az izomszövetből izolált DNS-ben multiplex deléciókat találtunk. Némely MDS-t okozó *RRM2B* mutáció csökkent proteint eredményez (Bourdon et al. 2007, Bornstein et al. 2008) hasonlóan az általunk talált R327X mutációhoz. Ezekben az esetekben azt gondoljuk, hogy a heterozygota hordozóknak hasonló tünetek lehetnek, mint a mi betegeinknek. Más mutáció, mint pl. a homozygota Q284X mutáció feltehetően „nonsense-mediated decay”-t eredményez, mert a Western analízis nem talált protein terméket ezekben az MDS-es csecsemőkben (Bourdon et al. 2007). Az ilyen mutációknál az *RRM2B*, haploinsufficiencia nem minősül patológiásnak, mert a heterozygota carrierek, az MDS betegek szülei egészségesek. Az általunk vizsgált betegekben csökkent p53R2 protein keletkezett, amelynek köszönhetően a p53R2 homodimer és az R1 homodimer interakciója valószínűleg károsodik, mert a hiányzó heptapeptid ehhez az interakcióhoz szükséges (Fisher et al. 1993, Shao et al. 2004). A mutáns protein gain-of-function vagy domináns negatív hatása okozza az RNR funkció változását és a postmitotikus szövetekben a dNTP háztartás felborulását. A nukleotid pool változásai a mutagenézist fokozhatják (Kunz et al. 1994, Mathews 2006). Jelen esetben a 36 éves férfi izmában az mtDNS-ben 0.96 mutáció/10kb mutáció volt a kontrol régióban és 0.34 mutáció/10kb a *CYTB* gén régióban. Az irodalmi adatok alapján hasonló mutációs load található egészséges egyének izomszövetében is (0.2-2 mutáció/10kb a kontrol régióban és 0.2-1 mutáció/10kb a *CYTB* gén régióban) (Wanrooij et al. 2004). Így elmondhatjuk, hogy a p53R2 R327X variánsa nem mtDNS pontmutációkat, hanem multiplex mtDNS deléciókat eredményezett. Hasonló multiplex mtDNS deléciókat írtak le a szintén dNTP pool zavart okozó *ANTI* mutáció következtében is. Az *RRM2B* gén nonsense mutációját munkacsoportunk elsőként írta le az adPEO háttérében. Vizsgálataink igazolták, hogy a p53R2 hibája olyan felnőttkori kezdetű izombetegséget is tud okozni, amely a mitochondrialis homeostatis zavarát eredményezi, de onkológiai vonatkozásai nincsenek. Eredményünk következtében kibővült az adPEO háttérében álló gének sora. A p53R2 domináns negatív vagy „gain-of-function” hatás következtében kialakuló multiplex mtDNS deléció kialakulásának pontos mechanizmusa azonban még várat magára.

## **5.6. Az izomdystrophiák és hereditár neuropathiák molekuláris diagnosztikai stratégiája**

### **5.6.1. A szekunder calpain deficiencia jelentősége az izomdystrophiák diagnosztikája során**

Az LGMD diagnosztikájának fejlődése a genetikai hiba felismerésén túl további, a betegség patogenezeise és terápiája szempontjából fontos információkat is nyújthat. Ilyen fontos megfigyelés az irodalomban elsőként leírt különleges dystrophinopathiás családnak, ahol szekunder calpain deficiencia társult az alapbetegséghez. Tudomásunk szerint ez a család az egyetlen olyan család, ahol az enyhe X kromoszómáisan öröklődő izomdystrophia háttérében dystrophin deficiencia és szekunder calpain deficiencia sajátos kombinációja igazolódott. A szokatlanul enyhe fenotípus felveti a kérdést, hogy vajon a kombinált dystrophin és calpain deficiencia egymás negatív hatását enyhítik-e? A családi anamnézis alapján 2-3 generációval korábban nem csak enyhe tünetek voltak, ami azt jelzi, hogy önmagában ez a dystrophin mutáció nem ártalmatlan. A DMD adatbázisban csak egy beteg található, ahol a mi betegünkénél is érintett régióban volt bázispár csere ([www.dmd.nl](http://www.dmd.nl)). Ennél a betegnél a c.G2836T csere a dystrophin gén 22. exonjában a Glu kodon helyett Stop kodont eredményezett. Így a súlyos fenotípust okozó mutáció természeténél fogva nem hasonlítható a mi eseteinkhez. Azt feltételezzük, hogy az ismeretlen etiológiájú nagy valószínűséggel szekunder calpain deficiencia utrophin expressziót fokozó hatása enyhítette a klinikai tünetek súlyosságát. A calpain inhibícióval történő utrophin expresszió fokozására ugyanis az irodalomban található adatok (Tidball 2002, Waheed 2003). Természetesen nem zárható ki az sem, hogy a 22. exon c2836-2838 GAG deléciója következtében kieső Glu hiány a dystrophin funkciója szempontjából nem jelentős változást eredményez és így ennek köszönhető a családban leírt enyhe fenotípus. Mindenesetre az igen magas szérumban CK szintek és az izombiopsziában látott izomdystrophiás elváltozások alapján korábbi tapasztalataink Becker fenotípust prediktálnának és az észlelt klinikai tünetek ennél is sokkal enyhébbek.

### **5.6.2. A nem kódoló DNS jelentősége az izomdystrophiák patogenezisében**

Időnként a klasszikus LGMD szindrómák genetikai vizsgálata is hozhat meglepetést. Ilyen a dysferlinopathiás betegünk esete, ahol a Western blot alapján vetődött föl a dysferlin deficiencia gyanúja. A genetikai vizsgálat meg is találta a



cDNS szekvenálása során az egyik allélen a C5302T patogén mutációt, ami az Arg1768Trp aminosav cserét eredményezte egy evolúciósan erősen konzervált helyen. A másik allél cDNS-e normálisnak bizonyult. A patogén mutációt korábban Myoshi myopathiában (MM) írták le, ami az LGMD2B allélikus variánsa, szintén autoszomalis recesszív öröklődésű. A mutáció autoszomalis domináns negatív hatásáról eddig irodalmi adatot nem találtunk. Saját eredményeink is ez ellen szólnak, mert 3 egészséges családtag is hordozta a mutációt. Mivel a talált dysferlin gén mutáció a korábbi közlések és sajátosságai alapján is egyértelműen patogénnek minősül, betegünk az egyik allélen azonosított mutációval és az izombiopsziában levő dysferlin hiánnyal compound heterozygótának minősíthető. A másik allél mutációja nagy valószínűséggel a dysferlin gén nem kódoló régiójában, vagy az intronokban, vagy a 3'vagy 5' szabályozó régióban vagy a transzkripció terminator régióban van. Ezen régiók vizsgálata nagyon nehézkes és a rutin diagnosztika számára nem érhető el. A core dysferlin promotor fragment szekvenálása 14 feltételezeten dysferlinopathiás betegben, akikben a szokásos mutáció keresés nem hozott eredményt, nem talált patogén mutációt (Foxton et al. 2004) arra utalván, hogy ez a típusú hiba nem lehet gyakori a betegség hátterében. Az irodalom áttekintése során 45 olyan beteget találtunk, akikben csökkent vagy hiányzott a dysferlin protein a vázizomban és csak 1 heterozygota patogén mutációt sikerült azonosítani ([www.dmd.nl](http://www.dmd.nl)) (5.4. Táblázat). Ezt a jelenleg rendelkezésünkre álló molekuláris technikák korlátai magyarázhatják, de nem zárható ki a nem kódoló ("junk") DNS-ben levő elváltozások patogenitása sem. A "junk" DNS a human szekvencia 98.7%-a. Ismereteink szerint eddig összesen 6 introni *DYSF* mutáció patogenitása igazolódott a dysferlinopathia hátterében (Nguyen et al. 2005, Sinnreich et al. 2006). Úgy gondoljuk a nem-kódoló DNS szerepének további vizsgálatára új diagnosztikai technológiák kidolgozása szükséges. Jelenleg a klasszikus myopathológiai és Western blot vizsgálatok nélkülözhetetlenek az LGMD ezen típusának diagnosztikájában. Esetenként a rutin molekuláris genetikai vizsgálat nem tudja kizárni az egyes gének patogenetikai szerepét, azaz nem minden esetben elegendő az egyes betegségek diagnózisának felállításához. A fentiek alapján diagnosztikus stratégiaként azt javasoljuk, hogy minden esetben a klasszikus módszer követendő az LGMD okának kiderítésénél, azaz az izombiopszia immunhisztokémiai feldolgozását követő Western blot, és annak

eredménye ismeretében végzendő el a kóros protein génjének analízise. A dysferlin gén kódoló szekvenciája mellett az 5' és 3' nem transzlálódó régió meghatározása, valamint a „junk” DNS SNP analízise hozhat az izomdystrophiák diagnosztikájában új távlatokat megnyitó lehetőséget.

	Specifikus fenotípus meghatározott protein érintettséggel	Specifikus fenotípus ismeretlen protein érintettséggel	Nem specifikus fenotípus meghatározott protein érintettséggel	Nem specifikus fenotípus ismeretlen protein érintettséggel	Összes No.
<b>Homozygota mutáció</b>	46	9	23	2	<b>80</b>
<b>Compound heterozygota mutáció</b>	166	35	9	4	<b>214</b>
<b>Egyes heterozygota mutáció</b>	45	5	13	76	<b>139</b>
<b>Összes eset</b>	<b>257</b>	<b>49</b>	<b>45</b>	<b>82</b>	<b>433</b>

5.4.Táblázat: A Leideni adatbázisban szereplő ismert dyferlin mutációk

A dystrophin génben is vannak patogén introni mutációk (Thi Tran et al. 2005). Ilyet közlünk mi is a süket dystrophinopathiás kisfiú és családja esetével, ahol a dystrophin gén 68-as exonját követő intron 3. pozíciójában találtunk splicing variánst. A család esete tette lehetővé, hogy először igazoljuk genetikailag, hogy a nem-szindrómás DFN4 típusú süketséget okozó genetikai hiba (melyet korábban 2 nagycsalád linkage analizise kapcsán az Xp21.2 lókuszra lokalizáltak) ténylegesen a dystrophin génbe lokalizálható (Lalwani et al. 1994, Pfister et al 1998). A korábbi megfigyelések csak indirekte bizonyították, hogy a *DFN4* kapcsolt nem-szindrómás süketség ténylegesen a dystrophin funkciózavar következtében alakul ki (Pfister et al. 1999). Az állatkísérletek eredményei ellentmondóak, egy közlemény van, amely egyértelműen bizonyítja, hogy a dystrophin hiányos egerekben a zaj nagyobb mértékű halláskárosodást okoz, mint az egészséges állatokban (Chen et al. 2002). A halláskárosodást ezekben az mdx egerekben nem csak a n. acusticus, hanem az agytörzs károsodása is okozhatta. Családunkban a dystrophin gén egyik intronjának splicing mutációja következtében alakultak ki a klinikai tünetek. Ugyanez a mutáció a 3 testvérből kettőben jellegzetes Duchenne típusú izomdystrophia klinikai képét eredményezte, míg a 3. gyermekben a süketség volt a vezető tünet. A süketség és

az izomdystrophia jelen esetben allélikus variánsnak minősíthetők. A kérdés újból felveti a már dysferlin hiányos családnál is tárgyaltakat, azaz a „junk DNS” szakaszok szerepének fontosságát a klinikai diagnosztikában. Az új molekuláris genetikai metodikáktól, mint az új típusú szekvenátorok és a jövőben a rutin diagnosztikában is alkalmazható chip technológiáktól reméljük ezeknek a nyitott kérdéseknek a megoldását.

### **5.6.3. A glycosylatio szerepe a végtagöv típusú izomdystrophiákban**

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy az LGMD betegek szignifikáns százalékában (11.3%)  $\alpha$ -DG hypoglycosylatio okozza a betegek tüneteit. Eredetileg a glycosylatios defektusokat olyan congenitalis izomdystrophiák háttérében írták le, ahol gyakran központi idegrendszeri tünetek is társultak az izombetegséghez. Ez alapján megállapíthatjuk, hogy a hyperglycosylált  $\alpha$ -DG immunhisztokémiai és Western blottal való kimutatása elengedhetetlen nem csak a congenitalis izomdystrophiák, de az LGMD átvizsgálása során is. Az  $\alpha$ -DG hypoglycosylatio a posttranszlációs módosításában szerepet játszó glycosyl-transzferázok hibás működése következtében alakul ki. Napjainkban az alphas-dystroglycanopathiák jelentős számában a végleges genetikai diagnózis a rutin módszerekkel nem születik meg, mint ahogy azt mi is tapasztaltuk az általunk vizsgált szériában. Ennek az egyik lehetséges oka a glycosylatioért felelős gének nagy száma. Mostanáig a *POMT1*, *POMT2*, *POMGnT1*, Fukutin, *FKRP*, and *LARGE* (Mercuri et al. 2009) génekről bizonyosodott be, hogy mutációik izombetegséget eredményezhetnek. Másik lehetséges magyarázat, hogy egyre több olyan LGMD beteget találunk, ahol a betegség az allelikus variánsa egy másik izombetegségnek. Erre jó példa az *FKRP* mutációk hatása, ugyanis azok nagyon széles klinikai fenotípust eredményeznek a congenitalis izomdystrophia 1C típusától az LGMD2I típusáig. Az eredmény, hogy az általunk vizsgált kohortban egyetlen betegnél sem találtunk *FKRP* mutációt arra utal, hogy feltehetően további új glycosyl-transzferázok felismerésére kell még számítani. A hypoglycosylált  $\alpha$ -DG deficienciák kimutatása során nem csak a költséges immunhisztokémiai vizsgálat és az idő és vegyszer igényes Western blot segíthet, hanem az előszűrőként alkalmazott lektin kötés vizsgálata is alkalmas lehet a glycosylatios zavarok kiszűrésére. Ezek a növényi lektinek az  $\alpha$ -DG legnagyobb oligoszacharid láncának két legdistalisabb komponenséhez kapcsolódnak.

Betegeinkben a WGA festődés csökkent, a PNA festődés pedig a kontrollnál intenzívebb volt. Tajima et al. (2005) distalis myopathiában is talált hasonló, a kontrolloknál erősebb PNA festődést. Az  $\alpha$ -DG fontos szerepet játszik az izomsejt felszíni membránjának az integritásának a megtartásában. Az  $\alpha$ -DG mucin-szerű doménjének glycosylatioja kor és szövet specifikus, és az egyes izombetegségekben és denervációs folyamatokban is megváltozhat (Leschziner et al. 2000). A legújabb eredmények azt mutatják, hogy lesz remény egyes glycosyl-transzferázok expressziójának fokozásával a kóros  $\alpha$ -DG funkció helyreállítására (Barresi et al. 2006). Így arra kell törekednünk, hogy minél egyszerűbben és megbízhatóbban diagnosztizáljuk az alpha-dystroglycanopathiákat és kövessük a klinikai vizsgálatokban a glycosyl-transzferázok hatékonyságát.

#### **5.6.4. Herediter neuropathiák diagnosztikus stratégiája**

Az örökletes neuropathiák etiológiai diagnosztikája a molekuláris medicina gyors fejlődésének köszönhetően egyre bonyolultabb. A bevezetésben felsorolt 25 gén szűrése a klinikai gyakorlatban megvalósíthatatlan. Egyes nagy generációkat érintő, nagyon súlyos fenotípus esetén próbálunk minél több gént megvizsgálni, de a rutin diagnosztika számára csak a leggyakoribb genetikai eltérések feltérképezését javasoljuk (Szigeti et al. 2006). A mindennapok gyakorlatában nem kis kihívást jelent a szokatlan klinikai megjelenési formák diagnosztikája.

##### **5.6.4.1. Új *MPZ* mutáció következtében kialakuló változatos klinikai fenotípus**

Egy széles spektrumú klinikai tünetekkel jelentkező öttagú család genetikai vizsgálata során az *MPZ* génben találtunk egy új mutációt (c.T143C), amely különlegessége, hogy az egyes családtagokban változó súlyosságú klinikai képet eredményezett (a subklinikus tünetektől a súlyos csecsemőkorban manifesztálódó formáig). A család 2 tagjánál nagyon korán (csecsemő- és gyermekkorban), míg az index betegnél csak 41 éves korban kezdődtek a tünetek. Shy et al. (2004) azt feltételezte, hogy a klinikai tünetek súlyossága attól függ, hogy a mutációk az *MPZ* protein melyik doménjében vannak és milyen aminosav cserét eredményeznek. Jelen családjunkban a fehérje hydrophob karaktere megváltozott az alifatikus leucin helyére az extracellularis doménbe beépülő prolin miatt. A mutáció az *MPZ* harmadlagos struktúráját befolyásolta. Ez azonban nem

magyarázhatja a családon belüli fenotípus variabilitást. Mivel az MPZ egy glycoprotein (Eichberg et al. 2002), úgy véljük, hogy a posztranszlációs glycosyláció módosulása játszhat szerepet a jelenség kialakításában. Feltételezzük, hogy a mutáció típusa, intragenikus elhelyezkedése mellett egyéb putative gének is szerepet játszanak az *MPZ* gén expressziójában, az mRNS stabilitásában és a posztranszlációs fehérje módosításában. Feltehetően ezek együttese határozza meg a végső klinikai fenotípust. Eredményünk alapján a széles fenotípusbeli variációval rendelkező AD öröklődésű családok *MPZ* mutációra való szűrése javasolt.

#### **5.6.4.2. A n. suralis ultrastrukturális elváltozásai mitofusin mutáció következtében kialakuló CMT2-ben**

Az *MFN2* egy nagy mitochondrialis transzmembrán GTP-áz, amely a mitochondrialis külső membránt nagy N terminálisával hidalja át és a relatíve kicsi C-terminális doménje nyúlik a cytosol felé. A GTPáz domén az N terminus mellett van, majd egy „coiled-coil” domén következik, két transzmembrán híd és végül egy „coiled-coil” domén a C terminalis farokban. Az általunk talált mutáció a GTP-áz és az N terminális „coiled-coil” domén között helyezkedik el. A mutációt először 2006-ban írták le perifériás neuropathia háttérben (Verhoveven et al. 2006). Az eddigi megfigyelések alapján nincs korreláció a mutáció helye és a klinikai tünetek súlyossága között. Mivel a hereditér neuropathiák differenciáldiagnosztikájában az utóbbi időben a molekuláris genetikai vizsgálatok a dominálóak viszonylag keveset tudunk a mutáció következtében a perifériás idegekben kialakuló finomszerkezeti elváltozásokról. Az irodalomban mindössze 1 közleményben olvashatunk a n. suralis ultrastrukturális eltéréseiről (Verhoveven et al. 2006). Az általunk talált neuropatológiai eltérések jól korrelálnak ezekkel a megfigyelésekkel, azaz elsősorban a nagy myelinizált rostok kiesését észleltük, ezek helyét Büngner szalagok töltötték ki. A mitochondrialis dinamika változása következtében egymáshoz szokatlanul közel levő mitochondriumok tűntek föl, melyek kicsik és electrodensek voltak. Nem találtunk viszont a mitochondriumokban se paracrystallin, se globularis inclusiot. Az axonok paranodalis régiójában számos degeneratív elváltozás volt jelen. Az ultrastrukturális elváltozások emlékeztettek a mtDNS rendellenesség következtében kialakuló neuropathiákban látottakra

(Schröder 1993, Schröder és Molnar 1997). Mivel ezek az ultrastrukturális elváltozások nem specifikusak az *MFN2* mutációra, nem javasoljuk a n. suralis biopsziát a diagnosztikus procedurába rutinszerűen beiktatni. Az *MFN2* molekuláris genetikai teszt diagnosztikus rátája pozitív családi anamnézissel rendelkező axonális CMT esetén 33%, ami arra utal, hogy jelen tudásunk szerint az *MFN2* mutáció a leggyakoribb oka a CMT2-nek (Verhoveven et al. 2006). Mindezek alapján a CMT2 genetikai szűrését javasoljuk az *MFN2* génnel kezdeni.

#### **5. 6.4.3. Roma neuropathiák Magyarországon**

Az AR módon öröklődő hereditér neuropathiák genetikai diagnosztikája az utóbbi években jelentősen gazdagodott. A leggyakrabban az *NDRG1*, a *CTDP1*, a *GAN1*, a *PRX*, az *SBF2*, a *GDAP1*, a *TDP1*, a *KIAA1985* gén mutációk okoznak demyelinizációs AR hereditér neuropathiát (Szigeti et al. 2006). Ezek közül az első két génben levő patogén mutációk roma alapító mutációként ismertek. Ezek nem gyakoriak, de a magyarországi romák nagy száma miatt nem lehet figyelmen kívül hagyni azokat. A betegség igen súlyos tüneteket okoz és a roma házassági szokások miatt nagyon sok a hordozó a hazai populációban. A roma neuropathiák diagnosztikája során érdemes a vizsgálatokat a jellegzetes roma neuropathiák alapító mutációjának szűrésével kezdeni. Vizsgálataink igazolták, hogy az egyéb európai országokhoz hasonlóan mindkét mutáció jelen van a hazai roma populációban. Betegeink klinikai adatai hasonlóak az egyéb országokban közltekkel (**15. és 16. Közlemény**). A legtöbb esetet eddig Bulgáriában írták le. A bolgár betegek fenotípusa azonban súlyosabb volt, mint a magyar betegeké. Ezt a jelenséget a fejlettebb magyar egészségügyi ellátással magyarázzuk, ugyanis a mi betegeink többségének már kisgyermekkorában voltak korrekciós műtétei, és állapotuk romlásával újabb és újabb korrekciós orthopaediai beavatkozások történtek. Így elektrofiziológiai paramétereik ugyan a bolgár betegekével hasonlóak, mégis önellátóbbak és mozgásukban kevésbé korlátozottak. A roma neuropathiás betegek szűrését a fenti alapító mutációkra nagyon fontosnak tartjuk. A roma populáció felvilágosítása a betegségről, az egymás közötti házasság veszélyeiről fontos népegészségügyi feladat. A mutáció hordozók kiszűrése és azok házassága esetén a genetikai tanácsadás, a prenatális genetikai diagnosztika segítheti a súlyos mozgáskorlátozottsággal járó kórkép megelőzését.

#### 5.6.4.4. Herediter kórképek és autoimmun betegségek együttes előfordulása

Az örökletes betegségekben számos esetben a genetikai hiba következtében komplex folyamatok változnak meg, melyek indirekte nem csak a vezető tüneteket produkáló szervrendszert érintik, hanem egyes külső környezeti tényezőkkel közösen hatva az alapbetegségtől függetlennek tűnő betegséget is produkálhatnak. Vizsgálataink során immun neuropathia és herediter sensomotoros neuropathia együttes előfordulását írtuk le. A talált genetikai eltérések és a n. suralis morfológiai vizsgálatai alapján a két betegség coexistenciája sokkal gyakoribb, mint a véletlenszerű együttes előfordulás (Ginsberg et al 2004). Vannak olyan közlések is, melyek azt vélik, hogy a herediter neuropathiák shubokban zajló rosszabbodása háttérben feltételezhető a genetikai hibához társuló gyulladáshoz immunitás komponens jelenléte (Gabriel et al 2002). A herediter neuropathiákhoz társuló immunitás diszfunkciót többen is megfigyelték: egyes CMT családokban az aktivált T lymphocyták arányát találták magasabbnak (Williams et al 1993), mások herediter neuropathia állatmodellekben az immunitás deficiens genetikai háttérbe való visszakeresztesés során a myelinizáció csökkenését találták (Schmid et al 2000). Nagyon valószínű, hogy autoimmun mechanizmusok is szerepet játszanak a betegség progressziójában, mert a *PMP22* duplikációval rendelkező betegek kb. 70 %-ban a *PMP22* protein ellenes antitestet figyelték meg (Ritz et al. 2000). Az izolált IgA hiány sokkal gyakoribb volt a CMT1A betegek között, mint az egészséges populációban, ami azt jelezi, hogy ezeknek a betegeknek a humorális immunitás válasza is érintett (Williams et al. 1979). IgG deficiencia jelenlétéről először számolunk be *PMP22* duplikációval rendelkező családban. Az 1. betegben SLE és n. suralis vasculitis, a 2. betegben csak n. suralis vasculitis komplikálta a herediter neuropathiát. A nőbetegekben a CD19<sup>+</sup> pozitív B sejtek aránya csökkent volt. Mindkét megfigyelés szokatlan, hiszen általában emelkedett CD19<sup>+</sup> B sejtszám és magas IgG koncentráció várható az olyan autoimmun betegségekben, mint az SLE, bár ritkán IgA deficiencia is kíséri a szisztémás autoimmun betegségeket (Rankin et al 1997). Nőbetegeinkben a neuropathia sokkal kifejezettebb volt, mint a férfiban. Ez alapján felvetődik a kérdés, hogy a nemi hormonok is szerepet játszhatnak a neuropathia súlyosságának meghatározásában. A progesteron ugyan fokozza a *PMP22* expresszióját, de mivel a 15 és 50 év közötti *PMP22* duplikációval rendelkező betegekben nem

figyeltek meg különbséget a CMT1A súlyosságában az egyes nemek között, úgy véljük, hogy a női nem nem játszik szerepet a neuropathia súlyosságának meghatározásában (Pareyson et al. 2004). Az általunk vizsgált családban a nőkben észlelt súlyosabb neuropathia feltehetően a vasculitis társulásának köszönhető.

### **5.7. Az izombetegségek molekuláris terápiáinak realitásai és útvesztői**

A molekuláris medicina fejlődésének köszönhetően számos új információhoz jutottunk a neurológiai kórképek diagnosztikáját, prevencióját, és etiológiáját illetően. Új aspektusok nyíltak meg egyes betegségek patogenezisének értelmezésében. A molekuláris terápiák területén a fejlődés azonban lassúbb tempójú volt a vártnál. Nagyon kevés az az ideggyógyászati kórkép, ahol elegendő a tudás és a tapasztalat a klinikai vizsgálatok indításához. Az izomdystrophiák területén belül, mi a dystrophinopathiák kezeléséhez kívántuk optimalizálni a terápiás gén transzfert. Előzetes állatkísérletek során azt tapasztaltuk, hogy a plazmid mediálta gén transzfer az immunogenitás és toxicitás hiánya, valamint a terápiás plazmid hosszú életideje alapján alkalmas lehet a target gén bejuttatására (Wolff et al. 1992, Levy et al. 1996, Lu et al. 2003, ). Az elsőként próbált electroporáció nem minősült optimálisnak, mivel a jó transzfer effektivitást eredményező paraméterek a kezelt izomban kifejezett kollaterális károsodást okoztak (18. Közlemény, 14. Absztrakt). Ezért ez a mechanikai hatások iránt eleve túl érzékeny dystrophinopathiás izom gyógyítására nem alkalmazható. Az enhancer nélküli plazmid mediálta gén transzfer humán kipróbálása igen alacsony effektivitásúnak bizonyult (Romero és mtsi 2004). Ezért mi kísérletünkben a plazmid felvételt sonoporációval segítettük, ami optimális kondíciók mellett sokkal kíméletesebben segíti a dystrophin gént tartalmazó plazmid felvételét. A sonoporáció hatékonyságát microbubble molekula egyidejű injektálásával fokoztuk. A kivitelezhetőséget és biztonságot vizsgáló humán klinikai vizsgálat eredménye biztató, azaz az elvégzett vizsgálatok nem igazoltak olyan mértékű kollaterális károsodást a kezelt izomban, amely a dystrophinopathiás izomra veszélyes lenne (23. 27. Absztrakt). Ezek a vizsgálatok a dystrophinopathiás kisfiúk Fázis IIa vizsgálatát célozták előkészíteni. Még ha a dystrophin gén-replacement intramuscularis alkalmazása a betegség meggyógyítására nem is alkalmas, a betegség szempontjából leginkább érintett izmokban a dystrophin expresszió fokozása, és ezzel ezen izomcsoportok



erejének javítása, a kontraktúrák kialakulásának gátlása az élet minőségét lényegesen javíthatja ebben a gyors progressziójú, korán tragikus kimenetelű betegségben.

## 6. AZ ELÉRT TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

### Mitochondriális betegségek

*Fenotípus-genotípus korrelációk mtDNS mutációk okozta mitochondriális betegségekben*

- Elsőként írtunk le mitochondriális myopathia-neuropathia háttérben egyszeres nagy mtDNS deléciót (nt 6570 és 14150 között)
- Infantilis myopathiában szenvedő gyermek tRNS<sup>Leu(UUR)</sup> génjében 4 szinergisztikusan ható új mutációkat írtunk le (nt 3259, 3261, 3266 és 3268 lokalizációban).
- Dystonia és stroke-szerű tünetek háttérben először írtuk le az mtDNS A8332G szubsztitúció patogenitását és a társuló nem-szinonim SNP-k szinergisztikus hatását.
- Új fenotípust társítottunk az mtDNS A8344G mutációjához maternalisan öröklődő affektív megbetegedés képében egy dizygota ikerpárnál és édesanyjuknál.
- Az mtDNS A8344G mutáció okozta myoclonus epilepsiás egypetéjű ikerpárnál az életkor előrehaladtával divergáló klinikai kép alapján az epigenetika fontosságára hívtuk föl a figyelmet a mitochondriális betegségekben is.
- Az mtDNS tRNS<sup>Lys</sup> és határoló gének rendkívüli variabilitásának igazolásával a régió vizsgálatának rutin diagnosztikus fontosságát emeltük ki.
- Elsőként írtuk le az autosomális domináns progresszív ophthalmoplegia externa háttérben az RRM2B heterozygota mutációját.

*Doppler és PET vizsgálatok mitochondriális betegekben*

- Enyhe kis arteriola diszfunkciót írtunk le a mitochondriális kórképekben.

- A cerebrális glükóz metabolizmus érintettségét igazoltuk mind a központi idegrendszeri tünetekkel rendelkező, mind a csak perifériás idegrendszeri tünetekkel bíró mitochondrialis betegekben.
- A mitochondrialis betegek cerebrális neuronjainak FDG uptake-je az occipitalis és a temporalis régiókban csökkent leginkább.

#### *Preimplantációs diagnosztika validálása heteroplasmikus egér modellen*

- A korai embryo egyes blastomerjeinek heteroplasmia arányainak meghatározásával elsőként validáltuk a preimplantációs diagnosztika alkalmazhatóságát a pontmutációk okozta mtDNS mutációk prenatalis diagnosztikájára.

#### *Mitochondrialis genetikai epidemiológia*

- Elsőként végeztünk átfogó epidemiológiai elemzéseket közép-kelet Európában feltételezeten mitochondrialis betegségben szenvedő kaukázusi kohortban. Az mtDNS A3243G MELAS mutáció előfordulási gyakorisága 2.2%, az A8344G klasszikus MERRF mutáció frekvenciája 2.53%. A mért frekvenciák hasonlóak a más európai országok kaukázusi populációjában mért előfordulási gyakoriságokkal.

### **Hereditær neuropathiák**

#### *Új MPZ mutáció leírása magyar családban*

- Új MPZ mutáció következtében kialakuló markáns fenotípusbéli különbségeket írtunk le egy magyar családban. Feltételezzük, hogy a mutáció típusa, intragenikus elhelyezkedése mellett egyéb putative gének is szerepet játszanak az MPZ gén expressziójában, az mRNS stabilitásában és a posttranszlációs fehérje módosításában és ezek együttese határozza meg a végső klinikai fenotípust.

#### *Mitofusin mutáció következtében kialakuló strukturalis és ultrastrukturalis jellegzetességek*

- Hereditær axonális neuropathiát okozó mitofusin mutáció következtében a n. suralisban látható morfológiai képet az elsők között jellemeztük A nagy

myelinizált rostok kiesése mellett a Schwann sejtek adaxonalis compartmentjeiben felszaporodó kis mitochondriumok nem specifikusak a mitofusin mutációk okozta neuropathiákra, így a morfológiai vizsgálat nem alkalmas a genetikai vizsgálatra való előszűrésre.

#### *Roma neuropathiák detektálása Magyarországon*

- Magyarországon elsőként írtuk le a sajátos roma típusú hereditér sensomotoros neuropathiákat (Lom és congenitalis cataracta, facialis dysmorphismus, neuropathia).

#### *Primer és szekunder mitochondrialis diszfunkció következtében kialakuló neuropathia*

- Primer mitochondrialis betegségekben a vasa nervorumban és a perifériás idegekben is megaclonalis és pleioclonalis mitochondriumokat találtunk, amelyek arra utalnak, hogy a mitochondrialis diszfunkció szerepet játszik a betegségben előforduló perifériás neuropathia kialakításában.
- A szekunder mitochondrialis diszfunkcióval járó kórképekben, mint az IBM igazoltuk a perifériás neuropathia jelenlétét. A mitochondrialis diszfunkció hátterében mtDNS deléciókat találtunk. A perifériás neuropathia nemcsak sporadikus IBM-ben, hanem a hereditér formában is jelen volt.
- A NOTCH3 mutáció következtében kialakuló CADASIL szindrómában másodlagos mitochondrialis diszfunkciót és perifériás neuropathiát találtunk.

#### **Izomdystrophiák**

##### *A molekuláris genetikai diagnosztika kihívásai a dysferlin deficiencia felismerésében*

- Felhívtuk a figyelmet a genetikai diagnosztika korlátaira és a nem kódoló génszakaszok patogénétikai jelentőségére a dysferlin deficienciában.

##### *Dystrophin gén mutáció és szekunder calpain deficiencia együttes jelenléte*

- A másodlagos calpain és dystrophin hiány együttes jelenlétének jótékony hatását figyeltük meg dystrophin microdeléción okozta dystrophinopathiában.
- Elsőként igazoltuk a nem-szindrómás halláskárosodást a dystrophin gén rendellenessége következményének.

### **Izomdystrophiák molekuláris terápiája**

#### *Elektroporáció alkalmazása terápiás gén bevitelére*

- Dystrophinopathiás mdx egér modellen elemeztük az elektroporációt befolyásoló tényezőket és kidolgoztuk az effektív elektroporáció paramétereit. Megállapítottuk, hogy a Hyaluronidáz adása növeli az elektroporáció hatékonyságát és immunosuppresszív hatással is rendelkezik.

#### *Sonoporáció alkalmazása a terápiás gén bejuttatása az izomsejtekbe. human klinikai vizsgálat*

- Elsőként teszteltük a sonoporáció és egyidejűleg intramuscularisan alkalmazott microbubble human izomra kifejtett hatását. A beavatkozás fájdalomtalan és biztonságosnak minősült, így az a további humán vizsgálatokban alkalmazható.

## 7. A TÉZISEKET MEGALAPOZÓ TUDOMÁNYOS MUNKÁK JEGYZÉKE

### In extenso közlemények:

1. Mechler F, Molnár M, Diószeghy P, Ádány R: The significance of dystrophin immunohistochemistry in the diagnosis of the muscular dystrophies. Clin Neurosci/ Ideggyógy Szle 1992, 45:295-300
2. Mechler F, Molnár M, Balázs M, Matkó J: Intracellular free calcium concentration in lymphocytes of patients with muscular dystrophies. Biochim biophys Acta (Amsterdam) 1989; 1012:227-230
3. Molnár M, Diószeghy P, Mechler F: Carnitine deficient myopathy – A case report. Clin Neurosci/Ideggy Szle 1992; 45:301-305
4. Molnar MJ, Neudecker S, Schröder JM: Increase of mitochondria in vasa nervorum of cases with mitochondrial myopathy. Kearns-Sayre syndrome, progressive external ophthalmoplegia and MELAS. Neuropathol and Applied Neurobiology 1995; 21:432-439
5. Molnar M, Zanssen S, Buse G, Schröder JM.: A large-scale deletion of mitochondrial DNA in a case with mitochondrial myopathy and neuropathy. Acta Neuropath. (Berl) 1996; 91:654-658
6. Zanssen S, Molnar M, Schröder JM, Buse G.: Multiple mitochondrial tRNA(UUR) mutácións associated with infantile myopathy. Mol Cell Biochem 1997; 174: 231-236
7. Schröder JM and Molnar M.: Mitochondrial abnormalities and peripheral neuropathy in inflammatory myopathy, especially inclusion body myositis. Mol Cell Biochem 1997; 174:277-281

8. Zanssen S, Molnar M, Buse G, Schroder JM: Mitochondrial cytochrome b gene deletion in Kearns-Sayre syndrome associated with a subclinical type of peripheral neuropathy. *Clinical Neuropathol* 1998; 17:291-296
9. Karpati G, Pari G, Molnar MJ: Molecular therapy for genetic muscle diseases – status 1999. *Clinical Genetics* 1999; 55:1-8.
10. Molnár M, Karpati G: A myalgia differenciáldiagnosztikája és terápiája – status 1999 *Clin Neurosci/Ideggyógy. Szle* 1999; 52:294-300
11. Zanssen S, Molnar M, Buse G, Schroder JM: Novel cluster of tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> mutációs in a sporadic case of infantile myopathy restricted to muscle tissue. *Neuropediatrics* 2000; 31; 93-96
12. Molnar M, Valikovics A, Molnar S, Tron L, Dioszeghy P, Mechler F, Gulyas B: Cerebral blood flow and glucose metabolism in mitochondrial disorders. *Neurology* 2000; 55:544-548
13. Hermanns B, Molnar M, Schroder JM: Peripheral neuropathy associated with hereditary and sporadic inclusion body myositis: Confirmation by electron microscopy and morphometry. *J Neurol Sci* 2000; 179:92-102
14. Hidasi E, Molnar M, Dioszeghy P, Mechler F: Electroneurographic and electromyographic alterations in mitochondrial disorders. *Clin Neurosci/Ideggy Szle* 2001; 54:165-171
15. Kalaydjieva L, King R, Gresham D, Molnar M, et al.: Hereditary motor and sensory neuropathy Lom. *Acta Myologica* 2001; 20:192-201
16. Tournev I, Thomas PK, Augelicheva D, King R, Youl B, Guerguelcheva V, Ishpekova B, Bleichsmidt K, Swoboda K, Petkov R, Molnar M, et al.: Congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome – Clinical, neuropathological and genetic investigation. *Acta Myologica* 2001; 20:210-219.

17. Dean NL, Battersby BJ, Ao A, Gosden RG, Tan ST, Shoubridge EA, Molnar MJ: Prospects of preimplantation genetic diagnosis for heritable mitochondrial DNA diseases. *Mol Hum Reprod* 2003; 9:631-638
18. Molnar MJ, Gilbert R, Lu Y, Liu AB, Guo A, Larochelle N, Orlopp K, Lochmuller H, Petrof BJ, Nalbantoglu J, Karpati G. Factors influencing the efficacy and safety of electroporation-assisted plasmid-based gene transfer into mouse muscles. *Mol Ther* 2004; 10: 447-455
19. Schröder JM, Züchner S, Dichgans M, Nagy Z, Molnar MJ.: Peripheral nerve and skeletal muscle involvement in CADASIL. *Acta Neuropathologica (Berl)* 2005; 110:587-599
20. Szabó A, Züchner S, Siska E, Mechler F, Molnar MJ: Marked phenotypic variation in a family with a new myelin protein zero mutáció. *Neuromuscular Disorders* 2005; 15:760-763
21. Molnár MJ: A neuromuscularis betegségek kezelése és rehabilitációja. *Gyermekgyógyászat*. 2005; 5:499-506
22. Molnár MJ: Az intravénás immunoglobulin alkalmazása autimmun neuromuscularis betegségekben *Clin Neurosci/Ideggy Szle* 2006; 59:98-106
23. Molnar MJ, Bencsik P: Establishing a neurological - psychiatric biobank: banking, informatics, and ethics. *Cell Immun* 2006; 244:101-104
24. Szabó A, Siska É, Molnar MJ: Herediter motoros és sensoros neuropathia-Lom. Első magyarországi közlés. *Clin Neurosci/Ideggy. Szle* 2007; 60:51-55
25. Siska É, Neuwirth M, Gooding R, Molnár MJ: Congenitalis cataracta facialis dysmorphismus neuropathia szindróma (CCFDN). Első magyarországi közlés. *Clin Neurosci/Ideggy*. 2007; 60:257-262

26. Gal A, Siska E, Nagy Z, Karpati G, Molnar MJ: Challenges for the genetic screening in dysferlin deficiency report of an instructive case and the review of the literature Clin Neuropathol 2008; 27: 289-294
27. György I, Bíró A, Mechler F, Molnár MJ: Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsy (HNPP) in Childhood. Clin Neurosci/Idegy Szle 2008; 61:423-425
28. Molnar MJ, Perenyi J, Siska E, Nagy Z: Depressive mood disorders associated with the typical MERRF (A8344G) mutácións of the mitochondrial DNA. Journal of Neurology. 2009; 256:264-265
29. Pal Z, Kiss E, Gal A, Csepany T, Lengyel A, Molnar MJ: Genetically determined neuropathy (CMT 1A) accompanied by immune dysfunction – a case report. Inflamm and Research 2009; 58: 359-364
30. Tyynismaa1 H, Ylikallio E, Molnar MJ, Haller R, Suomalainen A: A heterozygous mutation in RRM2B causes autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple mtDNA deletions Am J Hum Genet. 2009 85:290-5.
31. Gal A, Pentelenyi K, Remenyi V, Pal Zs, Csanyi B, Tomory B, Rasko I, Molnar MJ: Novel heteroplasmic mutáción in the anticodon-stem of mitochondrial tRNALys associated with dystonia and stroke-like episodes Acta Neurol Scand 2009 DOI:10.1111/j 1600-0404.2009.01297.x
32. Gal A, Komlosi K, Maasz A, Pentelenyi K, RemenyiV, Ovary C, Valikovics A, Dioszeghy P, Bereczki D, Melegh B, Molnár MJ: Molecular epidemiology analízis of the mtDNA A3243G mutation in Hungary Centr Eur J Med 2009 DOI:10.2478/s 11536-009-0118-2



### **Per review abstractok**

1. Molnar M, Neudecker S, and Schröder JM: Increase of the number and volume of mitochondria in blood vessels of sural nerves in cases of mitochondrial myopathy with or without encephalopathy. *Clinical Neuropathology* 1994, 5:258
2. Neudecker S, Molnár M, and Schröder JM: Correlation between morphometric changes of mitochondria in blood vessels of skeletal muscle in mitochondriopathies with or without CNS-involvement. *Clinical Neuropathology* 1994, 5:260
3. Molnár M, Neudecker S, and Schröder JM: Mitochondriopathies: Manifestation in muscle, peripheral nerve, and blood vessels. *Idegyógy Szle* 1995 48. Suppl.1:76
4. Zanssen S, Molnar M, Schröder JM, Buse G: A novel mitochondrial tRNA anticodon point mutation associated with infantile myopathy. *J Mol Med* 1995; 73:B60
5. Molnar M, Valikovics A, Diószeghy P, Bereczki D, Mechler F, Csiba L: Decreased cerebrovascular reserve capacity in patients with various types of mitochondrial disorders. *Neuromuscular Disorders* 1997; 7:450-451
6. Molnar M, Valikovics A, Tron L, Kerényi L, Gulyás B, Mechler F, Csiba L: Changes in neuronal metabolism and cerebrovascular reserve capacity in mitochondrial disorders studied by positron emission tomography and transcranial Doppler sonography. *Neurology* 1998; 50: S4, A48
7. Molnar M, Hidasi E, Gulyas B, Valikovics A, Molnar S, Mechler F: Correlative multimodal functional assesment of mitochondrial disorders. A potential tool for prognosis. *Muscle and Nerve* 1998; Suppl.7 p. S176
8. Molnar M J: The diagnostic possibility of the mitochondrial disorders. Abstract. *IdegySzle/Clin Neurosci* 1999; 52:160-161

9. Molnar MJ, Shoubridge E: Preimplantation genetic diagnosis for mitochondrial disorders. *Neuromuscular Disorders* 1999; 9:521
10. Molnar MJ, Perenyi J, Siska E: Neuropsychiatric phenotype associated with the typical MERRF mutáció of the mitochondrial DNA *J Neurol Sci* 2001; 187, Suppl.1:355
11. Molnar MJ, Siska E, Kalaydjieva L: Unique peripheral neuropathies in the gipsy population in Hungary. *Abstract Neuromusc Disord* 2001; 11:661
12. Gilbert R, A-B Liu, J-S Moon, MJ Molnar, J Nalbantoglu, PJ Basil, G Karpati: Very good transgene expresszió after electrotransfer of plasmid DNA in muscles of various mouse strains and *Mol Therapy* 2002; 5:S367
13. Molnar MJ, Gilbert R, Nalbantoglu J, Karpati G: Very good plasmid-mediated transgene exspression after electroporation in muscles of of various mouse strains. *Acta Neuropathol* 2002; 104:561
14. Molnar MJ, R Gilbert, BJ Petrof, J Nalbantoglu, G Karpati: How does in vivo electrotransfer and hyaluronidase markedly enhance uptake of plasmid gene vector into skeletal muscle fibers and et the same time cause collateral damage? *J Neurol Sci* 2002; 199:S75
15. Molnar MJ, Gilbert R, Nalbantoglu J, Petrof B, Karpati G: The efficacy and longevity of plasmid based gene transfer after electroporation into muscles of various mouse strains. (Abstract) *Neuromusc Disord.* 2003; 13:665-666
16. Mechler F, Szabó A, Siska É, Züchner S, Molnar MJ: Phenotypic variation in a family with MPZ gene mutation. *Neuromusc Disord.* 2003; 13:653-654

17. G. Karpati, Gibert R, Lu Y, Molnar MJ, Petrof B, Nalbantoglu J: Long term expression of transgene delivered by plasmid and electrotransfer into muscle fibers of immune deficient mice. *Neurology* 2003; S1:A 457
18. Molnar MJ, Sinnreich M, Herczegfalvi Á, Siska É, Karpati G: Combined deficiency of calpain and dystrophin mutually reduce the severity of phenotypes? *Neurology* 2004; 7 (S5):A169
19. Gilbert R, Larochelle N, Lu Y, Molnar MJ, Liu AB, Petrof BJ, Orlopp Ch, Lochmuller H, Nalbantoglu J, Karpati G: Factors influencing the transduction efficiency and duration of transgene introduced into muscles by plasmid-mediated electrotransfer. *Neurology* 2004; 7 (S5):A13-14
20. Siska É, Mechler F, Sinnreich M, Molnar MJ: Az izomdystrophia diagnosztikájának új lehetőségeiről egy dysferlinopathiás betegünk kapcsán. *Cephalalgia Hungarica* 2005; 15:104
21. Tóth I, Bori Z, Molnár MJ: Fenotípus variáció MERRF szindrómás egyiptetűjű ikertestvérekben. *Cephalalgia Hungarica* 2005; 15:111
22. Dodig DM, Therrien Ch, Molnar MJ, Karpati G, Sinnreich M: Altered expression of caveolin-3 in muscles of patients with dysferlin deficiency. *Neurology* 2005, 64(S1): A175
23. Molnar MJ, Gilbert R, Petrof B, Nalbantoglu J, Karpati G: Preparation for sonoporation enhanced plasmid mediated therapeutic gene transfer to skeletal muscle: a Phase I trial. *Neuromusc Disord* 2006; 16:S158
24. Szabó A, Sinnreich M, Molnar MJ, Karpati G: Alpha-dystroglycan hypoglycosylation in limb girdle muscular dystrophies. *Neurology* 2006, S2 A362
25. Gal A, Molnar MJ: The coexistence of an East-Asian mitochondrial anthropological marker and the C8270T, A8332C, and A8347C mtDNA

mutaciones in a Hungarian family with dystonia and juvenile stroke syndrome European Journal of Human Genetics, 2008; 16 S2: 266-267

26. Molnar MJ, Pentelenyi K, Remenyi V, Pal Z, Bereznai B, Gal A. The clinical importance of variability of tRNALys and its neighbouring mtDNA sequence. European Human Genetics Conference, European Journal of Human Genetics 2009; 17 S2: 69-70

27. Molnar MJ, Gilbert R, Gal A, Karpati G. Sonoporation of human biceps muscle as preparation for plasmid-based dystrophin gene transfer. Neurology. 2009; 72 S3: 306-307

## 8. AZ ÉRTEKEZÉSBEN HIVATKOZOTT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. Aarskog NK, Vedeler CA: Real-time quantitative polymerase chain reaction. *Hum Genet* 2000;107:494-498
2. Abad MM, Cotter PD, Fodor FH, Larson S, Ginsberg-Fellner F, Desnick RJ: Screening for the mitochondrial DNA A3243G mutation in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1997; 46, 445-449
3. Anderson LVB, Harrison RM, Pogue R, Vafiadaki E, Pollitt C, Davison K, Moss JA, Keers S, Pyle A, Shaw PJ, Mahjneh I, Argov Z, Greenberg CR, Wrogemann K, Bertorini T, Goebel HH, Beckmann JS, Bashir R, Bushby KM: Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). *Neuromusc Disord* 2000;10:553-559.
4. Anderson S, Bankier AT, Borel B, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG: Sequence and organisation of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290:457-465.
5. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Tunbull DM, Howell N: Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1999;23:147.
6. Angelicheva D, Tournev I, Dye D, Chandler D, Thomas PK, Kalaydjieva L: Congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome: a novel developmental disorders in Gypsies maps to 18qter. *Eur J Hum Genet* 1999;7:560-566.
7. Argov Z, Mitrani-Rosenbaum S: The hereditary inclusion body myopathy enigma and its future therapy. *Neurotherapeutics* 2008;5:633-637.
8. Arpa J, Cruz-Martínez A, Campos Y, Gutiérrez-Molina M, García-Río F, Pérez Conde C, Martín MA, Rubio JC, Del Hoyo P, Arpa-Fernández A, Arenas J: Prevalence and progression of mitochondrial diseases: a study of 50 patients. *Muscle Nerve* 2003;28:690-695.
9. Askanas V, Engel WK: Inclusion-body myositis: newest concepts of pathogenesis and relation to ageing and Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:1-14.
10. Askanas V, Engel WK, Nogalska A: Inclusion body myositis: a degenerative muscle disease associated with intra-muscle fiber multi-protein aggregates, proteasome inhibition, endoplasmic reticulum stress and decreased lysosomal degradation. *Brain Pathol* 2009;19:493-506.

11. Attardi G: The human mitochondrial genetic system. In: Mitochondrial DNA in Human Pathology, ed. Di Mauro S, Wallace DC, New York, Raven Press 1993:9-25.
12. Ballinger SW, Shoffner JM, Hedaya EV, Trounce I, Polak MA, Koontz DA, Wallace DC: Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. *Nat Genet* 1992;1:11-15.
13. Barresi R, Campbell KP: Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J Cell Sci* 2006;119:199-207.
14. Barresi R, Michele DE, Kanagawa M, Harper HA, Dovico SA, Satz JS, Moore SA, Zhang W, Schachter H, Dumanski JP, Cohn RD, Nishino I, Campbell KP: LARGE can functionally bypass  $\alpha$ -Dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. *Nat Med* 2004;10:696-703.
15. Barrientos A, Casademont J, Solans A, Moral P, Cardellach F, Urbano-Márquez A, Estivill X, Nunes V: The 9-bp deletion in region V of mitochondrial DNA: evidence of mutation recurrence. *Hum Genet* 1995;96:225-228.
16. Bashir R, Britton S, Strachan T, Keers S, Vafiadaki E, Lako M, Richard I, Marchand S, Bourg N, Argov Z, Sadeh M, Mahjneh I, Marconi G, Passos-Bueno MR, Moreira ES, Zatz M, Beckmann JS, Bushby K: A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor fer-1 is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nature Genet* 1998;20:37-42.
17. Beal MF: Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann Neurol* 2005;58:495-505.
18. Betts J, Jaros E, Perry RH, Schaefer AM, Taylor RW, Abdel-All Z, Lightowers RN, Turnbull DM: Molecular neuropathology of MELAS: level of heteroplasmy in individual neurones and evidence of extensive vascular involvement. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006;32:359-373.
19. Bindoff LA, Howell N, Poulton J, McCullough DA, Morten KJ, Lightowers RN, Turnbull DM, Weber K: Abnormal RNA processing associated with a novel tRNA mutación in mitochondrial DNA. *J Biol Chem* 1993;268:19559-19564.
20. Bindu LH, Reddy PP: Genetics of aminoglycoside-induced and prelingual non syndromic mitochondrial hearing impairment: a review. *Int J Audiol* 2008;47:702-707.
21. Van Blerkom J, Davis P, Alexander S: Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular

- organization, ATP content and competence. *Hum Reprod* 2000;15:2621-2633.
22. Boerkel CF, Takashima H, Garcia CA, Olney RK, Johnson J, Berry K, Russo P, Kennedy S, Teebi AS, Scavina M, Williams LL, Mancias P, Butler IJ, Krajewski K, Shy M, Lupski JR: Charcot Marie-Tooth disease and related neuropathies: Mutation distribution and genotype-phenotype correlation. *Ann Neurol* 2002;51:190-201.
  23. Boito CA, Melacini P, Vianello A, Prandini P, Gavassini BF, Bagattin A, Siciliano G, Angelini C, Pegoraro E: Clinical and molecular characterization of patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2I. *Arch Neurol* 2005;62:1894-1899.
  24. Bornstein B, Area E, Flanigan KM, Ganesh J, Jayakar P, Swoboda KJ, Coku J, Naini A, Shanske S, Tanji K, Hirano M, DiMauro S: Mitochondrial DNA depletion syndrome due to mutations in the RRM2B gene. *Neuromuscul Disord* 2008;18:453-459.
  25. Bourdon A, Minai L, Serre V, Jais JP, Sarzi E, Aubert S, Chretien D, de Lonlay P, Paquis Flucklinger V, Arakawa H, Nakamura Y, Munnich A, Rotig A: Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet* 2007;39:776-780.
  26. Brandstätter A, Parsons TJ, Parson W: Rapid screening of mtDNA coding region SNPs for the identification of West European Caucasian haplogroups. *Int J Legal Med* 2003;117:291-298.
  27. Bredenoord A, Dondorp W, Pennings G, de Die-Smulders C, Smeets B, de Wert G: Preimplantation genetic diagnosis for mitochondrial DNA disorders: ethical guidance for clinical practice. *Eur J Hum Genet* 2009;17:1550-1559.
  28. Brockington M, Yuva Y, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, Herrmann R, Anderson LV, Bashir R, Burgunder JM, Fallet S, Romero N, Fardeau M, Straub V, Storey G, Pollitt C, Richard I, Sewry CA, Bushby K, Voit T, Blake DJ, Muntoni F: Mutations in the fukutin-related gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet* 2001;10:2851-2859.
  29. Brown SC, Torelli S, Brockington M, Yuva Y, Jimenez C, Feng L, Anderson L, Ugo I, Kroger S, Bushby K, Voit T, Sewry C, Muntoni F: Abnormalities in  $\alpha$ -Dystroglycan expression in MDC1C and LGMD2I muscular dystrophies. *Am J Pathol* 2004;164:727-737.
  30. Bushby KM, Beckmann JS: The limb-girdle muscular dystrophies--proposal for a new nomenclature. *Neuromuscul Disord* 1995;5:337-343.

31. Bykhovskaya Y, Mengesha E, Fischel-Ghodsian N: Pleiotropic effects and compensation mechanisms determine tissue specificity in mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia (MLASA). *Mol Genet Metab* 2007;91:148-156.
32. Byrne E, Trounce I, Marzuki S, Dennett X, Berkovic SF, Davis S, Tanaka M, Ozawa T: Functional respiratory chain studies in mitochondrial cytopathies. Support for mitochondrial DNA heteroplasmy in myoclonus epilepsy and ragged red fibers (MERRF) syndrome. *Acta Neuropathol* 1991;81:318-323.
33. Byun DS, Chae KS, Ryu BK, Lee MG, Chi SG: Expression and mutation analyses of P53R2, a newly identified p53 target for DNA repair in human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2002;98:718-723.
34. Campos Y, Garcia A, Eiris J, Fuster M, Rubio JC, Martin MA, Hoyo P, Pintos E, Castro-Gago M, Arenas J: Mitochondrial myopathy, cardiomyopathy and psychiatric illness in a Spanish family harbouring the mtDNA 3303 C-T mutation. *J Inherit Metab Dis* 2001;24:685-687.
35. Campos Y, Lorenzo G, Martín MA, Torregrosa A, del Hoyo P, Rubio JC, García A, Arenas J: A mitochondrial tRNA(Lys) gene mutation (T8316C) in a patient with mitochondrial myopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *Neuromuscular Disord* 2000;10:493-496.
36. Cao H, Koehler DR, Hu J: Adenoviral vectors for gene replacement therapy. *Viral Immunol* 2004;17:327-333.
37. Cardaioli E, Dotti MT, Hayek G, Zappella M, Federico A: Studies on mitochondrial pathogenesis of Rett syndrome: ultrastructural data from skin and muscle biopsies and mutational analysis at mtDNA nucleotides 10463 and 2835. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1999;31:301-304.
38. Chae JH, Hwang H, Lim BC, Cheong HI, Hwang YS, Kim KJ: Clinical features of A3243G mitochondrial tRNA mutation. *Brain Dev* 2004;26:459-462. .
39. Chen TJ, Chen SS, Wang DC, Hsieh YL: Increased vulnerability of auditory system to noise exposure in mdx mice. *Laryngoscope* 2002;112:520-525.
40. Chiba A, Matsumura K, Yamada H, Inazu T, Dennett X, Berkovic SF, Davis S, Tanaka M, Ozawa T: Structures of salivated O-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve alpha-dystroglycan. The role of a novel O-mannosyl-type oligosaccharide in the binding of alpha-dystroglycan with laminin. *J Biol Chem* 1997;272:2156-2162.



41. Chae J.H., Hwang H., Lim B.C., Cheong H.I., Hwang Y.S., Kim K.J., Clinical features of A3243G mitochondrial tRNA mutation, *Brain Dev.*, 2004, 26, 459-462
42. Chinnery PF, DiMauro S, Shanske S, Schon EA, Zeviani M, Mariotti C, Carrara F, Lombes A, Laforet P, Ogier H, Jaksch M, Lochmüller H, Horvath R, Deschauer M, Thorburn DR, Bindoff LA, Poulton J, Taylor RW, Matthews JN, Turnbull DM: Risk of developing a mitochondrial DNA deletion disorder. *Lancet* 2004;364:592-596.
43. Chinnery PF, Thorburn DR, Samuels DC, White SL, Dahl HM, Turnbull DM, Lightowlers RN, Howell N: The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trend Genet* 2000;16:500-505.
44. Chinnery PF, Johnson MA, Wardell TM, Singh-Kler R, Hayes C, Brown DT, Taylor RW, Bindoff LA, Turnbull DM. The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann Neurol* 2000;b;48:188-193.
45. Coon KD, Valla J, Szelinger S, Schneider LE, Niedzielko TL, Brown KM, Pearson JV, Halperin R, Dunckley T, Papassotiropoulos A, Caselli RJ, Reiman EM, Stephan DA: Quantitation of heteroplasmy of mtDNA sequence variants identified in a population of AD patients and controls by array-based resequencing. *Mitochondrion* 2006;6:194-210.
46. Danialou G, Comtois AS, Dudley RW, Nalbantoglu J, Gilbert R, Karpati G, Jones DH, Petrof BF: Ultrasound increases plasmid-mediated gene transfer to dystrophic muscles without collateral damage. *Mol Ther* 2002;6:687-693.
47. Deng ZL, Xie DW, Bostick RM, Miao XJ, Gong YL, Zhang JH, Wargovich MJ: Novel genetic variations of the p53R2 gene in patients with colorectal adenoma and controls. *World J Gastroenterol* 2005;11:5169-5173.
48. Desquerre I, Christov C, Mayer M, Zeller R, Becane HM, Bastuji-Garin S, Leturcq F, Chiron C, Chelly J, Gherardi RK: Clinical heterogeneity of duchenne muscular dystrophy (DMD): definition of sub-phenotypes and predictive criteria by long-term follow-up. *PLoS One* 2009;4:4347.
49. Dichgans M: Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy: phenotypic and mutational spectrum. *J Neurol Sci* 2002;203-204:77-80.
50. DiMauro S, Davidzon G: Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med* 2005;37:222-232.
51. Echaniz-Laguna A, Degos B, Bonnet C, Latour P, Hamadouche T, Lévy N, Leheup B: NDRG1-linked Charcot-Marie-Tooth disease (CMT4D)

- with central nervous system involvement. *Neuromuscul Disord* 2007;17:163-168.
52. Eichberg J, Myelin PO: New knowledge and new roles. *Neurochem Res* 2002;27:1331-1340.
53. Finnila S, Tuisku S, Herva R, and Majamaa K: A novel mitochondrial DNA mutation and a mutation in the Notch3 gene in a patient with myopathy and CADASIL. *J Mol Med* 2001;79:641-647.
54. Finsterer J: Limb girdle muscular dystrophies. *Nervenarzt* 2004;75:1153-1166.
55. Finsterer J: Genetic, pathogenetic, and phenotypic implications of the mitochondrial A3243G tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) mutation. *Acta Neurol Scand* 2007;116:1-14.
56. Fisher A, Yang FD, Rubin H, Cooperman BS: R2 C-terminal peptide inhibition of mammalian and yeast ribonucleotide reductase. *J Med Chem* 1993;36:3859-3862.
57. Flanigan KM, Niederhausern A, Dunn DM, Alder J, Mendell JR, Weiss RB: Rapid Direct Sequence Analysis of the Dystrophin Gene. *Am J Hum Genet* 2003;72:931-939.
58. Foxton RM, Laval SH, Bushby KM: Characterisation of the dysferlin skeletal muscle promoter. *Eur J Hum Genet* 2004;2:127-131.
59. Francisco G, Hernández C, Martínez R, García-Arumí E, Andreu A, Simó R: Prevalence of mitochondrial A3243G mutation in adult type 1 diabetic patients in Catalonia. *Diabetes Metab* 2005; 31: 621-622
60. Fucharoen G, Fucharoen S, Horai S: Mitochondrial DNA polymorphisms in Thailand. *J Hum Genet* 2001;6:115-125.
61. Gabriel C, Gregson NA, Wood NW, Hughes RA: Immunological study of hereditary motor and sensory neuropathy type 1a (HMSN1a). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;72:230-235.
62. Gál A, Szabó A, Pentelényi K, Pál Z: Maternalisan öröklődő diabetes mellitus, nagyothallás, krónikus ophthalmoplegia externa és myopathia mint az mtDNS A3243G mutáció következménye. *Orvosi Hetilap* 2008;149:1593-1598.
63. Ginsberg L, Malik O, Kenton AR, Sharp D, Muddle JR, Davis MB, Winer JB, Orrell RW, King RH: Coexistent hereditary and inflammatory neuropathy. *Brain* 2004;127:193-202.
64. Goebel HH, Meyermann R, Rosin R, Schlote W: Characteristic morphologic manifestation of CADASIL, cerebral autosomal-dominant

arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy, in skeletal muscle and skin. *Muscle Nerve* 1997;20:625-627.

65. Gonzalez AM, Larruga JM, Abu-Amero KK, Shi Y, Pestano J, Cabrera VM: Mitochondrial lineage M1 traces an early human backflow to Africa. *BMC Genomics* 2007;8:223.
66. Goto YI, Nonaka I, Horai S: A mutation in the tRNA<sup>Leu (UUR)</sup> gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 1990;348:651-653.
67. Goyenvalle A, Babbs A, van Ommen GJ, Garcia L, Davies KE: Enhanced exon skipping induced by U7 snRNA carrying a splicing silencer sequence: Promising tool for DMD therapy. *Mol Ther* 2009;7:1234-1240.
68. Guittet O, Hakansson P, Voevodskaya N, Fridd S, Graslund A, Arakawa H, Nakamura Y, Thelander L: Mammalian p53R2 protein forms an active ribonucleotide reductase in Vitro with the R1 protein, which is expressed both in resting cells in response to DNA damage and in proliferating cells. *J Biol Chem* 2001;276:40647-40651.
69. Hakansson P, Hofer A, Thelander L: Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells. *J Biol Chem* 2006;281:7834-7841.
70. Herweijer H, Wolff JA: Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther* 2003;10:453-458.
71. Horai S, Murayama K, Hayasaka K, Matsubayashi S, Hattori Y, Fucharoen G, Harihara S, Park KS, Omoto K, Pan IH: MtDNA polymorphism in East Asian Populations, with special reference to the peopling of Japan. *Am J Hum Genet* 1996;59:579-590.
72. Hsieh RH, Li JY, Pang CY, Wei YH: A novel mutation in the mitochondrial 16S rRNA gene in a patient with MELAS syndrome, diabetes mellitus, hyperthyroidism and cardiomyopathy. *J Biomed Sci* 2001;8:328-335.
73. Illarioshkin SN, Ivanova-Smolenskaya IA, Greenberg CR, Nylen E, Sukhorukov VS, Poleshchuk VV, Markova ED, Wrogemann K: Identical dysferlin mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2B and distal myopathy. *Neurology* 2000;55:1931-1933.
74. Jenuth JP, Peterson AC, Fu K, Shoubridge EA: Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1996;14:146-151.
75. Joutel A, Vahedi K, Corpechot C, Troesch A, Chabriat H, Vayssiere C, Cruaud C, Maciazek J, Weissenbach J, Bousser MG, Bach JF, Tournier-

Lasserve E: Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients. *Lancet* 1997;350:1511-1515.

76. Kalaydjieva L, Lochmüller H, Tournev I, Baas F, Beres J, Colomer J, Guergueltcheva V, Herrmann R, Karcagi V, King R, Miyata T, Müllner-Eidenböck A, Okuda T, Milic Rasic V, Santos M, Talim B, Vilchez J, Walter M, Urtizberea A, Merlini L: Workshop report 125th International Workshop: Neuromuscular Disorders in the Roma (Gypsy) Population, 23-25 April 2004, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscular Disorders* 2005;15:65-71.
77. Kalaydjieva L, Nikolova A, Turnev I, Petrova J, Hristova A, Ishpekova B, Petkova I, Shmarov A, Stancheva S, Middleton L, Merlini L, Trogu A, Muddle JR, King RH, Thomas PK: Hereditary motor and sensory neuropathy-Lom, a novel demyelinating neuropathy associated with deafness in gypsies clinical, electrophysiological and nerve biopsy findings. *Brain* 1998;121:399-408.
78. Karpati G, Gilbert R, Molnar MJ: The principles of therapies and prevention based on cellular and molecular mechanisms of muscle disease. In *Structural and molecular basis of skeletal muscle diseases*. International Society of Neuropathology and World Federation of Neurology, ed. Karpati G 2002;296-304.
79. Karpati G, Holland P: Sweetening the pot in muscle- Genetic defects of protein glycosylation causing muscle disease. *Neurology* 2002;59:1674-1676.
80. Karpati G, Molnar MJ: Molecular Therapies for the Nervous System and Muscle. In: *Neurological Therapeutics, Principles and Practice*, Martin Dunitz, Taylor and Francis Group, London and New York, ed. Noseworthy JH 2006;1,25-35.
81. Kato T, Inubushi T, Kato N: Magnetic resonance spectroscopy in affective disorders. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1998;10:133-147.
82. Kato T, Kato N: Mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Bipol Disord* 2000; 2:180-190.
83. Kato T, Stine OC, McMahon FJ, Crowe RR: Increased levels of a mitochondrial DNA deletion in the brain of patients with bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 1997; 42:871-875.
84. Kimura T, Takeda S, Sagiya Y, Gotoh M, Nakamura Y, Arakawa H: Impaired function of p53R2 in Rrm2b-null mice causes severe renal failure through attenuation of dNTP pools. *Nat Genet* 2003;34:440-445.
85. Klemm T, Neumann S, Trülzsch B, Pistrosch F, Hanefeld M, Paschke R: Search for mitochondrial DNA mutation at position 3243 in German

- patients with a positive family history of maternal diabetes mellitus, *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001; 109:283-287
86. Kleinle S, Schneider V, Moosmann P, Brandner S, Krähenbühl S, Liechti-Gallati S: A novel mitochondrial tRNA(Phe) mutation inhibiting anticodon stem formation associated with a muscle disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247:112-115.
87. Klemm T, Neumann S, Trülzsch B, Pistrosch F, Hanefeld M, Paschke R: Search for mitochondrial DNA mutation at position 3243 in German patients with a positive family history of maternal diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;109:283-287.
88. Kodaka R, Itagaki Y, Matsumoto M, Nagai T, Okada S: A transcranial doppler ultrasonography study of cerebrovascular CO<sub>2</sub> reactivity in mitochondrial encephalomyopathy. *Stroke* 1996;27:1350-1353.
89. Koene S, Kozicz TL, Rodenburg RJ, Verhaak CM, de Vries MC, Wortmann S, van de Heuvel L, Smeitink JA, Morava E: Major depression in adolescent children consecutively diagnosed with mitochondrial disorder. *J Affect Disord* 2009;114:327-332.
90. Koene S, Smeitink J: Mitochondrial medicine: entering the era of treatment. *J Intern Med* 2009;265:193-209.
91. Komlósi K, Bene J, Havasi V, Tihanyi M, Herczegfalvi A, Móser J, Melegh B: Phenotypic variants of A3243G mitochondrial DNA mutation in a Hungarian family. *Orv Hetil* 2004;145:1805-1809.
92. Komlósi K, Kellermayer R, Maász A, Havasi V, Hollódy K, Vincze O, Merkli H, Pál E, Melegh B: Maternally inherited deafness and unusual phenotypic manifestations associated with A3243G mitochondrial DNA mutation. *Pathol Oncol Res* 2005;11:82-86.
93. Konradi C, Eaton M, MacDonald ML, Walsh J, Benes FM, Heckers S: Molecular evidence for mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2004;61:300-308.
94. Kunz BA, Kohalmi SE, Kunkel TA, Mathews CK, McIntosh EM, Reidy JA: International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability. *Mutat Res* 1994;318:1-64.
95. Kwon SJ, Park SS, Kim JM, Ahn TB, Kim SH, Kim J, Lee SH, Ha CK, Ahn MY, Jeon BS. Investigation of common mitochondrial point mutations in Korea. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1011:339-44
96. Lalwani AK, Brister JR, Fex J, Grundfast KM, Pikus AT, Ploplis B, San Agustin T, Skarka H, Wilcox ER: A new nonsyndromic X-linked

- sensorineural hearing impairment linked to Xp21.2. *Am J Hum Genet* 1994;55:685-694.
97. Laval M, Pascal M: A calpain-like activity insensitive to calpastatin in *Drosophila melanogaster*. *Biochim Biophys Acta* 2002;1570:121-128.
  98. Lehtonen MS, Moilanen JS, Majamaa K: Increased variation in mtDNA in patients with familial sensorineural hearing impairment. *Hum Genet* 2003;113:220-227.
  99. Leschziner A, Moukhles H, Lindenbaum M, Gee SH, Butterworth J, Campbell KP, Carbonetto S: Neural regulation of alpha-dystroglycan biosynthesis and glycosylation in skeletal muscle. *J Neurochem* 2000;74:70-80.
  100. Lévêque M, Marlin S, Jonard L, Procaccio V, Reynier P, Amati-Bonneau P, Baulande S, Pierron D, Lacombe D, Duriez F, Francannet C, Mom T, Journel H, Catros H, Drouin-Garraud V, Obstoy MF, Dollfus H, Eliot MM, Faivre L, Duvillard C, Couderc R, Garabedian EN, Petit C, Feldmann D, Denoyelle F: Whole mitochondrial genome screening in maternally inherited non-syndromic hearing impairment using a microarray resequencing mitochondrial DNA chip. *Eur J Hum Genet* 2007;15:1145-1155.
  101. Levinger L, Morl M, Florentz C: Mitochondrial tRNA 3' end metabolism and human disease. *Nucleic Acids Research* 2004;32:5430-5441.
  102. Levy MY, Barron LG, Meyer KB, Szoka FC Jr: Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into blood. *Gene Ther* 1996;3:201-211.
  103. Linde L, Kerem B: Introducing sense into nonsense in treatments of human genetic diseases. *Trends Genet* 2008;24:552-563.
  104. Liu CS, Cheng WL, Chen YY, Ma YS, Pang CY, Wei YH: High prevalence of the COII/tRNA(Lys) intergenic 9-bp deletion in mitochondrial DNA of Taiwanese patients with MELAS or MERRF syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1042:82-87.
  105. Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, Serrano C, Urtizberea JA, Hentati F, Ben Hamida M, Bohlega S, Culper EJ, Amato AA, Bossie K, Oeltjen J, Bejaoui K, McKenna-Yasek D, Hosler BA, Schurr E, Arahata K, de Jong PJ, Brown RH Jr: Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nature Genet* 1998;20:31-36.
  106. Lu QL, Bou-Gharios G, Partridge TA: Non-viral gene delivery in skeletal muscle: a protein factory. *Gene Ther* 2003;10:131-142.

107. Magariños AM, Orchinik M, McEwen BS: Morphological changes in the hippocampal CA3 region induced by non-invasive glucocorticoid administration: a paradox. *Brain Res* 1998;809:314-318.
108. Majamaa K, Moilanen JS, Uimonen S, Remes AM, Salmela PI, Kärppä M, Majamaa-Voltti KA, Rusanen H, Sorri M, Peuhkurinen KJ, Hassinen IE: Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: prevalence of the mutation in an adult population. *Am J Hum Genet* 1998;63:447-454.
109. Majamaa K, Turkka J, Kärppä M, Winqvist S, Hassinen IE: The common MELAS mutation A3243G in mitochondrial DNA among young patients with an occipital brain infarct. *Neurology* 1997;49:1331-1334.
110. Malandrini A, Albani F, Palmeri S, Fattapposta F, Gambelli S, Berti G, Bracco A, Tammara A, Calzavara S, Villanova M, Ferrari M, Rossi A, Carrera P: Asymptomatic cores and paracrystalline mitochondrial inclusions in CADASIL. *Neurology* 2002;59:617-620
111. Małecki M, Klupa T, Wanic K, Frey J, Cyganek K, Sieradzki J: Search for mitochondrial A3243G tRNA(Leu) mutation in Polish patients with type 2 diabetes mellitus. *Med Sci Monit* 2001; 7,246-250
112. Mancuso M, Nesti C, Petrozzi L, Orsucci D, Frosini D, Kiferle L, Bonuccelli U, Ceravolo R, Murri L, Siciliano G: The mtDNA A8344G "MERRF" mutation is not a common cause of sporadic Parkinson disease in Italian population. *Parkinsonism Relat Disord* 2008;14:381-382.
113. Manzur AY, Muntoni F: Diagnosis and new treatments in muscular dystrophies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009;80:706-714.
114. Marchbanks RM, Mulcrone J, Whatley SA: Aspects of oxidative metabolism in schizophrenia. *Br J Psychiatry* 1995;167:293-298
115. Marotta R., Chin J., Quigley A., Katsabanis S., Kapsa R., Byrne E. et al., Diagnostic screening of mitochondrial DNA mutations in Australian adults 1990-2001, *Intern. Med. J.*, 2004, 34, 10-19
116. Martin-Kleiner I, Pape-Medvidovic E, Pavlic-Renar I, Metelko Z, Kusec R, Gabrilovac J, Boranić M: Pilot study of mitochondrial DNA point mutation A3243G in a sample of Croatian patients having type 2 diabetes mellitus associated with maternal inheritance. *Acta Diabetol* 2004; 41:179-184.
117. Mathews CK: DNA precursor metabolism and genomic stability. *Faseb J* 2006;20:1300-1314.

118. Mercuri E, Messina S, Bruno C, Mora M, Pegoraro E, Comi GP, D'Amico A, Aiello C, Biancheri R, Berardinelli A, Boffi P, Cassandrini D, Laverda A, Moggio M, Morandi L, Moroni I, Pane M, Pezzani R, Pichiecchio A, Pini A, Minetti C, Mongini T, Mottarelli E, Ricci E, Ruggieri A, Saredi S, Scuderi C, Tessa A, Toscano A, Tortorella G, Trevisan CP, Uggetti C, Vasco G, Santorelli FM, Bertini E: Congenital muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Neurology* 2009;72:1802-1809.
119. Middleton FA, Mirnics K, Pierri JN, Lewis DA, Lewitt P: Gene expression profiling reveals alterations of specific metabolic pathways in schizophrenia. *J Neurosci* 2002; 22:2718-2729.
120. Misik V, Riesz P: Free radical intermediates in sonodynamic therapy. *Ann NY Acad Sci* 2000;899:335-348.
121. Mkaouar-Rebai E, Tlili A, Masmoudi S, Belguith N, Charfeddine I, Mnif M, Triki C, Fakhfakh F: Mutational analysis of the mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene in Tunisian patients with mitochondrial diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;355:1031-1037.
122. Molnar MJ: Further mitochondrial disorders. *Encyclopedia of Molecular Medicine*. Ed. Kazazian HH Jr, Klein G, Moser HW, Orkin SH, Roizman B, Thakker V, Watkins H: John Wiley and Sons 2010
123. Molnar MJ, Karpata G: Muscular dystrophies related to deficiency of sarcolemmal proteins. *Blue Books of Practical Neurology Series, Muscle Diseases*, ed. Schapira AHV and Griggs RC, Butterworth-Heinemann 1999;83-114.
124. Molnar MJ, Karpata G: *Az izombetegségek alapjai és modern szemlélete*. Springer, Budapest, 2001
125. Moore SA, Shilling CJ, Westra S, Wall C, Wicklund MP, Stolle C, Brown CA, Michele DE, Piccolo F, Winder TL, Stence A, Barresi R, King N, King W, Florence J, Campbell KP, Fenichel GM, Stedman HH, Kissel JT, Griggs RC, Pandya S, Mathews KD, Pestronk A, Serrano C, Darvish D, Mendell JR: Limb-Girdle Muscular Dystrophy in the United States. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65:995-1003.
126. Moraes CT, Ciacci F, Bonilla E, Ionasescu V, Schon EA, DiMauro S: A mitochondrial tRNA anticodon swap associated with a muscle disease. *Nat Genet* 1993;4:284-288.
127. Moraes CT, Ciacci F, Bonilla E, Jansen C, Hirano M, Rao N, Lovelace RE, Rowland LP, Schon EA, DiMauro S: Two novel pathogenic mitochondrial DNA mutations affecting organelle number and protein synthesis: is the tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> gene an etiologic hotspot? *J Clin Invest* 1993;92:2906-2915.



128. Moraes CT, Ricci E, Arnaudo E, Bonilla E: Quantitative defects of mitochondrial DNA. In: *Mitochondrial DNA in Human Pathology*, ed. Di Mauro S, Wallace DC, New York, Raven Press 1993:97-108.
129. Munné S, Daily T, Sultan KM, Grifo J, Cohen J: The use of first polar bodies for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod* 1995;10:1014–1020
130. Muntoni F, Torelli S, Ferlini A: Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* 2003;2:731-740.
131. Nagata H., Kumahara K., Tomemori T., Arimoto Y., Isoyama K., Yoshida K. et al., Frequency and clinical features of patients with sensorineural hearing loss associated with the A3243G mutation of the mitochondrial DNA in otorhinolaryngic clinics, *J. Hum. Genet.*, 2001, 46, 595-599
132. Nakano K, Bálint E, Ashcroft M, Vousden KH: A ribonukleotide reductase gene is a transcriptional target of p53 and p73. *Oncogene* 2000;19:4283-4289.
133. Navarro C, Teijeira S: Neuromuscular disorders in the Gypsy ethnic group. A short review. *Acta Myol* 2003;1:11-14.
134. Nelis E, Timmerman V, De Jonghe P, Van Broeckhoven C, Rautenstrauss B: Molecular genetics and biology of inherited peripheral neuropathies: a fast moving field. *Neurogenetics* 1999;2:137-148.
135. Newman CM, Bettinger T: Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer. *Gene Ther* 2007;14:465-47
136. Ng M.C., Yeung V.T., Chow C.C., Li J.K., Smith P.R., Mijovic C.H. et al, Mitochondrial DNA A3243G mutation in patients with early- or late-onset type 2 diabetes mellitus in Hong Kong Chinese, *Clin.Endocrinol. (Oxf)*., 2000, 52, 557-564
137. Nguyen K, Bassez G, Bernard R, Krahn M, Labelle V, Figarella-Branger D, Pouget J, Hammouda el H, Beroud C, Urtizbera A, Eymard B, Leturcq F, Levy N: Dysferlin mutations in LGMD2B, Miyoshi myopathy, and atypical dysferlinopathies. *Hum Mutat* 2005;26:165.
138. Nordlund P, Reichard P: Ribonukleotide reductases. *Annu Rev Biochem* 2006;75:681-706.
139. Nunomura A, Honda K, Takeda A, Hirai K, Zhu X, Smith MA, Perry G: Oxidative damage to RNA in neurodegenerative diseases. *J Biomed Biotechnol* 2006;3:82323.

140. Oldfors A, Larsson NG, Lindberg C, Holme E: Mitochondrial DNA deletions in inclusion body myositis. *Brain* 1993;116:325-336.
141. Pang CY, Huang CC, Yen MY, Wang EK, Kao KP, Chen SS, Wei YH: Molecular epidemiologic study of mitochondrial DNA mutations in patients with mitochondrial diseases in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 1999;98:326-334.
142. Pareyson D, Dell'Anna E, DiMonda T, Scaioli V, Ciano C, Sghirlanzoni A, Lauria G, Morbin M, Laurà M, Solari A, Taroni F: Influence of gender and pregnancy on CMT1A. *Journal of the Peripheral Nervous System* 2004;9:118.
143. de la Pena P, Bornstein B, del Hoyo P, Fernandez-Moreno MA, Martin MA, Campos Y, Gomez-Escalonilla C, Molina JA, Cabello A, Arenas J, and Garesse R: Mitochondrial dysfunction associated with a mutation in the Notch3 gene in a CADASIL family. *Neurology* 2001;57:1235-1238.
144. Petrozzi L, Ricci G, Giglioli NJ, Siciliano G, Mancuso M: Mitochondria and neurodegeneration. *Biosci Rep* 2007;27:87-104.
145. Pfister MH, Apaydin F, Turan O, Bereketoglu M, Bilgen V, Braendle U, Kose S, Zenner HP, Lalwani AK: Clinical evidence for dystrophin dysfunction as a cause of hearing loss in locus DFN4. *Laryngoscope* 1999;109:730-735.
146. Pfister MH, Apaydin F, Turan O, Bereketoglu M, Bilgen V, Braendle U, Zenner HP, Lalwani AK: A second family with nonsyndromic sensorineural hearing loss linked to Xp21.2: refinement of the DFN4 locus within DMD. *Genomics* 1998;53:377-382.
147. Pontarin G, Ferraro P, Hakansson P, Thelander L, Reichard P, Bianchi V: p53R2 dependent ribonucleotide reduction provides deoxyribonucleotides in quiescent human fibroblasts in the absence of induced DNA damage. *J Biol Chem* 2007;282:16820-16828.
148. Pontarin G, Fijolek A, Pizzo P, Ferraro P, Rampazzo C, Pozzan T, Thelander L, Reichard PA, Bianchi V: Ribonucleotide reduction is a cytosolic process in mammalian cells independently of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105:17801-17806.
149. Poulton J, Morten K: Noninvasive diagnosis of the MELAS syndrome from blood DNA. *Ann Neurol* 1993;34:116.
150. Rankin EC, Isenberg DA: IgA deficiency and SLE: prevalence in a clinic population and a review of the literature. *Lupus* 1997;6:390-394.
151. Remes AM, Kärppä M, Rusanen H, Majamaa K, Hassinen IE, Moilanen JS, Uimonen S, Sorri M, Salmela PI, Karvonen SL. Epidemiology of the mitochondrial DNA 8344A>G mutation for the myoclonus epilepsy and

ragged red fibers (MERRF) syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:1158-1159.

152. Renshaw PF, Yurgelun-Todd DA, Wei H, Charles HC, Tohen M, Lieberman JA: Olanzapine induced reductions in frontal lobe lactate levels correlate with treatment response in first episode psychosis. *Biol Psych* 2003;53:67.
153. Rieder MJ, Taylor SL, Tobe VO, Nickerson DA: Automating the identification of DNA variations using quality-based fluorescence re-sequencing: analysis of the human mitochondrial genome. *Nucleic Acids Research* 1998;26:967-973.
154. Ritz M, Lechner-Scott J, Scott RJ, Fuhr P, Malik N, Erne B, Taylor V, Suter U, Schaeren-Wiemers N, Steck AJ: Characterisation of autoantibodies to peripheral myelin protein 22 in patients with hereditary and acquired neuropathies. *J Neuroimmunol* 2000;104:155-163.
155. Rodríguez-Hernández M, Hirano M, Arrieta T, Lestayo Z, Estrada R, Santiesteban R, Guerra-Badía R, Galarraga J, Gutierrez J, Hechevarría E, Andreu A, Montoya J, DiMauro S: Molecular studies in Cuban patients with progressive external ophthalmoplegia. *Rev Neurol* 2000;30:1001-1005.
156. Roland PE, Zilles K: Brain atlases - a new research tool. *Trends Neurosci* 1994;17:458-467.
157. Rollins B, Martin MV, Sequeira PA, Moon EA, Morgan LZ, Watson SJ, Schatzberg A, Akil H, Myers RM, Jones EG, Wallace DC, Bunney WE, Vawter MP: Mitochondrial variants in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *PLoS One* 2009;4:4913.
158. Romero NB, Braun S, Benveniste O, Leturcq F, Hogrel JY, Morris GE, Barois A, Eymard B, Payan C, Ortega V, Boch AL, Lejean L, Thioudellet C, Mourot B, Escot C, Choquel A, Recan D, Kaplan JC, Dickson G, Klatzmann D, Molinier-Frenckel V, Guillet JG, Squiban P, Herson S, Fardeau M: Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* 2004;15:1065-1076.
159. Ruppert V, Nolte D, Aschenbrenner T, Pankuweit S, Funck R, Maisch B: Novel point mutations in the mitochondrial DNA detected in patients with dilated cardiomyopathy by screening the whole mitochondrial genome. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:535-543.
160. Sakuta R, Nonaka I: Vascular involvement in mitochondrial myopathy. *Ann Neurol* 1989;6:594-601.
161. Salles JE, Kalinin LB, Ferreira SR, Kasamatsu T, Moisés RS: Diabetes mellitus associated with the mitochondrial mutation A3243G: frequency

and clinical presentation, *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007;51:559-565.

162. Scaglia F, Towbin JA, Craigen WJ, Belmont JW, Smith OB, Neish SR, Ware SM, Hunter JV, Fernbach SD, Vladutiu GD, Wong LJC, Vogel H. Clinical spectrum, morbidity and mortality in 113 pediatric patients with mitochondrial disease. *Pediatrics* 2004;114:925-931
163. Schachter H, Vajsar J, Zhang W: The role of defective glycolysation in congenital muscular dystrophy. *Glycoconj J* 2004;20:291-300.
164. Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, Chinnery PF: The epidemiology of mitochondrial disorders--past, present and future. *Biochim Biophys Acta* 2004;1659: 115-120.
165. Schimmel PR: Aminoacyl-tRNA synthetases: general feature and recognition of tRNAs. *Annu Rev Biochem* 1977;48:601-648.
166. Schmid C, Stienekemeier M, Oehen S, Bootz F, Zielasek J, Gold R, Toyka KV, Schachner M, Martini R: Immune deficiency in mouse models for inherited peripheral neuropathies leads to improved myelin maintenance. *J Neurosci* 2000;20:729-735.
167. Schratzberger A, Krainin JG, Schratzberger G, Silver M, Ma H, Kearney M, Zuk RF, Brisken AF, Losordo DW, Isner JM: Transcutaneous ultrasound augments naked DNA transfection of skeletal muscle. *Mol Ther* 2002;6:576-583.
168. Schröder JM: Neuropathy associated with mitochondrial disorders. *Brain Pathol* 1993;3:177-190.
169. Schröder JM, Molnar M: Mitochondrial abnormalities and peripheral neuropathy in inflammatory myopathy, especially inclusion body myositis. *Mol Cell Biochem* 1997;174:277-281.
170. Schulman LH, Pelka H: Anticodon swithes changes the identity of methionine and valine tRNAs. *Science* 1988;242:765-768.
171. Shao J, Zhou B, Zhu L, Qiu W, Yuan YC, Xi B, Yen Y: In vitro characterization of enzymatic properties and inhibition of the p53R2 subunit of human ribonukleotide reductase. *Cancer Res* 2004;64:1-6.
172. Shoffner JM, Bialer MG, Pavlakis SG, Lott M, Kaufman A, Dixon J, Teichberg S, Wallace DC: Mitochondrial encephalomyopathy with a single nukleotide pair deletion in the mitochondrial tRNA<sup>LEU(UUR)</sup> gene. *Neurology* 1995;45:286-292.

173. Shoffner JM, Brown MD, Torroni A, Lott MT, Cabell MF, Mirra SS, Beal MF, Yang CC, Gearing M, Salvo R: Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer disease and Parkinson disease patients. *Genomics* 1993;17:171-184.
174. Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC: Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA (Lys) mutation. *Cell* 1990;61:931-937.
175. Shoubridge E, Molnar MJ: Oxidative phosphorylation defects. In *Structural and molecular basis of skeletal muscle diseases*. International Society of Neuropathology and World Federation of Neurology, ed. Karpati G 2002;202-213.
176. Shy ME, Jani A, Krajewski K, Grandis M, Lewis RA, Li J, Shy RR, Balsamo J, Lilien J, Garbern JY, Kamholz J: Phenotypic clustering in MPZ mutations. *Brain* 2004;127:371-384.
177. Siffringer M, Uhlenberg B, Lammel S, Hanke R, Neumann B, von Moers A, Koch I, Speer A: Identification of transcripts from a subtraction library which might be responsible for the mild phenotype in an intrafamilially variable course of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet* 2004;114:149-156.
178. Sinnreich M, Therrien C, Karpati G: Lariat branch point mutation in the dysferlin gene with mild limb-girdle muscular dystrophy. *Neurology* 2006;66:1114-1116.
179. Sissler M, Helm M, Frugier M, Giege R, Florentz C: Aminoacylation properties of pathology-related human mitochondrial tRNA(Lys) variants. *RNA* 2004;10:841-853.
180. Smeds J, Berggren P, Ma X, Xu Z, Hemminki K, Kumar R: Genetic status of cell cycle regulators in squamous cell carcinoma of the oesophagus: the CDKN2A (p16(INK4a) and p14(ARF) ) and p53 genes are major targets for inactivation. *Carcinogenesis* 2002;23:645-655..
181. Soodyall H, Vigilant L, Hill AV, Stoneking M, Jenkins T: MtDNA control-region sequence variation suggests multiple independent origins of an "Asian-specific" 9-bp deletion in sub-Saharan Africans. *Am J Hum Genet* 1996;58:595-608.
182. Sorimachi H, Toyama-Sorimachi N, Saido TC, Kawasaki H, Sugita H, Miyasaka M, Arahata K, Ishiura S, Suzuki K: Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle. *J Biol Chem* 1993;268:10593-10605.
183. Stavrovskaya IG, Kristal BS: The powerhouse takes control of the cell: is the mitochondrial permeability transition a viable therapeutic target

against neuronal dysfunction and death? *Free Radic Biol Med* 2005;38:687-697.

184. Steffann J, Frydman N, Gigarel N, Burlet P, Ray PF, Fanchin R, Feyereisen E, Kerbrat V, Tachdjian G, Bonnefont J-P, Frydman R, Munnich A: Analysis of mtDNA variant segregation during early human embryonic development: a tool for successful NARP preimplantation diagnosis. *J Med Genet* 2006;43:244–247.
185. Sternberg D, Chatzoglou E, Laforêt P, Fayet G, Jardel C, Blondy P, Fardeau M, Amselem S, Eymard B, Lombès A: Mitochondrial DNA transfer RNA gene sequence variations in patients with mitochondrial disorders. *Brain* 2001;124:984-994.
186. Sveen ML, Schwartz M, Vissing J: High prevalence and phenotype-genotype correlations of limb girdle muscular dystrophy type 2I in Denmark. *Ann Neurol* 2006;59:808-815.
187. Szigeti K, Garcia CA, Lupski JR: Charcot-Marie-Tooth disease and related hereditary polyneuropathies: molecular diagnostics determine aspects of medical management. *Genet Med* 2006;8:86-92.
188. Tajima Y, Uyama E, Go S, Sato C, Tao N, Kotani M, Hino H, Suzuki A, Sanai Y, Kitajima K, Sakuraba H: Distal myopathy with rimmed vacuoles: impaired O-glycan formation in muscular glycoproteins. *Am J Pathol* 2005;166:1121-1130.
189. Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, Shiraishi K, Fukuda S, Matsui K, Takei Y, Nakamura Y: A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* 2000;404:42-49.
190. Tang DL, Zhou X, Li X, Zhao L, Liu F: Variation of mitochondrial gene and the association with type 2 diabetes mellitus in a Chinese population, *Diabetes Res. Clin Pract* 2006; 73, 77-82
191. Tengan CH, Gabbai AA, Shanske S, Zeviani M, Moraes CT. Oxidative phosphorylation dysfunction does not increase the rate of accumulation of age-related mtDNA deletions in skeletal muscle. *Mutation Research* 1997;379:1-11
192. Thangaraj K, Chaubey G, Kivisild T, Selvi Rani D, Singh VK, Ismail T, Carvalho-Silva D, Metspalu M, Bhaskar LV, Reddy AG, Chandra S, Pande V, Prathap, Naidu B, Adarsh N, Verma A, Jyothi IA, Mallick CB, Shrivastava N, Devasena R, Kumari B, Singh AK, Dwivedi SK, Singh S, Rao G, Gupta P, Sonvane V, Kumari K, Basha A, Bhargavi KR, Lalremruata A, Gupta AK, Kaur G, Reddy KK, Rao AP, Villems R, Tyler-Smith C, Singh L: Maternal footprints of Southeast Asians in North India. *Hum Hered* 2008;66:1-9.

193. Thangaraj K, Sridhar V, Kivisild T, Reddy AG, Chaubey G, Singh VK, Kaur S, Agarawal P, Rai A, Gupta J, Mallick CB, Kumar N, Velavan TP, Suganthan R, Udaykumar D, Kumar R, Mishra R, Khan A, Annapurna C, Singh L: Different population histories of the Mundari- and Mon-Khmer-speaking Austro-Asiatic tribes inferred from the mtDNA 9-bp deletion/insertion polymorphism in Indian populations. *Hum Genet* 2006;116:507-517.
194. Thi Tran HT, Takeshima Y, Suroño A, Yagi M, Wada H, Matsuo M: A G-to-A transition at the fifth position of intron-32 of the dystrophin gene inactivates a splice-donor site both in vivo and in vitro. *Mol Genet Metab* 2005;3:213-219.
195. Thomas MG, Cook CE, Miller KW, Waring MJ, Hagelberg E: Molecular instability in the COII-tRNA(Lys) intergenic region of the human mitochondrial genome: multiple origins of the 9-bp deletion and heteroplasmy for expanded repeats. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1998;353:955-965.
196. Tidball JG, Spencer MJ: Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during murine muscle disuse. *J Physiol* 2002;545:819-828.
197. Tokunaga M, Mita S, Sakuta R, Nonaka I, Araki S: Increased mitochondrial DNA in blood vessels and ragged red fibers in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke like episodes (MELAS). *Ann Neurol* 1993;33:275-280.
198. Tournev I, Kalaydjieva L, Youl B, Ishpekova B, Guergueltcheva V, Kamenov O, Katarova M, Kamenov Z, Raicheva-Terzieva M, King RH, Romanski K, Petkov R, Schmarov A, Dimitrova G, Popova N, Uzunova M, Milanov S, Petrova J, Petkov Y, Kolarov G, Aneva L, Radeva O, Thomas PK: Congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome, a novel complex genetic disease in Balkan Gypsies: clinical and electrophysiological observations. *Ann Neurol* 1999;45:742-750.
199. Tömöry G, Csányi B, Bogácsi-Szabó E, Kalmár T, Czibula A, Csoz A, Priskin K, Mende B, Langó P, Downes CS, Raskó I: Comparison of maternal lineage and biogeographic analyses of ancient and modern Hungarian populations. *Am J Phys Anthropol* 2007;134:354-368.
200. Turner L.F., Kaddoura S., Harrington D., Cooper J.M., Poole-Wilson P.A., Schapira A.H., Mitochondrial DNA in idiopathic cardiomyopathy, *Eur. Heart J.*, 1998, 19, 1725-1729
201. Yao YG, Watkins WS, Zhang YP: Evolutionary history of the mtDNA 9-bp deletion in Chinese populations and its relevance to the peopling of east and southeast Asia. *Hum Genet* 2000;107:504-512.

202. Yokoi F, Hara T, Iio M, Nonaka I, Satoyoshi E: 1-[11C]pyruvate turnover in brain and muscle of patients with mitochondrial encephalomyopathy. A study with positron emission tomography (PET). *J Neurol Sci* 1990;99:339-348.
203. Varon R, Gooding R, Steglich C, Marns L, Tang H, Angelicheva D, Yong KK, Ambrugger P, Reinhold A, Morar B, Baas F, Kwa M, Tournev I, Guerguelcheva V, Kremensky I, Lochmüller H, Müllner-Eidenböck A, Merlini L, Neumann L, Bürger J, Walter M, Swoboda K, Thomas PK, von Moers A, Risch N, Kalaydjieva L: Partial deficiency of the C-terminal-domain phosphatase of RNA polymerase II is associated with congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome. *Nat Genet* 2003;2:185-189.
204. Verhoeven K, Claeys KG, Züchner S, Schröder JM, Weis J, Ceuterick C, Jordanova A, Nelis E, De Vriendt E, Van Hul M, Seeman P, Mazanec R, Saifi GM, Szigeti K, Mancias P, Butler IJ, Kochanski A, Ryniewicz B, De Bleecker J, Van den Bergh P, Verellen C, Van Coster R, Goemans N, Auer-Grumbach M, Robberecht W, Milic Rasic V, Nevo Y, Tournev I, Guerguelcheva V, Roelens F, Vieregge P, Vinci P, Moreno MT, Christen HJ, Shy ME, Lupski JR, Vance JM, De Jonghe P, Timmerman V: MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain* 2006;129:2093-2102.
205. Vona G, Falchi A, Moral P, Calò CM, Varesi L: Mitochondrial sequence variation in the Guahibo Amerindian population from Venezuela. *Am J Phys Anthropol* 2005;127:361-369.
206. Waheed I, Gilbert R, Nalbantoglu J, Guibinga GH, Petrof BJ, Karpati G: Factors associated with induced chronic inflammation in mdx skeletal muscle cause posttranslational stabilization and augmentation of extrasynaptic sarcolemmal utrophin. *Hum Gene Ther* 2005;16:489-501.
207. Wallace DC: Mitochondrial disease in man and mouse. *Science* 1999;283:1482-1488.
208. van der Walt JM, Dementieva YA, Martin ER, Scott WK, Nicodemus KK, Kroner CC, Welsh-Bohmer KA, Saunders AM, Roses AD, Small GW, Schmechel DE, Murali Doraiswamy P, Gilbert JR, Haines JL, Vance JM, Pericak-Vance MA: Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk. *Neurosci Lett* 2004;365:28-32.
209. Walter MC, Petersen JA, Stucka R, Fischer D, Schröder R, Vorgerd M, Schroers A, Schreiber H, Hanemann CO, Knirsch U, Rosenbohm A, Huebner A, Barisic N, Horvath R, Komoly S, Reilich P, Müller-Felber W, Pongratz D, Müller JS, Auerswald EA, Lochmüller H: FKR1P (826 C>A) frequently causes limb-girdle muscular dystrophy in German patients. *J Medical Genetics* 2004;41:50.



210. Van Wamel A, Boukaz A, Versluis M, de Jong N: Micromanipulation of endothelial cells: ultrasound-microbubble-cell interaction. *Ultrasound Med Biol* 2004;30:1255-1258.
211. Wang CL, Li F, Hou QZ, Li HZ, Zhang Y, Ning G: Analysis of mitochondrial DNA gene tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) A3243G mutation in diabetic pedigrees. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2009;26:74-77.
212. Wang IC, Kroner A, Fisher S, Berghoff M, Kobsar I, Mäurer M, Martini R: Role of immune cells in animal models for inherited peripheral neuropathies. *Neuromuscular Med* 2006;107:494-498.
213. Wang ZX, Luan XH, Zhang Y, Yang YL, Qi Y, Bu DF, Yuan Y: Mitochondrial DNA mutation analysis in 97 Chinese patients with mitochondrial cephalomyopathy. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2008;88:3254-3256.
214. Wanrooij S, Luoma P, van Goethem G, van Broeckhoven C, Suomalainen A, Spelbrink JN: Twinkle and POLG defects enhance age-dependent accumulation of mutations in the control region of mtDNA. *Nucleic Acids Res* 2004;32:3053-3064.
215. Wiedemann FR, Bartels C, Kirches E, Mawrin C, Wallesch CW: Unusual presentations of patients with the mitochondrial MERRF mutation A8344G. *Clin Neurol Neurosurg* 2008;110:859-863.
216. Williams L, Penn GM: Selective IgA deficiency in Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Clin Pathol* 1979;72:800-806.
217. Williams L, Shannon BT, Wright FS: Circulating cytotoxic immune components in dominant Charcot-Marie-Tooth syndrome. *J Clin Immunology* 1993;13:389-396.
218. Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P, Jani A: Long term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet* 1992;1:363-369.
219. Wong LJ: Diagnostic challenges of mitochondrial DNA disorders. *Mitochondrion* 2007;7:45-52.
220. Worton R, Molnar MJ, Brais B, Karpati G: The muscular dystrophies. In: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8-th Edition. McGraw-Hill, ed: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS 2001 Chapter 216:5493-5524.
221. Wu J: Temperature rise generated by ultrasound in the presence of contrast agent. *Ultrasound Med Biol* 1998;24:267-274.

222. Zanusso G, Vattemi G, Ferrari S, Tabaton M, Pecini E, Cavallaro T, Tomelleri G, Filosto M, Tonin P, Nardelli E, Rizzuto N, Monaco S: Increased expression of the normal cellular isoform of prion protein in inclusion-body myositis, inflammatory myopathies and denervation atrophy. *Brain Pathol* 2001;11:182-189.
223. Zhang Y, Yang YL, Sun F, Cai X, Qian N, Yuan Y, Clinical and molecular survey in 124 Chinese patients with Leigh or Leigh-like syndrome, *J.Inherit. Metab. Dis.*, 2007, 30, 265
224. Zhao J, Ji JZ, Wang DW, Zhang J, Wu HJ, Lu JX: Detecting of mtDNA mutations at position A3243G and G3316A in patients with type 2 diabetes mellitus in Wenzhou, *Yi Chuan*, 2006; 28, 1206-1212
225. Zeviani M, Gellera C, Antozzi C, Rimoldi M, Morandi L, Villani F, Tiranti V, DiDonato S: Maternally inherited myopathy and cardiomyopathy: association with mutation in mitochondrial DNA tRNA(Leu)(UUR). *Lancet* 1991;338:143-147.
226. [www.dmd.nl](http://www.dmd.nl)
227. [www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)
228. [www.molneur.eoldal.hu](http://www.molneur.eoldal.hu)

## 9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutató munka a klinikus számára a postgenomika korszakában sajátos kihívást jelent. A gyógyító tevékenység sem képzelhető el team munka nélkül, de hatványozottabban érvényesül ez a tudományos tevékenységben. A diszciplinákon áthatoló szemlélet hozhatja meg az eredményt.

Doktori értekezésemet mesteremnek, a neuromuscularis kutatás egyik legtiszteltebb alakjának, George Karpati emlékének ajánlom, akinek bölcsessége, tisztánlátása, embersége több mint 15 éven át formálta szemléletemet, irányította klinikai és tudományos tevékenységemet.

Köszönettel tartozom professzoraimnak, akik a neurológia, a neuropathológia és genetika világába bevezettek. Mechler Ferenc és Diószeghy Péter a DOTE Neurológiai Klinikáján, Michael J. Schröder az aacheni egyetem neuropathológiai intézetében, Eric Shoubridge a McGill Egyetemen. A neurogenetika iránti vonzalmat az aacheni kutatócsoport tagjaival, Stephan Züchnerrel és Stephanie Zansennel közösen alapoztuk meg, köszönöm nekik az inspirációt és a mai napig tartó lelkesítést.

Külön köszönettel tartozom Tulassay Tivadarnak, aki lehetővé tette kutatócsoportom Semmelweis egyetemi integrációját és megteremtette számunkra a gyógyító és kutató munka feltételeit. A SE és a DEOEC Neurológiai Klinika igazgatóinak Bereczki Dánielnek és Csiba Lászlónak, valamint az OPNI főigazgatójának, Nagy Zoltánnak köszönettel tartozom a szakmai támogatásért.

Az értekezésben bemutatott multidiszciplináris kutató munkában tanítványaim jelentős szerepet töltek be. Dinamikus, szorgalmas munkájáért köszönettel tartozom Gál Anikónak, Pál Zsuzsannának, Bereznai Benjaminnak, Pentelényi Klárának, Reményi Viktóriának, Inczedy-Farkas Gabriellának és Szabó Antalnak. Úgyszintén szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak a tanároknak, kollegáknak, pályatársaknak és barátoknak, akik a doktori értekezés írásakor fontos tanácsokkal, észrevételekkel segítettek a munkámat.

Hálás vagyok az értekezésben bemutatott betegeknek a készséges együttműködésükért.

Köszönöm férjemnek, Németh Györgynek, a megértést, a türelmet, és a szakmai tanácsokat, melyekkel mind a kutató munka során és a doktori értekezés összeállítása közben is folyamatosan támogatt.

## 10. RÖVIDÍTÉS JEGYZÉK

**AD** - autosomalis domináns

**ANA** - antinuclear antitest

**ANT1** - adenin nukleotid transzlokátor

**Anti-ENA** - extranukleáris antitestek

**Anti-SS** - Sjörgen's szindróma antitest

**AO** - antisense oligonucleotid

**AR** - autosomalis recesszív

**ATP** - adenzin-trifoszfát

**AvaI** - Anabaena variabilis I. restrikciós endonukleáz

**BAEP** - agytörzsi akusztikus kiváltott válasz

**BALB** - bagg albino, inbred laboratóriumi egértörzs

**BanI** - Bacillus aneurinolyticus I. restrikciós endonukleáz

**BCS1L** - Saccharomyces cerevisiae, homolog-like

**bp** - bázispár

**BTB** - bric-a-brac domain

**CADASIL** - cereberalis autosomalis dominans arteriopathia subcorticalis infarktussokkal, leukoencephalopathiával

**CB** - promoter

**CBV** - cereberalis vérátáramlási sebesség

**CCFDN** - congenitalis cataracta facialis dysmorphismus neuropathia szindróma

**CD19-FITC** - cluster of differentiation 19 – fluorescein konjugált

**CD1** - cluster of differentiation 1 (antigén prezentáló sejtek felszínén expresszáldó glikoprotein)

**CD** - cluster of differentiation

**CD8+** - citotoxikus T-sejtek felszínén expresszáldó marker

**CHN** - Congenitális Hypomyelinizációs Neuropathia

**CK** - Creatin-kináz

**CMR<sub>Glu</sub>** - cerebral glucose metabolism rate

**CMT** - Charcot-Marie-Tooth betegség

**CMV** - cytomegalovirus

**COI** - citokróom-oxidáz I. alegysége

**COII** - citokróom-oxidáz II. alegysége  
**COX** - citokróom-oxidáz  
**CPEO** - chronikus progressive externalis ophthalmoplegia  
**CR** - cerebrovascularis reaktivitás  
**CRC** - cerebrovascularis reserve kapacitás  
**CT** - computer tomographia  
**CTDP1** - carboxy-terminal domain, RNS polimeráz II, polipeptid A, foszfatáz 1. alegység  
**CV** - variációs coefficiens  
**CYTB** - cytokróom b  
**DAB** - diaminobenzidin  
**DCAR** - dendritic cell immuno-activating receptor  
**DDP1** - deafness/dystonia peptide 1  
**DFN4** - non-syndromic autosomal dominant X-linked sensorineural hearing impairment  
**DG** - dystroglycan  
**DGUOK** - deoxyguanosin kináz gén  
**DM** - diabetes mellitus  
**DMD** - Duchenne/Becker izomdystrophia  
**DMEM** - Dulbecco által módosított Eagle medium  
**DMSO** - dimethyl-szulfoxid  
**DNAJC19** – a mitochondrialis import belső membrán translocase TIM14-et kódoló génje  
**DNM2** - dynamin 2  
**DPBS** - Dulbecco-féle sótartalmú foszfát-tompítóoldat  
**DSN** – Dejerine Sottas- Neuropathia  
**EDTA** - etilén-diamin-tetraacetát  
**EEG** - electroencephalogram  
**EGR2** - early growth response 2  
**ELISA** - enzyme-linked immunosorbent assay  
**EMG** - electromyographia  
**ENG** - electroneurographia  
**EP/ELP** - electroporatio  
**ETHE-1** - ethylmalonsav encephalopathia 1

**FACS** - fluorescence-activated cell sorting  
**FAM** - fluoreszcens jelölő festék  
**FDG** - 2-(18F)-fluoro-deoxy-D-glucose  
**FKRP** - fukutin related protein  
**FSH** - facioscapulohumeralis izomdystrophia  
**FXN** - frataxin  
**Gal** - galaktozidáz  
**GAN1** - giant axonal neuropathy  
**GARS** - glicyl-tRNS-szintetáz  
**GDAP1** - ganglioside-induced differentiation-associated protein-1  
**GJB1** - gap junction protein 1 (connexin 32)  
**Glu** - glutaminsav  
**GOM** - granularis osmiophil anyag  
**GR** - direct gén replacement  
**GTPase** - guanozin-trifoszfátáz  
**HADHA** - hydroxyacyl-coa dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase, alpha subunit  
**HaeIII** - Haemophilus aegyptius III. restrikciós endonukleáz  
**Ham1/7B6** - dysferlin antitest  
**hCG** - humán choriogonadotropin  
**HE** - hematoxylin eosin  
**HEp2** - epithelialis sejtvonal  
**HEPES** - 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-piperazinil]-etánszulfonsav  
**H-KSOM** - HEPES-pufferes kalium simplex optimalizált mediumba  
**HMC-CoA-lyase** - 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase  
**HMG** - high-mobility-group  
**HMGCS2** - 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2  
**HMSN3** - hereditary motor sensory neuropathy type 3  
**HN** - herediter neuropathia  
**HNPP** - herediter neuropathia with liability to pressure palsies  
**HP** - heteroplasmia  
**HpaII** - Haemophilus parainfluenzae II. restrikciós endonukleáz  
**HSP** - Heat Shock Protein  
**HSV1** - hipervariábilis régió 1

**Hyase** - hyaluronidase  
**KCC3** - kalium-chlorid csatorna cotransporter  
**KIAA1985** - Charcot-Marie-Tooth disease type 4C protein  
**KIF1B** - kinesin family member 1B  
**KIF5A** - kinesin family member 5A  
**KSS** - Kearns-Sayre Szindróma  
**LAMP2** - lysosomal-associated membrane protein 2  
**LARGE** - acetylglucosaminyltransferase-like protein  
**LDH** - laktát-dehidrogenáz  
**LGMD** - végtag öv típusú izomdystrophia  
**LHON** - Leber féle optikus neuropathia  
**LMNA** - lamin A/C  
**LOD** - logarithm (base 10) of odds (kapcsoltsági analízis statisztikai mérőszáma)  
**LRPPRC** - leucine-rich PPR motif-containing protein  
**MCA** – median cerebral artery  
**MD** -muscular dystrophy  
**MDC** - congenitalis izomdystrophia  
**MDS** - mtDNS depletios szindróma  
**MELAS** - mitochondriális encephalopathia laktacidózis stroke szerű tünetekkel  
**MERRF** - myoclonusos epilepsia ragged-red rostokkal  
**MFN2** - nagy mitochondriális transzmembrán GTPáz  
**MI** - myocardiális infarctus  
**MIDD** - maternally inherited diabetes and deafness  
**MM** - mitochondriális myopathia  
**MNF2** - mitofusin  
**MNGIE** - mitochondriális neurogastrointestinalis encephalopathia szindróma  
**MPZ** - myelin protein zero  
**MRI** - mágneses rezonanciás képalkotás  
**mtDNS** - mitochondriális DNS  
**MTMR2** - myotubularin-related protein 2  
**MTND5** - mitochondriális NADH dehidrogenáz 5. alegysége  
**NAD** - nikotinamid adenin dinkleotid  
**NARP** - neuropathia ataxia és retinitis pigmentosa  
**ND** - NADH dehidrogenáz

**NDGR1** - downstream regulated gene 1  
**NDUFS** - NADH-ubiquitin oxidoreduktáz Fe-S protein  
**NDUFV** - NADH-ubiquitin oxidoreduktáz flavoprotein  
**NEFL** - neurofilamentum könnyű lánc  
**NEPSYBANK** - neurológiai, pszichiátriai biobank  
**NFL** - light molecular weight neurofilament protein  
**NlaIII** - Neisseria lactamica III. restrikciós endonukleáz  
**Not1** - Negative regulator Of Transcription 1  
**OAE** - otoacusticus emissio  
**OH** - mitochondriális genom replikációs origo, nehéz lánc  
**OL** - mitochondriális genom replikációs origo, könnyű lánc  
**OPA1** - opticus athrophia  
**OPA2** - opticus athrophia  
**OPNI** - Országos Pszichiátriai és Neurológiai Intézet  
**OXPHOS** - oxidatív foszforilációs rendszer (légzési lánc)  
**pCAGGS** - klónozó plazmid  
**PCBLaCZ** - béta-galaktózidáz kódoló poliklórozott bifenil biodegradatív plazmid  
**PCBMuDys** - murine dystrophin kódoló PCB plazmid  
**PCBVUtrF1** - utrophin tartalmzó plazmid  
**pCMV** - emlős expressziós vektor, hybrid cytomegalovirus  
**pCMVMicroDys** - microdystrophin cDNS kódoló plazmid  
**PCR** - polimeráz láncreakció  
**PCR-RFLP** - polimeráz láncreakció – restrikciós fragment hossz polymorphizmus  
**PEO** - Progressive Externalis Ophthalmoplegia  
**PET** - pozitron emissziós tomographia  
**PGD** - Preimplantációs Genetikai Diagnosztika  
**PI** - Pulsatilitási Index  
**PINK1** - PTEN-Induced Putative Kinase 1  
**PMP22** - Peripheriás Myelin Protein 22  
**PNA** - mogyoró agglutinin  
**POLG** - polimeráz- $\gamma$   
**POMGnT** - N-acetylglucosaminyl transzferáz  
**POMT** - protein O-mannosyltranszferáz



**PRX** - periaxin  
**PTC** - receptor tyrosin kináz  
**PVDF** - polyvinil-difluorid  
**R148X** - nonsense mutáció  
**RAB7** - endoszóma marker  
**REF** – Ragged Red Fiber  
**RNR** - RiboNukleotid Reduktáz  
**ROS** - reaktív oxigén gyökök  
**RRM2B** - Ribonukleotid Reduktáz M2 B  
**RSV** - Respiratory Syncytial Virus  
**SBF2** - SET Binding Factor 2  
**SCA** - SpinoCerebellaris Ataxia  
**SCAIP** - Single Condition Amplification/Internal Primer  
**SCID** - Severe Combined Immunodeficiency  
**SD** - standard deviáció  
**SDH** - szukcinát dehidrogenáz  
**SDHA** - szukcinát dehidrogenáz A alegység  
**SDHB** - szukcinát dehidrogenáz B alegység  
**SDHC** - szukcinát dehidrogenáz C alegység  
**SGOT** - serum glutamát-oxálacetát-transzamináz  
**SGPT** - serum glutamát-piruvát-transzamináz  
**SIMPLE** - endosomal/lysosomal membrán protein  
**SLE** - Szisztémás Lupus Erythematosus  
**SNP** - Single Nucleotid Polymorphizmus  
**SOX10** - SRY-related HMG-Box-containing gén 10  
**SPG7** - spasticus paraplegia 7  
**SRY** - sex-determining region Y  
**SSB** - abortív egyes szálú break  
**SURF1** - Surfeit 1  
**SV40** - Simian vacuolating virus 40  
**TA** - musculus tibialis anterior  
**TAMRA** - fluoreszcens tetramethyl-rhodamin festék  
**Taq** - Thermus aquaticus hőstabil DNS-polimeráz  
**TCD** - transcranialis Doppler

**TDP1** - tyrosyl DNA foszfodiészteráz  
**TIA** - transiens ischaemiás attack  
**TIMM8A** - a belső mitochondrialis membrán 8. transzlokáza  
**TK** - timidin kináz  
**TP** - timidin foszforiláz  
**TRIM32** - tripartite motif-containing 32  
**tRNS** - transzfer RNS  
**TYMP** - timidin foszforiláz  
**UH** - ultrahang  
**VEP** - vizuális kiváltott válasz  
**VIA4-1** - alfa-dystroglycan  
**VMA21** - vacuolar ATPase assembly integral membrane protein  
**VOI** - volumen-of interest  
**WFS1** - Wolfram szindróma 1  
**WGA** - wheat germ agglutinin  
**XhoI** - Xanthomonas holcicola I. restrikciós endonukleáz  
**XR** - X-hez kötött recesszív