

# **DNS hibridizációs módszerek alkalmazása a klinikai cytogenetikában**

PhD értekezés tézisei

Czakó Márta

PTE Orvosi Genetikai és Gyermekfejlődéstani Intézet

2005

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

A molekuláris genetikai technikák jelentős mértékben bővítették a genomiális rendellenességek kimutatásának lehetőségét. Joggal remélhető tehát, hogy a DNS hibridizációs technikák – köztük a 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 azonban 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 tehetők 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 (a legismertebbek a Prader-Willi, az Angelman, a DiGeorge, a Williams, a Miller-Dieker, a Wolf-Hirschhorn, a Cri du Chat, a Kallmann és a Smith-Magenis szindrómák). Ezek az összetett fenotípussal jellemezhető rendellenességek legtöbbször sporadikusan fordulnak elő, de ismertek familiáris esetek is, amelyek hátterében 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 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. 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.

A mikroszatellita markerek segítségével lehetőségünk van egyes kromoszómák, ill. kromoszóma régiók szülői eredetének megállapítására, aminek a klinikai diagnosztikában is jelentősége van. A 46 kromoszómával jellemzett euploidia ugyanis 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 sejt vonal szervezeten belüli együttlétéről van szó.

A fejlődő magzatban létrejövő szomatikus mutációk okozta fejlődésbeli elmaradás, ill. malformáció mértéke a kóros és az egészséges sejt vonal 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 növekedéselmaradásra („confined placental aneuploidy”), lokalizált congenitalis malformációra.

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.

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.

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. 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 végeztünk interfázis FISH vizsgálatokat a különféle szövetekből (lymphocyták, buccalis nyálkahártya, tenyésztett fibroblast sejtek, esetenként izomszövet sejtjei, a vizeletüledékben található laphámsejtek, valamint hajgyökér sejtjei) vett mintákon.

## 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 feladatunk 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 ismertett 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. *Fibroblast kultúrához* alkohollal történő fertőtlenítést követően történt a bőrbioopszia vétele. *Amnion sejt kultúra készítéséhez* 20 ml amnion folyadékot steril centrifugacsőben lecentrifugáltunk (2000 rpm, 10 perc), az üledéket felszuszpendálva steril tenyésztőedényekben osztottuk el. A tenyésztés, ill. a kromoszómapreparátumok készítése hagyományos módszerrel történt. *Hajgyökér sejtekből nyert preparátum készítése:* a kihúzott hajszálok gyökerét fiziológias sóoldatba áztattuk fél órára, majd a hajgyökér sejtjeit tisztított üveg tárgylemezre kentük ki. A preparátumot metanolba mártva fixáltuk, majd szobahőn megszárítottuk. *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. *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. *Szövetminták preparálása:* a műtéti eljárás során nyert mintákat (szöveti metszetek) paraffinba ágyazva, tárgylemezre rögzítve kaptuk. A paraffint 3 x 10 perc xyolban 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.

A FISH vizsgálat megkezdéséig a preparátumokat -20 °C-on tároltuk.

**4.2. Metafázisos preparátumokon végzett FISH vizsgálat** (lymphocytá, ill. fibroblast és amnion sejt kultúrák): a FISH vizsgálat megkezdése előtt a fagyasztva tárolt lemezeket szobahőmérsékleten engedték felmelegedni. A vizsgálatokat a széles körben használt protokollok szerint végeztük.

**4.3. Interfázis FISH** (buccalis kenet, vizeletüledékből nyert laphámsejtek, hajgyökér sejtjei és egyéb szövetek nyugalmi állapotú sejt magjain, ill. magzati sejt mintákon): a protokoll a metafázis FISH módszernek 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.

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

#### **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, etidium-bromidos festéssel ellenőriztük. A PCR termék maradékát 8 % poliakrilamid gélen futtattuk, ezüstoffestéssel tettük láthatóvá.

Az értékelés során a gyermek (vizsgált személy) alléljeit a két szülő alléljeihez viszonyítottuk, azaz a kapott termékek mintázatát értékeltük.

### **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, bőrbioopsziából indított fibroblast kultúra sejtjei, vizeletüledékben található laphámsejtek, hajgyökér sejtek, esetenként izomszövet sejtjei) vett mintákon interfázis FISH vizsgálatokat végeztem.

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).

<b>Klinikai probléma:</b>	<b>Rutin cytogenetikai vizsgálat</b>	<b>Perifériás vér: IF FISH</b>	<b>Buccalis kenet: IF FISH</b>	<b>Vizeletüledék laphámsejtek: IF FISH</b>	<b>Fibroblast sejtek: IF FISH</b>	<b>Egyéb szövet: IF FISH</b>
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

<b>Klinikai probléma:</b>	<b>Rutin cytogenetikai vizsgálat</b>	<b>Perifériás vér: IF FISH</b>	<b>Buccalis kenet: IF FISH</b>	<b>Vizeletüledék laphámsejtek: IF FISH</b>	<b>Fibroblast sejtek: IF FISH</b>	<b>Egyéb szövet: IF FISH</b>
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 amenorrhoea	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 sejtvonallal jelenlétét. (Mivel a 14. esetben a kapott eredményeket a gyermek fenotípusát figyelembe véve nem tudtuk értelmezni, további vizsgálatokat végeztünk. Ezek eredményét az 5.2.1. fejezetben 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 sejtvonallal jelenlétét a szervezet más szöveteiben.

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 esetről 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.

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

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 aneuploidiák 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 szűrőmodszereként 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, 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 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, izomhypotonia, 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  $\alpha$  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 vizsgálatokor 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 rövidege, 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-sávós 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 kiegyensúlyozatlan formában történő öröklődésével magyarázható (Morava és mtsai, 2003b). Az édesanya következő terhességében a megfelelő painting próbák alkalmazásával végeztük a magzat vizsgálatát.

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-sávós 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 deléciót igazolt. A kérdéses régió kiegyensúlyozott transzlokációját a gyermek szüleiben nem tudtuk kimutatni (de novo rendellenesség a gyermekben).

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 száypad és micrognathia) mellett a 18-as triszómiára jellemző átfedő ujjai voltak, szívfejlődési rendellenesség azonban nem volt észlelhető. Súlyos növekedésbeli elmaradás, izomhypotonia és pszichomotoros elmaradás szerepelt a tünetek között.

Cytogenetikai vizsgálati eredménye a 6-os és 14-es kromoszómák közti kiegyensúlyozott transzlokációra, valamint a 4-es kromoszóma rövid kar esetleges deléciójára utalt. 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. 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”.

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).

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.

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.

<b>Klinikai diagnózis</b>	<b>Esetszám</b>	<b>Mikrodeléció igazolt</b>	<b>Kritikus régió</b>
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
<b>Összesen</b>	<b>412</b>	<b>59</b>	

5. táblázat: mikrodeléció kimutatására végzett FISH vizsgálatok eredményei

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 craniosynostosisal 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, dysmorphic 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.

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 mikrodeléció 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.

Az átrendeződésben részt vevő kromoszómát további FISH elemzésekkel 11-esként azonosítottuk: a két tünetmentes édesapa a t(11p;17p) kiegyensúlyozott szubmikroszkópos transzlokációt hordozza. A két érintett gyermek testvérei közül ketten hordozók, egynek normális a genotípusa. 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 mikrodelécióját igazolta.

### **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 várakozásnak 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 mikrodeléciót 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; Czako 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 ismertett 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.) mikrodeléziós 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.

## 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. IF: 2,479
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 háttérben 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. IF: 2,479
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. IF: 2,479
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. IF: 2,479
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 újszülöttnél 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. IF: 2,479
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. IF: 0,636
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. IF: 0,417
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. IF: 0,649
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. IF: 2,603
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. IF: 0,417

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. IF: 0,815
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, Emödy 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, Emödy 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, Nádasi 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. Érendszeri 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 Dymorphol*, 2003, 12, 3, 161-165. IF: 0,649
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. IF: 2,603
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. IF: 2,132
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. IF: 2,292

### **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. IF:10.09
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. IF:2.506
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. IF: 3,173
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. IF: 3,173
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. IF: 3,136
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. IF: 3,669
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. IF: 3,669
8. Hadzsiev K, *Czakó M*, Veszprémi B, Kosztolányi Gy. Prenatal screening of aneuploidy by interphase FISH. *Eur J Hum Genet*, 2003, 11, P401. IF: 3,669
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. IF:10,09
3. Kosztolányi Gy, Nádasi E, Melegh B, Morava É, *Czakó M*. Mitochondrial DNA4977 deletion in human newborn samples. *Eur J Hum Genet*, 1999, 7, P894, A143. IF:2.506



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. IF: 3,136
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. IF: 3,136
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. IF: 3,136
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. IF: 3,669
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. IF: 3,669
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, Nádas 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, Nádas 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, Nádas 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. Humánogenetikai 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. Humánogenetikai Társaság III. Kongresszusa, Debrecen, 2001. június.
9. *Czakó M*, Kárteszi J, Morava É, Kosztolányi Gy. A molekuláris cytogenetika jelentősége egy komplex kromoszómaátrendeződés felderítésében. Humánogenetikai Társaság III. Kongresszusa, Debrecen, 2001. június.
10. Hadzsiev K, *Czakó M*, Veszprémi B, Kosztolányi Gy. Magzati aneuploidiák vizsgálata interfázis FISH módszerrel. Magyar Humánogenetikai 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 Humánogenetikai 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 Humánogenetikai Társaság V. Kongresszusa, Szeged, 2004. november.
13. Veszprémi B, Hadzsiev K, Vizer M, Arany A, *Czakó M*, Kerecsényi P, Szabó I, Kosztolányi Gy. Számbeli kromoszóma rendellenességek nem invazív módszerekkel történő szűrésével szerzett tapasztalatok. Magyar Humánogenetikai 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 Humánogenetikusok 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 Humánogenetikai Társaság V. Kongresszusa, Szeged, 2004. november.
3. Funke S, Morava É, *Czakó M*, Ertl T, Kosztolányi Gy. Koraszülöttek osteopéniája és genetikai polimorfizmusok. Magyar Humánogenetikai Társaság V. Kongresszusa, Szeged, 2004. november.

#### **A dolgozat témájához kapcsolódó poszterek**

1. *Czakó M*, Morava É, Nádas E, Szabó L, Kovács E, Melegh B, Kosztolányi Gy. Familiáris Miller-Dieker syndroma II. Fluoreszcens in situ hybridizációval végzett diagnosztikai vizsgálat. A Magyar Gyermekegyorvosok 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: deléció vagy telomerikus fúzió? Magyar Humángenetikai 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, Nádas E, *Czakó M*, Gyűrűs P, Morava É, Melegh 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.  $\beta$ 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 évekkel 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 Gyermekfejlődéstani 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.