

Ritka betegségek speciális genotípus-fenotípus asszociációi

PhD értekezés tézisei

Dr. Hadzsiev Kinga

Témavezető: Dr. Melegh Béla egyetemi tanár

PTE Orvosi Genetikai Intézet

2011

1. Bevezetés

A genetikai tudásanyag bővülésével egyre több betegség/betegségcsoport molekuláris patomechanizmusa kerül felismerésre. Így azonosíthatók egyrészt a gyakori, felnőttkori krónikus betegségek háttérében álló genetikai variánsok, másrészt az ún. ritka betegségek pontos diagnosztizálása és differenciáldiagnosztizálása is lehetővé válik. A ritka betegség meghatározása nem egységes, az Európai Unióban a definíció szerint a ritka betegség az életet veszélyeztető, krónikusan senyvesztő, alacsony prevalenciájú kórkép. Az alacsony prevalencia a későbbiekben 5/10000-ben lett megadva, így az EU-ban ez hozzávetőlegesen 25-30 millió érintettet jelent. Jelen ismereteink szerint 5000-8000 ritka kórkép létezik, és így a világ népességének 6-8 százalékát érinti valamelyik. A ritka betegségek 75%-a gyermekeben fordul elő, akik 30%-a nem éri meg az ötödik életévét. E betegségek általában genetikai eredetűek, egyes becslések szerint kb. 80%-ukban azonosították a genetikai hátteret. A ritka kórképek molekuláris mechanizmusainak vizsgálata jelentős hatást fejtett ki a gyakori betegségekkel kapcsolatos ismereteinkre is a kórokok felderítése, a patomechanizmusok megértése és a komplexitás megfejtése tekintetében.

2. Irodalmi áttekintés

Intézetünkben néhány, országos egyedülálló molekuláris genetikai vizsgálat érhető el, ami lehetőséget ad a ritka betegségek bizonyos csoportjainak vizsgálatára

2.1.CDG szindróma

A kongenitális glikozilációs defektus (CDG) az oligoszaharidok N-glikozilációs szintézisében, képződésében és processzálsban szerepet játszó 21 enzim bármelyikének hiánya miatt fellépő, abnormális oligoszaharid glikoziláció miatt kialakuló anyagcsere rendellenesség. Mivel a testfehérjéknek kb. a fele tartalmaz szénhidrát láncot és az emberi genom közel 1%-a (200-300 gén) szerepet játszik a glikozilációs folyamatokkódolásában, ezért a klinikai manifesztáció is rendkívül változatos.

A CDG diagnosztikus tesztje a transzferrin izoelektromos fókuszálás, ennek mintázata alapján különíthető el e két fő csoport: az I-es típusában az N-oligoszaharid prekurzorok szintézisének egy korábbi szakaszában, míg a II. típusban a szintézis terminális szakaszában,

az oligoszacharidok processzálásában fellépő hiba miatt alakul ki a betegség. A biokémiailag megoldatlan eseteket Ix jelzéssel különítjük el az ismert formáktól.

2.2. Rett szindróma

A Rett szindróma (OMIM 312750) egy, főleg lányokban jelentkező súlyos, a központi idegrendszer szürkeállományát érintő, korai fejlődési zavar, klasszikus formája mellett több variánsa is ismert.

A betegség előfordulási gyakorisága 1/10000-15000 lányokban, öröklődése X-hez kötött domináns mintát mutat. A kórkép hátterében az Xq28 régióban elhelyezkedő metil-CpG-kötő fehérje 2 gén (*MECP2*) mutációit írták le kórokozóként, ez a klasszikus formát mutató betegek 80-96%-ban, az atípusos formát mutató betegek kb. 40-50%-ban található meg. Mivel néhány esetben klinikailag jól meghatározhatóan Rett szindrómás betegekben az *MECP2* gén mutációi nem voltak kimutathatóak, ezért felmerült más gének szerepe is a kórkép létrejöttében. Így derült fény a ciklin-függő-kináz-szerű 5 (*CDKL5*) és a forkhead box protein G1 (*FOXG1*) gének kórokozó szerepére a szindróma atípusos formáinak kialakulásában.

2.3. Mitokondriális betegségek

A mitokondriális betegségek általában ritka, multisisztémás kórképek, klinikailag, genetikailag és biokémiailag nagyon különbözőek. A klinikai tünetek alapján szindrómás és nem szindrómás formákra oszthatóak.

2.3.1. Genetikailag determinált halláskárosodás

A halláskárosodás a leggyakoribb veleszületett érzékszervi rendellenesség, 1000 újszülöttről egyet érint. A fellépés ideje alapján pre- és posztlingualisra osztható, attól függően, hogy más tünetekkel társul-e, szindrómás és nem-szindrómás halláskárosodás különíthető el, illetve csoportosítható a súlyosság alapján is. Oka lehet genetikai vagy nem genetikai eredetű. A mitokondriális DNS mutációi is állhatnak a halláskárosodás hátterében, ezek szintén szindrómás és nem-szindrómás formában fordulhatnak elő.

2.3.2. Leigh szindróma

Az egyik legismertebb mitokondriális szindróma elnevezését első leírójáról, Denis Leigh-ről kapta, aki 1951-ben közölte, és az észlelt elváltozások alapján – agytörzsi kapilláris proliferáció és fokális nekrozis - szubakut nekrotizáló enkefalomielopátiának nevezte el. A kórkép általában gyermekkorban kezdődő neurodegeneratív betegség, jellemzően a központi

idegrendszer, ezen belül is az agytörzs, a talamusz, a bazális ganglionok, a cerebellum és a gerincvelő területén észlelhető fokális, bilaterális lézióival, ami demielinizáció, gliózis, nekrozis, spongiózis vagy kapilláris proliferáció lehet. A kórkép előfordulási gyakorisága kb. 2,05/100000, ami 6 éves kor előtt 1/32000-re tehető. A tünetek leggyakrabban két éves kor előtt jelennek meg (infantilis forma), azonban előfordul, hogy későbbi gyermekkorban (juvenilis forma), illetve felnőtt korban lépnek fel.

A klinikai tünetek a központi idegrendszer léziójának lokalizációjától függenek, de a szomatomentális késés, izomhipotónia, laktát acidózis, epilepsziás rohamok általában a klinikai kép részét képezik.

3. Célkitűzés

A laboratóriumi technikák fejlődésének köszönhetően a molekuláris eltérések és mechanizmusok feltárása egyre gyorsabbá vált. Fontos feladat, hogy ezekhez a felfedezett eltérésekhez minél pontosabban meg tudjuk határozni a fenotípusbeli jellegzetességeket. Ezért alapvető célkitűzésünk volt, hogy különböző, ritka betegcsoportokban klinikai adatokat gyűjtsünk a jellegzetes tünetek és a kórlefolyás minél részletesebb meghatározására.

1. A CDG Ix csoportba tartozó betegek klinikai adatait összehasonlítva a leggyakoribb dizmorfiás jelek, neurológiai és klinikai tünetek alapján a diagnosztizált betegek gondozása során javasolt vizsgálatok meghatározása.

2. A Rett szindróma tüneteit mutató magyar betegekben meghatározni a genetikai eltérést, az *MECP2*, a *CDKL5* és a *FOXG1* gének vizsgálatával.

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

3. A mt7445A>G mutáció miatt kialakult halláskárosodás és esetleges kísérő tünetek részletes feltárása saját betegeinkben.

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

4. A vizsgálatban résztvevő betegek

Az Európai Unió javaslata alapján a ritka betegségek ellátásában országos központok létrehozása szükséges. Magyarországon intézetünk látja el ezt a feladatot, ami a koordinálási munkák mellett diagnosztikai feladatot is jelent. Új, országosan egyedül álló módszerek beállításával, majd ezekről szakmai körben történt tájékoztatást követően kerülnek a betegek

intézetünk genetikai járóbeteg ellátására. Ebből adódóan egy-egy ritka betegséggel is relatívan gyakran találkozunk, és így

a fenotípusos variációk detektálásában nagyobb lehetőségekkel rendelkezünk.

A CDG-s betegcsoportban 10 olyan beteg fenotípusát elemeztük, akiknél a vizsgálatok során a CDG Ix diagnózisát állítottuk fel.

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

A halláskárosodás vizsgálata során egy három generációs családot vizsgáltunk, két érintett egyeddel. Mivel a halláskárosodás hátterében, magyar betegek közül ebben a családban mutattuk ki először a mt7445A>G mutációt, fenotípusukat az eddig ismertetett betegekével hasonlítottuk össze.

Leigh szindrómás betegünknel a genotípus meghatározása után került sor a fenotípus pontos elemzésére a rendelkezésre álló kórleírások, eszközös vizsgálatok (koponya MR, kardiológiai vizsgálatok, BERA, VEP) leletei alapján. A genotípust különböző szövetekből nyert mintán is meghatároztuk. A gyermek további hat családtagjánál végeztük el a mutáció meghatározását. Az így nyert adatainkat itt is a korábban már ismertetett betegek adataival vetettük össze.

5. Alkalmazott módszerek

5.1. Transzferrin izoelektromos fókuszálás

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

A szaturáció után elvégezzük az izoelektromos fókuszálást: 5-8 közötti pH gradienst tartalmazó poliakrilamid gélt 15 °C-ra hűtött szeparáló felületre helyezünk (PHASTSYSTEM;

Pharmacia). Az előkészített mintákból 1 µl-t a géltre felviszünk, majd elvégezzük az elektroforézist (2000 V, 5.0 mA, 3.5 W, 15 °C kondíciók mellett 130 Vh ideig).

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

5.2. Polimeráz láncreakció (PCR)

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

5.3. Restriktions fragmentum hossz polimorfizmus (RFLP) módszer

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

5.4. DNS szekvencia meghatározás és analízis

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

összehasonlítását a Winstar genetikai programcsomaggal végeztük (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA).

Az *MECP2*, *CDKL5* és *FOXG1* gének vizsgálata direkt szekvenálással történt. Az *MECP2* gén 3 kódoló szakaszának (2-es, 3-as és 4-es exon) amplifikálásához az általunk tervezett 9 primer párt használtuk. A *CDKL5* gén esetében részben az irodalomban korábban publikált, részben általunk tervezett primerekkel analizáltuk a 22 kódoló szakaszt, míg a *FOXG1* gén vizsgálatánál saját tervezésű primereket alkalmaztunk.

5.5. Multiplex ligációfüggő próba amplifikáció

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

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

6. Eredmények

6.1. A CDG Ix klinikai spektruma

Azoknál a betegeknél, akik esetében a CDG Ix diagnózisát állítottuk fel, a két meghatározó tünet a fejlődésbeli késés és az axiális hipotónia volt. Előbbit a betegek 91, utóbbit 82%-ában észleltük. Emellett nem-specifikus tüneteket, mint dizmorfiás jelek,

rendellenes alvadási faktorok, hipoalbuminémia, májbetegségek, különböző audiológiai és szemészeti rendellenességek, figyeltünk meg. strabizmus és nisztagnus ritkábban forrdult elő.

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

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

A klinikai tünetek alapján jól elkülöníthető a kórkép két alcsoportja: a kizárólag neurológiai tünetekkel, illetve a neurológiai és többszervi manifesztációval járó forma. Anyagunkban a kórkép kizárólagosan neurológiai prezentációja 6 betegnél volt észlelhető. A saját 10 betegünk és az irodalomban közölt 13 beteg részletes tünettana az 1. táblázat mutatja.

6.2. A fenotípus-genotípus vizsgálata Rett szindrómában

Ebben a betegcsoportban első lépésben elvégeztük az *MECP2* gén mutációsűrését, majd azokban a betegekben, akiknél ennek során eltérést nem találtunk a *CDKL5* gén vizsgálata történt. Utolsó lépésként azoknál, akiknél mindkét gén vizsgálata negatív volt, a *FOXP1* gént analizáltuk.

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

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

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

deléció mutáció vagy polimorfizmus - betegünkben nem a 18 bázispárnyi deléció felelős a Rett fenotípusért.

Az *MECP2* vizsgálata során nyert genotípus-fenotípus összefüggéseket részletesen a 2. táblázat mutatja, néhány adatot azonban fontosnak tartunk kiemelni: az *MECP2* negatív betegek mindössze 17%-a mutatta a RTT klasszikus formáját, 8% esetében az RTT kongenitális formája volt valószínűsíthető, és 12%-uk fiú volt.

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

6.3. A mt7445A>G mutáció miatt kialakult halláskárosodás

A fenti mutációt eddig mindössze hat családban észlelték a halláskárosodás háttérében (Reid, 1994). Az általunk vizsgált család és az irodalomban eddig leírt családok eredményeinek összevetését a 3. táblázat mutatja.

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

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

vizsgálata negatív eredményt adott. Ezt követően a mt1177C>A mitokondriális mutációt vizsgáltuk, amit a beteg minden mintájában heteroplazmiás formában detektáltunk. RFLP agaróz gél denzitometriás analízise az 1177A allél arányát vérben 50%-nak, izomban és májban 60%-nak mutatta. Betegünkben észlelt eltérések összevetését az irodalomban eddig ismertetett betegek tüneteivel a 4. táblázat mutatja

7. Az eredmények megbeszélése

7.1. CDG Ix

A 10 általunk diagnosztizált és a 13 korábban közölt CDG Ix szindrómás beteg klinikai adatait áttekintve a következő megállapításokat tehetjük:

- A CDG Ia szindrómára jellegzetes invertált emlőbimbót és abnormális zsíreloszlást más CDG formákban is megfigyelhetjük, bár sokkal ritkábban.
- A betegekben leggyakrabban észlelt dizmorfiás tünetek- nem specifikus tünetek, gyakran kísérik a központi idegrendszer kongenitális anomáliáit
- Az abnormális alvadási paraméterek gyakran fordulnak elő CDG Ix altípusban, néha tünetmentesen. Ezért mindig, CDG gyanúja esetén épp úgy, mint konkrét diagnózisnál, az alvadási paraméterek ellenőrzése szükséges.
- Szemészeti elváltozások közül CDG Ix alcsoportban jellegzetes a látóideg sorvadás, valamint kissé ritkábban a kétoldali katarakta és glaukóma társulása.

Vizsgálataink alapján minden izomhipotóniás, dizmorfiás gyermekben, akinél katarakta is fennáll, CDG irányába történő vizsgálatok elvégzését javasoljuk.

Látóideg sorvadás disztóniás mozgással történő társulása Leber optikus neuropátiában észlelhető, azonban CDG eddig még nem tisztázott altípusában is leírásra került. Ezért javasoljuk LHON esetén, amennyiben a mitokondriális vizsgálatok negatív eredményt adnak, CDG tesztelés elvégzését.

A klinikai tünetek és a kórlefolyás alapján a CDG Ix-es betegek tisztán neurológiai és neurológiai-többszervi tüneteket mutató csoportra oszthatók. A csak neurológiai tüneteket mutató betegek kórlefolyása enyhébb, míg a másik csoportba tartozóknál korábbi kezdet, gyorsabb kórlefolyás észlelhető.

7.2. Rett szindróma

A szindróma klasszikus formájában szenvedő betegek kb. 60%-ában lehetett az *MECP2* gén mutációit kimutatni, irodalmi adatok alapján. Mi a beteganyagunkban mindössze

27,6%-ban találtuk meg ebben a génben az eltérést. Ennek két magyarázata lehetséges: egyrészt az *MECP2* gént érintő nagyobb genomai átrendeződések, amik a szekvenálással nem detektálhatók, és amelyek a klasszikus esetek kb. 37%-ában, míg az atípusos formák 7,5%-ában kórokozók. A viszonylag alacsony arány másik magyarázatát a fenotípus elemzés adja, hisz az *MECP2* negatív betegek mindössze 16,2%-a mutatta a szindróma klasszikus formáját. során a *CDKL5* gén kóroki eltérését két atípusos Rett fenotípust mutató betegünkönél találtuk meg, míg a *FOXG1* génben egy esetben sem találtunk eltérést. Ennek háttérében szintén két okot találtunk: egyrészt a *FOXG1* gén általában alacsony arányban észlelhető Rett szindrómásokban, a másik ok, pedig, hogy betegeink között mindössze kb. 8%-ban észleltük a kongenitális forma tüneteit.

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

7.3. A mt7445A>G mutáció miatt kialakult halláskárosodás

Betegünkben a mtDNS 7445-ös pozíciójában egy adenin-guanin bázispár cserét találtunk. A 7445G variáns eddig mindössze hat családban került felismerésre, néha palmoplantáris keratodermával kombinálódva, néha anélkül. A betegség penetranciája és expresszivitása családon belül is változó volt. Az általunk talált magyar család vizsgálata kapcsán úgy gondoljuk, hogy más mitokondriális és nukleáris faktorok, valamint környezeti ágensek is – nagy valószínűséggel - szerepet játszanak a halláskárosodás kialakulásában. Az érintett mutáció a vizsgált családokban homoplasztikus és heteroplasztikus formában is előfordult, azonban eddig olyan családot, ahol egyszerre mindkét - homo- és heteroplasztikus – forma kimutatható volt, rajtunk kívül még nem észlelték. Amellett, hogy a heteroplazmia arányában igen jelentős különbségek észlelhetők családon belül, a család mindkét ágában klinikailag érintett (halláskárosodott) családtagok találhatóak. Ez alapján azt a megállapítást tehetjük, hogy a mutáns mtDNS aránya önmagában nem határozza meg szükségszerűen a klinikai tünetek kifejlődését. Fontosnak tartjuk kihangsúlyozni azt is, hogy az mt7445A>G eltérés analízise, ebben és a korábbi vizsgálatokban is, csak a vér leukocitákban történt meg. A normál és a mutáns allélek aránya a különböző szövetekben, pl. a hallószerv sejtjeiben eltérő lehet, mindamelllett, hogy a mutáció által károsított fehérje még nem azonosított. Az azonban mindenképpen lényeges adat, hogy egészséges kontrollokon a mt7445A>G mutáció

alapos vizsgálata során kizárólag a normál allélt lehetett kimutatni. Ez alátámasztja a vizsgált családban észlelt eltérés patológiás szerepét.

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

A Leigh szindróma genetikai háttere igen heterogén, ennek megfelelően számos mtDNS mutáció is állhat a hátterében. Ugyan a mtl11777C>A mutáció egy gyakorinak tartott elváltozás, mindössze négy betegben azonosították az irodalomban. Az irodalmi adatokat összevetve a tünetek az általunk ismertett betegnél jelentkeztek a legkorábban (7 hónapos korban), és ezek a többi beteg tüneteitől jelentősen eltértek (West szindróma, toxikus hányás és hipertrófiás obstruktív kardiomiopátia). A betegség progressziója az ő esetében igen agresszív volt, ami korai fatális kimenetelhez vezetett. Mindezek alapján betegünk a többi ismertett esettől jelentősen eltér, ezzel is alátámasztva, hogy rendkívül széles a talált mutáció által okozott fenotípusos spektrum.

8. Összefoglalás

Tanulmányunkban a következő genotípus-fenotípus asszociációkat figyeltük meg:

1. CDG Ix szindrómás betegek vizsgálata kapcsán:

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

2. A Rett szindróma tüneteit mutató betegekben:

- részletesen meghatároztuk az *MECP2* génben észlelt mutációk megoszlását és frekvenciáját.
- pontos megfigyeléseket tettünk a fenotípusos jegyekkel és a betegség progressziójával kapcsolatban a genotípus viszonylatában.

- a *CDKL5* génvizsgálata során két betegben egy-egy új mutációt írtunk le, amihez meghatároztuk a pontos klinikai képet.
- eredményeink alapján javasoljuk a korai terápiarezisztens epilepsziával járó RTT betegekben a *CDKL5* gén vizsgálatának elvégzését az *MECP2* gén negativitása esetén, vagy akár első vizsgálatként is elvégezni.

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

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

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

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

1. táblázat CDG Ix betegek klinikuma

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

^a tranzienst májfunkciós rendellenesség

Későbbi diagnózis. CDG Ik.

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

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

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

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

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

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

4. táblázat. A mtDNS1177C>A mutáció következtében kialakult Leigh szindróma fenotípusai

A dolgozat alapjául szolgáló eredeti közlemények

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

IF: 2,69

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

IF: 4,82

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

IF: 2,6

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

IF: 2,5

A témában megjelent egyéb közlemények

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

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

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

IF: 3,659

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

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

IF: 3,43

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

IF: 2,205

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

IF: 0,534

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

IF: 3,56

Más témában megjelent közlemények

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

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

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

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

IF:1,072

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

IF: 0,456

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

IF:0, 688

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

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

Idézhető absztraktok

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

Hadzsiev K, Schmidt I, Ertl T, Tamás P, Szabó I. Impedance cardiography of the neonate

XIIth Congress of Perinatal Medicine, XXth Alpe Adria Meeting Proceedings (eds: Pajntar M, Cerar T, Premu-Srsen, M. Trenkic) Ljubljana, 1998 ISBN 961-90492-3-3, 108

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Összesített impakt faktor idézhető absztraktok nélkül: 28,214

Összesített impakt faktor idézhető absztraktokkal: 60,618

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Melegh Béla Pofessor Úrnak, hogy lehetővé tette a PhD programba való bekapcsolódásomat. Köszönöm figyelmét, bátorítását, szakmai irányítását és bírálatait.

Köszönöm Dr. Kosztolányi György Professzor Úrnak, hogy mindig, minden kérdéssel bizalommal fordulhattam hozzá.

Köszönetet mondok kollégáimnak, első sorban Dr. Czakó Mártának, Dr. Maász Anitának és Dr. Polgár Noéminek minden segítségükért, illetve az Orvosi Genetikai Intézet minden munkatársának az együtt végzett munkáért.

Végül köszönöm férjemnek, szüleimnek és gyermekeimnek türelmes szeretetüket és derűjüket, amiből minden nehéz pillanatban erőt meríthettem.

Special genotype-phenotype correlations in rare diseases

PhD Thesis

Kinga Hadzsiev MD

Department of Medical Genetics

University Pécs, Pécs, Hungary

Supervisor: Béla Melegh MD PhD DSc

2011

1. Introduction

A rare disease, also referred to as an orphan disease, is any disease that affects a small percentage of the population. There is no single, widely accepted definition for rare diseases. The European Commission on Public Health defined rare diseases as life-threatening or chronically debilitating diseases which are of such low prevalence that special combined efforts are needed to address them. The term low prevalence has been later defined as generally meaning fewer than 1 in 2,000 people. The European Organization for Rare Diseases (EURORDIS) estimates that there exist between 5,000 and 7,000 distinct rare diseases. Although each individual disease is rare, the sheer number of individual rare diseases results in between 6% and 8% of the population of the European Union that means, that 30 million EU citizens being affected by a rare disease. Rare diseases usually are genetic, hence chronic. It is estimated that at least 80% of them have an identified genetic origin. Other rare diseases are supposed to be a result of infections and allergies, or due to degenerative and proliferative causes. 75% of rare diseases affect children, whom 30% do not live until 5 years of age. Examination of rare diseases' molecular mechanism exercises a strong influence on our knowledge of diagnosis, pathological behavior and treatment of common diseases.

2. Studied diseases

2.1.CDG syndrome

The group of congenital disorders of glycosylation (CDG) is a family of inherited metabolic diseases caused by defects in the synthesis, assembly and processing of glycans. About half of the body proteins contain carbohydrate chains essential for protein structure and function, and about 200-300 genes have been found to be involved in glycosylation processes. Most type of CDG described so far arise from defects in the N-glycosylation pathway. The clinical presentation of CDG patients includes psychomotor and mental retardation, muscle hypotonia, seizures, ophthalmological anomalies, neurological signs, failure to thrive, endocrine and coagulation abnormalities and variable dysmorphic features.

Based on the localization of the metabolic defect within the cell, two main groups of CDG can be distinguished by their specific transferrin isoelectric focusing (TIEF) pattern:

CDG I and CDG II. The clinical spectrum of the unsolved patients studied, classified as CDG Ix.

2.2. Rett syndrome

Rett syndrome (OMIM 312750) is a severe neurodevelopmental disorder affecting females almost exclusively. Besides the classic form of RTT, many variants are known.

Classic Rett syndrome shows an X-linked dominant pattern of inheritance and has a relatively high incidence of approximately 1 in 10,000 among females. Mutations in the methyl-CpG binding protein, *MECP2* gene, were identified as disease-causing and according to data published, *MECP2* mutations account for approximately 80-96% of the classical Rett cases and 40-50% of atypical Rett manifestations. The lack of *MECP2* mutation in a small percentage of clinically well defined Rett syndrome patients with infantile spasms suggested the involvement of another gene locus. Indeed, mutations of the cyclin-dependent kinase-like 5 (*CDKL5* also known as serine threonine kinase 9, *STK9*) and in the *FOXG1* gene were identified in patients with atypical RS.

2.3. Mitochondrial disorders

Mitochondrial diseases are rare multisystem disorders affecting tissues with high energy demand and are clinically, genetically and biochemically highly variable. On the basis of clinical symptoms they can be divided into syndromic and non-syndromic forms.

2.3.1. Hearing impairment

Hearing impairment is one of the most common disease with a frequency of at least 1/1000 births. The onset of the disease may be before or after beginning of speech (pre- or post-lingual hearing impairment). The disease can present as a non-syndromic isolated hearing impairment or as associated with other abnormalities (syndromic). Half of the cases may attribute to genetic defects. The mutations of the mitochondrial DNA play significant role in both syndromic and non-syndromic hearing impairment. The most common mitochondrial mutation in the A1555G transition has been identified in association with a non-syndromic hearing loss.

Mutations of the gene encoding the Ser^{UCN}-tRNA have also been implicated in the development of a sensorineural hearing loss.

2.3.2. Leigh syndrome

One of the most well-known syndromic mitochondrial disease is Leigh syndrome, first described by Denis Leigh in 1951 in a patient with focal necrosis and capillary proliferation in the brainstem. The onset of Leigh syndrome is usually in childhood and is characterized by developmental regression, hypotonia, lactic acidosis, failure to thrive, seizures and typical lesions in the brainstem and basal ganglia. The estimated prevalence of Leigh Syndrome is 2.05 cases per 1,00,000, and the preschool incidence of Leigh syndrome is 1 out of 32,000.

Clinical symptoms depend on which areas of the central nervous system are involved. Several mitochondrial mutations have been shown to involve in pathogenesis of Leigh syndrome.

3. Aims of the study

As a result of laboratory techniques development, acceleration in the detection of molecular mechanisms and alterations has been achieved. This stated the new tasks to assign the most precise phenotypic characteristics to these molecular variations. Our aims were to collect clinical data in four clinical entities to define their symptoms and clinical course and the workflow for the achievement of these aims may be divided in four task groups as follows:

1. Compare the clinical data of the examined CDG Ix patients, and based on the dysmorphic signs, neurologic and specific clinical symptoms to determine the follow-up chart and prognosis assessment.
2. Provide an analysis of *MECP2*, *CDKL5* and *FOXP1* genes to determine the genetic alteration in the Hungarian Rett patients. Following the molecular investigations to explore the genotype-phenotype correlations and determine a diagnostic algorithm.
3. Describe a new phenotypic variant caused by mt7445A>G mutation.
4. Describe a new phenotype caused by mt11777C>A mutation.

4. Patients

According to the proposal of the European Union for the homogeneous and appropriate supply of rare diseases Centers should be established in every country. In

Hungary this task and all the surrounding facilities are provided by our Institute, together with the coordination and global diagnostic work. Therefore the prevalence of patients with rare disease is relative frequent, giving us also the opportunity to detect recurrently phenotypic variations.

We reviewed the clinical presentations of 10 patients diagnosed with CDG type Ix. In all patients, an abnormal TIEF profile was observed with a decreased amount of tetrasialo- and increased amounts of asialo- and disialotransferrin.

Blood DNA samples were collected from 158 patients with suspected Rett syndrome individuals after informed consent. All of them were originally recruited from patients who had been referred to our institute for *MECP2* testing. In the second stage of screening all those patients negative for a detectable *MECP2* mutation were selected and screened for mutations of the *CDKL5* gene. Similarly, patients with no detected *MECP2* or *CDKL5* mutations were tested for *FOXG1* mutations.

We examined a Hungarian family with 16 members affected by hearing loss. While in Hungarian hearing-loss patient our detection was the first, we compared our patients' data to those found in the literature

In the case of our LS patient after the molecular genetic investigations we explored the phenotype with the analysis of previous clinical descriptions and of finding of examinations (brain MRI, cardiologic investigations, BERA, VEP) We determine the genotype in different tissues from the proband and from six other family member.

5. Methods

5.1. Polymerase chain reaction (PCR)

The genomic DNA was obtained from peripheral blood leucocytes using a standard salting out method. The examining parts of the available DNAs were amplified with polymerase chain reactions. The GenBank reference sequence signed by AY422949 accession number was applied for the study design. The amplifications in all molecular analyses were carried out in a final volume of 50 μ l containing 200 μ M of each dNTP, 0.2 mM of each primer, 5 μ l of reaction buffer (containing 500 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 14 mmol/L MgCl₂, pH 9.0), 1U of Taq polymerase (10 U/ μ l) and 1 μ g extracted DNA as template. The sequences

of oligonucleotide primers applied and circumstances of PCR reactions were reviewed in *Table 1*.

5.2. Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

For RFLP assays 10-15 microlitres of PCR products were digested with 1U of appropriate restriction endonuclease with 10x enzyme buffer incubating on the appropriate temperature. The primers were designed to create obligatory cleavage sites of the proper restriction enzymes in the amplicons independently of the genotype to control the accuracy of the digestion. The bands received were electrophoresed through an ethidium-bromide-stained 3% agarose gel and were analyzed with UVIDoc gel documentation system.

5.3. Bidirectional DNA sequencing and analyses

To validate our genotyping results bidirectional sequencing was performed for some samples. The examinations were carried out using ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer. The sequence alignments were made using Winstar genetic program.

5.4. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) analysis

Genomic DNA was purified from peripheral blood leucocytes as previously described. Screening for MECP2 and CDLK5 single and multi-exon deletions was performed using the SALSA P015-E1 MLPA assay (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands), as instructed by the manufacturer. This assay is containing probes for MECP2, CDKL5, ARX and NTNG1. An aliquot of ,100 ng of denatured genomic DNA was used in the overnight annealing of the exon-specific probes and subsequent ligation reaction. PCR was carried out with FAM-labelled primers using 10 ml of ligation reaction. Separation and relative quantification of the amplification products were carried out using an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, California, USA). The peak area for each fragment was measured with GeneScan Analysis software V.3.7 (Applied Biosystems), and normalised by dividing it by the combined area of all peaks in that lane. This normalised peak area was then divided by the average normalised peak area from five normal controls. With this method, the results given are allele copy numbers compared with normal controls, and a

ratio of ,1 should be obtained if both alleles are present. A reduction or increase in the peak area values to ,0.7 or .1.3 was considered an indication of a deletion or a duplication, respectively. DNA samples showing such a reduction or increase in the MLPA peak area values were reanalysed by MLPA, and only the samples showing consistent results between the two experiments were considered positive for a deletion or duplication.

6. Results

6.1. CDG Ix clinical spectrum

In those patients, who were diagnosed as being CDG Ix ones, two determined signs were present: developmental delay and axial hypotonia. Beside these, other non-specific symptoms as, dysmorphic features, abnormal clotting factors, hypoalbuminemia, liver disease, and various ocular abnormalities were also detected.

For their clinical importance several patients were highlighted, who presented unusual signs, while the typical presence of CDG Ix was obvious:

- In four patients unique association of optic nerve atrophy and blindness were observed with movement disorder.
- In other two patients cataract and epileptic seizures were combined with liver disorder.
- One patient presented microcephaly seizures, ascites, hepatomegaly, nephritic syndrome and severe developmental delay, while in another unique findings included arthrogryposis, macrocephaly, polyneuropathy and cystic kidneys.

An overview of all clinical symptoms showed that two main subgroups could be distinguished based on the severity of the disease course: one with a pure neurological presentation and the other with the neurological-multivisceral form. The clinical features of all CDG Ix patients are summarized in Table 1.

6.2. Genotype-phenotype examinations in Rett syndrome

In the first stage of the screening we performed mutation analysis of *MECP2* by direct sequencing. Exons 2-4 of *MECP2* were amplified by polymerase chain reaction. In the second stage of screening all those patients negative for a detectable *MECP2* mutation were selected

and screened for mutations of the *CDKL5* gene. Similarly, patients with no detected *MECP2* or *CDKL5* mutations were tested for *FOXP1* mutations.

A total of 22 different known *MECP2* alterations were identified in 42 subjects: 7 frameshift-deletions, 4 nonsense mutations, 10 missense mutations, and in one patient one nucleotide insertion. We also detected a missense c.925C>T (Arg309Trp) change whose role in Rett pathogenesis is unknown. Interestingly we identified a 18bp deletion 1162_1179del18 in a father and his daughter (R/34). The daughter also carried the frameshift mutation 276insG. The detailed correlations among the genotype-phenotype obtained throughout the *MECP2* examinations are presented in Table 2.

Following the *MECP2* mutation screening we tested all patients without any *MECP2* alteration for *CDKL5* mutations. During the mutation analysis we have identified previously described polymorphism c.2327A>C (Gln791Pro) in 8 subjects as well as both the c.3003C>T (His1001His) and c.3084G>C (Thr1028Thr) known polymorphisms in one of the patients. In addition, we discovered two novel nonsense mutations: c.607G>T that results in a premature termination codon at amino acid position 203 disrupting the catalytic domain of CDKL5 protein, and c.536C>T (p.Ser179Phe) leading to a premature stop at amino acid position 570 of the C-terminal region involved in either the catalytic activity or the subcellular localization.

Finally, we screened our patients for *FOXP1* mutations using direct sequencing, but we did not find any alterations affecting this gene.

6.3. Phenotypic variants of the deafness-associated mt7445A>G mutation

The mutation above was revealed in only six families. In Table 3. different families, found in the literature, with the same mutation, were compared with the Hungarian family detected in our Institute.

6.4. Phenotype of mitochondrial DNA 11777C>A mutation associated Leigh syndrome

In male proband restlessness and vomiting were seen on first days of life, and on the 5th day of life, myoclonus was also observed. In the checkup records taken at 7 months age,

infantile spasticity, limb convulsions, and cerebral palsy with hypotonia were documented. The electroencephalogram showed hypsarrhythmia, West syndrome was diagnosed and treatment with vigabatrin was initiated. The following period was without any attacks, and the EEG examination performed at the age of 16 months did not show any epileptic disorder. During 1.5-T MRI, gray matter spectroscopy exhibited increased signal intensity within almost the entire mesencephalon and medulla oblongata. Increased lactate signal was detected by proton spectrometry. The clinical features suggested mitochondrial encephalomyopathy. Rapid progression developed, the child showed fast general deterioration; with somnolence and several attacks of vomiting. Hypertrophic obstructive cardiomyopathy was revealed by cardiac examination. Due to cardiorespiratory arrest, the child died at the age of 17 months. The most common mitochondrial mutations associated with Leigh syndrome and mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) syndrome tests in the proband, by direct sequencing were negative. DNA samples isolated from liver, blood, and muscle were also examined for the 11777C>A mitochondrial mutation, which was detected in heteroplasmic form in all of these tissues. The quantity of the mutant load was estimated by densitometry analysis of RFLP agarose gels. The percentage of the 11777A allele was 50% in blood and 60% both in the liver and the muscle DNA. Although the 11777C>A mtDNA mutation is cited in reviews and is recognized as a widely detected mutation, only four individuals are to be found reported in the PubMed, the major clinical data are summarized in Table 4.

7. Discussion

7.1. CDG Ix

The clinical records of 23 CDG Ix patients were reviewed.

- Inverted nipples and abnormal fat distribution, characteristic of CDG Ia, may be found in patients with other subtypes, although they are much less common.

- In the patient detected dysmorphic features such as retrognathia, low-set ears and club foot are common, non-specific findings that could be observed in patients with congenital CNS anomalies.

- Abnormal clotting is an important indicator of a glycosylation disorder as indicated by the high number of CDG Ix patients presenting with at least abnormal laboratory results. Therefore, coagulation parameters should be evaluated in each patient suspected for CDG even if no clinical symptoms are visible.

- The review of CDG Ix patients shows that additionally bilateral cataract, glaucoma and optic nerve atrophy can be specific features in CDG. Our data indicated that the diagnosis of CDG should be considered in each patient with hypotonia, dysmorphic features and developmental delay accompanied by cataract. The combination of optic nerve atrophy and dystonic movements is extremely rare. It is common in mitochondrial disorders and has been observed in hereditary Leber optic neuropathy, but had not been described so far in any of the solved types of CDG I. The rare association of these symptoms, accompanied by relatively mild multivisceral presentation, may suggest a new CDG I subtype. On the other hand, it might indicate the need for CDG screening among patients with suspected Leber hereditary optic neuropathy. CDG Ix patients could be divided in two subgroups corresponding to clinical symptoms: the solely neurological form and a neurological-multivisceral presentation. The course of the disease in the patients with neurological presentation was usually milder, whereas in the patients with multivisceral form the symptoms occurred early and progressed rapidly.

7.2. Rett syndrome

According to data in the literature, common point mutations of *MECP2* are present in 60-70% of the cases. We have only detected *MECP2* mutations in 27.6% of Rett patients studied, a ratio that is likely because of the limitations of direct sequencing method used for mutation analysis, but possibly attributable to a high percentage of gross rearrangements of the *MECP2* gene that are not detectable by sequencing. It is important to point out that among the *MECP2* –negative patients only 17% showed classical Rett phenotype. In all, 8% of these patients showed the features of congenital form of Rett syndrome, 12% were male patients and 4% have no neurological symptoms. Among the subjects screened, we identified 2 patients with ovel *CDKL5* mutation, but we did not find any alterations affecting the *FOXP1* gene, that may be because of overall low frequency of *FOXP1* mutations in patients with Rett phenotype.

7.3. Deafness- associated mt7445A>G mutation

The disease appears either with deafness only, or combined with palmoplantar keratoderma. Penetrance and expressivity of the disease are different within the pedigrees. The mt7445A>G mutation was for the first time found in Hungarian patients in our Institute. The findings in our Hungarian family also suggest that other mitochondrial or nuclear factors and environmental agents may contribute to the development of hearing loss. The mutation was present in homoplasmic or in heteroplasmic form in the families, however, previously no pedigrees were found in which homo- and heteroplasmic forms of the mutation appeared simultaneously. The analysis of the A7445G alteration was performed from only blood leukocytes, other tissues were examined neither in this work, nor in previous studies. However, the proportion of the normal and mutant alleles may vary for example in the auditory cells. The normal allele which was found in the grandmother in low proportion did not segregate to the mother and the proband at all; while in the other branch of the pedigree the heteroplasmy was transmitted at a very low level. In spite of detecting huge differences of level of heteroplasmy, there were clinically affected individuals on both sides of the family tree which shows that the degree of the mutated DNA alone does not necessarily determine the development of clinical symptoms.

7.4. Mitochondrial DNA 11777C>A mutation associated Leigh syndrome

Several different types of gene-determined metabolic defects can lead to Leigh disease or Leigh-like symptoms and several mitochondrial mutations have been shown to involve in pathogenesis of Leigh disease. Albeit the 11777C>A mtDNA mutation is cited in reviews and is recognized as a widely seen mutation, only four individuals are reported in the PubMed. Our patient was 7 months old, which is the earliest among the patients presented to date. The main clinical features were West syndrome, toxic vomiting, and hypertrophic obstructive cardiomyopathy. The progress was aggressive, leading to a relatively early fatal outcome. These together clearly differentiate our case from the others presented, supporting the wide clinical phenotype spectrum associated with this mutation.

8. Conclusions

The following exceptional genotype-phenotype associations were described in the thesis of this work:

1. In CDG Ix syndrome:

- developmental delay and axial hypotonia are dominant features, non-specific craniofacial dysmorphic signs (micro/retrognathia, hypertelorism, prominent and low-set ears) are observed.
- the prevalence of abnormal clotting is high, presented sometimes only by abnormal laboratory results. Therefore, coagulation parameters should be evaluated in each patient suspected for CDG even if no clinical symptoms are visible.
- ophthalmological findings are common additional symptoms, optic nerve atrophy is the most frequent one.
- in some cases the diagnosis of CDG Ix arises upon the rare association of symptoms.

2. In Rett syndrome we specified:

- in details the distribution and frequency of mutations detected by MECP2 screening in Hungarian patients with Rett syndrome phenotype.
- the phenotypic signs and disease course relation to the genotype.
- at the screening of CDKL5 gene mutations two novel nonsense mutations: in the first case a c.607G>T change that results in a premature termination codon at amino-acid position 203, and c.1708G>T in a second patient that leads to a premature stop at amino-acid position 570 of the C-terminal region.

Based on our observation we suggest to perform the *CDKL5* gene screening in case of *MECP2* negativity even as a first investigation in patient with therapy-resistant seizures.

3. In deafness associated with mtDNS 7445A>G mutation:

- we first described in Hungarian patient this rare mutation
- In spite of the huge differences in the level of heteroplasmy, there were clinically affected individuals on both sides of the family tree, indicating that the proportion

of mutated mtDNA in the blood DNA alone does not necessarily determine the development of the clinical symptoms.

4. *mt11777C>A mutation associated Leigh syndrome:*

- new phenotype was described, as in our patients symptoms appeared at exceptionally early age and the main clinical features; West syndrome, toxic vomiting and hypertrophic obstructive cardiomyopathy also differed from the already known ones and showed a rapid progression.
- examining the phenotype of our patients and that of the ones found in the literature we found that there is a wide clinical phenotype spectrum associated with mt11777C>A mutation.

Table 1. Overview of the clinical symptoms observed in CDG Ix patients

Symptoms	Patient																	
	1	2	3 ^a	4	5	6 ^b	7 ^a	8	9 ^a	10	11-13	14	15	16-17	18	19	20-21	22-23
Dysmorphic features	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+
Hypotonia	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Psychomotor retardation	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
Retinitis pigmentosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Glaucoma	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CKatarakt	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Optic atrophy	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Extrapyramidal symptoms	-	-	+/-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Stroke-like episodes	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Seizures	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+/-	+	-	+/-	-	+	+	-
Cardiomyopathy	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Muscle weakness, increased CK	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Polyneuropathy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Cerebellar atrophy	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
Arthrogryposis	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Failure to thrive	+	+	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
Cystic kidney disease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Respiratory failure	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Diarrhoea/vomiting	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+/-	+	-	+	-	-	-	+
Liver involvement	-	+	+/-	-	+	+	-	-	-	-	+/-	+	-	+	+	-	+	+
Hypoalbuminaemia	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+
Coagulation anomalies	-	+	+/-	+/-	+/-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Thrombocytopenia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+	-	+	-	-	-	+
Recurrent infections	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neurological presentation	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Neurovisceral presentation	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+

^a transient liver function abnormalities

Patient diagnosed with CDG Ix.

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

Table 2. Genotype-phenotype correlations in connection with *MECP2*

	Mutant (43)	Polymorphic (8)	Negative (74) – 9 boy
<u>I. stadium</u>			
Uneventful	44,2%	50%	27,39%
Slow development	51,2%	37,5%	71,23%
Hypotonic muscles	4,65%	12,5%	1,36%
<u>Inflowing of II st.</u>	19,9 month (6-48)	14,6 month (8-24)	21,39 month (3-66)
Not determinable (in)		25%	19,17%
<u>Dysmorphic signs</u>			
Microcephaly	74,4%	37,5%	41%
Little feet	46,5%		12,3%
Facial asymmetry	34,8%		
Scoliosis	32,5%		23,2%
Dyscrania			15%
Negative	4,65%	12,5%	17,8%
<u>Neurological signs</u>			
Stereotypic/compulsive	76,7%	62,5%	49%
Seizure	44,1%		42,4%
Abnormal reflex	37,2%		
Hypotonic muscles	34,8 %	50%	50,6%
Autistic features		37,5%	
Neuroradiol. sign			21,9%
Negative			4%
Mild phenotype	4,65%		
Classic phenotype			16,2%
<u>Age at examination</u>	6,865 years (2-21)	5,5 years (2-9)	5,32 years (0,75-18)

Nationality of the family	Number of patients/affected	Status of mutation	Onset	Additional symptom	Additional findings	Gene
Scottish	14/13	homo/heteropl	3-18 years	-	Polimorph.	MT-CYB
New-Zealand	10/18	Heteroplasmic	Second decade	-	Two sec. Leber's mut.	MT-ND
Japanese	3/17	homoplasmic	childhood	PPK	-	-
French	2/4	homoplasmic	>6 years	PPK	Not tested	-
Ukrainian	5/7	homoplasmic	6-15 years	-	-	-
Portuguese	8/10	homoplasmic	No data	PPK	Not tested	-
Hungarian	5/2	homo/heteropl.	childhood	-	Polimorph.	16S rRNS, MT-ND, Mt-CYB, MT-COI-II

Table 3. Comparison of families with the A7445G mitochondrial mutation

Table 4. Review of the clinical data of patients with the 11177C>A mitochondrial mutation

Nationality/sex of the patient	Examined tissues	11777C>A mutation load (%)	Onset of first symptoms	Additional symptoms	Additional findings	
					Mitokondriális mutáció	haplotype
Japanese female 1	Muscle blood myoblast fibroblast	83 40 78 57	3 years and 5 months (short stature)	Exotropia (right eye) Mildly reduced muscle tone Elevated lactate in blood and CSF MRI: abnormal signals in the bilateral midbrain and thalamus	73A>, 150C>T, 151C>T, 263A>G, 303delC, 310insC, 489T>C, 527C>G, 1107T>C, 1438A>G, 2706A>G, 3106delC, 4200A>T, 4216T>C, 4317A>G, 4769A>G, 4833A>G, 4985G>A, 5178C>A, 5301A>G, 5442T>C, 5554C>T, 7028C>T, 7129A>G, 7669C>T, 8580C>T, 8860A>G, 10397A>G, 10398A>G, 10400C>T, 10873T>C, 11394T>C, 11719G>A, 12705C>T, 12810A>G, 13984C>T, 14783T>C, 14927A>G, 15043G>A, 15301G>A, 15326A>G, 15622T>C, 15737G>A, 16184insC, 16190delC, 16233C>T, 16291C>T, 16311T>C, 16316A>G, 16362T>C	D 5
Japanese female 2	muscle blood myoblast	76 52 76	3 years (dystonia)	Exotropia (left eye) short stature, hyperactive reflexes, dystonia, Elevated lactate in blood/CSF MRI: abnormal signals in the bilateral basal ganglia, substantia nigra and cervical cord	73A>G, 143G>A, 152T>C, 204T>C, 263A>G, 489T>C, 709G>A, 1438A>G, 3106delC, 3426A>G, 4769A>G, 4833A>G, 4985G>A, 5108T>C, 7028C>T, 7621T>C, 8701A>G, 8854G>A, 8860A>G, 9540T>C, 10398A>G, 10400C>T, 10873T>C, 11335T>C, 11719G>A, 12705C>T, 14569G>A, 14766T>C, 15043G>A, 15301G>A, 15326A>G, 15746A>G, 16233C>T, 16274G>A, 16362T>C	HV-N-L3
Italian female	muscle	60	6 years (bilateral optic atrophy)	Leigh – like symptoms, normal lactate, MRI: transient involvement in the rostral midbrain, abnormal signals in the basal nuclei		ND
British male	Muscle brain	93 67-81	67 years (left-sided resting tremor)	Hemiparesis, epilepsy, pancreatitis, elevated lactate in blood/CSF MRI: hyperintense lesions in frontal, parietal lobe and cerebellar hemisphere		ND
Hungarian male	muscle blood liver	60 ^a 50 ^a 60 ^a	7 months (spasticity, hypotonia, cerebral palsy)	Hypsarhythmias, West syndrome MRI: frontal atrophy, ventricular dilatations, increased signal intensity within the whole area of the medulla oblongata Presence of lactate in the brain Toxic vomiting, hypertrophic obstructive cardiomyopathy	4216T>C, 11719G>A, 12453T>C, 13708G>A, 15452C>A	J

LIST OF PUBLICATIONS

Publications related to the thesis:

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

IF: 2,69

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

IF: 4,82

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

IF: 2,6

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

IF: 2,5

Other publications in this topics:

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

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

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

IF: 3,659

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

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

IF: 3,43

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

IF: 2,205

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

IF: 0,534

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

IF: 3,56

Publications in other topics:

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

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

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

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

IF:1,072

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

IF: 0,456

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

IF:0, 688

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

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

Idézhető absztraktok

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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