

DNS hibridizációs módszerek alkalmazása a klinikai cytogenetikában

PhD értekezés

Czakó Márta

PTE Orvosi Genetikai és Gyermekfejlődéstani Intézet

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

2005

Tartalom

1. Bevezetés

- 1.1. Kromoszómális eltérések populációs gyakorisága
- 1.2. Lehetőségek a diagnosztika hatékonyságának bővítésére
 - 1.2.1. Fénymikroszkóppal nem detektálható eltérések vizsgálata
 - 1.2.2. Mozaikosság vizsgálata

2. Célkitűzés

3. Vizsgálati anyag

- 3.1. A klinikai indikáció szerint
- 3.2. A sejtek, ill. a DNS forrása szerint

4. Alkalmazott módszerek

- 4.1. Mintavétel és preparátumkészítés
- 4.2. Metafázisos preparátumokon végzett FISH vizsgálat
- 4.3. Interfázis FISH
- 4.4. Mikroszatellita marker analízis

5. Eredmények

- 5.1. FISH alkalmazása interfázisos sejtmagokon
 - 5.1.1. Szöveti mozaikosság
 - 5.1.2. Magzati szűrés
- 5.2. FISH alkalmazása metafázisos kromoszómákon
 - 5.2.1. Multiplex fejlődési rendellenességet okozó szerkezeti kromoszómahibák
 - 5.2.2. Mikrodeléciós szindrómák
- 5.3. Mikroszatellita markerek szegregálódása
 - 5.3.1. UPD kimutatása ismeretlen eredetű testi-szellemi rendellenességben
 - 5.3.2. A számfeletti 21-es kromoszóma szülői eredetének vizsgálata Down szindrómában
 - 5.3.3. Monogénes rendellenességekben a mutációt hordozó kromoszóma identifikálása

6. Az eredmények értékelése

7. Következtetések

Irodalom

Rövidítések jegyzéke

FISH: fluorescens in situ hibridizáció

IF FISH: interfázisos sejteken végzett FISH

PCR: polimeráz láncreakció

VCFS: velo-cardio-facialis szindróma

YAC: élesztő mesterséges kromoszóma

FGFR: fibroblast growth factor receptor

TWIST: transzkripció faktor gén

UPD: uniparentális disomia

DMD: Duchenne muscularis dystrophia

DAPI: 4',6-diamidine-2'-phenylindole-dihydrochloride

1. Bevezetés

1.1. Kromoszómális eltérések populációs gyakorisága

Tankönyvi adat, hogy az élveszülöttek 0,6 %-ában kromoszómaaberrációk mutathatók ki (Oláh, 1999). Ez Magyarországon évente 600 kromoszómahibás újszülött világrajöttét jelenti. Az ilyen defektusok általában nagyon súlyos mentális és fizikai következményekkel járnak. Mivel a kromoszómarendellenességek következményeinek gyógyítására nincs lehetőség, jelenleg csak a veszélyeztetettek pontos identifikálásán és prenatális diagnózison alapuló megelőzés jelenthet hatékony segítséget.

Alig vitatható vélemény, hogy a kromoszómaaberrációk valóban létező populációs gyakorisága a 0,6 %-os születéskori incidenciánál lényegesen magasabb. Tudjuk, hogy a spontán abortuszok mintegy felét kromoszómális rendellenességek okozzák. A spontán abortumokban a kromoszóma eltérések előfordulása annál gyakoribb, minél korábbi terhességből származik a minta (átlagban 50 %, a 12. hét előtt: 60 %, 12-20. hét között: 20 %, a későbbi abortuszok és a halvaszületések között: 5-10 %), és intrauterin szelekció eredményeképpen alakul ki a kromoszómaaberrációk születéskori incidenciája.

Még lényegesebb annak figyelembevétele, hogy a kromoszómális eltérések kimutatása módszerfüggő. A 0,6 %-os születéskori gyakorisági adat hagyományos, részletek kimutatására nem alkalmas metodikákkal végzett vizsgálatokon alapul, s minden módszertani bővülés addig kimutathatatlan aberrációk identifikálását eredményezheti.

A molekuláris genetikai technikák, amelyek az elmúlt években hazánkban is megjelentek (Katona és mtsai, 1996; Tóth és mtsai, 2001; Treszl és mtsai, 2004), jelentős mértékben bővítették a genomiális rendellenességek kimutatásának lehetőségét. A komplementer DNS szekvenciák hibridizációján alapuló módszerek a próbák célzott alkalmazása folytán jelentősen fokozták a

vizsgálatok specifikusságát. Joggal remélhető tehát, hogy a DNS hibridizációs technikák – köztük a jelen dolgozatban tárgyalt fluorescens in situ hibridizáció (FISH) és a mikroszatellita markerek vizsgálata – hozzájárulnak ahhoz, hogy a kromoszómaaberrációk minél nagyobb hányada minél nagyobb pontossággal identifikálásra kerüljön. A veleszületett testi, szellemi rendellenességek többségének etiológiája ugyanis ismeretlen, s ezek közt minden bizonnyal jelentős arányban szerepelnek a hagyományos módszerekkel nem észlelhető kromoszómahibák.

1.2. Lehetőségek a diagnosztika hatékonyságának bővítésére

1.2.1. Fénymikroszkóppal nem detektálható eltérések vizsgálata

A hagyományos sávozási technikák a számbeli és a nagyobb (> 10 Mb) szerkezeti kromoszóma rendellenességek kimutatására alkalmasak. A DNS hibridizáció és a fluorescens festékekkel történő detektálás akár kilobázis nagyságrendű szakaszok specifikus kimutatását is lehetővé teszi, s ezáltal a korábbi fénymikroszkópos technikákat messze felülmúló felbontóképességet eredményez.

Ezzel a technikával egészen kis kromoszómarégiók tehetőek láthatóvá a genomban, felfedve ezen szakaszok áthelyeződését, delécióját vagy duplikációját. A 3-5 Mb méretű deléciók detektálása az ún. mikrodeléciós szindrómák elkülönült csoportjának felismerését eredményezte (Malcolm, 1996). Ezek az összetett fenotípussal jellemezhető rendellenességek legtöbbször sporadikusan fordulnak elő, de ismertek familiáris esetek is, amelyek háttérben általában rejtett szülői kiegyensúlyozott transzlokáció áll. A mikrodeléciós szindrómákban a fenotípus több gén érintettsége miatt alakul ki. Emiatt talán találóbb az „érintkező gén szindróma” elnevezés, ami a funkcionálisan független, ám a kromoszómákon fizikailag egymás mellett elhelyezkedő gének

együttes deléciójára utal. A legismertebb mikrodeléciós szindrómák a Prader-Willi, az Angelman (Thomas és mtsai, 1999; Erdel és mtsai, 1996), a DiGeorge (Shprintzen és mtsai, 1981; Driscoll és mtsai, 1992; Fibison és mtsai, 1990; Cohen, 2002; Coumoul és mtsai, 2003), a Williams (Ewart és mtsai, 1993), a Miller-Dieker (Ledbetter és mtsai, 1992), a Wolf-Hirschhorn (Gandelman és mtsai, 1992; Altherr és mtsai, 1991), a Cri du Chat, a Kallmann és a Smith-Magenis (Greenberg és mtsai, 1991) szindrómák.

A FISH specifikussága ezen felül arra is lehetőséget nyújt, hogy az egyes kromoszómákra specifikus próbákat más-más színű fluorokrómmal jelöljük, s így a fénymikroszkópban hasonló megjelenésű kromoszómákat egymástól elkülönítsük. Ennek a transzlokációk vizsgálatában van óriási jelentősége.

A FISH további előnye, hogy megfelelő próbák alkalmazásával nem osztódó, interfázisos sejteken is képes a keresett kromoszómális szakaszok detektálására. A FISH technika interfázis cytogenetikai hazai alkalmazása a prenatális diagnosztikában (Tardy és mtsai, 1996 és 1997) és malignus elváltozások vizsgálatában terjedt el elsőként (Szuhai és mtsai, 1997; Pajor, 1998). Az IF FISH számbeli kromoszóma rendellenességek vizsgálatában az összehasonlító tanulmányok adatai szerint (Pajor és mtsai, 1998) a hagyományos cytogenetikai vizsgálatnál érzékenyebbnek bizonyult. Ez az eljárás képes egy-egy kromoszóma számbeli eltéréséről nagy számú sejt elemzésével információt nyújtani metafázisok vizsgálata nélkül, ezért lehetővé teszi a kromoszómális szöveti mozaikosság vizsgálatát is (lásd: 1.2.2. fejezetben).

A mikroszatellita markerek tandem ismétlődő dinukleotid egységekből álló szekvenciák, amelyek a homológ kromoszómákon eltérő hosszúságúak lehetnek (4.4. fejezet), és a genomban elszórtan találhatóak. Segítségükkel lehetőségünk van egyes kromoszómák, ill. kromoszóma régiók szülői eredetének megállapítására, aminek a klinikai diagnosztikában is jelentősége van. A molekuláris DNS módszereknek köszönhetően kiderült ugyanis, hogy a

46 kromoszómával jellemzett euploidia nem mindig a két szülő komplett haploid szerelvényének egyesülésével jön létre, s az ún. uniparentális diszómia fejlődési rendellenességek okozója lehet.

1.2.2. Mozaikosság vizsgálata

A populációban létező kromoszómális eltérések felismerésének esélyét az is fokozza, ha a diagnosztikában elszakadunk attól a hagyományos feltételezéstől, miszerint a vizsgált biológiai minta maradéktalanul reprezentálja a teljes szervezetet. A *mozaikosságról*, az eltérő genotípusú sejtek együttes jelenlétéről ugyan régóta tudunk, módszertani nehézségek miatt azonban korlátozottak az ismereteink. Számos adatból lehet arra következtetni, hogy a genetikai mozaikosság létező gyakorisága lényegesen nagyobb, mint a felismert esetek száma.

Az élet során keletkező szomatikus sejt mutációk daganatokat okoznak, ami végeredményben mozaikosságnak felel meg. A daganatképződéshez vezető kromoszómális vagy génszintű mutációk ugyan egyre több esetben verifikálhatók, azonban azok a minden bizonnyal létező, daganatot nem okozó mutációk, amelyek a sejt funkcionális zavarával járnak, egyelőre nem vagy alig mutathatók ki.

Némileg jobb eséllyel vizsgálható az *intrauterin életben bekövetkező mutációk* szerepe. A posztzigótikusan, a fejlődő embrióban kialakuló mutációk ugyanis fejlődési rendellenességet okoznak, a kóros fenotípus tehát felhívhatja a figyelmet eltérő genotípusú sejtek jelenlétére. Noha a foltos, körülírt szöveti, szervi eltérésekben ma már génszintű mozaikosságok is kimutathatók, módszertani korlátok miatt mind a mai napig ha mozaikosságról beszélünk, akkor mozaik aneuploidiáról, két vagy több, eltérő kromoszómakészlettel rendelkező sejtvonal szervezeten belüli együttlétéről van szó.

A fejlődő magzatban létrejövő szomatikus mutációk okozta fejlődésbeli elmaradás, ill. malformáció mértéke a kóros és az egészséges sejtvonal arányától és szöveti megoszlásától függ. Mivel mozaik esetekben a klinikai tünetek rendszerint enyhébbek a kizárólag kóros sejtekkel rendelkező személyekhez képest, a mozaikosság adhat magyarázatot az öröklődő rendellenességek

változatos manifesztációjára (genetikai heterogenitás), szegmentális és aszimmetrikus fejlődési hibákra (a bőr pigmentáció zavarai, az egyik testfélben vagy testrészben hemihypertrophia vagy unilateralis hypoplasia), normális karyotípus mellett előforduló intrauterin növekedésmaradásra („confined placental aneuploidy”), lokalizált congenitalis malformációra (Hall, 1988; Jonkman és mtsai, 1999; Seely és mtsai, 1984; Kalousek és mtsai, 2000).

A genetikai tanácsadás számára nagy problémát jelent, ha egy családban „új mutáció”-ként megjelenő kromoszómális rendellenesség ismétlődik. Ennek hátterében szülői mozaikosság – esetleg csak a gonádokban létező, germinális mozaikosság – állhat. Ez utóbbi gyakorlatilag nem vizsgálható, de a vér lymphocytákban lévő mozaikosság is csak célzott megközelítéssel zárható ki. A 15 % alatti arányú rendellenes sejtvonal felismerésére ugyanis rutin eljárással a vizsgált alacsony sejtszám miatt kicsi az esély (irodalmi adatok alapján pl. mozaik Down szindrómás gyermekekben a kóros sejtvonal aránya gyakran 15% alatti, a rejtett mozaik hordozó szülőkben pedig még az 5%-ot sem éri el) (Uchida és mtsai, 1985). Ezért a „normális” karyotípusú szülőkben is alaposabb cytogenetikai vizsgálatra, vagy legalább a kérdéses veleszületett betegség finomabb tüneteinek keresésére lenne szükség gondos fenotípus vizsgálat keretében (Méhes és mtsa, 1990).

A mozaikosság kimutatását nehezíti, hogy a vér lymphocyták vizsgálatával kapott normális karyotípus alapján nem zárható ki az aneuploid sejtvonal jelenléte más szövetekben, valamint azzal is számolni kell, hogy az egyes szövetfélésekben a rutinszerűen vizsgált lymphocytákban észlelttől eltérő lehet a kóros sejtek aránya, amire eddig a genotípus-fenotípus összefüggés elemzésében - módszertani korlátok miatt – kisebb figyelmet lehetett fordítani. Az ilyen ún. *szöveti mozaikosság* különféle szövetekből származó nagyszámú mitózis elemzésével lenne megállapítható, ez azonban a klinikai gyakorlatban nehezen kivitelezhető. (Sejtkultúrában nagyszámú mitózis elemzéséhez gyakran

több passzálás szükséges. A felpasszált sejteket új tenyésztőedénybe áthelyezve a letapadás függvényében a különféle sejtvonalak klónjai az eredeti szervezethez képest eltérő arányt reprezentálhatnak.)

Az interfázisos sejteken alkalmazott FISH a korábbinál lényegesen jobb lehetőséget kínál a mozaikosság vizsgálatára is, aminek a rendellenességek kialakulási mechanizmusának megértése, ill. a prognózis megítélése szempontjából van jelentősége (Robinson és mtsai, 2001). A technikával különféle szövetmintákon tenyésztés nélkül is viszonylag nagyszámú sejt vizsgálható. Ezáltal lehetőség nyílik a véren kívül más, invazív mintavételt nem igénylő anyagmintán gyors eljárással, metafázisok elemzése nélkül vizsgálati adathoz jutni bizonyos kromoszómák számbeli anomáliáiról.

A számbeli kromoszóma rendellenességek kiterjedt elemzése céljából vezettük be intézetünkben a különféle szövetekből (lymphocyták, buccalis nyálkahártya, tenyésztett fibroblast sejtek, esetenként izomszövet sejtjei, a vizeletüledékben található laphámsejtek, valamint hajgyökér sejtjei) vett mintákon végzett interfázis FISH vizsgálatokat.

2. Célkitűzés

Intézetünk a hagyományos cytogenetikai elemzés (G-, Q-, C- és R-sávok technikák és festési eljárások alkalmazása) területén évtizedek óta nagy tapasztalatokkal rendelkezik a pre- és postnatalisan végzett vizsgálatokban egyaránt. A molekuláris cytogenetikai technikák fejlődése azonban a klinikai gyakorlatban jelentkező számos, a hagyományos eljárások számára megoldhatatlan problémát jelentő vizsgálat elvégzését tették lehetővé. A munkacsoportban elsődleges feladatomban a DNS hibridizációs módszerek (FISH, mikroszatellita marker analízis) bevezetése volt a betegellátás szempontjából legfontosabb területeken, a diagnosztikában alkalmazható laboratóriumi vizsgálatok körének bővítése érdekében. Jelen dolgozat tudományos céljai a diagnosztikus munka során felmerült problémákhoz kötődnek. Elemezni kívántam az egyes módszerek alkalmazási lehetőségeit, előnyeit, ill. korlátait a diagnosztikában nyert tapasztalatok alapján az alábbi kérdések szerint:

- milyen mértékben növelhető a konstitucionális kromoszómaaberrációk felderítésének aránya?
- mennyiben járul hozzá a FISH a fenotípus-genotípus korrelációs elemzésekhez?
- milyen jelentőséget lehet tulajdonítani a kromoszómális mozaikosságnak az emberi patológiában?
- milyen előnyökkel jár az interfázis FISH a magzati aneuploidiák szűrésében?
- milyen módon lehet fokozni a genetikai diagnosztika hatékonyságát a mikroszatellita markerek szegregálódásának vizsgálatával?

3. Vizsgálati anyag

3.1. A klinikai indikáció szerint: elsősorban a genetikai tanácsadáson megjelent, testi-szellemi rendellenességben szenvedő betegektől származó minták kerültek feldolgozásra (tumorokból származó mintákat kivéve) a dolgozatban ismertetett vizsgálatok keretein belül. Ezek mellett a Down-szűrési program keretében intézetünkbe került magzati mintákon végeztem vizsgálatokat.

3.2. A sejtek, ill. a DNS forrása szerint: lymphocyták, fibroblast és amnion kultúra sejtjei, chorionboholy minta, buccalis nyálkahártya sejtjei, vizeletüledékben található laphámsejtek, hajgyökér sejtek, ill. néhány esetben szöveti sejtek adták a vizsgálatok anyagát.

4. Alkalmazott módszerek

4.1. Mintavétel és preparátumkészítés

Metafázis FISH vizsgálat céljára sterilen vett perifériás vért használtunk. 2 x 4 ml phytohemagglutinin-t tartalmazó táptalajba (Chromosome Medium 1A, Gibco Co.) 5-5 csepp vért cseppentettünk, összeráztuk, majd 72 órára 37 °C-os termosztátba helyeztük. 2 órával a feldolgozás előtt colcemidet (0,1 µg/ml végkoncentrációnak megfelelő mennyiségben) adtunk a kultúrához. A hipotonizálás 0,075 M KCl oldattal történt 37 °C-on 30 percig, majd többször átmostuk a sejteket fixálóval (metanol és jégcet 3:1 arányú elegye). A preparátumot -20 °C-on tartottuk min. 30 percig, majd tisztított üveg tárgylemezre cseppentettük ki a sejteket (Gail, 1998). A FISH vizsgálat megkezdéséig a lemezeket -20 °C-on tároltuk.

Fibroblast kultúra készítése: alkohollal történő fertőtlenítést követően történt a bőrbopszia vétele. A bőrt sterilen kezelve – petricsészében, szikével - apró darabokra vágtuk, majd a darabokat steril tenyésztőedényekbe szétosztottuk. Az első napon csupán 2-3 ml táptalajt (Chang Medium, Gibco Co.) adtunk hozzá, majd az edényt oldalára fordítottuk a jobb letapadás elősegítése érdekében és 37 °C-os CO₂ termosztátba helyeztük. Másnap normál helyzetbe visszaállítottuk az edényt. A letapadást és növekedést 2-3 naponként ellenőriztük, szükség esetén friss táptalajt adva a sejtekhez. Megfelelő növekedés elérése után colcemidet adtunk a kultúrához, majd két óra eltelte után feldolgoztuk: a hipotonizálás 0,075 M KCl oldattal történt 37 °C-on 30 percig, majd többször átmostuk a sejteket fixálóval (metanol és jégcet 3:1 arányú elegye). A FISH vizsgálat megkezdéséig a lemezeket -20 °C-on tároltuk.

Amnion sejt kultúra készítése: 20 ml amnion folyadékot steril centrifugacsőben lecentrifugáltunk (2000 rpm, 10 perc), az üledéket felszuszpendálva steril tenyésztőedényekben osztottuk el. Táptalajt (AmnioMax és Chang Medium, Gibco Co.) adtunk a sejtekhez, és a mintákat 37 °C-os CO₂ termosztátba helyeztük. A letapadást és növekedést 2-3 naponként ellenőriztük, szükség esetén friss táptalajt adva a sejtekhez. Megfelelő növekedés elérése után colcemidet adtunk a kultúrához, majd két óra eltelte után feldolgoztuk: a hipotonizálás 0,05 M KCl oldattal történt 37 °C-on 30 percig, majd többször átmostuk a sejteket fixálóval (metanol és jégcet 3:1 arányú elegye). A FISH vizsgálat megkezdéséig a lemezeket -20 °C-on tároltuk.

Hajgyökér sejtekből nyert preparátum készítése: a kihúzott hajszálak gyökerét fiziológias sóoldatba áztattuk fél órára, majd a hajgyökér sejtjeit tisztított üveg tárgylemezekre kentük ki. A preparátumot metanolba mártva fixáltuk, majd szobahőn megszárítottuk. A FISH vizsgálat megkezdéséig a lemezeket -20 °C-on tároltuk.

Vizeletüledékből nyert laphámsejtek preparálása: 20-50 ml vizeletet lecentrifugáltunk (5000 rpm, 10 perc), a felülúszó eltávolítása után az üledéket metanolban felszuszpendáltuk, tisztított üveg tárgylemezre cseppentettük, és szobahőn megszárítottuk. A FISH vizsgálat megkezdéséig a lemezeket -20 °C-on tároltuk.

Buccalis nyálkahártya kenet készítése: fából készült steril lapkával a szájüreg nyálkahártyáról mintát vettünk, tisztított üveg tárgylemezre kentük ki. A preparátumot metanolba mártva fixáltuk, majd szobahőn megszárítottuk. A FISH vizsgálat megkezdéséig a lemezeket -20 °C-on tároltuk.

Szövetminták preparálása: a műtéti eljárás során nyert mintákat (szövetteni metszetek) paraffinba ágyazva, tárgylemezre rögzítve kaptuk. A paraffint 3 x 10 perc xyloolban történő áztatással oldottuk ki szobahőn. A lemezre rögzített preparátumot leszálló alkoholsorban (100-90-70-50 % etanol) hidráltuk, majd 2 x SSC oldatban inkubáltuk 75 °C-on 10 percig.

4.2. Metafázisos preparátumokon végzett FISH vizsgálat (lymphocyta, ill. fibroblast és amnion sejt kultúrák)

A FISH vizsgálat megkezdése előtt a fagyasztva tárolt lemezeket szobahőmérsékleten engedték felmelegedni. Minden FISH protokollban a következő törzsoldatokat használtuk (4 °C-on egy hónapig tárolható):

20 x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na-citrát (pH 7.0)

10 x PBS: 137 mM NaCl, 27 mM KCl, 80 mM Na₂HPO₄, 15 mM KH₂PO₄ (pH 7.0)

10 % Tween 20

1 M MgCl₂

10 % pepszin (-20 °C-on tároltuk)

1 N HCl

70 % - 90 % - 100 % etanol

DAPI magfesték: 125 ng/ml antifade mounting mediumban oldva (4 °C-on tároltuk)

Munkaoldatok (mindig frissen készítettük):

2 x SSC (500ml): 450 ml desztillált víz + 50 ml 20 x SSC (pH 7.0)

1 x PBS (1000 ml): 900 ml desztillált víz + 100 ml 10 x PBS (pH 7.0)

MgCl₂/PBS (500 ml): 480 ml 1 x PBS + 20 ml MgCl₂

MgCl₂/PBS/formaldehid (100 ml): 100 ml MgCl₂/PBS + 1 ml formaldehid

Az *előkezelés* lényege egy pepszin emésztés közbeiktatása a fehérjementesítés elvégzése érdekében, ill. egy azt követő fixálás. Minden munkafázist festőküvetében végeztünk.

1. Mosás 2 x SSC oldatban: 3 x 3 perc
2. Mosás 1 x PBS oldatban: 1 x 3 perc
3. Emésztés: 100 ml desztillált víz és 1 ml 1 N HCl elegyét 37 °C-ra előmelegítettük, majd az emésztés megkezdése előtt 25 µl 10 %-os pepszin oldatot kevertünk bele: 10 percig inkubáltuk 37 °C-on.
4. Mosás 1 x PBS oldatban: 3 x 3 perc
5. Mosás MgCl₂/PBS oldatban: 2 x 3 perc
6. Fixálás MgCl₂/PBS/formaldehid oldatban: 1 x 10 perc
7. Mosás 1 x PBS oldatban: 1 x 3 perc
8. Dehidráció jéghideg felszálló alkoholsorban (70 – 90 – 100 %): 1-1 perc
9. A lemezek szárítása szobahőn

Az előkezelt lemezeket fáziskontraszt mikroszkópban átvizsgáltuk, kiválasztottuk a hibridizációra alkalmas területet, amelyet a lemez karcolásával megjelöltünk.

Denaturálás és hibridizáció: az általunk használt módszer, az ún. kodenaturáció szerint a fluorochrome vagy haptén jelölésű próbát hibridizációs pufferrel (50 % formamid/ 2 x SSC) elegyítettük, 10 µl végtérfogatra desztillált vízzel szükség szerint kiegészítettük. Az így kapott elegyet a hibridizáció céljára előzetesen kiválasztott területre cseppentettük, fedőlemezzel buborékmentesen lefedtük, majd hot plate-re helyezve a lemezeket 3 percig 80 °C-on együtt

denaturáltuk a próbát és a kromoszómális DNS-t. Denaturálás után a fedőlemezt körberagasztottuk, és lefordítva (fekvő küvettában) 37 °C-os pára kamrába tettük. A hibridizáció az ún. painting (teljes kromoszómát festő) próbák használatakor két éjszakán át, minden más próba esetén egy éjszakán át tartott.

Poszthibridizációs mosás: a mosási lépések elvégzése előtt a munkaoldatokat frissen készítettük el, majd az oldatokat és a festőküvettákat egyaránt 37 °C-ra előmelegítettük (fűthető vízfürdőben).

Munkaoldatok (minden oldat pH értékét 7.0-ra állítottuk):

50 % formamid/ 2 x SSC (400 ml): 160 ml desztillált víz + 40 ml 20 x SSC + 200 ml formamid (pH 7.0)

2 x SSC (500 ml): 450 ml desztillált víz + 50 ml 20 x SSC (pH 7.0)

4T (500 ml): 400 ml desztillált víz + 100 ml 20 x SSC + 2,5 ml 10 % Tween 20 (pH 7.0)

1. A lemezeket a pára kamrából elővéve a fedőlemezeket a hibridizált területről eltávolítottuk.
2. Mosás 50 % formamid/ 2 x SSC oldatban 37 °C-on: 3 x 5 perc
3. Mosás 2 x SSC oldatban 37 °C-on: 3 x 5 perc
4. Mosás 4T oldatban 37 °C-on vagy szobahőn: 3 x 3 perc

Fluorochrome jelölésű próbák esetén csupán desztillált vízben leöblítettük a lemezt, majd szobahőn megszáritottuk. Ilyen próbák alkalmazásánál a denaturálás pillanatától fénytől védve kezeltük a preparátumot. Utolsó lépésként a hibridizált területet DAPI magfestéssel lefedtük.

Haptén jelölésű próbák esetében az első 4T mosási lépés után az előhívás következett: a próba jelölésének megfelelő antitestet blokkoló reagenssel hígítottuk (előhívó oldat; a gyártó által megadott előírások szerint). A lemezt 100 µl előhívó oldattal buborékmentesen lefedtük, majd min. 30 percre 37 °C-os pára kamrába tettük. Az inkubálási idő lejárta után a 4T mosási lépésektől folytattuk a munkát, ügyelve arra, hogy fénytől védjük a preparátumot.

Deszillált vizes öblítés után szobahőn megszárítottuk a lemezeket, a hibridizált területet DAPI magfestéssel fedtük.

Értékelés: a lemezeket fluorescens mikroszkópban értékeltük, az alkalmazott fluorescens festékeknek megfelelő filtereket használva.

4.3. Interfázis FISH (buccalis kenet, vizeletüledékből nyert laphámsejtek, hajgyökér sejtszövetjei és egyéb szövetek nyugalmi állapotú sejtmagjain, ill. magzati sejtmintákon)

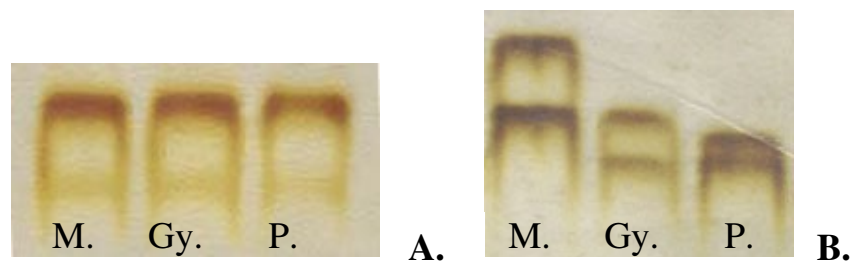
A protokoll a metafázis FISH módszernél leírtaknak megfelelő volt, csupán a poszthibridizációs mosásban tért el: egyes próbáknál (pl. a gyakran keresztjelölő X centromerikus próba használata esetén) 45 °C-os hőmérsékletet vagy 60 % formamid arányt alkalmaztunk.

4.4. Mikroszatellita marker analízis

A DNS izolálás perifériás vérből kisózással (Miller és mtsai, 1988) történt. Az alkalmazott mikroszatellita markerek primer szekvenciáit a Genome Database adatbázisból vettük. A markerek amplifikálása a következő hőprogramon történt: denaturálás 3 percig 94 °C-on, majd 38 cikluson keresztül denaturálás 45 másodpercig 94 °C-on, annealing 30 másodpercig 55-57 °C-on, szintézis 30 másodpercig 72 °C-on, végső extenzió 3 percig 72 °C-on, végül 4 °C-on tartottuk az elegyet. Az amplifikációt 2 % agaróz gélen, etídium-bromidos festéssel ellenőriztük. A PCR termék maradványát 8 % poliakrilamid gélen futtattuk, ezüstfestéssel tettük láthatóvá.

Az értékelés során a gyermek (vizsgált személy) alléljeit a két szülő alléljeihez viszonyítottuk, azaz a kapott termékek mintázatát értékeltük. Azokat a markereket, amelyekre nézve a család tagjai homozigóták (két azonos méretű allél) voltak, az értékelésnél nem tudtuk figyelembe venni, és a „nem informatív” megjelölést alkalmaztuk (1. ábra: A.). Azokat a markereket sem

vettük figyelembe, amelyekre nézve a családtagok ugyan heterozigóták voltak, de minden családtag mintájában ugyanaz a két allél fordult elő, hiszen ilyen mintázat esetén nem állapítható meg a gyermek (vizsgált személy) alléljeinek szülői eredete. A mikroszatellita marker analízis szempontjából csupán azok a markerek informatívak, amelyekre nézve a családtagok heterozigóták, és a két szülő legalább az egyik allélméretben különbözik egymástól (1. ábra: B.).



1. ábra: A. egy „nem informatív” megjelölésű marker képe: a gyermek és a szülők egyaránt homozigóták (két azonos méretű allél) B. informatív marker mintázat: mindhárom vizsgált személy heterozigóta, a szülők termékei különböző méretűek (M.: az anya, Gy.: a gyermek, P.: az apa mintája)

5. Eredmények

Az 1998-2005 májusa között eltelt hét és fél év során összesen 3331 eset cytogenetikai vizsgálatára került sor intézetünkben (1876 karyotípus készült perifériás vérből, 1270 amnion, 83 chorion és 102 fibroblast minta feldolgozását és értékelését végeztük el). Ebben az időszakban 889 metafázisos és interfázisos FISH vizsgálat, valamint 2002 májusa óta 890 magzati mintán (amnionon és chorionon egyaránt) végzett interfázisos FISH elemzés készült, a vizsgálatok száma évről évre folyamatosan növekszik.

Az említett 3331 eset közül 387 volt kóros (11,7 %). 208 mintában (6,25 %) hagyományos cytogenetikai vizsgálatokkal kimutatható és pontosan verifikálható volt a rendellenesség. 120 esetben (3,60 %) a hagyományos módszerek alkalmazásával ismertük fel az eltérést, de pontos eredményre csak FISH vizsgálatokkal tudtunk jutni. 59 olyan esetünk volt (1,78 %), amelyeknél a rendellenességet FISH technika alkalmazása nélkül fel sem ismertük volna. Mindezek alapján elmondható, hogy a FISH technika alkalmazása jelentős mértékben támogatta a diagnosztikus munkát. Az egyes alkalmazási területek eredményeit az alábbiakban ismertetem.

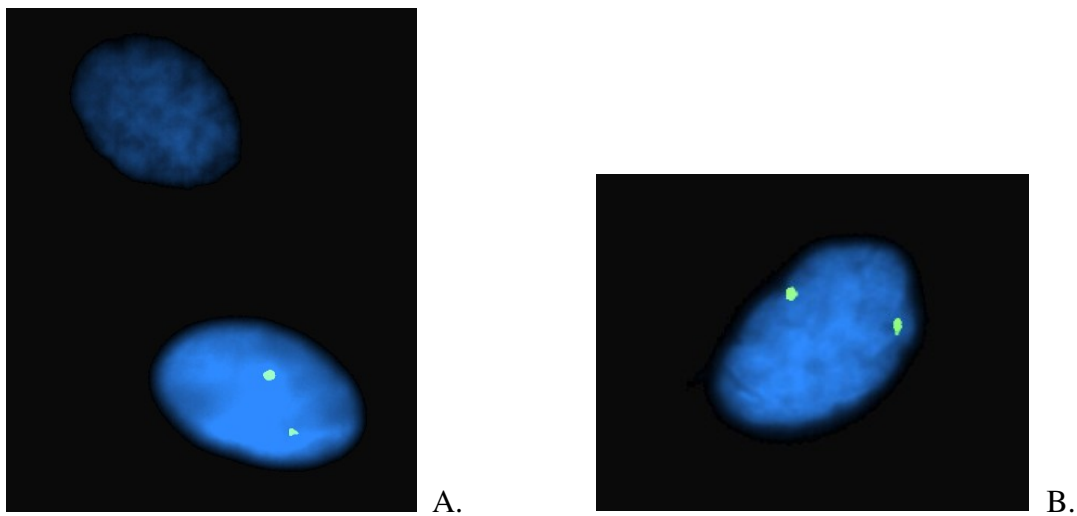
5.1. FISH alkalmazása interfázisos sejtmagokon

5.1.1. Szöveti mozaikosság

Az egyik betegcsoportban - amelybe olyan személyek tartoznak, akiknél vagy a vér lymphocyták vizsgálatával észleltük a mozaikosságot, vagy pedig a jellemző klinikai képhez viszonyítva szokatlanul enyhe tüneteket figyeltünk meg – a számbeli kromoszóma rendellenességek kiterjedt elemzése céljából különféle szövetekből (buccalis nyálkahártya, bőrbíopsziából indított fibroblast

kultúra sejtjei, vizeletüledékben található laphámsejtek, hajgyökér sejtek, esetenként izomszövet sejtjei) vett mintákon interfázis FISH vizsgálatokat végeztem (2. ábra).

16 beteg esetében került sor – a hagyományos cytogenetikai vizsgálatot követően – az említett szövetek sejtjein interfázis FISH analízisre, amely segítségével a 9-es, 13-as, 18-as és 21-es, valamint az X és Y kromoszómák számbeli rendellenességeinek arányát vizsgáltam (lásd a következő 2 táblázatot).



2. ábra: IF FISH a 3.eset vizeletüledék laphámsejtjein (A.) és buccalis kenetén (B.) (zöld színben az X kromoszóma jele látható)

Klinikai probléma:	Rutin cytogenetikai vizsgálat	Perifériás vér: IF FISH	Buccalis kenet: IF FISH	Vizeletüledék laphámsejtek: IF FISH	Fibroblast sejtek: IF FISH	Egyéb szövet: IF FISH
1. eset: Turner sy., mozaik marker X krom.	45,X (80%)/ 46,X, mar(X) (20%)	-	46,X, mar(X) (100%)	45,X (30%)/ 46,X, mar(X) (70%)	-	-
2. eset: Turner sy.; alacsony növés, sex. infant., enyhe tünetek	45, X (100%)	-	45,X (100%)	45,X (100%)	45,X (100%)	hajgyökér s. 45,X (100%)
3. eset: Turner sy., alacsony növés, minor anomáliák	45,X (22%)/ 46,XX (78%)	-	45,X (16%)/ 46,XX (84%)	46,XX (100%)	-	-
4. eset: mentális retardáció	46,XY(72%)/ 46,XX (28%)	-	46,XY(80%)/ 46,XX (20%)	46,XY(78%)/ 46,XX (22%)	46,XY(95%)/ 46,XX (5%)	herebiopszia 46,XY (100%)
5. eset: Down szindróma	46,XX (12%)/ 47,XX,+21 (88%)	-	46,XX (50%)/ 47,XX,+21 (50%)	46,XX (67%)/ 47,XX,+21 (33%)	-	-
6. eset: Down szindróma enyhe tünetekkel	46,XY(10%)/ 47,XY,+21 (90%)	-	46,XY (4%)/ 47,XY,+21 (96%)	46,XY (12%)/ 47,XY,+21 (88%)	-	-
7. eset: Down szindróma enyhe tünetekkel	47,XY,+21 (100%)	-	-	46,XY (88%)/ 47,XY,+21 (12%)	-	-
8. eset: mozaik 9-es triszómia, többszörös fejl. rendellenesség	46,XX (83%)/ 47,XX,+9 (17%)	46,XX (86%)/ 47,XX,+9 (14%)	46,XX (84%)/ 47,XX,+9 (16%)	-	46,XX (100%)	izomszövet: 46,XX (100%)

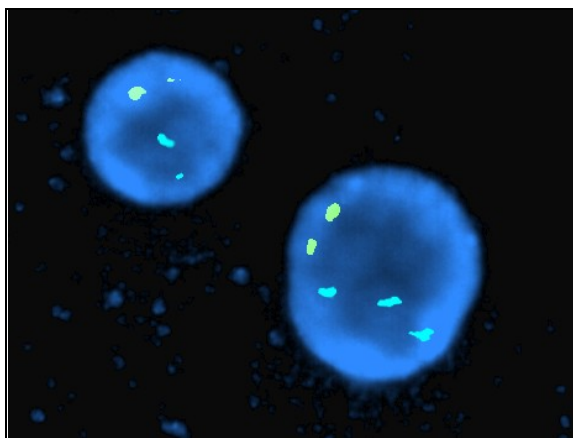
1. táblázat: az 1-8. mozaikos esetek adatai

Klinikai probléma:	Rutin cytogenetikai vizsgálat	Perifériás vér: IF FISH	Buccalis kenet: IF FISH	Vizeletüledék laphámsejtek: IF FISH	Fibroblast sejtek: IF FISH	Egyéb szövet: IF FISH
9. eset: mozaik 9-es triszómia (kiegyensúlyozatlan transzlok., többsz. fejl. rendell.)	46,XX,del(7p) (74%)/ 47,XX,del(7p)+9 (26%)	46,XX,del(7p) (74%)/ 47,XX,del(7p)+9 (26%)	46,XX,del(7p) (86%)/ 47,XX, del(7p)+9 (14%)	46,XX,del(7p) (90%)/ 47,XX, del(7p)+9 (10%)	-	-
10. eset: mozaik 13-as triszómia, enyhébb tünetekkel	47,XX,+13 (100%)	47,XX,+13 (92%)/ 46,XX (8%)	47,XX,+13 (100%)	47,XX,+13 (100%)	47,XX,+13 (76%)/ 46,XX (24%)	-
11. eset: mozaik 18-as triszómia, enyhe tünetekkel	47,XX,+18 (100%)	47,XX,+18 (75%)/ 46,XX (25%)	47,XX,+18 (94%)/ 46,XX (6%)	-	47,XX,+18 (93%)/ 46,XX (7%)	-
12. eset: primer amenorrhaea	45,X0 (30%)/ 46,XY (70%)	45,X0 (34%)/ 46,XY (66%)	45,X0 (34%)/ 46,XY (66%)	45,X0 (40%)/ 46,XY (60%)	-	-
13. eset: Edwards vagy DiGeorge sy.	47,XX,+18 (100%)	47,XX,+18 (90%)/ 46,XX (10%)	-	-	-	-
14. eset: Klinefelter szindróma	45,X (100%)	45,X (100%)	45,X (100%)	-	-	herebiopszia 45,X (100%)
15. eset: minor anomáliák	sikertelen	47,XX,+18 (10%)/ 46,XX (90%)	-	-	-	-
16. eset: Edwards szindróma	47,XY,+18 (100%)	47,XY,+18 (64%)/ 46,XY (36%)	47,XY,+18 (64%)/ 46,XY (36%)	-	-	-

2. táblázat: a 9-16. mozaikos esetek adatai

Tizennégy beteg mintáiban a vizsgált mozaik aneuploidiák esetében a különféle szövetekben eltérő arányú mozaikosságot észleltem. A fennmaradó két eset (2. és 14.) abból a csoportból került ki, ahol a szokatlanul enyhe klinikai tünetek alapján vetődött fel a kromoszómális szöveti mozaikosság gyanúja, a hagyományos cytogenetikai vizsgálat eredménye azonban kizárólag kóros sejtek jelenlétét mutatta. Ebben a két esetben a különféle szövetekből származó sejtek vizsgálata sem igazolta normális sejtvonal jelenlétét. (Mivel a 14. esetben a kapott eredményeket a gyermek fenotípusát figyelembe véve nem tudtuk értelmezni, további vizsgálatokat végeztünk. Ezek eredményét a 26. oldalon leírt 29. esetről ismertetem.)

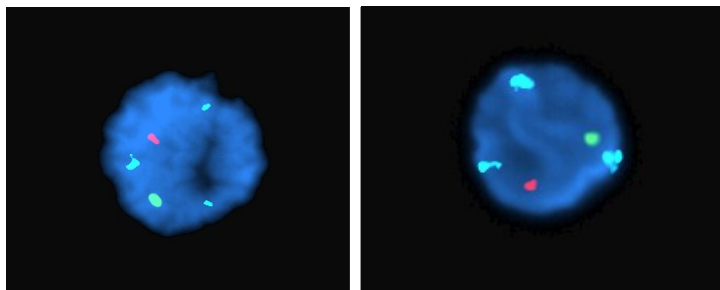
Ugyanebbe a csoportba sorolható további 5 eset (7., 10., 11., 13. és 16.), amelyeknél a hagyományos cytogenetikai elemzés szintén 100%-ban kóros sejteket mutatott, a további vizsgálatok azonban igazolták a normális sejtvonal jelenlétét a szervezet más szöveteiben (3. és 4. ábrák).



3. ábra: IF FISH a 11. eset perifériás vérmintáján (a zöld szignál az X, a kék, ún. aqua a 18-as kromoszómákat jelöli)

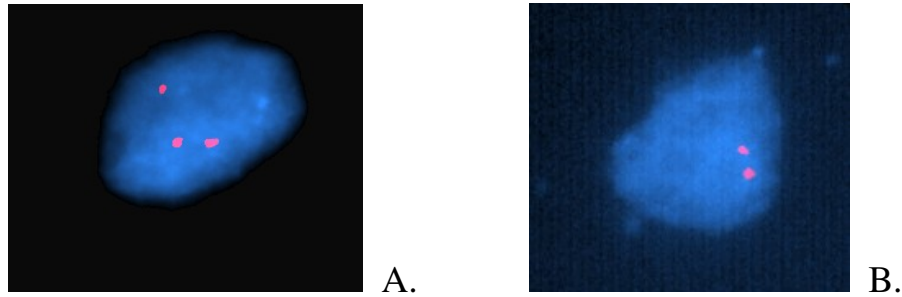
Figyelemre méltó, hogy a 2. és 14. esetekben, amelyeknél az enyhébb klinikai tüneteket nem sikerült a szervezetben jelenlévő normális sejtvonallal megindokolni – az általunk vizsgált mintákban legalábbis nem -, a nemi kromoszómák eltéréséről volt szó, a fennmaradó öt esetről azonban a 13-as (10.

eset), a 18-as (11., 13. és 16. esetek) és a 21-es (7. eset) kromoszómák triszómiájáról (3. ábra). Ez utóbbiak közül a 13-as és 18-as triszómiát hosszú távon az élettel összeegyeztethetetlennek tartjuk (az öt esetből négy ide sorolható). A hosszabb túlélés, illetve szokatlanul enyhe tünetek tehát ebben a csoportban nagyobb esélyt jelentenek a kromoszómális szöveti mozaikosság vizsgálatára, ill. ilyen vizsgálatok indikációjának pontosabb körülírására. (A 15. esetben is 18-as triszómia volt a klinikai diagnózis, de az újszülött vérmintájának hagyományos cytogenetikai vizsgálatát a preparátum rendkívül rossz minősége miatt nem tudtuk elvégezni, az interfázis FISH módszere azonban legalább a felvetett diagnózist igazolta.)



4. ábra: IF FISH a 16. eset buccalis kenetén és perifériás vérmintáján (a piros szignál az Y, a zöld az X, az aqua a 18-as kromoszómát jelöli)

Nyolc esetben (1., 3., 4., 5., 6., 8., 9. és 12. esetek) a hagyományos cytogenetikai vizsgálat is észlelte a mozaikosságot, a különféle szövetek sejteinek elemzése a normális és kóros sejtek arányát volt hivatott megállapítani (5. ábra), ami minden esetben eltérőnek bizonyult (a 8. esetet részletesen ismertető publikáció: Morava és mtsai, 2002a). A 13., 15. és 16. esetekben a mozaikosság további vizsgálatára az újszülöttek elhalálása miatt nem kerülhetett sor.



5. ábra: a 6. eset buccalis kenetének(A) és vizeletüledékének (B) sejtjein végzett IF FISH (21-es kromoszóma: piros szignál)

Vizsgálataink eredménye magyarázatot adott néhány jelenségre: változó expresszivitás (8. és 9. esetek), letális kórképekben meglepő túlélési idő (10. és 11. esetek), Turner (1. és 3.eset) és Down szindróma enyhe tünetekkel (5., 6. és 7. esetek).

Eredményeink azt mutatják, hogy a vizsgált mozaik aneuploidiák többségében a különféle szövetekben eltérő arányú mozaikosság észlelhető. Hasonló esetekben tehát a pontos diagnózis felállításához szükség lehet többféle, a lehető legkevésbé invazív beavatkozással nyerhető szövetminta analízisére. Az eredmények továbbá megerősítik azt a feltételezést, miszerint az emberi szervezetben a mozaikosság – beleértve a kóros genotípusú sejtek szövetek közti eltérő arányát is – nagyobb szerepet játszik a fenotípus kialakításában és a prognózis meghatározásában, mint ahogy azt jelenlegi ismereteink alapján gondoljuk.

5.1.2. Magzati szűrés

A mozaikos esetek feldolgozása során kifejlesztett technikát alkalmazva lehetőségem nyílt tenyésztetlen amnionsejteken a gyakori aneuploidiaák kimutatását célzó szűrővizsgálati módszer beállítására. A számbeli eltérések vizsgálatára irányuló szűrőprogramban eddig több mint 890 minta feldolgozása során a fénymikroszkópos metafázisos kromoszómaelemzés mellett minden esetben elvégeztem az interfázis FISH-t a 13-as, 18-as, 21-es, valamint az X és Y kromoszómák számbeli eltéréseinek detektálására.

Kiemelhető az eredmények közül, hogy az interfázis FISH és a párhuzamosan elvégzett tenyésztés eredménye egyetlen esetben sem tért el. 30 pozitív esetről (3,37 %) a fent említett kromoszómák számbeli eltérését mutattuk ki. További 10 esetben más kromoszómákat érintő rendellenességet detektáltunk: 3 mintában számfeletti marker kromoszómát, 7 esetben pedig különféle transzlokációkat (5 kiegyensúlyozott, 2 kiegyensúlyozatlan) észleltünk a metafázisos kromoszóma vizsgálat során. Az egyik kiegyensúlyozatlan transzlokációt mutató magzat esetében az egyik szülő ismert hordozó, emiatt a metafázisos analízis volt a vizsgálat elsődleges célja. Az eddig elemzésre került 890 minta közül tehát mindössze két, abnormális fenotípus kialakulásához vezető rendellenesség maradt felderítetlen az interfázis FISH analízis alkalmazásával (0,23 %).

Az IF FISH előnye a hagyományos metafázisos analízissel szemben, hogy lényegesen kisebb a munkaigénye (igaz, nagyobb anyagi ráfordítást igényel), s hogy a mintavétel után két nappal megvan az eredmény. Tapasztalataink alapján ezért megfogalmaztuk azt az irodalomban korábban már felvetett javaslatot, hogy e megbízható, gyors teszt szűrőmódszerként bizonyos indikáció, mindenek előtt magas anyai életkor esetén kiválthatja a mintegy 2 hetet igénybe vevő metafázis-készítést (Hadzsiev és mtsai, 2005; közlésre előkészítve).

5.2. FISH alkalmazása metafázisos kromoszómákon

5.2.1. Multiplex fejlődési rendellenességet okozó szerkezeti kromoszómahibák

A FISH alkalmazása a hagyományos cytogenetikai technikák kiegészítéseként jelentős előrelépést jelentett a legkülönbözőbb kromoszómális eltérések (számbeli, szerkezeti, mozaikos formában jelentkező) pontos feltérképezésében, ami a helyes diagnózis megállapításához elengedhetetlen.

A kromoszóma szerkezeti eltérések azonosítása céljából végzett FISH vizsgálatokat teljes kromoszómára specifikus, ún. painting próbák, valamint az egyes kromoszómák alpha satellita, centromerikus, ill. telomerikus régióira specifikus és single copy próbák alkalmazásával végeztem kettős, ill. többes festések segítségével. Beállítottam továbbá egy specifikus próbákat alkalmazó szűrőmodszert olyan szubtelomerikus átrendeződések detektálására (de Vries és mtsai, 2003; Flint és mtsai, 2003; Hélias-Rodzewicz és mtsai, 2002), amelyek fénymikroszkóppal nem ismerhetők fel, s elsősorban idiopathiás mentális retardációban várható előfordulásuk.

A továbbiakban összesen 30 kromoszóma szerkezeti eltérés pontos azonosítását ismertetem (3. és 4. táblázatok), ezek közül két esetben komplex átrendeződést (Houge és mtsai, 2003) találtunk. A bemutatott esetek zömében a G-sávok elemzés eredménye alapján felvetett szerkezeti rendellenességek pontosítása volt a FISH vizsgálat célja. Néhány esetben (5., 25. és 30.) a vizsgált személy egy bizonyos kromoszómális rendellenességre utaló fenotípusos jegyei miatt került sor további vizsgálatokra. A 14. számú esetben a FISH elemzés feladata egy kiegyensúlyozott transzlokáció hordozásának megállapítása volt, mivel a kérdéses kromoszómális régió áthelyeződése G-sávok technika alkalmazásával nem észlelhető.

Eset	A vizsgálat indikációja	G-sávós eredmény	FISH eredmény
1.	Turner szindróma	45,X (30%)/46,X,+mar(70%)	45,X/46,X,idi(Y)(q11)
2.	craniodysplasia, izom-hypotonia, minor anomáliák	46,X,del(Yq)	del(Y)(q12)
3.	szellemi elmaradás	46,XY/47,XY,+8/47,XY,+mar	a marker azonosítása: r(8)
4.	Edwards szindróma	46,XY,t(6;14)	46,XY,t(4;6;14)(q26;q16;p11),del(4)(qter)
5.	hypospadiasis, többsz. fejl. rendellenesség: del(18q)?	46,XY(?)	46,XY,del(18)(qter)
6.	hypophosphatasia	46,X,del(Xp)	46, X,del(X)(p22.3)
7.	alacsony növés	46,X,del(Xp)	46, X,del(X)(p22.3)
8.	minor anomáliák, növekedésbeli elmaradás	46,XY,del(2q)	46,XY,del(2)(q33.3)
9.	alacsony növés	46,XX,t(1;20)	46,XX,t(1;20)(p11.1;q11.1)
10.	hypotonia, megkésett mozgásfejlődés	46,XX,13q+	46,XX,t(7;13),del(13)(qter)
11.	Down szindróma	46,XX,9p+,10q+,22q-	46,XX,t(10;22)(q26;q12),dup(9p),del(9)(pter)
12.	minor anomáliák, pszichomot. elmaradás	46,XX,18p+	46,XX,der(18),t(18;20)(p11.1;p11.1)pat
13.	alacsony növés, szellemi elmaradás	46,XX,13q+	46,XX,dup(13)(q12→q14)
14.	t(5;18) hordozó (?)	46,XX(?)	46,XX,t(5;18)(qter;qter)
15.	magzati szűrés (Down?)	46,XY (70%)/46,XY,+F (30%)	46,XY (70%)/46,XY,+20 (30%)

3. táblázat: G-sávós technikával észlelt, ill. a fenotípus alapján felvetett kromoszóma szerkezeti eltérések FISH-sel történt pontosítása I.

Eset	A vizsgálat indikációja	G-sávós eredmény	FISH eredmény
16.	trigonocephalia, minor anomáliák	46,XY,del(2p)	46,XY,der(2)t(2;17)(p25;q24)pat
17.	minor anomáliák	46,XY,t(12;15)(p11;p11)	46,XY,t(12;15)(q13;q15)
18.	minor anomáliák, szellemi elmaradás	46,XY,t(2;14)	46,XY,t(2;14)(q11;q24)
19.	hiperpigmentáció a bőrön, café au lait foltok	46,XX,r(15)	a töréspontok pontosítása (lásd: Morava és mtsai, 2003(a))
20.	minor anomáliák	47,XX,+der(15)	47,XX,+der(15)(pter→q14)
21.	minor anomáliák	47,XY,+der(9),t(9;21)	47,XY,+der(9),t(9;21)(q13;p13)mat
22.	minor anomáliák	46,XX/46,XX,r(18)/45,XX,-r(18)	46,XX,del(18p)/46,XX,r(18)/45,XX,-r(18)
23.	Turner szindróma	45,X	45,X (95%)/46,X,i(Yp) (5%)
24.	magzati szűrés (Down?)	46,XY,-B,+C	46,XY,t(2;5)(q32;q14)
25.	gynecomastia (intersexualitás?)	46,XX(?)	46,XX,t(Xp;Yp)
26.	minor anomáliák	46,XX,14p+	46,XX,der(14),t(14;X)(p12;p11)
27.	magzati szűrés (Down?)	46,XX,t(2q;6q)	46,XX,t(2q;6q)(6q;11q)(11q;3q)(3q;2q)
28.	amenorrhoea	46,XY	SRY régió detektálása
29.	Klinefelter	45,X	45,X,t(16;Y)(p13.3;p11.2)
30.	minor anomáliák, szellemi elmaradás*	46,XX	46,XX,del(9p)

4. táblázat: G-sávós technikával észlelt, ill a fenotípus alapján felvetett kromoszóma szerkezeti eltérések FISH-sel történt pontosítása II.

(* = szűrés szubtelomerikus átrendeződésre)

A FISH által nyújtott többlet információ az elmúlt évek gyakorlatában sok eset megoldásához nélkülözhetetlennek bizonyult, többek között annál a Turner szindróma gyanújával intézetünkbe utalt fiatal lánynál (1. eset), akinél a rutin kromoszómavizsgálat két sejtvonal jelenlétét mutatta (45,X/46,X,+mar), a sejtek 70 %-ában egy marker kromoszómával. Turner szindrómában az Y kromoszóma eredetű fragmensek jelenléte nem ritka jelenség, ezért Y α satellita próbát alkalmaztunk, ami isodicentrikus Y kromoszómaként azonosította a marker kromoszómát. A marker mérete alapján feltételezhető volt az Y hosszú kar jelentős részének hiánya, amit az Yq12 régiót jelölő próbával igazoltunk (Morava és mtsai, 2000c).

A marker kromoszómák azonosítása a hagyományos kromoszóma vizsgálati módszerekkel nem megoldható, ezekben az esetekben szintén a FISH nyújthat segítséget. Az elmúlt években egy az édesanya toxoplazmafertőzését követően kialakult mozaik 8-as triszómia szindrómás eset (3. számú) vizsgálata során a mos 46,XY[60]/47,XY,+8[13]/47,XY,+mar[27] karyotípust állapítottuk meg; a marker kromoszóma a 8-as painting próbával készült vizsgálat alapján 8-as gyűrűnek bizonyult (Morava és mtsai, 2002b).

Egy másik, 15-ös gyűrűkromoszómás eset (19. számú) FISH vizsgálatakor a gyűrű azonosítása mellett nagyobb jelentősége volt a gyűrűkromoszóma képződésekor kialakult töréspontok, valamint a hiányzó szakaszok pontosabb meghatározásának, mivel a gyermek fenotípusa meglehetősen eltérő volt az irodalomban addig ismertetett hasonló esetekhez képest (Morava és mtsai, 2003a). Az alkalmazott single copy és sáv-specifikus próbák által adott eredmény nem utalt jelentős méretű (kódoló) szakasz deléciójára (a vizsgálatok egy része a Drezdai Egyetem Klinikai Genetikai Intézetében történt).

Egy alacsony növésű és szellemileg elmaradott 7 éves gyermekben (13. eset) a cytogenetikai vizsgálat a 13-as kromoszóma szubtelomerikus

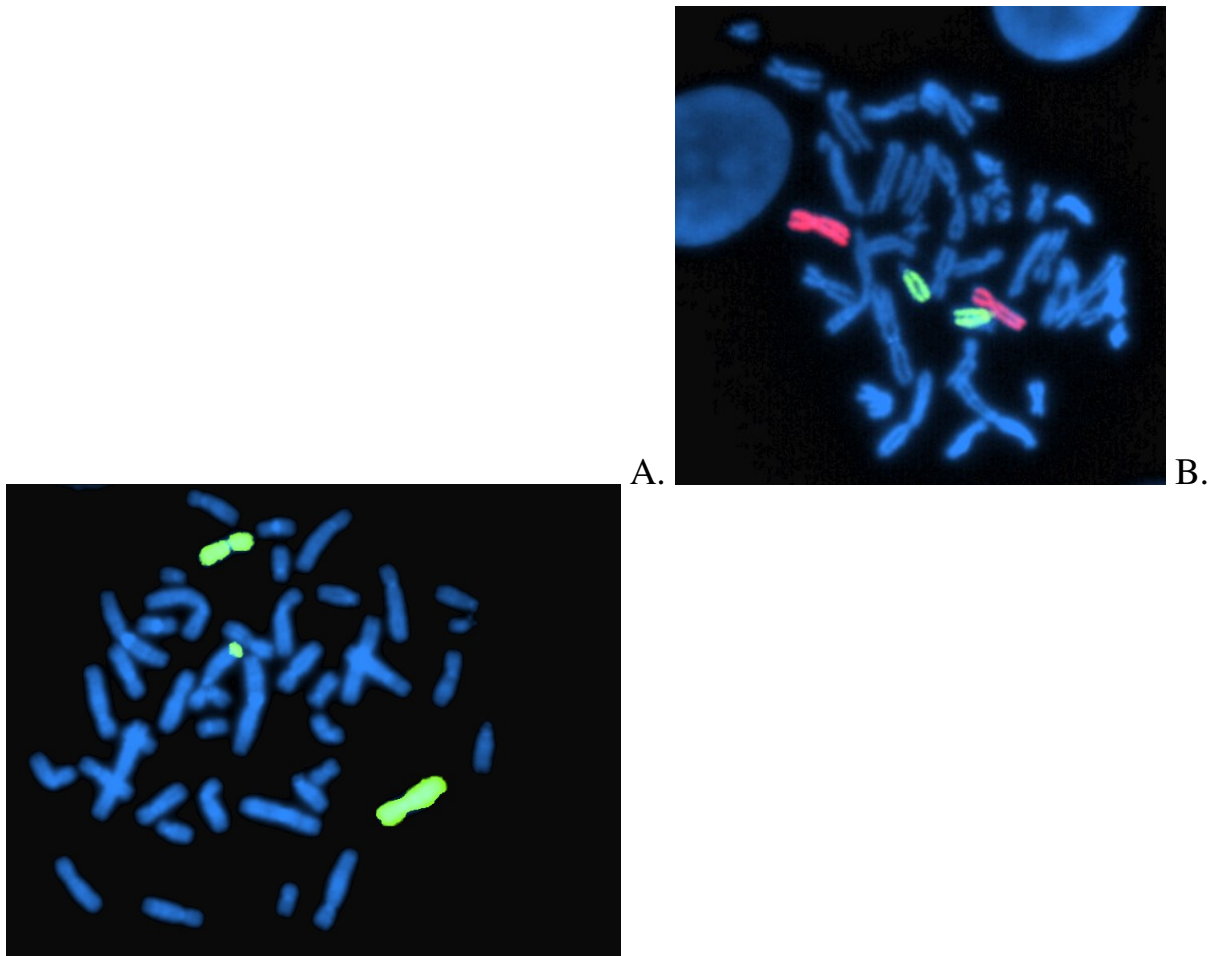
régiójában egy többlet kromoszómadarab jelenlétét mutatta. A kérdéses kromoszómális szakasz FISH vizsgálata a darabot 13-as kromoszóma eredetű anyagként (13-as painting próba), ezen belül a 13q14 régióban bekövetkezett duplikáció által létrehozott plusz sávként azonosította (13q14 régióra specifikus próba). A kapott eredmény ebben az esetben nem csupán a diagnózis megállapítása, hanem a gyermek későbbi klinikai követése szempontjából is fontos volt, hiszen a duplikált régió érintettsége fokozott osteosarcoma és retinoblastoma kockázatot jelenthet (Hermann és mtsai, 2000).

A 2-es kromoszóma hosszú kar distalis szakaszának eltérése vetődött fel a karyotípusa alapján egy 18 hónapos gyermekben (8. eset), akinél több minor anomáliát és súlyos növekedésbeli elmaradást állapított meg a klinikai vizsgálat. Az eltérés a 2q33.3 sáv interstitialis deléciója volt, aminek a pontos körülhatárolása, a töréspontok meghatározása az érintett régióba eső YAC klónok FISH reakcióban történő alkalmazását kívánta meg (a vizsgálatokat a Zürichi Egyetem Orvosi Genetikai Intézetében végeztem) (Riegel és mtsai, 2001).

A G-sávós cytogenetikai vizsgálat a több sávot érintő kromoszóma szerkezeti eltérések, különösen a transzlokációk feltárásakor megfelelő módszer lehet az átrendeződés felismerése mellett annak pontos jellemzésére is. Azokban az esetekben azonban, amikor a szerkezeti eltérés egészen kis, illetve hasonló sáv-mintázatú szakaszokat érint, már elengedhetetlen a fluorescens próbák alkalmazása. Ez rendkívül fontos, mert familiáris kromoszómális rendellenesség esetén az eltérés pontos ismerete lehetőséget teremt egy leendő terhességben magzati kromoszómavizsgálatra. Ennek kivitelezése mind a rendelkezésre álló idő rövide, mind pedig az amniocentézis útján nyert sejtek tenyésztésével kapott kromoszómák olykor gyengébb minősége miatt feltételezi a FISH alkalmazását. Egy már ismert eltérés specifikus próbákkal sokkal gyorsabban és pontosabban vizsgálható a magzat kromoszómáin.

Egy pszichomotoros elmaradás és minor anomáliák miatt vizsgált gyermekben (12. eset) a G-sávos eredmény a 18-as és 20-as kromoszómák rövid karjainak enyhe megnagyobbodására utalt. Mivel a szülők vizsgálata során az édesapa kromoszómáin is látható volt a 18p eltérés, FISH technika pedig a lelet elkészültének idején nem állt rendelkezésre, lehetséges polimorfizmusként értékelték az eredményt. A FISH bevezetése után a két említett kromoszómára specifikus painting próbákkal az édesapában a 18-as és 20-as kromoszómák rövid karjai közötti reciprok (teljes kart érintő) transzlokációra derült fény, ami a gyermekben kiegyensúlyozatlan formában volt jelen (18p monoszómia és 20p triszómia) (Czakó és mtsai, 2002). A családban két évvel ezelőtt az idősebb testvér vizsgálatára is sor került a hordozó státusz kizárására, valamint egy újabb terhességben (az említett FISH próbák alkalmazásával) a születendő magzat genotípusának megállapítására.

Hasonlóan az eddigiekhez egy súlyos izomhypotoniával, hydrocephalussal és ízületi kontraktúrákkal vizsgált gyermekben (10. eset) parciális 7q triszómiát állapítottunk meg, ami az édesanya $t(7;13)(q34;q34)$ kiegyensúlyozott transzlokációjának (6. ábra) kiegyensúlyozatlan formában történő öröklődésével magyarázható (Morava és mtsai, 2003b). Az édesanya következő terhességében a megfelelő painting próbák alkalmazásával végeztük a magzat vizsgálatát.

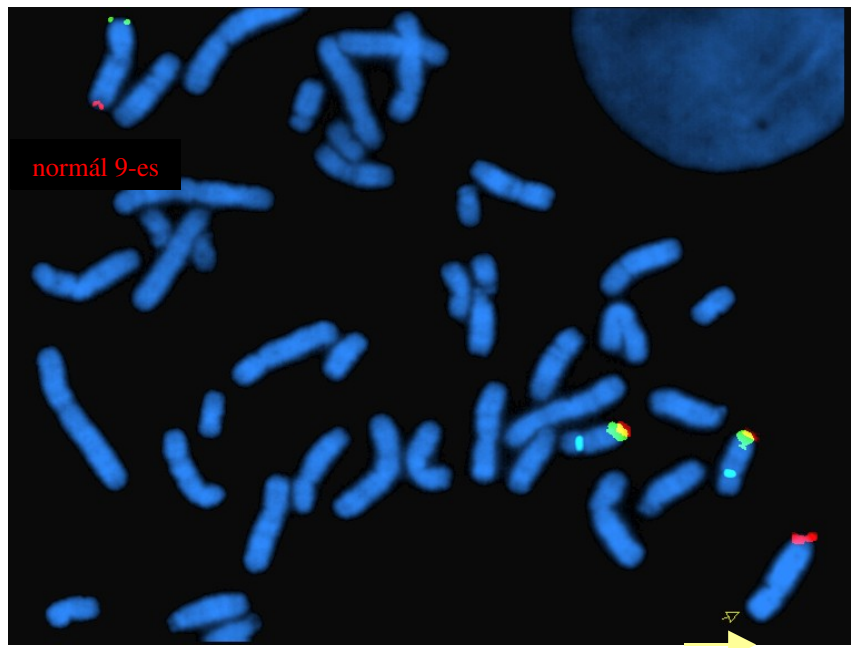


6. ábra: A: az édesanya metafázis FISH vizsgálata (zöld színű a 7-es painting próba jele) – a transzlokálódott 7q szegmens a 13q terminális szalacson látható; B: 7-es (piros) és 13-as (zöld) painting próbák a magzat metafázisán (normál mintázat)

Egy apai kiegyensúlyozott $t(2;17)(p25;q24)$ transzlokációt (majd kiegyensúlyozatlan átadását a gyermekben) a 2-es és 17-es kromoszómák telomerikus régióit jelölő próbákkal tártunk fel (16. eset) (Czakó és mtsai, 2004).

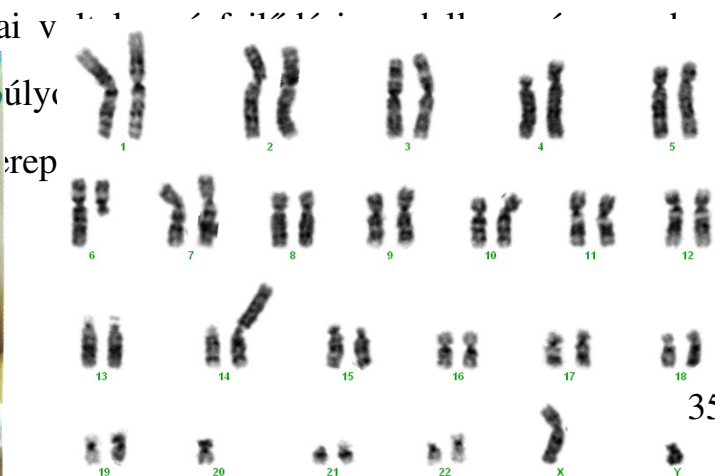
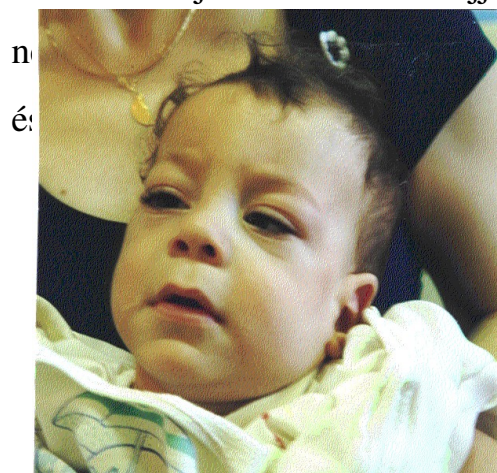
Egy Klinefelter szindróma gyanúja miatt vizsgált fiúnál (29. eset) az Y és 16-os kromoszómák közötti kiegyensúlyozatlan transzlokációra derítettünk fényt (Kellermayer és mtsai, 2005), akinek rutin fénymikroszkópos vizsgálata 45,X karyotípust mutatott. FISH nélkül e meglepő lelet megmagyarázhatatlan maradt volna. Így azonban kiderült, hogy a férfias genitalia kialakulásához szükséges Y régió mégis jelen van, a fiú mentális retardációja viszont a 16-os kromoszóma rövid karjának parányi deléciója miatt alakult ki.

Egy minor anomáliák és szellemi elmaradás miatt vizsgált gyermeknél (30. eset) a G-sávos elemzés normális karyotípust mutatott. Mivel a klinikai tünetek egyértelműen kromoszómális rendellenességre utaltak, elvégeztük a szubtelomerikus átrendeződések vizsgálatát, amely az egyik 9-es kromoszóma rövid karjának szubtelomerikus régiójában deléciókat igazolt (7. ábra). A kérdéses régió kiegyensúlyozott transzlokációját a gyermek szüleiben nem tudtuk kimutatni (de novo rendellenesség a gyermekben).



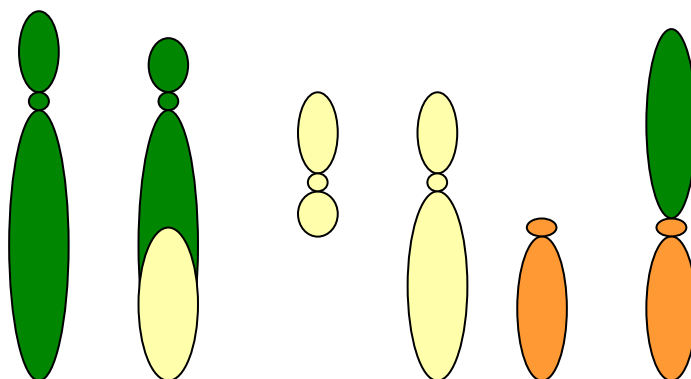
7. ábra: a 9-es kromoszóma rövid kar szubtelomerikus régió deléciója (30. eset)

Komplex kromoszóma szerkezeti átrendeződést eddig mindössze két esetben vizsgáltunk. Az első egy 3 éves fiú gyermek (4. eset) volt, aki terminusra, kis súllyal született. Többszörös minor anomáliák (brachycephalia, alacsonyan ülő fülek, duzzadt szem körüli régió, strabismus, benyomott orrgyök, felfelé mutató orrnyílások, gótikus szájpád és micrognathia) mellett a 18-as triszómiára jellemző átfedő ujjai v



8. ábra: komplex kromoszóma szerkezeti átrendeződéssel vizsgált betegünk arcképe és G-sávós karyogramja

Cytogenetikai vizsgálati eredménye a 6-os és 14-es kromoszómák közti kiegyensúlyozott transzlokációra, valamint a 4-es kromoszóma rövid kar esetleges deléciójára utalt (8. ábra). A 4p16.3 régióra specifikus, valamint a 4-es, 6-os és 14-es painting próbákat kettős festésekben alkalmazva komplex átrendeződést mutattunk ki: a 6-os kromoszóma distalis szakasza (töréspont: q16) a 4-es kromoszóma hosszú karjára transzlokálódott (töréspont: q26). A 4-es hosszú kar (a törésponthoz képest distalisan elhelyezkedő) szakasza a 14-es rövid karra helyeződött át, a 4q telomerikus próba a transzlokált 4-es hosszú karon deléciót mutatott (9. ábra). Mindezek alapján feltételezhető egy negyedik töréspont a 4q distalis szakaszán, illetve hogy a 4q terminális szakasza vett részt az áthelyeződésben. Ennek az összetett folyamatnak az eredménye tehát egy 4q terminális deléció, amely lelet a gyermek fenotípusának megfelelő: „4q-szindróma”.



4 t(4;6) 6 6 14 t(4;14)

9. ábra: A komplex kromoszóma szerkezeti átrendeződés sematikus ábrája

A második komplex átrendeződést egy magzati kromoszómavizsgálat alkalmával (27. eset) fedeztük fel. A vizsgálatokra emiatt viszonylag kevés időnk volt, ez három átrendeződés feltérképezésére adott lehetőséget, azonban az eredmények már ekkor felvetették egy negyedik kromoszóma szerepét is a folyamatban. Mivel az édesanya a részleges eredményeket figyelembe véve is a terhesség kihordása mellett döntött, csak a gyermek megszületése után kerülhetett sor a további vizsgálatokra, amelyek igazolták, hogy négy töréspontot, illetve kromoszómát érintő komplex átrendeződésről van szó: 46,XX,t(2q;6q)(6q;11q)(11q;3q)(3q;2q).

5.2.2. Mikrodeléciós szindrómák

Régió-specifikus festéssel de novo átrendeződések, deléciók és duplikációk vizsgálatát, valamint egy ritka, familiáris rejtett transzlokáció felderítését végeztem.

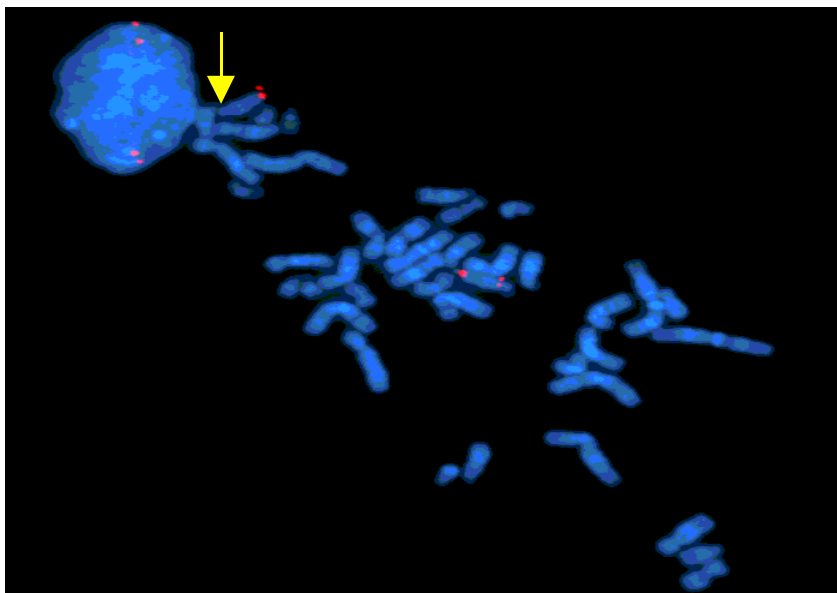
Az 1998-2005 közötti időszakban összesen 412 esetben végeztünk FISH vizsgálatot valamelyik ismert mikrodeléciós szindróma irányában olyan betegeknél, akiknél a klinikai tünetek alapján ennek a kromoszóma szerkezeti eltérésnek a gyanúja felmerült. 59 esetben pozitív eredményt adott a FISH elemzés, azaz a mikrodeléció kimutatható volt (5. táblázat).

Klinikai diagnózis	Esetszám	Mikrodeléció igazolt	Kritikus régió
Prader-Willi szindróma (10. ábra)	85	12	15q11-13
Angelman szindróma	89	3	15q11-13
DiGeorge szindróma/VCFS	96	9	22q11.2
Williams szindróma (11. ábra)	34	13	7q11.23
Wolf-Hirschhorn szindróma	5	1	4p16.3

Cri du Chat szindróma	6	2	5p15.2
Kallmann szindróma	2	1	Xp22.3
Charcot-Marie-Tooth szindróma	21	1 (duplikáció)	17p11.2
X-hez kötött ichthyosis	20	8	Xp22.3
Retinoblastoma	11	2	13q14
Smith-Magenis szindróma	22	2	17p11.2
Miller-Dieker szindróma	21	5	17p13.3
Összesen	412	59	

5. táblázat: mikrodeléció kimutatására végzett FISH vizsgálatok eredményei

A Prader-Willi szindrómás esetek közül egy 4 hónapos csecsemő vizsgálata emelhető ki, akinél a generalizált izomhypotonián kívül mindössze néhány nem specifikus tünetet észleltek a klinikai vizsgálatok alkalmával. A gyermek 2 hónapos korában elvégzett hagyományos cytogenetikai analízis kóros eltérést nem mutatott, a 15q11-13 régió FISH vizsgálatára csupán újabb két hónap után került sor az addig eltelt időszakban kialakult ill. észlelt újabb tünetek (pszichomotoros retardáció, kis kezek és lábak) nyomán. A vizsgálat a deléciót igazolta (10. ábra).

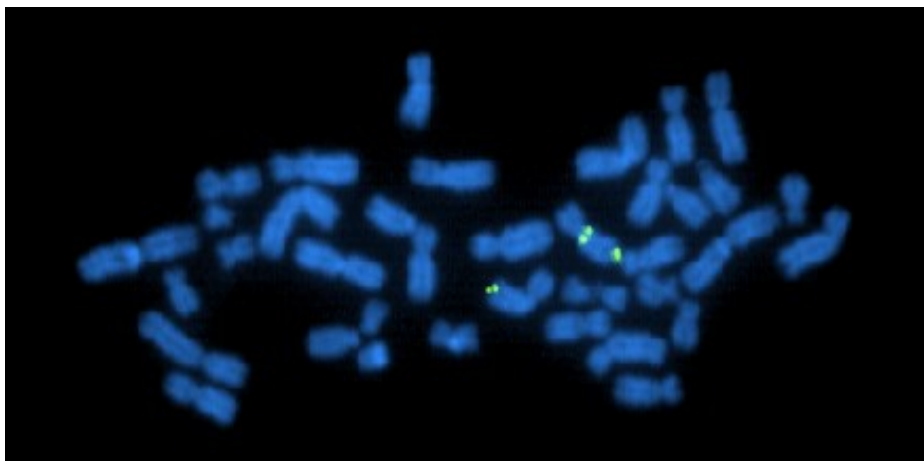


10. ábra: A Prader-Willi szindrómás csecsemő metafázis FISH képe – a mikrodeléció helyét nyíl mutatja

A Prader-Willi szindróma diagnózisát a molekuláris cytogenetikai eredmény birtokában már bizonyossággal fel lehetett állítani, feleslegessé téve ezzel sok egyéb vizsgálat elvégzését, amelyeket az újszülött-, ill. csecsemőkori izomhypotonia differenciáldiagnózisának klinikai protokollja megkíván. Az eset nyomán írt publikációban (Erhardt és mtsai, 2000) felhívtuk a figyelmet az izomhypotoniás újszülöttek/csecsemők esetében a molekuláris cytogenetikai vizsgálat elvégzésére.

DiGeorge, velo-cardio-facialis szindróma és veleszületett szívfejlődési rendellenesség miatt végzett vizsgálatok a 22q11.2 régióban kimutatható mikrodeléció előfordulását tanulmányozó szűrőprogram (Morava és mtsai, 2000a) keretében történtek, amely a DiGeorge és a velo-cardio-facialis szindrómákban, valamint az izoláltnak tartott szívfejlődési rendellenességben eltérő gyakoriságú mikrodeléció és az érintettek fenotípusos jegyei között próbált összefüggést találni. A tanulmány célja az említett három rendellenességben a deléció szűrésére vonatkozó ajánlások megfogalmazása volt, hiszen a kromoszómális eltérés korai felismerése a további családtervezés, a prognózisbecslés, valamint a rehabilitáció szempontjából döntő jelentőségű (Morava és mtsai, 2000b).

Ugyanezen régió (22q11.2) mikrodelécióját mutattuk ki egy parciális coronalis craniosynostosis-sal és veleszületett szívfejlődési rendellenességgel vizsgált újszülöttnél, akinél a craniosynostosisban gyakran vizsgált gének (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3* és *TWIST*) szekvencia analízise mutációt nem tudott kimutatni. A 22q11.2 deléciós spektrum jellemző tünete a szívfejlődési rendellenesség, emellett azonban a craniosynostosis is előfordul. Az újszülött szívfejlődési rendellenessége, dysmorphiás arcvonásai és arachnodactyliája miatt elvégzett FISH vizsgálat mutatta ki a 22q11.2 mikrodeléciót. Mivel a craniosynostosis gyakorisága a 22q11.2 mikrodeléciós betegek körében 1 %, ami jóval magasabb az átlagpopulációban megfigyelthez képest (0,05 %), az esetet bemutató publikációban (Kárteszi és mtsai, 2004) javasoltuk a craniosynostosis mellett szívfejlődési rendellenességet is mutató betegekben a



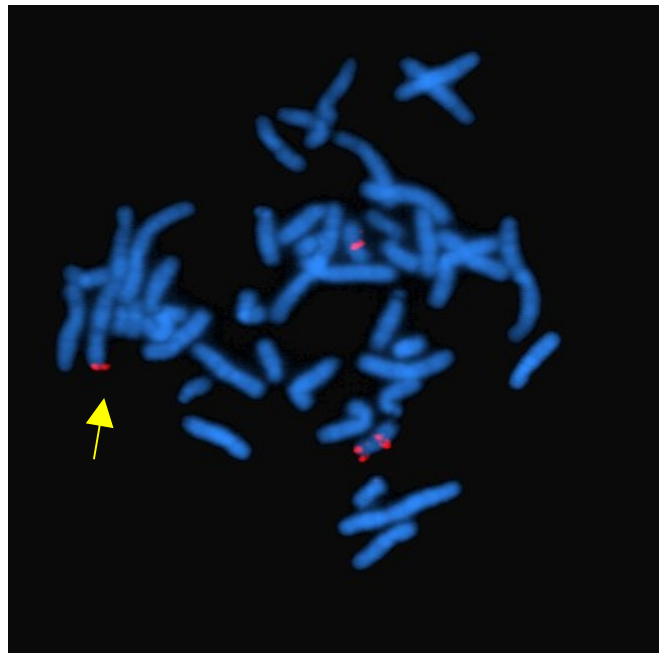
22q11.2 deléció FISH vizsgálatának elvégzését.

11. ábra: az első Williams szindrómás gyermek metafázis FISH képe – a nyíl a mikrodeléció helyét mutatja

Az első Smith-Magenis szindrómás esetet részletesen bemutattuk egy tanulmányban (Kárteszi és mtsai, 2001), amelyben a szellemi és beszédfejlődésükben elmaradt, viselkedészavarban szenvedő gyermekekben a kivizsgálás részeként javasoltuk a 17p11.2 kritikus régió FISH elemzését.

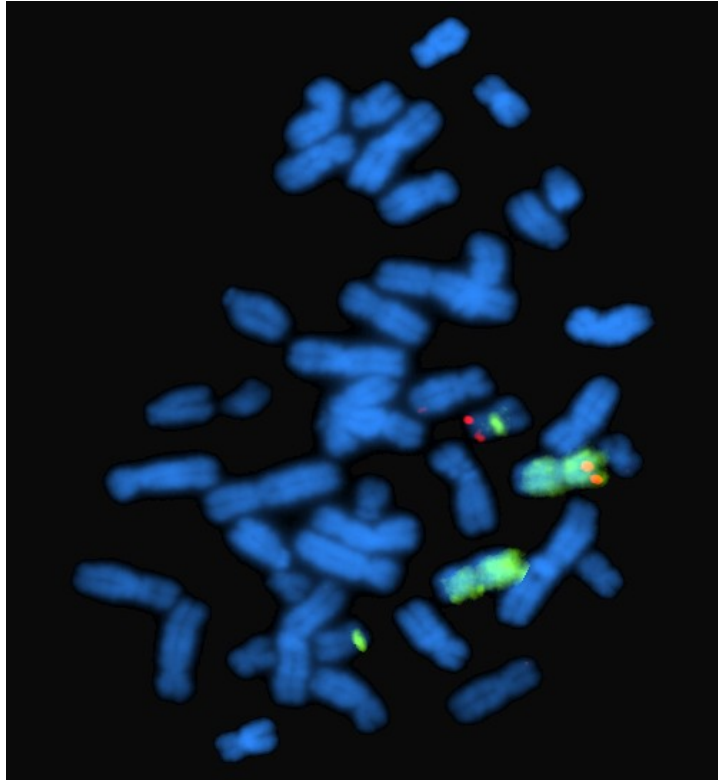
Az első Miller-Dieker szindróma miatt vizsgált családban két elsőfokú unokatestvér esetében a klinikai tünetek alapján felállított Miller-Dieker

szindróma diagnózisát a fent említett régió FISH analízisével megerősítettük, a mikrodéléción mindkét gyermekben kimutatható volt. A familiaritás felvetette a kromoszómális transzlokáció lehetőségét, ezért elvégeztük a szülők mintáinak a vizsgálatát, amely a két édesapa (testvérek) esetében a 17p13.3 régiót egy C-csoportú kromoszóma rövid karjára transzlokálódva mutatta (12. ábra).

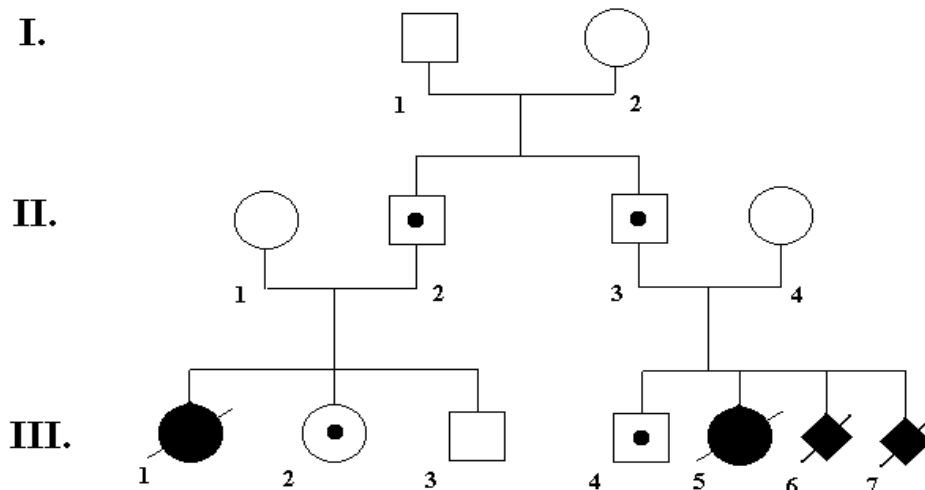


12. ábra: az egyik hordozó édesapa metafázis FISH vizsgálata Miller-Dieker sz. próbával (az érintett 17-es kromoszómán csak a centromerikus szignál látható, a Miller-Dieker régió egy C-csoportú kromoszóma rövid karjára helyeződött át)

Az átrendeződésben részt vevő kromoszómát további FISH elemzésekkel 11-esként azonosítottuk (13. ábra): a két tünetmentes édesapa a $t(11p;17p)$ kiegyensúlyozott szubmikroszkópos transzlokációt hordozza. A két érintett gyermek testvérei közül ketten hordozók, egynek normális a genotípusa (14. ábra). A családoknak felajánlottuk a prenatális vizsgálat lehetőségét, amelyet az egyik házaspár két esetben vett igénybe. Az amniocentézist követő metafázis FISH vizsgálat mindkét magzatban kiegyensúlyozatlan transzlokációt, illetve ennek következtében az érintett 17-es kromoszómán a p13.3 régió mikrodélécióját igazolta.



13. ábra: a $t(11p;17p)$ transzlokáció vizsgálata – a Miller-Dieker régió (piros) a normál 17-es kromoszóma rövid karján és a zöld painting próbával jelölt 11-es kromoszóma rövid karján látható (a 17-es kromoszómákat zöld centromerikus kontroll szignál jelzi)



14. ábra: a Miller-Dieker régiót érintő transzlokáció miatt vizsgált család

5.3. Mikroszatellita markerek szegregálódása

5.3.1. UPD kimutatása ismeretlen eredetű testi-szellemi rendellenességben

DNS polimorfizmus (mikroszatellita markerek) vizsgálatára elsősorban uniparentális disomia (UPD) kizárására került sor (Miozzo et al, 2002; Robinson, 2000a; Robinson és mtsai, 2000b; Knoll és mtsai, 1990).

Silver-Russel szindrómára utaló klinikai tünetek (intrauterin és postnatalis növekedési elmaradás, congenitalis hemihypertrophia ill. test-aszimmetria, jellegzetes arcvonások) miatt 12 családban végeztük el a 7-es kromoszóma uniparentális disomia vizsgálatát mikroszatellita markerek segítségével, UPD-t azonban egyetlen esetben sem sikerült kimutatnunk. Figyelembe véve, hogy irodalmi adatok szerint a Silver-Russel szindrómás esetek 7-10 %-ában mutatható ki csupán a 7-es kromoszóma anyai UPD, nem meglepő, hogy az általunk vizsgált családok közül egynél sem találtuk meg a keresett eltérést.

Beckwith-Wiedemann szindrómában (jellemző a megnagyobbodott nyelv, omphalocele, visceromegalia, hemihypertrophia, ill. fokozott kockázat egyes tumorok kialakulására) hasonló elven 11-es paternális UDP vizsgálatára került sor 21 családban. Annak ellenére, hogy Beckwith-Wiedemann szindrómában 20 %-ra tehető az UPD előfordulása (Kubota és mtsai, 1994), pozitív esetet ebben a csoportban sem találtunk.

A 15-ös kromoszóma UPD két jellegzetes szindróma tüneteit okozhatja a sejtekben jelenlévő 15-ös kromoszómák szülői eredetétől függően. A Prader-Willi szindrómában leírt tünetek a csökkent magzatmozgás, születés után kezdetben etetési nehézségek, később elhízás, izomhypotonia, alacsony növés, értelmi elmaradás, hypogonadotrop hypogonadismus, valamint kis kezek és lábak, ill. jellegzetes arcvonások. A 15-ös kromoszóma anyai UPD az esetek

20-25 %-ában ismert. Az ugyanezen kromoszómapárt érintő apai UPD Angelman szindrómát okoz (súlyos motoros és értelmi elmaradással, ataxiával, hypotóniával járó kórkép, amelyet epilepszia, a beszédképesség hiánya és szokatlan arcvonások kísérnek). Ebben a betegségben a 15-ös paternális UPD mindössze az esetek 1-2 %-ában mutatható ki.

Prader-Willi és Angelman szindrómákban anyai ill. apai 15-ös kromoszóma uniparentális disomia kimutatására 60 családban végeztünk mikroszatellita marker analízist, amely két Prader-Willi szindrómás gyermekben igazolta az anyai 15-ös UPD-t. Az elsőként vizsgált gyermek családjában később a szülők kérésére (az édesanya következő terhességében) chorion biopsziából nyert magzati DNS mintán szintén elvégeztük a vizsgálatot, amely a várákoszásnak megfelelően negatív eredménnyel zárult.

5.3.2. A számfeletti 21-es kromoszóma szülői eredetének vizsgálata Down szindrómában

A 21-es kromoszóma szegregáció analízisét 14 esetben végeztük annak eldöntésére, hogy meiotikus vagy mitotikus non-disjunctio vezetett a 21-es triszómia kialakulásához, illetve a számfeletti 21-es szülői eredetének megállapítására. A markerek mintázata 3 családban nem volt informatív, 5 családban mitotikus (vagy meiosis II-es fázisban történt) non-disjunctiót, 6 családban meiosis I-es fázisban bekövetkezett osztódási hibát mutattunk ki (ezek közül kettőben paternális, háromban maternális eredetű számfeletti 21-es kromoszómát detektáltunk, egy családban azonban a szülők azonos méretű allélpárjai miatt a számfeletti 21-es eredetét nem lehetett megállapítani). A vizsgált esetek közel egyharmadában tehát mitotikus/meiosis II-es fázisban bekövetkezett non-disjunctiót állapítottunk meg, ami a szabad 21-es triszómiás

esetek körében leírt irodalmi adatoknak megfelel. Az a két eset viszont, amelyekben paternális eredetű a számfeletti 21-es kromoszóma, meglehetősen ritka (Antonarakis és mtsai, 1991; 1992).

5.3.3. Monogénes rendellenességekben a mutációt hordozó kromoszóma identifikálása

Végeztem mikroszatellita marker analízist olyan esetekben is, ahol monogénes betegség öröklődik a családban, pontos mutáció analízisre azonban nincs lehetőség (pl. ha a beteg családtag elhunyt után – minta hiányában – már nem mutatható ki a konkrét genetikai elváltozás, a családtagok születendő utódaikban azonban az ismétlődés kockázatát szeretnék minimálisra csökkenteni), vagy a kérdéses gén mérete nem teszi lehetővé rutinszerűen a mutáció kimutatását, mint a neurofibromatózis I-es típusában.

A genetikai tanácsadás szempontjából különös jelentőséggel bír a Duchenne muscularis dystrophia hordozásának kérdése. 14 családban próbáltuk az érintett (a vizsgálat idején általában már elhunyt) fiú és az esetlegesen hordozó leánytestvér, illetve a szülők, nagyszülők X kromoszómáinak szegregáció analízisével eldönteni, hogy a beteg fiú és a leánytestvér azonos anyai X kromoszómát örökölték-e. Két család esetében tudtuk biztonsággal kizárni a betegség hordozását a leánytestvérben, további két családban a markerek mintázata nem tette lehetővé a kérdés eldöntését.

Kilenc családban a leánytestvér hordozását ezzel a módszerrel nem lehetett kizárni, a kapott eredmények alapján azonban magzati vizsgálatokra nyílik lehetőség, amelyet eddig négy család vett igénybe. Egy terhességben egy feltehetően hordozó leány magzatot, négyben pedig fiú magzatot mutatott a

vizsgálat eredménye, mindegyikük esetében a családban anyai ágon öröklődő X kromoszóma jelenlétét állapítottuk meg.

A harmadikként vizsgált családban két fiúgyermekben (testvérek) a Duchenne muscularis dystrophia diagnózisát a dystrophin (DMD) gén 45-50 exonjait érintő deléció kimutatásával támasztottuk alá. Mivel a két gyermek mintáiban azonos exonok delécióját találtuk, az anyát obligát hordozónak tekintettük. A mutációt hordozó anyai X kromoszóma azonosítása céljából elvégeztük a családban az X kromoszóma és kiemelten a DMD gén régió mikroszatellita markereinek vizsgálatát. A DMD génben, ill. annak közvetlen közelében található markerek a két gyermekben azonos anyai alléleket, az ezen régiótól távolabbi (az X kromoszóma rövid és hosszú kar distalis szakaszán található) markerek viszont eltérő anyai alléleket mutattak. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a deletált DMD gén az anyai X kromoszómák közötti rekombináció során átkerült az eredeti kromoszómáról a homológ pár másik tagjára. A deléció területére eső markerek termékeit az anya mintájában detektáltuk (két különböző méretű allélt), a két gyermekében viszont nem. A kapott eredmények birtokában a család anyai ágán két fiatal nő esetleges DMD hordozó státuszának vizsgálatára került sor az SZTE Gyermekklinikán. Az ott elvégzett kiterjedt családvizsgálat eredménye felveti az anya esetében a gonadális mozaikosság lehetőségét.

Neurofibromatosis I-es típusában 16 családban végeztük el a 17-es kromoszóma szegregáció analízisét a feltehetően mutációt hordozó 17-es kromoszóma azonosítására a családtagok mintáiban. Egy családban sikerült ezt biztonsággal megállapítani, ahol egy testvérpár két tagjában a beteg szülő különböző 17-es kromoszómáinak öröklődését mutattuk ki, ez az eredmény a gyermekek eltérő fenotípusával is jól összhangba hozható.

6. Az eredmények értékelése

A „Célkitűzések” fejezetben feltett kérdésekre az előzőekben bemutatott eredmények alapján az alábbi válaszok fogalmazhatók meg:

1. A dolgozatban leírtak alapján elmondható, hogy a DNS hibridizációs technikák megfelelő területeken történő alkalmazása jelentősen **növeli a genetikai diagnosztika hatékonyságát**. Az 1998 óta intézetünk cytogenetikai laboratóriumában feldolgozott 387 kóros eset több mint felében (208 esetben: 53,8 %) ugyan kizárólag hagyományos kromoszóma vizsgálati módszereket alkalmaztunk, a fennmaradó 46,2 % diagnosztikus vizsgálata során azonban a FISH értékes információt adott. Hagyományos módszerekkel felismertük a kromoszómális rendellenességet 120 esetben (az összes kóros eset 31 %-a), FISH technikával pedig pontosítottuk, illetve megerősítettük az eredményt. Ezek mellett 59 beteg esetében (15,2 %) FISH alkalmazására volt szükség már a rendellenesség felismeréséhez is, a pontos diagnózis megállapításáról nem is beszélve.

Mind Prader-Willi, mind Smith-Magenis szindrómában - tudomásom szerint - Magyarországon elsőként mutattunk ki mikrodéléciót diagnosztikus vizsgálatok során, illetve a szubtelomerikus kromoszóma szerkezeti átrendeződések vizsgálata is intézetünkben vált elsőként elérhetővé.

2. Az egyes kromoszómális eltérések vizsgálatával kapott eredmények **hozzájárulnak a fenotípus és genotípus összefüggéseinek megértéséhez**. Néhány tanulmányban megerősítettük az irodalomban korábban már közölt adatokat (Morava és mtsai, 2000(a), 2000(b) és 2000(c)), másokban pedig ajánlásokat fogalmaztunk meg egyes fenotípusos jegyek megléte esetén konkrét kromoszómális régiók FISH vizsgálatára (Erhardt és mtsai, 2000; Kárteszi és mtsai, 2001; Kárteszi és mtsai, 2004). Egyes kromoszómális szakaszok

érintettsége esetén a fenotípus részletes ismertetésével adatokat közöltünk, aminek a hasonló esetekben várható prognózis megítélése szempontjából, valamint adott fenotípusos eltéréshez köthető kromoszómális régió feltérképezésében van jelentősége (Hermann és mtsai, 2000; Riegel és mtsai, 2001; Czakó és mtsai, 2002; Morava és mtsai, 2002(a), Morava és mtsai, 2003(a) és 2003(b); Kellermayer és mtsai, 2005).

3. A mozaikos esetekben IF FISH módszer előre megtervezett protokoll szerinti alkalmazására az irodalomban nem találtam utalást. Eredményeink igazolják azt az egyes esetközlésekben korábban már megfogalmazott felvetést, amely szerint *kromoszómális szöveti mozaikosság eseteiben szövetenként eltérhet a normális és kóros sejtek aránya.*

Megállapítható továbbá, hogy mozaikosság kimutatására végzett vizsgálatokban a perifériás vér lymphocytákra vonatkozóan nem elegendő a rutin cytogenetikai vizsgálat metafázisok értékelése alapján adott eredményét figyelembe venni, mivel alacsony arányú mozaikosság eseteiben ez nem mutatja ki a kisebb arányban jelen lévő sejtvonalat (illetve nem zárja ki annak jelenlétét). Ilyen esetben indokolt a perifériás vér lymphocyták preparátumán az IF FISH elvégzése nagy számú sejt értékelésével.

A kromoszómális szöveti mozaikosság kimutatását célzó vizsgálatok többféle szövet sejtjein történő elvégzése szükséges a.) változó expresszivitást mutató, kromoszómális eltéréshez köthető kórképekben; b.) letálisnak tartott kórképekben a vártnál hosszabb túlélési idő esetén; c.) kromoszómális szindrómák gyanúját keltő esetekben, ahol a perifériás vér lymphocytákban normális a karyotípus.

Eredményeink megerősítik azt a – korábban az 1.2.2. fejezetben már tárgyalt – feltételezést, hogy az emberi szervezetben a mozaikosság, illetve a kóros genotípusú sejtek egyes szövetek közötti eltérő aránya nagyobb szerepet

játszik a fenotípus kialakításában és a prognózis meghatározásában, mint azt jelenlegi ismereteink alapján gondoljuk.

4. Az IF FISH másik jelentős alkalmazási területe a magzati aneuploidiák szűrése. A módszer legnagyobb előnye ebben a szűrőprogramban, hogy viszonylag *kevesebb munka ráfordítása mellett is gyors és megbízható eredményt ad*. Emellett a metafázis elemzéshez képest több sejt értékelésére ad lehetőséget, ami akár alacsony arányú mozaikosság megállapítására is képessé teszi.

5. A *mikroszatellita markerek alkalmazása* a diagnosztikus vizsgálatokban egyedülálló eszköz a több ismertetett kórképben leírt *uniparentális disomia* vizsgálatára. Intézetünk gyakorlatában az elmúlt években a Duchenne muscularis dystrophiában szenvedők családjában végzett *szegregáció analízis* terén tudta a legtöbbet nyújtani. A mikroszatellita marker analízissel ezen felül adatokat nyertünk a 21-es triszómia kialakulási mechanizmusának értelmezéséhez is.

7. Következtetések

A DNS hibridizációs módszerek klinikai alkalmazása megteremtette *a diagnosztikus vizsgálatok lehetőségét* 1.) mikrodéléciós szindrómákban, 2.) szubtelomerikus átrendeződések, ill. szerkezeti rendellenességek esetében, 3.) a hagyományos cytogenetikai elemzéssel nem vizsgálható esetekben (finom kromoszóma szerkezeti eltérések, hasonló sávmintázatú régiók átrendeződése), 4.) nem osztódó sejtekben (mozaikosság kimutatása, gyakori aneuploidiák szűrése magzati mintákban), 5.) uniparentális disomia esetén, valamint 6.) monogénes rendellenességekben a mutációt hordozó kromoszóma azonosításában.

A metafázis FISH technika fent felsorolt alkalmazási területein különösen nagy jelentőségűek a familiáris kromoszóma szerkezeti rendellenességekben végzett *prenatális vizsgálatok*, amelyek során a már pontosan ismert rendellenesség célzott kimutatása rövid idő alatt, megbízhatóan elvégezhető a megfelelő fluorescens próbák alkalmazásával.

A DNS hibridizációs módszerek nagymértékben bővítik a hagyományos cytogenetikai vizsgálatok által nyújtott diagnosztikai lehetőségek körét, nagyon fontos azonban megállapítani, hogy *nem a klasszikus sávtechnikák helyett, hanem azokat kiegészítve*, azok eredményeire támaszkodva kell alkalmazni ezeket a módszereket.

Eredményeinkből végül olyan megállapítások is megfogalmazhatók, amelyek *szakmapolitikai döntések meghozatalában* is figyelmet érdemelhetnek. Ezen módszerek bevezetéséhez megfelelő anyagi háttér szükséges. A mikroszatellita marker analízis költségei nem különböznek ugyan lényegesen más molekuláris genetikai vizsgálatokétól, a FISH elemzés azonban mind a próbák és egyéb reagensek árát (5-10 000 Ft/teszt), mind a technika által megkívánt műszerek beszerzésének és fenntartásának költségeit (min. 15 millió Ft) tekintve meglehetősen nagy anyagi terhet jelent egy diagnosztikus laboratórium számára.

A vizsgálatok eredményeinek értékeléséhez nagy tapasztalat, viszonylag hosszú, gyakorlatban eltöltött idő szükséges. A vizsgálatot végző és értékelő személyeknek rendelkezniük kell mind molekuláris genetikai, mind cytogenetikai ismeretekkel, ezek mellett alapvető követelmény a fluorescens mikroszkópiában való jártasság. A vizsgálati eredmények interpretálása miatt fontos, hogy a kétféle vizsgálat azonos intézményben történjen.

Az egyes kromoszómális eltérések felderítésének sikere nagymértékben függ a megfelelő próbák alkalmazásától. A klinikai probléma által felvetett

kérdések pontos megválaszolása csak akkor lehetséges, ha az analízist végző és értékelő személy a rendelkezésére álló információk alapján megtervezi a diagnosztikus vizsgálat lépéseit. Ez egyrészt a klinikus és a laboratóriumban dolgozó munkatársak team-munkáján, párbeszédén, másrészt a felhasznált próbák pontos ismeretén múlik.

Mindezek miatt a fent ismertetett vizsgálati módszerek alkalmazása csak nagyobb laboratóriumokban, központokban javasolható, amelyekben minden feltétel (financiális háttér, műszerek és megfelelően képzett személyzet) rendelkezésre áll ezek diagnosztikában (különösen magzati vizsgálatokban) történő alkalmazásához.

Irodalom

- Antonarakis, S.E.; Lewis, J.G.; Adelsberger, P.A.; Petersen, M.B.; Schinzel, A.A.; Binkert, F.; Schmid, W.; Pangalos, C.; Raoul, O.; Chakravarti, A.; Hafez, M.; Cohen, M.M.; Roulston, D.; Schwartz, S.; Mikkelsen, M.; Tranebjaerg, L.; Greenberg, F.; Hoar, D.I.; Rudd, N.L.; Warren, A.C.; Metaxotou, C.; Bartsocas, C.; Down Syndrome Collaborative Group: Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 using DNA polymorphism analysis. *New Eng. J. Med.*, 1991, 324, 872-876.
- Antonarakis, S.E.; Petersen, M.B.; McInnis, M.G.; Adelsberger, P.A.; Schinzel, A.A.; Binkert, F.; Pangalos, C.; Raoul, O.; Slaugenhaupt, S.A.; Hafez, M.; Cohen, M.M.; Roulson, D.; Schwartz, S.; Mikkelsen, M.; Tranebjaerg, L.; Greenberg, F.; Hoar, D.I.; Rudd, N.L.; Warren, A.C.; Metaxotou, C.; Bartsocas, C.; Chakravarti, A.: The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination using DNA polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 1992, 50, 544-550.
- Altherr M.R., Bengtsson U. et al.: Molecular confirmation of Wolf-Hirschhorn syndrome with a subtle translocation of chromosome 4. *Am J Hum Genet*, 1991, 49, 1235-1242.
- Cohen M.M.: Malformations of the craniofacial region: evolutionary, embryonic, genetic and clinical perspectives. *Am J Med Genet*, 2002, 115, 245-268.
- Coumoul X., Deng Ch.: Roles of FGF receptors in mammalian development and congenital diseases. *Birth Defects Research*, 2003, 69, 286-304.
- Driscoll D.A., Budarf M.L., Emanuel B.S.: A genetic etiology for DiGeorge syndrome: consistent deletions and microdeletions of 22q11. *Am J Hum Genet*, 1992, 50, 924-933.
- Erdel M., Schuffenhauser S., Buchholz B. et al.: Routine screening for microdeletions by FISH in 77 patients suspected of having Prader-Willi or Angelman syndromes using YAC clone 273A2 (D15S10). *Hum Genet*, 1996, 97, 784-793.
- Ewart A.K., Morris C.A. et al.: Hemizyosity at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nat Genet*, 1993, 5, 11-16.
- Fibison W.J., Budarf M., McDermid H., Greenberg F., Emanuel B.S.: Molecular studies of DiGeorge syndrome. *Am J Hum Genet*, 1990, 46, 888-895.

- Flint J., Knight S.: The use of telomere probes to investigate submicroscopic rearrangements associated with mental retardation. *Current Opinion in Genetics and Development*, 2003, 13, 310-316.
- Gail H.V.: Cytogenetics: a short review and update. *Cancer Investigation*, 1998, 16 (1): 40-44.
- Gandelman K., Gibson L., Meyn M.S., Yang-Feng T.L.: Molecular definition of the smallest region of deletion overlap in the Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Hum Genet*, 1992, 51, 571-578.
- Greenberg F., Guzzetta V. et al.: Molecular analysis of the Smith-Magenis syndrome: a possible contiguous-gene syndrome associated with del(17)(p11.2). *Am J Hum Genet*, 1991, 49, 1207-1218.
- Hall J.G.: Review and hypotheses: somatic mosaicism: observations related to clinical genetics. *Am J Hum Genet*, 1988, 43, 355-363.
- Hélias-Rodzewicz Z, Bocian E., Stankiewicz P. et al.: Subtelomeric rearrangements detected by FISH in three of 33 families with idiopathic mental retardation and minor physical anomalies. *J Med Genet*, 2002, 39, 9, e53.
- Houge G. et al.: Ten years follow up of a boy with a complex chromosomal rearrangement: going from a >5 to 15-breakpoint CCR. *Am J Med Genet*, 2003, 118A, 235-240.
- Jonkman M.F.: Revertant mosaicism in human genetic disorders. *Am J Med Genet*, 1999, 85, 361-364.
- Kalousek D.K.: Pathogenesis of chromosomal mosaicism and its effect on early human development. *Am J Med Genet*, 2000, 91, 39-45.
- Katona R., Szeles A., Hadlaczky Gy.: Mouse euchromatin specific "genome-painting" with a LINE probe: a rapid method for identification and mapping of human chromosomes in mouse-human microcell hybrids by two-color FISH. *Hereditas*. 1996, 124, 2, 131-135.
- Knoll J.H.M., Nicholls R.D. Magenis R.E., Glatt K., Graham J.M. Kaplan L., Lalande M.: Angelman syndrome: three molecular classes identified with chromosome 15q11q13-specific DNA markers. *Am J Hum Genet*, 1990, 47, 149-155.
- Kubota, T., Saitoh, S., Matsumoto, T., Narahara, K., Fukushima, Y., Jinno, Y., Niikawa, N.: Excess functional copy of allele at chromosomal region 11p15 may cause Wiedemann-Beckwith (EMG) syndrome. *Am J Med Genet*, 1994, 49, 378-383.
- Ledbetter, S.A., Kuwano, A., Dobyns W.B., Ledbetter, D.H.: Microdeletions of chromosome 17p13 as a cause of isolated lissencephaly. *Am J Hum Genet*, 1992, 50, 182-189.

- Malcolm S.: Microdeletion and microduplication syndromes. *Prenat Diagn*, 1996, 16, 1213-1219.
- Méhes K., Kosztolányi Gy.: A mozaicizmus mai értelmezéséről. *Orv Hetil*, 1990, 131, 33, 1815-1819.
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16, 1215.
- Miozzo M., Simoni G.: The role of imprinted genes in fetal growth. *Biol Neonate*, 2002, 81, 217-228.
- Oláh É.: A klinikai genetika alapjai. *Medicina*, Budapest, 1999.
- Pajor L.: Az interfázis citogenetika alkalmazási lehetőségei az onkopatológiai diagnosztikában. *Orv Hetil*, 1998, 49, 2939-2946.
- Pajor L., Szuhai K., Méhes G., Kosztolányi Gy., Jáksó P., Lendvai G., Szanyi I., Kajtár P.: Combined metaphase, interphase cytogenetic and flow cytometric analysis of DNA content of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry*, 1998, 34, 87-94.
- Robinson W.P., McFadden D.E., Stephenson M.D.: The origin of abnormalities in recurrent aneuploidy/polyploidy. *Am J Hum Genet*, 2001, 69, 1245-1254.
- Robinson W.P., Binkert F., Bernasconi F., Lorda-Sanchez I., Werder E.Aa., Schinzel A.A.: Molecular studies of chromosomal mosaicism: relative frequency of chromosome gains or loss and possible role of cell selection. *Am J Hum Genet*, 1995, 56, 444-451.
- Robinson W.P.: Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences. *BioEssays*, 2000, 22, 452-459.
- Robinson W.P., Christian S.L. et al.: Somatic segregation errors predominantly contribute to the gain or loss of a paternal chromosome leading to uniparental disomy for chromosome 15. *Clin Genet*, 2000, 57, 349-358.
- Shprintzen R.J., Goldberg R.B., Young D., Wolford L.: The Velo-Cardio-Facial syndrome: a clinical and genetic analysis. *Pediatrics*, 1981, 67, 2, 167-172.
- Seely J.R., Seely B.L., Bley R., Altmiller C.J.: Localized chromosomal mosaicism as a cause of dysmorphic development. *Am J Hum Genet*, 1984, 36, 899-903.
- Szuhai K., Méhes G., Kosztolányi Gy., Kajtár P., Lendvai G., Szanyi I., Pajor L.: Interfázis citogenetika alkalmazása a DNS-tartalom változásának megítélésére gyermekkori akut lymphoid leukaemiában (ALL). *Orv Hetil*, 1997, 49, 3111-3119.

- Tardy E., Toth A., Hajdu K., Gombos S., Laszlo J.: Fluorescens in situ hibridizáció a prenatalis diagnosztikában. Az első tapasztalatok. *Orv Hetil*, 1996, 137, 10, 523-526.
- Tardy E.P., Toth A.: Cross-hybridization of the chromosome 13/21 alpha satellite DNA to chromosome 22 or a rare polymorphism? *Prenat Diagn*, 1997, 17, 5, 487-488.
- Tardy EP, Toth A, Kosztolanyi G. Prenatal exclusion of segmental trisomy in familial chromosome 21 pericentric inversion by fluorescence in situ hybridization. *Prenat Diagn*, 1997, 17, 9, 871-873.
- Thomas N.S., Browne C.E., Oley C., Healey S., Crolla J.A.: Investigation of a cryptic interstitial duplication involving the Prader-Willi/Angelman syndrome critical region. *Hum Genet*, 1999, 105, 384-387.
- Toth A, Tardy EP, Hajdu K, Batorfi J, Doszpod J, Egyed J, Gati I. Fluorescence in situ hybridization of chorionic interphase cells for prenatal screening of Down syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2001, 94, 1, 46-50.
- Treszl A, Adany R, Rakosy Z, Kardos L, Begany A, Gilde K, Balazs M.: Extra copies of c-myc are more pronounced in nodular melanomas than in superficial spreading melanomas as revealed by fluorescence in situ hybridisation. *Cytometry B Clin Cytom*, 2004, 60, 1, 37-46.
- Uchida, I.A., Freeman, V.C.P.: Trisomy 21 Down syndrome. Parental mosaicism. *Hum Genet*, 1985, 70, 246-247.
- de Vries B.B.A., Winter R., Schinzel A., van Ravenswaaij-Arts C.: Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet*, 2003, 40, 385-398.

A dolgozat témájában megjelent közlemények

1. Morava É, *Czakó M*, Melegh B, Kosztolányi Gy. Velo-cardio-facial phenotype and deletion of 22q11.2 in Hungarian children. *Clin Genet* 2000(a), 58, 5, 403-405.
2. Morava É, Masszi Gy, *Czakó M*, Kosztolányi Gy. 22q11.2 kromoszóma deléció és velo-cardio-facialis szindróma egy Fallot-tetralogiás betegben. *Orv Hetil* 2000(b), 141, 34, 1873-1875.
3. Erhardt É, Morava É, *Czakó M*, József I, Decsi T. Izomhipotonia hátterében felfedezett Prader-Willi syndroma esete. *Gyermekgyógyászat* 2000, 4, 382-384.
4. Morava É, Hermann R, *Czakó M*, Soltész G, Kosztolányi G. Isodicentric Y syndrome in an Ullrich-Turner patient without virilization. *Am J Med Genet* 2000(c), 91, 2, 99-101.
5. Hermann R, Soltész G, Morava É, Kosztolányi G, *Czakó M*. De novo partial duplication of long arm of chromosome 13: (dup13)(q12-q14). *Am J Med Genet* 2000, 92, 4, 296-297.
6. Riegel M, Morava É, *Czakó M*, Kosztolányi Gy, Schinzel A. Distal deletion, del(2)(q33.3;q33.3), in a patient with severe growth deficiency and minor anomalies. *Am J Med Gen* 2001, 102, 3, 227-230.
7. Kárteszi J, Morava É, *Czakó M*, Kosztolányi Gy. Smith-Magenis-szindróma – genetikailag kódolt viselkedészavar? *Gyermekgyógyászat*, 2001, 52, 4, 369-373.
8. 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.
9. *Czakó M*, Riegel M, Morava É, Schinzel A, Kosztolányi Gy. Patient with rheumatoid arthritis and MCA/MR syndrome due to unbalanced der(18) transmission of a paternal translocation t(18;20)(p11.1;p11.1). *Am J Med Genet*, 2002, 108, 3, 226-228.
10. Morava É, *Czakó M*, Aszmann M, Illés T, Kosztolányi Gy. Tissue specific mosaicism of trisomy 9 in a patient with severe torsion scoliosis. *Genetic Counseling*, 2002(a), 13, 4, 455-457.
11. Morava É, Varga L, *Czakó M*, Decsi T. Anyai toxoplazmafertőzést követő mozaik 8 triszómia szindróma. *Orvosi Hetilap*, 2002(b), 143, 11, 563-565.
12. Morava É, Bartsch O, *Czakó M*, Frensel A, Kárteszi J, Kosztolányi Gy. A girl with cutaneous hyperpigmentation, café au lait spots and ring chromosome 15 without significant deletion. *Genetic Counseling*, 2003(a), 14, 3, 337-342.
13. Morava É, Bartsch O, *Czakó M*, Frensel A, Kalscheuer V, Kárteszi J, Kosztolányi Gy. Small inherited terminal duplication of 7q with

- hydrocephalus, cleft palate, joint contractures, and severe hypotonia. Clin Dysmorphology, 2003(b), 12, 2, 123-127.
14. *Czakó M*, Riegel M, Morava É, Bajnóczky K, Kosztolányi Gy. Opitz „C” trigonocephaly-like syndrome in a patient with terminal deletion of 2p and partial duplication of 17q. Am J Med Genet, 2004, 131A , 3, 310-312.
 15. Kárteszi J, Kress W, Szász M, *Czakó M*, Melegh B, Kosztolányi Gy, Morava É. Partial craniosynostosis in a patient with deletion 22q11. Genetic Counseling, 2004, 15, 4, 481-483.
 16. Kellermayer R, *Czakó M*, Kiss-Laszlo Z, Gyuris P, Kozari A, Melegh B, Kosztolányi Gy. Alpha-thalassemia/mental retardation syndrome in a 45,X male. Am J Med Genet A, 2005, 132, 4, 431-433.
 17. Hadzsiev K., *Czakó M.*, Veszprémi B., Kosztolányi Gy.: rapid interphase FISH vs karyotyping in prenatal screening of common chromosomal aneuploidies. (közlésre elküldve)

A dolgozat témájához nem kapcsolódó közlemények

1. Hoffmann G, Gajdos G, *Czakó M*, Kerényi M, Tóth V, Emődy L, Tomcsányi T. Genetic diversity in *Proteus penneri*. Acta Biologica Hungarica, 1997, 48, 4, 395-398.
2. Hoffmann G, Gajdos G, *Czakó M*, Kerényi M, Tóth V, Emődy L, Tomcsányi T. Diversity among clinical isolates of *Proteus penneri* detected by random amplified polymorphic DNA analysis. Zentralblatt von Bakteriologie, 1998, 288, 351-360.
3. Kovács E, Morava É, Nádas E, *Czakó M*, Melegh B, Kosztolányi Gy. Fragilis X szindróma szűrésére alkalmas molekuláris biológiai (PCR) eljárás. Orv Hetil, 1998, 139, 52, 3121-3125.
4. Kárteszi J, Morava É, *Czakó M*, Gáti I, Czopf J, Kosztolányi Gy, Melegh B. Kennedy-betegség egy progresszív beszédzavarban szenvedő férfiben. Orv Hetil, 2001, 142, 35, 1915-1917.
5. Horváth A, Morava É, Tóth G, *Czakó M*, Melegh B, Kosztolányi Gy. Érrendszeri betegségek, spina bifida és schizophrénia egy családon belüli együttes előfordulása a metilén-tetrahidrofolsav-reduktáz enzim hőérzékeny variánsának heterozigóta mutációjával. Orv Hetil, 2001, 142, 27, 1445-1448.
6. Cser B, Morava É, *Czakó M*, Kárteszi J, Szőnyi L, Wevers R, Kosztolányi Gy. Veleszületett glikozilációs zavar (CDG-Ia betegség) egy izomhipotóniás, hepatopathiás gyermekben. Gyermekgyógyászat, 2003, 54, 1, 37-42.

7. Morava É, *Czakó M*, Kárteszi J, Cser B, Weissbecker K, Méhes K. Ulnar/fibular ray defect and brachydactyly in a family: a possible new autosomal dominant syndrome. *Clin Dysmorphol*, 2003, 12, 3, 161-165.
8. Kárteszi J, Hollódy K, Bene J, Morava É, Hadzsiev K, *Czakó M*, Melegh B, Kosztolányi Gy. Az MECP2 gén mutációinak analízise direkt szekvenálással magyarországi Rett szindrómás betegekben. *Orv Hetil*, 2004, 145, 17, 909-911.
9. Kárteszi J, Hollódy K, Bene J, Morava É, Hadzsiev K, *Czakó M*, Melegh B, Tészás A, Kosztolányi Gy. Mutation analysis of MECP2 and determination of the X-inactivation pattern in Hungarian Rett syndrome patients. *Am J Med Genet*, 2004, 131, 1, 106.
10. Erhardt É, *Czakó M*, Csernus K, Molnár D, Kosztolányi Gy. The frequency of Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene in healthy and obese Hungarian children and its association with cardiovascular risk factors. *Eur J Clin Nutr*, 2005, 59, 8, 955-959.
11. Kellermayer R, Halvax L, *Czakó M*, Shahid M, Dhillon VS, Husain SA, Sule N, Gomori E, Mammel M, Kosztolányi Gy. A novel frame shift mutation in the HMG box of the SRY gene in a patient with complete 46,XY pure gonadal dysgenesis. *Diagn Mol Pathol*, 2005, 14, 3, 159-163.

A dolgozat témájában megjelent idézhető absztraktok

1. Morava É, Shapira E, *Czakó M*, Szabó L, Jackson KE, Melegh B, Kosztolányi Gy. Paternal balanced translocation resulting in Miller-Dieker syndrome in two first cousins. *Am J Hum Genet*, 1998, 63 (Suppl) P820, A145.
2. Morava É, *Czakó M*, Hermann R, Tóth G, Kosztolányi Gy. De novo partial duplication on the long arm of chromosome 13, dup (13) (q12-q14). *Eur J Hum Genet*, 1999, 7, P229, A244.
3. Kárteszi J, Morava É, *Czakó M*, Decsi T, Kosztolányi Gy. Dup 9p syndrome with multiplex hemangiomas and deafness in a familial t(10;22) carrier. *Eur J Hum Genet*, 2001, 9, P0264, A152.
4. *Czakó M*, Morava É, Kosztolányi Gy. The significance of microsatellite analysis in the routine diagnostics of MR/MCA syndromes. *Eur J Hum Genet*, 2001, 9, P0211, A142.
5. *Czakó M*, Morava É, Cser B, Kárteszi J, Kosztolányi Gy. Terminal deletion 4q in a patient with complex chromosomal rearrangement and characteristic phenotype. *Eur J Hum Genet*, 2002, 10, P0330.

6. Kárteszi J, Morava É, Hadzsiev K, *Czakó M*, Kosztolányi Gy. Cutis laxa, lipodystrophy and transient progeroid phenotype in mosaic polyploidy. *Eur J Hum Genet*, 2003, 11, P165.
7. *Czakó M*, Szabó L, Morava É, Hadzsiev K, Kárteszi J, Kosztolányi Gy. Pregnancy outcome in carriers of translocation involving the Miller-Dieker critical region. *Eur J Hum Genet*, 2003, 11, P208.
8. Hadzsiev K, *Czakó M*, Veszprémi B, Kosztolányi Gy. Prenatal screening of aneuploidy by interphase FISH. *Eur J Hum Genet*, 2003, 11, P401.
9. Hadzsiev K, Nagy Á, *Czakó M*, Kellermayer R, Melegh B, Kosztolányi Gy. Rare case in haemophilia A in a female patient with a 46,X,idic(Xq) karyotype. *Eur J Hum Genet*, 2004, 12, P065.
10. *Czakó M*, Kress W, Kárteszi J, Kosztolányi Gy, Morava É. Craniosynostosis in a 22q11.2 microdeletion patient without FGFR3 mutation. *Eur J Hum Genet*, 2004, 12, P079.
11. Kellermayer R, *Czakó M*, Hadzsiev K, Gyuris P, Kozári A, Kosztolányi Gy. Y;autosomal translocation or cryptic tissue mosaicism in a boy with 45,X0? *Eur J Hum Genet*, 2004, 12, P221.

A dolgozat témájához nem kapcsolódó idézhető absztraktok

1. *Czakó M*, Gajdos G, Hoffmann Gy, Garamszegi M, Tornóczky E, Czirner Gy, Tomcsányi T. Genetic diversity of *Helicobacter pylori* strains derived from the south transdanubian region. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 1997, 44, 58.
2. Tóth, G, Morava É, Jackson KE, Horváth A, *Czakó M*, Kosztolányi Gy. Mutation of the thermolabile variant of MTHFR enzyme in a family with vascular events and neural tube defects. *Am J Hum Genet*, 1999, 65 (Suppl), A431, 2443.
3. Kosztolányi Gy, Nádas E, Melegh B, Morava É, *Czakó M*. Mitochondrial DNA4977 deletion in human newborn samples. *Eur J Hum Genet*, 1999, 7, P894, A143.
4. Funke S, Morava É, *Czakó M*, Cser B, Kosztolányi Gy, Illés T. Dystrophic scoliosis and genetic polymorphisms in patients with neurofibromatosis. *Eur J Hum Genet*, 2002, 10, P0087.
5. Morava É, *Czakó M*, Hadzsiev K, Kosztolányi Gy, Méhes K. Autosomal dominant ulnar/fibular ray defect: a possible new syndrome. *Eur J Hum Genet*, 2002, 10, P0191.
6. Kárteszi J, Bene J, Morava É, *Czakó M*, Hollódy K, Melegh B, Kosztolányi Gy. Analysis of the MECP2 gene by direct sequencing in Hungarian Rett syndrome patients. *Eur J Hum Genet*, 2002, 10, P0740.

7. Cser B, Morava É, *Czakó M*, Kárteszi J, Kosztolányi Gy. Hip dysplasia, characteristic face, relative macrocephaly, delayed motor development, failure to thrive and café au lait spots – possible new autosomal dominant syndrome. *Eur J Hum Genet*, 2003, 11, P174.
8. Funke S, Morava É, *Czakó M*, Ertl T, Kosztolányi Gy. Osteopenia of prematurity (OOP) and genetic polymorphisms: a pilot study. *Eur J Hum Genet*, 2003, 11, P783.
9. Kárteszi J, Bene J, Hollódy K, Morava É, Hadzsiev K, *Czakó M*, Melegh B, Tészás A, Kosztolányi Gy. Mutation analysis of MECP2 and determination of the X-inactivation pattern in Hungarian Rett Syndrome patients. *Eur J Hum Genet*, 2004, 12, P050.
10. Funke S, Morava É, *Czakó M*, Ertl T, Kosztolányi Gy. Association of estrogen receptor dinucleotide repeat polymorphism with osteopenia in very low birth weight (VLBW) infants. *Eur J Hum Genet*, 2004, 12, P885.

A dolgozat témájában tartott kongresszusi előadások

1. *Czakó M*, Morava É, Nádasi E, Szabó L, Kovács E, Melegh B, Kosztolányi Gy. Familiáris Miller-Dieker syndroma II. Fluorescens in situ hybridizációval végzett diagnosztikai vizsgálat. Humángenetikai Társaság I. Kongresszusa, Szeged, 1998. június.
2. *Czakó M*, Morava É, Nádasi E, Szabó L, Kovács E, Melegh B, Kosztolányi Gy. Familiáris Miller-Dieker syndroma II. Fluoreszcens in situ hybridizációval végzett diagnosztikai vizsgálat. Magyar Humángenetikusok Konferenciája, Szeged, 1998. október 18-21.
3. Erhardt É, Morava É, Decsi T, *Czakó M*, Kosztolányi Gy. Súlyos újszülöttkori izomhypotonia Prader-Willi syndroma régió deléciójával. Magyar Humángenetikusok Konferenciája, Szeged, 1998. október 18-21.
4. Morava É, Hermann R, *Czakó M*, Kosztolányi Gy. De novo részleges duplikáció a 13-as kromoszóma hosszú karján, dup(13) (q12-q14). Magyar Humángenetikusok Konferenciája, Szeged, 1998. október 18-21.
5. Szabó L, Kiss Zs, *Czakó M*, Morava É, Nádasi E, Kovács E, Garzuly F, Melegh B, Kosztolányi Gy. Familiáris Miller-Dieker syndroma I. Klinikai, patológiai és klasszikus cytogenetikai elváltozások. Magyar Humángenetikusok Konferenciája, Szeged, 1998. október 18-21.
6. *Czakó M*, Riegel ML, Morava É, Kosztolányi Gy. Deléciós/duplikációs szindrómát okozó familiáris t(18;20) transzlokáció. Magyar Humángenetikai Társaság II. Kongresszusa, Pécs, 1999. augusztus.
7. Morava É, *Czakó M*, Illés T, Kosztolányi Gy. Haplotípus analízis mikroszatellita markerek felhasználásával egy frontometaphyseális

- dysplasiás családban. Humángenetikai Társaság III. Kongresszusa, Debrecen, 2001. június.
8. Kárteszi J, Morava É, *Czakó M*, Decsi T, Kosztolányi Gy. Dup 9p szindróma egy familiáris 10;22 transzlokációt hordozó betegben. Humángenetikai Társaság III. Kongresszusa, Debrecen, 2001. június.
 9. *Czakó M*, Kárteszi J, Morava É, Kosztolányi Gy. A molekuláris cytogenetika jelentősége egy komplex kromoszómaátrendeződés felderítésében. Humángenetikai Társaság III. Kongresszusa, Debrecen, 2001. június.
 10. Hadzsiev K, *Czakó M*, Veszprémi B, Kosztolányi Gy. Magzati aneuploidiák vizsgálata interfázis FISH módszerrel. Magyar Humángenetikai Társaság IV. Kongresszusa, Budapest, 2002. november.
 11. *Czakó M*, Kress W, Kárteszi J, Kosztolányi Gy, Morava É. A 22q11.2 deléció előfordulása részleges coronalis craniosynostosisban. Magyar Humángenetikai Társaság V. Kongresszusa, Szeged, 2004. november.
 12. Hadzsiev K, *Czakó M*, Veszprémi B, Kosztolányi Gy. Prenatális vizsgálat során észlelt változó arányú mozaik 21-triszómia. Magyar Humángenetikai Társaság V. Kongresszusa, Szeged, 2004. november.
 13. Veszprémi B, Hadzsiev K, Vízer M, Arany A, *Czakó M*, Kerecsényi P, Szabó I, Kosztolányi Gy. Számbeli kromoszóma rendellenességek nem invazív módszerekkel történő szűrésével szerzett tapasztalatok. Magyar Humángenetikai Társaság V. Kongresszusa, Szeged, 2004. november.

A dolgozat témájához nem kapcsolódó kongresszusi előadások

1. Kovács E, Molnár J, *Czakó M*, Gyűrűs P, Morava É, Melegh B, Kosztolányi Gy. Friedreich ataxia szűrésére alkalmas molekuláris genetikai módszer. Magyar Humángenetikusok Konferenciája, Szeged, 1998. október 18-21.
2. Kárteszi J, Bene J, Hollódy K, Morava É, Hadzsiev K, *Czakó M*, Melegh B, Tészás A, Kosztolányi Gy. Az MECP2 gén mutáció analízise és az X-inaktivációs mintázat vizsgálata Rett szindrómás betegekben. Magyar Humángenetikai Társaság V. Kongresszusa, Szeged, 2004. november.
3. Funke S, Morava É, *Czakó M*, Ertl T, Kosztolányi Gy. Koraszülöttek osteopéniája és genetikai polimorfizmusok. Magyar Humángenetikai Társaság V. Kongresszusa, Szeged, 2004. november.

A dolgozat témájához kapcsolódó poszterek

1. *Czakó M*, Morava É, Nádasi E, Szabó L, Kovács E, Melegh B,

- Kosztolányi Gy. Familiáris Miller-Dieker syndroma II. Fluoreszcens in situ hybridizációval végzett diagnosztikai vizsgálat. A Magyar Gyermekorvosok Társasága 1998. évi Nagygyűlése, Szeged.
2. Morava É, *Czakó M*, Kárteszi J, Weissbecker K, Méhes K. Ulnaris sugár defektus és brachydactylia E egy családon belüli jelentkezése. Magyar Humánogenetikai Társaság IV. Kongresszusa, Budapest, 2002. november.
 3. *Czakó M*, Morava É, Hadzsiev K, Kárteszi J, Kosztolányi Gy. Kromoszómális szöveti mozaikosság vizsgálata interfázis FISH technikával szellemi és testi fejlődészavarban szenvedő betegekben. Magyar Humánogenetikai Társaság IV. Kongresszusa, Budapest, 2002. november.
 4. Cser B, Morava É, *Czakó M*, Kosztolányi Gy. 22-es gyűrűkromoszóma: deléción vagy telomerikus fúzió? Magyar Humánogenetikai Társaság IV. Kongresszusa, Budapest, 2002. november.

A dolgozat témájához nem kapcsolódó poszterek

1. Tornóczky E, Czirner G, *Czakó M*, Tomcsányi T. A tenyésztés és molekuláris biológiai módszerek alkalmazása a *Helicobacter pylori* diagnosztikában. 1996. évi Bakteriológus Kongresszus, Miskolc, 1996. május.
2. *Czakó, M.*, Gajdos G, Hoffmann G, Garamszegi M, Tornóczky E, Czirner G, Tomcsányi T. Dél-Dunántúlon izolált *Helicobacter pylori* törzsek genetikai diverzitása. Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése Nyíregyháza 1996. augusztus.
3. Kovács E, Molnár J, Nádasi E, *Czakó M*, Gyűrűs P, Morava É, Meleg B, Kosztolányi Gy. Friedreich ataxia szűrésére alkalmas molekuláris biológiai eljárás. A Magyar Gyermekorvosok Társasága 1998. évi Nagygyűlése, Szeged.
4. *Czakó M*, Erhardt É, Molnár D, Kosztolányi Gy. β 3-adrenoreceptor gén polimorfizmus előfordulása extrémén kövér gyermekekben és szüleikben. A Magyar Gyermekorvosok Társasága 2001. évi Nagygyűlése, Pécs.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Kosztolányi Györgynek, aki hosszú évekkkel ezelőtt a munkacsoportjába fogadott, és megbízott olyan feladatokkal, amelyek a diagnosztikus munka felelősségteljes elvégzésére megtanítottak. Köszönöm a sok együtt-gondolkodással töltött órát, amelyek során alkalmam nyílt megismerni értékrendjét, a betegközpontú és etikus genetikai szemléletet, amelyet mindig képviselt.

Köszönöm Dr. Méhes Károlynak, hogy minden kérdéssel bizalommal fordulhattam hozzá, és hogy tanított. A tőle kapott tanulmányok rengeteg értékes információt nyújtottak.

Köszönettel tartozom Dr. Melegh Bélának az elmúlt években nyújtott támogatásáért és figyelméért.

Köszönöm Dr. Morava Évának, hogy mindig inspirált, képes volt lelkesedni, és ezáltal engem is lelkesíteni egyre újabb feladatok megoldására. Soha nem felejttem el a sok izgalmas, együtt felgöngyölített esetet. Legfőképpen türelméért és barátságáért vagyok hálás.

Köszönetet mondok klinikus kollégáimnak, Dr. Hadzsiev Kingának és Dr. Kellermayer Richárdnak, és az Orvosi Genetikai és Gyermekefejlődéstani Intézet minden munkatársának az együtt végzett munkáért.

Végtelen hálával tartozom Dr. Albert Schinzelnek és Dr. Mariluce Riegelnek mindazért, amit tőlük tanultam.

Az MTA kutatócsoport minden tagja hozzájárult az elmúlt évek eredményeihez, nekik is köszönöm a közös munkát.

Hálásan köszönöm a családom türelmét és szeretetét, amely mindig erőt adott. Példamutatásuk alakított, formált emberré.