Neurális vagy neuromuszkuláris tünetekkel manifesztálódó genetikai eltérések vizsgálata magyar népességmintákban és az RPE65-gén mutációinak szerepe retina-disztrófiás betegekben

PhD értekezés

Dr. Gyűrűs Péter
Pécsi Tudományegyetem
MTA-PTE Klinikai Genetikai Tanszéki Kutatócsoport
PTE, Orvosi Genetikai és Gyermekfejlődéstani Intézet
2002.

Programvezető és témavezető:
Prof. Dr. Melegh Béla

Tartalomjegyzék

Előszó 3.

I. Intragénikus trinukleotid ismétlődések vizsgálata a DM, DRPLA, HD, SBMA és SCA-1 lokuszokon
I/1 Bevezetés 4.
I/2 Anyagok és módszerek 6.
I/3 Eredmények 8.
I/4 Megbeszélés 12.

II. A disztrofin-gén deléciós töréspontjainak vizsgálata Duchenne-Becker szindrómás magyar betegekben
II/1 Bevezetés 13.
II/2 Anyagok és módszerek 16.
II/3 Eredmények 18.
II/4 Megbeszélés 21.

III. Galaktóz-1-foszfát-uridil-transzferáz gén Q188R és N314D mutációinak vizsgálata magyar galaktozémiás betegekben
III/1 Bevezetés 23.
III/2 Anyagok és módszerek 27.
III/3 Eredmények 31.
III/4 Megbeszélés 33.

IV. Az RPE65-gén mutációinak vizsgálata retina-disztrófiában szenvedő betegekben
IV/1 Bevezetés 39.
IV/2 Anyagok és módszerek 42.
IV/3 Eredmények 51.
IV/4 Megbeszélés 69.

V. Az eredmények összefoglalása 73.

VI. Rövidítések 75.

VII. Saját közlemények, absztraktok és előadások jegyzéke 76.

VIII. Irodalomjegyzék 78.

Köszönetnyílvánítás 89.

Előszó

A humán populációgenetika célja különböző népcsoportok genetikai kapcsolatának és a genetikai variabilitás hátterében álló mechanizmusoknak a vizsgálata megfelelően választott genetikai markerek által. Az elmúlt évtizedekben a hozzáférhető markerek alapvetően megváltoztak. Míg korábban a különböző fehérje természetű markerek (vércsoport antigének, szérumfehérjék, enzimek) polimorf típusainak elemzésével próbáltak adatokat nyerni, az elmúlt kb. 15-év biotechnológiai áttörésének eredményeképpen a DNS vizsgálatán alapuló módszerek terjedtek el. A DNS-markerek elemzése többnyire egyszerűbb és olcsóbb, mindazonáltal információtartalmuk (polimorfizmusuk) nagyobb, mint az említett fehérje típusú markereké. A különböző lokuszokhoz társuló polimorfizmusok eloszlásának vizsgálata mellett egyes öröklődő betegségek genetikai hátterének (génmutációinak) populációk közti változása is érdekes adat, mind a népcsoportok közti genetikai kapcsolat, mind az eltérések/mutációk feltételezett eredetének vizsgálata szempontjából.

Az értekezés első három fejezetében hazai népességből vett mintákon végzett populációgenetikai jellegű vizsgálatainkat 3 példán keresztül megközelítve mutatom be.

Az öröklődő betegségek genetikai hátterének feltárása, az elmúlt másfél évtized biotechnológiai fejlődésének következtében, korábban szinte elképzelhetelenül gyors ütemben zajlik. A fenotípus és genotípus közti összefüggések megértését, az öröklődő betegségek jelentős részét jellemző allélikus és nem-allélikus genetikai heterogenitás alaposan megnehezíti. Különösen igaz ez az ideghártya változatos öröklésmenetet mutató disztrófiáira, amelyek hátterében kóroki tényezőként több tucat génben írtak le különböző mutációkat. A retina elfajulásával kapcsolatba hozható gének többsége a fotoreceptorokban expresszálódik, újabban azonban felismerték, hogy a fotoreceptorok fiziológiás működéséhez fontos struktúrákban, mint például az ideghártya pigmenthámjában expresszálódó gének mutációi is okozhatnak degeneratív eltéréseket a retinában.

A hamburgi egyetem humángenetikai intézetében töltött tanulmányutam során, Gál András professzor úr vezetése alatt, a pigmenthámra jellemző RPE65-gén szerepét vizsgáltunk súlyos fokú, öröklődő ideghártya-disztrófiában szenvedő betegekben. Az RPE65-gén mutációinak vizsgálatát az értekezés negyedik fejezetében ismertetem.

Intragénikus trinukleotid ismétlődések vizsgálata a DM, DRPLA, HD, SBMA és SCA-1 lokuszokon

Bevezetés

Az emberi genom, akárcsak a többi összetett eukariota szervezet, nagy arányban tartalmaz rövidebb-hosszabb egységek tandem ismétlődéseiből álló szakaszokat, amelyek az ismétlődő egység nagysága, valamint az ismétlődések száma alapján három csoportba sorolhatók: a szatellita, a miniszatellita és a mikroszatellita típusú ismétlődésekre. A mikroszatellita ismétlődések 1-5bp hosszú egységek viszonylag rövid (gyakran 150bp-nál rövidebb) sorozataiból állnak (Tautz és Schlotterer, 1994). A mononukleotid sorozatok, amelyek többnyire adenin illetve timin nukleotidok sorozatai, összeségükben a genom 0,3%-át, kb 10MB-t képeznek. A dinukleotid ismétlődések, túlnyomórészt CA/TG és CT/AG sorozatok szintén gyakoriak, a genom kb 0,7%-át alkotják, míg a tri- és tetranukleotid egységekből álló ismétlődések viszonylag ritkábbak, 300-500kb-onként fordulnak elő. A mikroszatelliták szerepe ugyan nem ismert, azonban nagyfokú polimorfizmusuk miatt a genotípus-diagnosztikában (indirekt géndiagnosztika), a géntérképezésben (Weissenbach és mtsai, 1992) illetve a populációgenetikában (Deka és mtsai, 1995a; Deka és mtsai, 1995b; Pérez-Lezaun és mtsai, 1997) kiterjedten felhasználhatók.

A trinukleotid ismétlődések egy része a mikroszatelliták egy sajátos kategóriáját képezi. Az elmúlt évtizedben egyre növekvő számban váltak ismertté olyan intragénikus trinukleotid ismétlődések, amelyek kóros, expandált formációi elsősorban neurodegeneratív manifesztációjú betegségek molekuláris hátterét képezik (Caskey és mtsai, 1992; Timchenko és Caskey, 1996; Reddy és Housman, 1997). Molekuláris szempontból ezen kórképek két részre oszthatók: az egyik csoportba a génfunkció elvesztését okozó kifejezetten expandált ismétlődések, míg a másikba poliglutamin szakaszt kódoló, többnyire a mérsékelten kiterjedt trinukleotid sorozatok (CAG ismétlődések) tartoznak. Az utóbbi csoportban a mutáció (az ismétlődések kóros expanziója) egy „többlet funkciót” eredményez, amely a képződött fehérje toxicitása által szelektív sejtelhalást okoz (Reddy és Housman, 1997; Rubinsztein és mtsai, 1999).

A génfunkció-vesztés révén keletkező betegségek csoportjába a fragilis X-szindróma (FRAXA, FRAXE) (Verkerk és mtsai, 1991; Gu és mtsai 1996), a Friedreich-ataxia (FA) (Campuzano és mtsai, 1996), a dystrophia myotonica (DM) (Brook és mtsai, 1992) és spinocerebelláris ataxia 8-as típusa (SCA-8) (Koob és mtsai, 1999) sorolhatók.

A „funkció-többlet” következtében kialakuló betegségek közé a Huntington-betegség (The Huntington’s Disease Collaborative Group, 1993), a Kennedy-betegség (SBMA) (La Spada és mtsai, 1991), a spinocerebelláris ataxiák (SCA-1, SCA-2, SCA-3, SCA-6, SCA-7 típusok) (Orr és mtsai, 1993; Imbert és mtsai, 1996; Pulst és mtsai, 1996; Sanpei és mtsai, 1996; Kawaguchi és mtsai, 1994; Zhuchenko és mtsai, 1997; Gouw és mtsai, 1995) és a dentatorubrális pallidoluysian atrófia (Koide és mtsai, 1994; Nagafuchi és mtsai, 1994) tartoznak.

Az átlag-populációban ezen trinukleotid sorozatok ismétlődésszámai ugyan nagyfokú változatosságot mutatnak, többé-kevésbé jól meghatározott értékek között mozognak. Az ismétlődésszámok eloszlása különböző népcsoportok között jelentős különbségeket mutat, így a populációk közötti genetikai távolságok becslésére jól használhatók (Edwards és mtsai, 1992; Watkins és mtsai, 1995;). Vizsgálataink egy részében az intragénikus trinukleotid ismétlődések eloszlásának meghatározását tűztük ki célul, a SCA-1, SBMA, DRPLA, HD és MD betegség-lokuszokon.

Anyagok és módszerek

A vizsgálatokhoz a DNS-t perifériás (vénás) vérmintákból ún. kisózásos (Miller és mtsai, 1988) módszerrel izoláltuk: 10ml EDTA-val alvadásgátolt vért 50ml-es centrifugacsőben 2000 percenkénti fordulatszámmal (rpm) 10 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót leszívtuk. Az üledéket lízis-pufferrel (10mM Tris-HCl, 400mM NaCl, 2mM Na_2EDTA, pH 8,2) 45ml-re feltöltöttük, az üledéket felszuszpendálva 15 percig rázattuk. A szuszpenziót 2000rpm-el 15 percig centrifugáltuk 4C^o-on. Az előbbi lépés megismétlését követően az üledéket éjszakán át emésztettük 37C^o-on (5ml SE-puffer [75mM NaCl, 25mM Na_2EDTA]+50µl Proteináz-K, 500µl 10% SDS). 2ml 5M-os NaCl hozzáadása után 10 másodpercig vortexeltük, majd 15 percig 4000rpm-el lecentrifugáltuk. A felülúszót egy másik csőbe töltöttük és 20ml –20C^o-os abszolút alkohollal összekevertük, majd fél órát állni hagytuk. A kicsapódott DNS-t egy steril kanüllel kinyertük és Eppendorf-centrifugacsőbe helyeztük. A DNS-precipitátumot 70%-os alkoholban, enyhe rázást követően fél óráig hagytuk állni. Centrifugálást követően a felülúszót leöntöttük, az üledéket kb. fél óráig szárítottuk és 500µl TE pufferben (12,2% Tris és 3,4% Na_2EDTA, pH 8,0) éjszakán át oldottuk.

A SCA-1, SBMA, DRPLA, HD, MD lokuszok bázishármas ismétlődéseket tartalmazó szakaszait PCR-reakciókkal erősítettük fel. Az erősítésekhez az irodalomból ismert primereket (Watkins és mtsai, 1995) használtuk. A PCR reakciókat PCT100 és PTC200 típusú (MJ Research) termo-ciklométerekkel végeztük a következő körülmények között: PCR-elegyek csövenként 25µl végtérfogatban 100-200ng DNS-t, mindkét primerből 25pmol-t, minden egyes dNTPből (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) 20-20nmol-t, 3 egység Taq polymerase-t és Taq polymerase puffert (50mM KCl, 0,1% Triton X-100, 10mM Tris-HCL, pH 8,0) tartalmaztak. A vizsgált lokusztól függően, az alkalmazott $MgCl_2$ koncentrációt 2,5-3,5mM között változtattuk, a Mg-optimalizációs teszt eredményétől függően.

A PCR-reakciókhoz a következő hőprogramot használtuk: 2 perc 96C^o (kezdeti denaturálás); 35 ciklusban 96C^o 1 perc, 62C^o 1 perc, 72C^o 1 perc (ciklikus szakasz, erősítés); végül 72C^o 10 perc (utolsó extenziós lépés). A PCR-reakciók során kapott végtermékeket agaróz-gélelektroforézissel (1,5-2,0%-os géleken) ellenőriztük.

A bázishármasokat tartalmazó PCR-termékek hosszát poliakrilamid-gélelektroforézissel (8%-os poliakrilamid gél, acrilamid:bisakrilamid 29:1) határoztuk meg. Az elektroforézishez vertikális rendszert alkalmaztunk (42x30x0,08cm, Stratagene BaseAce Jr), a fragmenteket a jó szétválás érdekében viszonylag lassú futtással (konstans 220V-os feszültségen, 22 óra alatt) szobahőn választottuk el. A géleket ezüstözéssel hívtuk elő, a következő módon (Budowle és mtsai, 1991): az elektroforézist követően a géleket 5-10 percig 10%-os alkoholban fixáltuk, majd 1%-os salétromsavban 3 percig oxidáltuk. Desztillált vizes öblítés után 20 perces rázatás következett 12mM-os ezüst-nitrát oldatban, miután a felesleget kétszeri desztillált vizes mosással távolítottuk el. Végül, a DNS-hez kötődött ezüstionokat 0,28M nátrium-bikarbonátot és 0,019% formalint tartalmazó oldatban redukáltuk fémezüstté. Mikor a DNS-csíkok festődése elérte a kívánt intenzitást (sötét barna, fekete), a redukáló reakciót 10%-os ecetsavas mosással (kb. 2 perc) állítottuk le. A géleket szűrőpapírra helyezve fóliával fedtük és vákuumos gélszárítóval szárítottuk.

Vizsgált népcsoport

A trinukleotid-ismétlődések eloszlásának vizsgálatához a Pécsi Orvostudományi Egyetem Gyermekklinikája molekuláris biológiai laboratóriumában összegyűjtött egészséges, magyar származású önkéntesek perifériás (vénás) vérmintáit használtuk. A DRPLA-lokuszt 102, az SCA-1 lokuszt 71, a huntingtin-gént (HD) 69, az SBMA-lokuszt 54 és az Mt-PK gént 88 egyénben vizsgáltuk.

Statisztikai elemzés

A trinukleotid ismétlődések vizsgálatakor az egyes lokuszok különböző alléljainak gyakoriságát a mérési eredmények alapján határoztuk meg. Az adott lokusz trinukleotid ismétlődésére jellemző heterozigozitási index (h) becslését a $h = 1 - \sum_{i=1}^{n} x_i^2$ formula segítségével számoltuk ki, ahol n az allélek száma, x_i az i-edik allél mért gyakorisága (Nei, 1987). A különböző trinukleotid ismétlődések (allélok) egyes lokuszonként észlelt gyakoriságát az ázsiai és kaukázusi rasszok megfelelő adataival hasonlítottuk össze χ^2-formulával számolva. Az összehasonlítás alapját képező adatokat Watkins és mtsai (1995) tanulmányából vettük, akik 90 kaukázusi (észak-európai és francia származású) és 78 ázsiai (kevert, távol-keleti származásúak) egyént tipizáltak.

Eredmények

A vizsgált egészséges egyénekben a trinukleotid sorozatok ismétlődésszámai mindegyik lokuszon a normál tartományba estek. A heterozigóták becsült/várható előfordulási gyakoriságát az 1. táblázatban adjuk meg, a kaukázusi és ázsiai minták megfelelő adataival összehasonlítva (Watkins és mtsai, 1995).

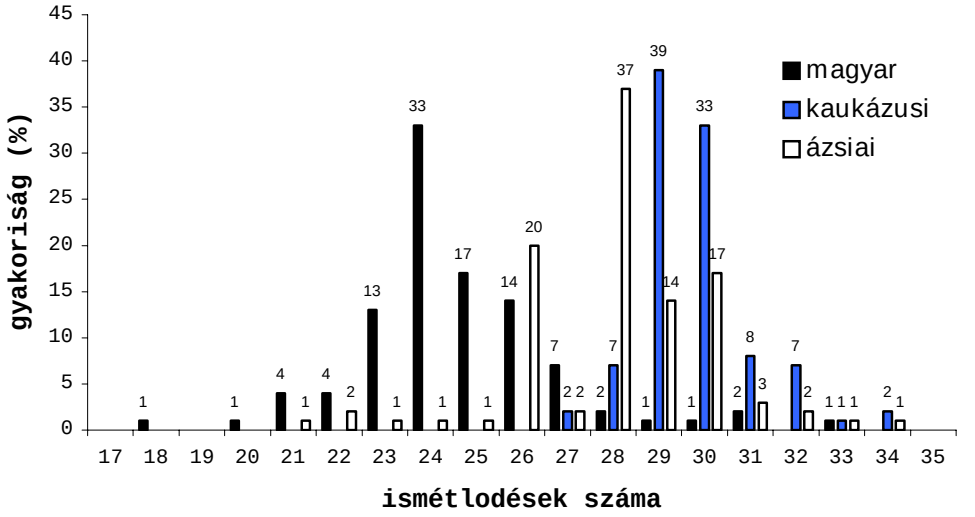
1. táblázat. A heterozigóták becsült aránya az öt betegség lokuszán

Népcsoportok	**DM (%)**	**HD (%)**	**DRPLA (%)**	**SBMA (%)**	**SCA-1 (%)**
magyar	82	86	88	85	82
kaukázusi	79	87	77	89	72
ázsiai	81	78	86	88	77

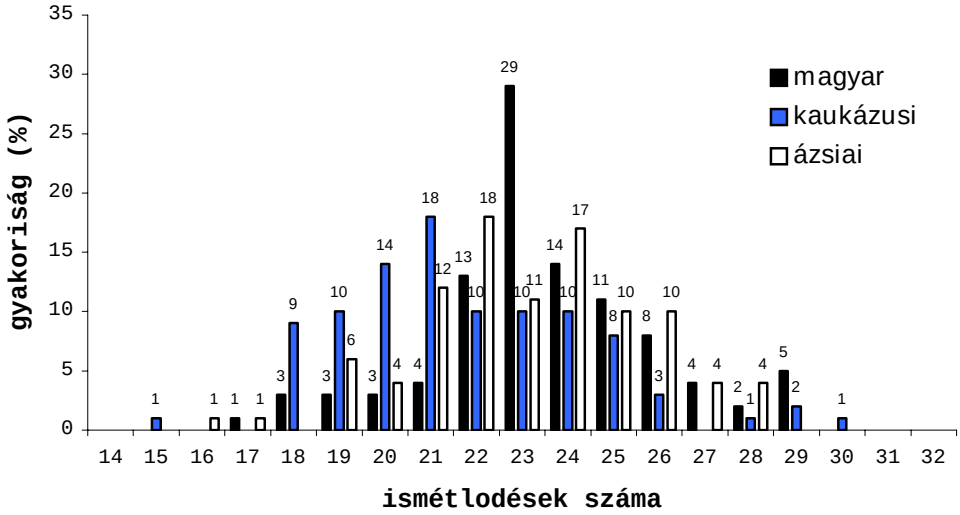
Az allélok gyakoriságának eloszlását az egyes lokuszokon a kontroll csoportokkal összehasonlítva az 1-5. ábrákon mutatjuk be.

Az SCA-1 allélok eloszlása (1. ábra) a kaukázusi és ázsiai rasszhoz viszonyítva szignifikáns eltérést mutatott ($P<0,001$). Az allélok mindhárom populációban egy modusz körül helyezkedtek el, azonban a magyarok között a modusz a kaukázusi adatokhoz képest 5, míg az ázsiai adatokhoz képest 4 ismétlődéssel balra, az alacsonyabb ismétlődésszámok irányába tolódott.

Az SBMA allélok eloszlása a hazai populációban unimodalisnak bizonyult, akárcsak a kontroll népcsoportokban (2. ábra). Az allélok 17-29 ismétlődésszámok közti értékeket mutatnak, hasonlóan a másik két populációhoz (kaukázusiak 15-30, ázsiaiak 16-28). A magyaroknál a modusz a 23-as ismétlődésszámnál van, ami szignifikánsan eltér ($P<0,05$), magasabb, a megfelelő kontroll értékektől. Ez magyarázza, hogy a heterozigóták becsült aránya ezen lokuszon kissé alacsonyabb mint a másik két populációban. A 21 ismétlődésnél rövidebb allélok aránya a kaukázusi csoporthoz képest szignifikáns eltérést mutat ($P<0,02$).



1. ábra. A trinukleotid ismétlődések eloszlása az SCA-1 génben.

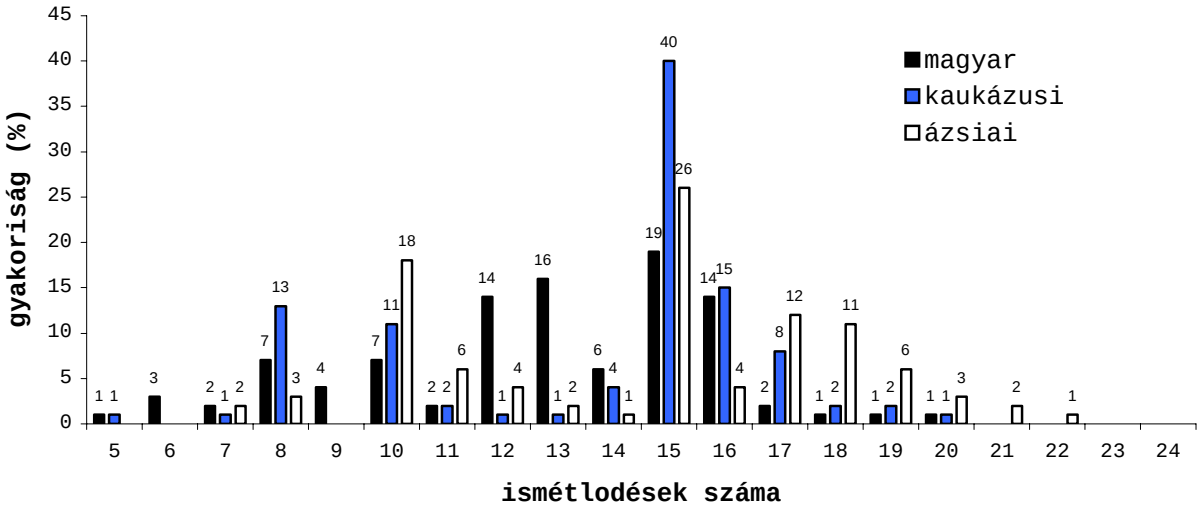


2. ábra. A trinukleotid ismétlődések eloszlása az SBMA-génben.

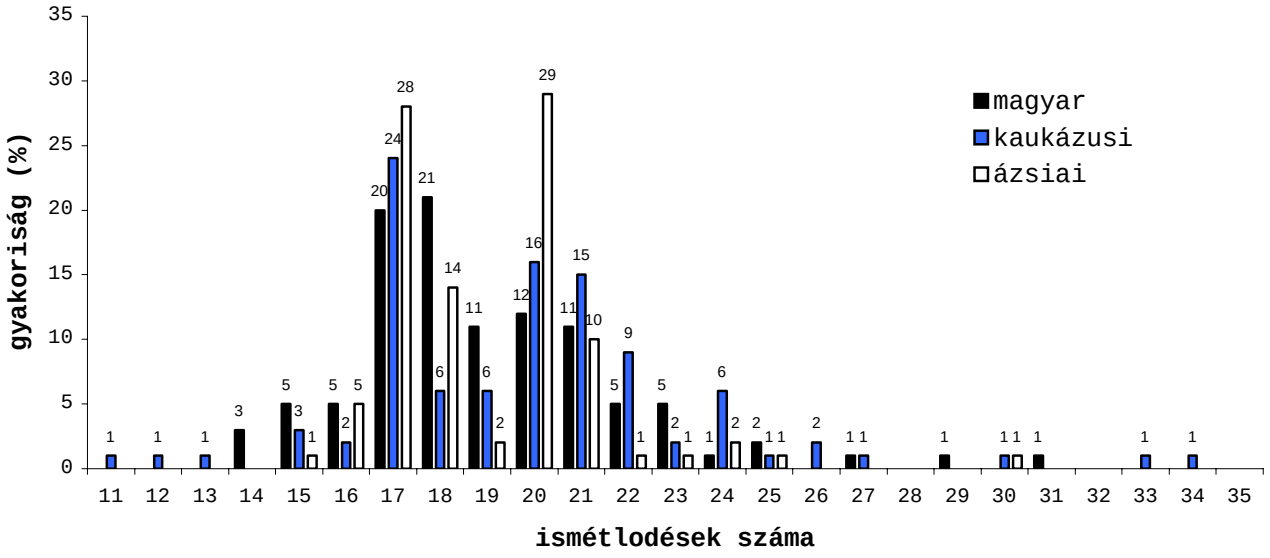
A DRPLA-allélek (3. ábra) bimodalis eloszlást mutatnak mint a hazai, mint a kontroll populációkban. A trinukleotid sorozatok hossza 5-20 ismétlődésszámok közti értéket mutat a kaukázusi és a hazai népességben, míg az ázsiai mintában az allélok kissé eltolódtak a nagyobb ismétlődésszámok felé (7-22). A 15-22 ismétlődésszámok közti tartományban a magyar mintában az allélek szignifikánsan rövidebbek és gyakoriságuk összeségében is kisebb, mint a kontroll csoportokban (P<0,001). Ezzel szemben a 9, 12, 13 trinukleotidból álló sorozatok a másik két populációhoz képest lényegesen gyakrabban fordultak elő (P<0,05).

A huntingtin-génben a hazai mintában a 17-es illetve 18-as, míg a kaukázusi és ázsiai mintában a 17-es és 20-as ismétlődésszámú allélek a leggyakoribbak (4. ábra). Az allélok eloszlása az ázsiai mintához képest egyenletesebb, ahol a 17-es és 20-as modusz képviseli az allélok csaknem 60%-át. Ez magyarázza, hogy ezen a lokuszon a heterozigóták becsült/várható gyakorisága az utóbbi mintában a legalacsonyabb.

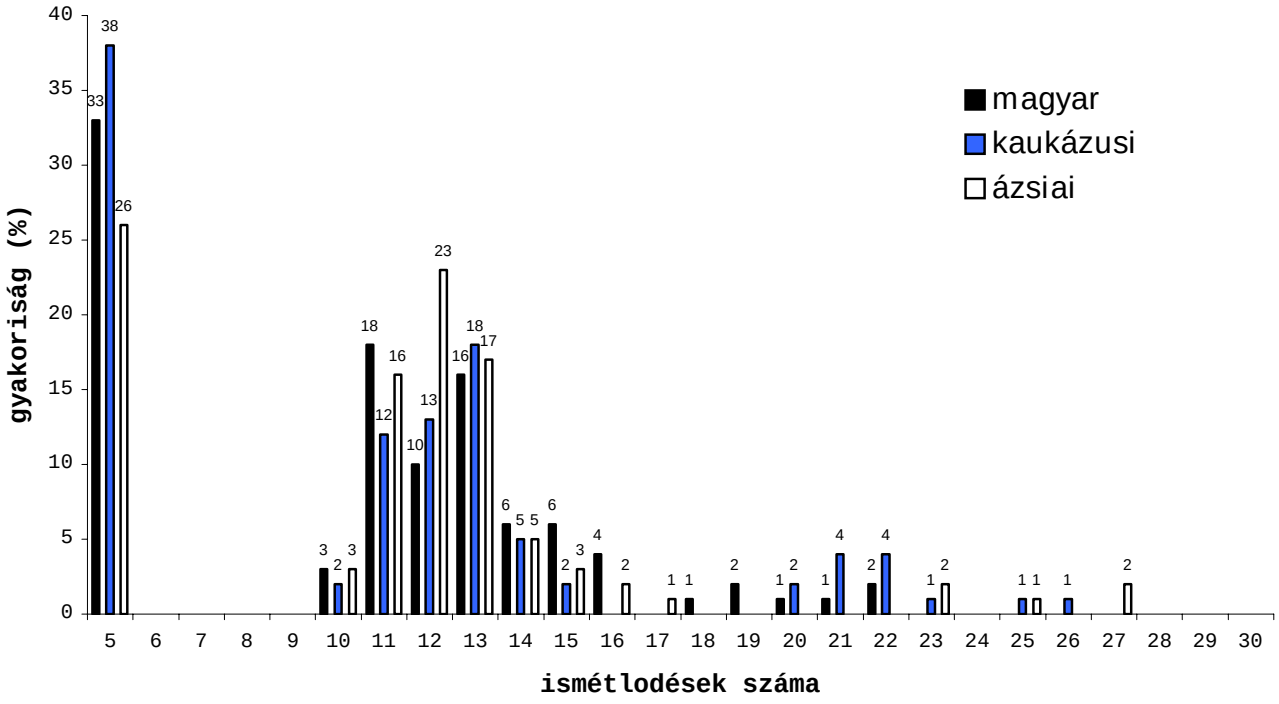
Az Mt-PK-génben az allélok hozzávetőlegesen 3 modusz körül csoportosulnak, továbbá feltűnő, hogy az 5 trinukleotid ismétlődést tartalmazó allélok a leggyakoribbak mind a hazai, mind a kontroll népcsoportokban egyaránt (5. ábra). A statisztikai elemzés során ezen lokuszon nem észleltünk szignifikáns különbséget a megfelelő allélek gyakoriságát illetően a magyar populáció, illetve a kaukázusi és ázsiai rasszok között.



3. ábra. A trinukleotid ismétlődések eloszlása a DRPLA-génben.



4. ábra. A trinukleotid ismétlődések eloszlása a huntingtin-génben.



5. ábra. A trinukleotid ismétlődések eloszlása az Mt-PK-gén 3'UT-régiójában.

Megbeszélés

A trinukleotid ismétlődések egyénenként nagyfokú variabilitást mutatnak, az egyes lokuszok alléljeinek magas száma és változatos eloszlása által különösen alkalmasak populációk genetikai kapcsolatainak vizsgálatára. Előnyük a viszonylag egyszerű tipizálhatóság, a genomban való elszórt elhelyezkedésük, valamint az, hogy feltehetően nem állnak szelekciós nyomás alatt (Edwards és mtsai, 1992). Az elmúlt 10 évben a bázishármas sorozatok a tudományos érdeklődés előterébe kerültek, mivel felismerték, hogy egyes intragénikusan elhelyezkedő típusaik kóros expanziójához - elsősorban neurodegeneratív manifesztációjú- megbetegedések társulnak (Fu és mtsai, 1991; La Spada és mtsai, 1991). Ezen intragénikus bázishármas sorozatok a tünetmentes átlagpopulációban meghatározott, az adott lokuszra jellemző tartományban nagyfokú változatosságot mutatnak, míg - egy a lokuszonként meghatározott ismétlődésszám feletti- expanziójuk megbetegedést okoz. Ezen felismerés egyben a korábban ismert mutációktól alapvetően eltérő mechanizmusú genetikai elváltozás felfedezését is jelentette.

Több korábbi tanulmány megállapítja, hogy az egyes betegség-lokuszok bázishármas ismétlődéseinek eloszlása etnikai különbségeket mutat (Watkins és mtsai, 1995; Zerylnick és mtsai, 1995). Ezen adatokra támaszkodva vizsgáltuk meg öt betegség-lokuszon az intragénikus ismétlődések eloszlását a magyar populációban.

A bázishármas-sorozatok ismétlődésszámai mind az öt lokuszon a normál tartományon belüli értékeket vettek fel. Az egyes lokuszok alléljeinek mért gyakoriságából számolva, a heterozigóták várható arányára a magyar népességben a kontrollcsoportokhoz hasonló értékeket kaptunk. A HD és MD lokuszokon az allélek eloszlása a hazai mintában nem tért el szignifikánsan a kaukázusi és ázsiai kontrollcsoportokétól.

Az SCA-1 lokuszon az egyes ismétlődésszámok gyakoriságai szembetűnő eltérést mutattak a másik két mintától, a magyar allélek eloszlása 4-5 bázishármassal balra, a rövidebb trinukleotid sorozatok irányába tolódott.

Az SBMA-allélek eloszlása a kaukázusi mintától szignifikánsan eltért, míg az ázsiai mintához viszonyítva statisztikailag különbség nem volt kimutatható. A DRPLA-lokuszon a magyar mintában az ismétlődések a kontroll mintákhoz képest rövidebbek voltak, illetve ennek megfelelően az egyes allélek gyakorisága is eltért.

A disztrofin-gén deléciós töréspontjainak eloszlása magyar Duchenne-Becker szindrómás betegekben

Bevezetés

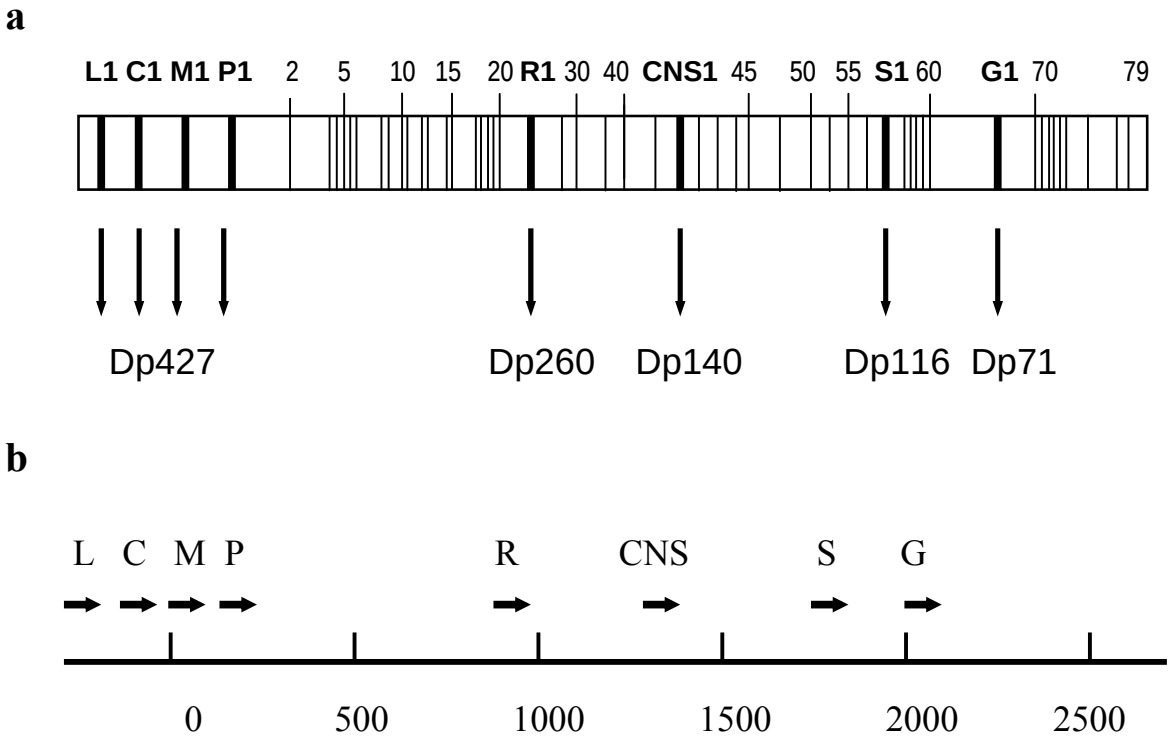
Duchenne-féle (DMD) illetve a Becker-féle (BMD) izomdisztrófiák az X-kromoszómához kötötten recesszíven öröklődő betegségek, amelyek, bár egyes tüneteik alapján hasonlóságot mutatnak, kórlefolyásukat illetően nagyfokban különböznek. A DMD legjellemzőbb vonása a proximális izomcsoportokban progrediáló disztrófia, amelyhez a lábikra izomzatának pszeudohipertrófiája társul. A vázizomzat mellett a szívizomzat és a simaizmok is érintettek, az utóbbi a gyomor kitágulásához, illetve bélelzáródásszerű tünetekhez vezet. Érdekes módon a szemmozgató izmok megkíméltek (Kaminski és mtsai, 1992), sem az egyéb izomcsoportoknál észlelt izomelhalás, illetve a kórosan emelkedett intracelluláris Ca-szint sem alakul ki (Khurana és mtsai, 1995). A klinikai tünetekhez enyhe, illetve esetenként közepesen súlyos szellemi fogyatékosság (IQ < 70) is társul.

A DMD többnyire 3 éves kor előtt tüneteket okoz, a betegek 12 éves korunkra tolószékhez kötöttek és átlagosan 20 éves korukig élnek. A BMD enyhébb kórlefolyású és a tünetek is később jelentkeznek, gyakran a betegek 20-30 éves korukban kerülnek észlelésre és esetenként viszonylag magas kort is megélnek.

A 80-as évek közepe óta ismert, hogy mindkét betegség molekuláris hátterében az ún. disztrofin fehérjét kódoló gén hibái állnak (Kunkel és mtsai, 1986). A disztrofin fehérje a nevét a kapcsolódó emberi betegségekről kapta, mint például Huntington-kórról a huntingtin, az Emery-Dreifuss izomdisztrófiáról az emerin és az 1-es típusú spinocerebelláris ataxiáról az ataxin. A disztrofin-gént géntérképezéssel és pozícionális klónozással is az X-kromoszóma rövid karjára (Xp21) lokalizálták (Lindenbaum és mtsai, 1979; Murray és mtsai, 1982; Fadda és mtsai, 1985; Bodrug és mtsai, 1987).

Időközben a disztrofin-gén mutációihoz kapcsolódóan egyéb kórképek kialakulását is leírták, mint például az X-kromoszómához kötött dilatatív cardiomyopathiát és egy sajátos, nem progrediáló görcsös izomfájdalomban megnyilvánuló izomdisztrófiát (Towbin és mtsai, 1993; Gospe és mtsai, 1989).

A disztrofin-gén az emberi szervezet egyik legnagyobb génje (2,4Mb), legalább 79 exonja van, amelyek viszonylag rövid mRNS-t kódolnak (kb. 14kb), amelyről az izomszövetben 3685 aminosavból álló fehérje képződik (1. ábra). Az exonokat szokatlanul terjedelmes intronok (átlagosan 30kb) választják el. Ezidáig 8 promoter régió ismert, amelyek a szövetenként eltérő nagyságú fehérjék képződését szabályozzák. A szövet-specifikus disztrofin-izomorfok molekulatömege 427 és 71 kilodalton között változik. A gén további érdekes vonásai a mutációk kivételesen nagy gyakorisága, valamint az intragénikus rekombinációk ugyancsak magas száma (Darras és mtsai, 1988; Oudet és mtsai, 1989).



1. ábra A disztrofin-gén. **a.** Az óriás-gén exon/intron szerkezete. A gén átíródását legalább nyolc, sejt/szövet specifikus promoter szabályozza. L:limfocita, C: agykéreg, M: izom, P: Purkinje-sejt, R: retina, CNS: központi idegrendszer, S: Schwann-sejt, G: általános-promoter. Az egyes promoterektől nyilak utalnak a képződő disztrofin-izomorfok molekulatömegére (Dp:disztrofin fehérje). **b.** A promoterek elhelyezkedése a gén szekvenciájához viszonyítva. A nukleotidok számát kilobázisban tüntettem fel.

A kórokozó mutációk az esetek többségében (kb. 65%) a gén különböző nagyságú delécióí, amelyek mellett duplikációkat (kb. 5%) valamint „splice site” és „nonsense” mutációkat is leírtak (Darras és mtsai, 1988; Hu és mtsai, 1988; Liechti-Gallati és mtsai, 1989).

A disztrofin-gén delécióinak töréspontjai az ezidáig vizsgált populációkban jellegzetes eloszlást mutattak, függetlenül a betegcsoport etnikai/nemzeti hovatartozásától. A töréspontok túlnyomó része a gén középső harmadának 3’ végén, míg kisebb részük a gén 5’ végén található. Ezen két régión belül, a különböző népcsoportokban, az intronok egymástól esetenként szignifikánsan eltérő gyakorisággal érintettek. Ennek magyarázatául sokan az adott mintára jellemző, esetlegesen a DNS-töréseire hajlamosító szekvenciák létezését feltételezik a szelekciós hatástól mentes intronokban (Danieli és mtsai, 1993; Claustres és mtsai, 1991; Florentin és mtsai, 1995; Shomrat és mtsai, 1994; Todorova és mtsai, 1996; Gökgöz és mtsai, 1993).

Vizsgálataink célja a disztrofin-gén deléciós töréspontjainak meghatározása, illetve a töréspontok eloszlásának elemzése a hazai DMD/BMD beteg-populációban.

Anyagok és módszerek

A disztrofin-gén delécióinak kimutatása

A disztrofin-gén delécióinak kimutatására kétféle módszer terjedt el, a Southern-féle hibridizáció és a multiplex PCR-módszer. Gazdaságossága, feloldóképessége és viszonylagos egyszerűsége révén az utóbbi technika alkalmazása célszerűbb (Abbs és mtsai, 1991), ezért a 159 magyar DMD/BMD beteg DNS-ének vizsgálatát mi is multiplex PCR-rendszerekkel végeztük el. A napjainkban összegyűlt irodalmi adat alapján a deléciók a disztrofin-gén exonjainak csak egy részét érintik, így megbízható kimutatásuk korlátozott számú exon felerősítésével elérhető. A PCR-reakciókhoz az eredeti közleményekben (Chamberlain és mtsai, 1988; Beggs és mtsai, 1990; Abbs és mtsai, 1991), illetve Todorova és munkatársai (1996) által leírt primereket használtuk.

A PCR reakciókat PCT100 és PTC200 típusú (MJ Research) termo-ciklométerekkel végeztük, a reakcióelegyek összetétele 100µl-es végtérfogatban a következő volt: 250ng DNS, 0,5µM minden egyes primerből, minden egyes dNTP-ből 0,5mM, 6,5mM $MgCl_2$, 3 egység Taq polymerase és Taq polymerase puffer (50mM KCl, 0,1% Triton X-100, 10mM Tris-HCL, pH 8,0). Az amplifikációkat a következő hőprogrammal végeztük: 96C^o 5 perc denaturálás után 35 ciklusban 94C^o 30s, 53 C^o 30s, 72 C^o 4 perc; végül 72 C^o 5 perc. A termékek elválasztása 1,4 %, illetve 3%-os agaróz gélen, valamint 12%-os poliakrilamid-gélen történt. A poliakrilamid gélelektroforézist vertikális készülékben végeztük. A reakciótermékeket az agarózgélben etídium-bromid festéssel, míg a poliakrilamid-gélben etídium-bromid festéssel és ezüstözéssel vizualizáltuk (Budowle és mtsai, 1991).

Az amplifikációk során képződött eltérő hosszúságú fragmentumok a disztrofin-gén különböző exonjainak felelnek meg, így a vizsgált mintákban az egyes fragmentumok megléte (kimutathatósága) illetve hiánya alapján a gén hiányzó, deletálódott szakaszának nagysága kikövetkeztethető.

Beteganyag

A disztrofin-gén deléciós töréspontjait Magyarországon, magyar szülők házasságából született Duchenne/Becker típusú izomdisztrófiában szenvedő fiú gyermekek vérmintáiból vizsgáltuk. A betegek kórismézése a jellegzetes klinikai kép, az elektromiogramm és a kreatin-kináz értékek alapján történt. Egyes egyesetekben a diagnózist izombiopsziával és anti-disztrofin antitesttel végzett immunhisztokémiai reakciókkal egészítettük ki. Jelen tanulmányba csak az egyértelműen diagnosztizálható eseteket vettük be. 135 Duchenne típusú és 24 Becker típusú izomdisztrófiában szenvedő (összesen 159) betegtől vettünk vért molekuláris vizsgálatokra. A mintákat három hazai orvostudományi egyetem (Debrecen, Pécs, Szeged) laboratóriumaiban elemezték.

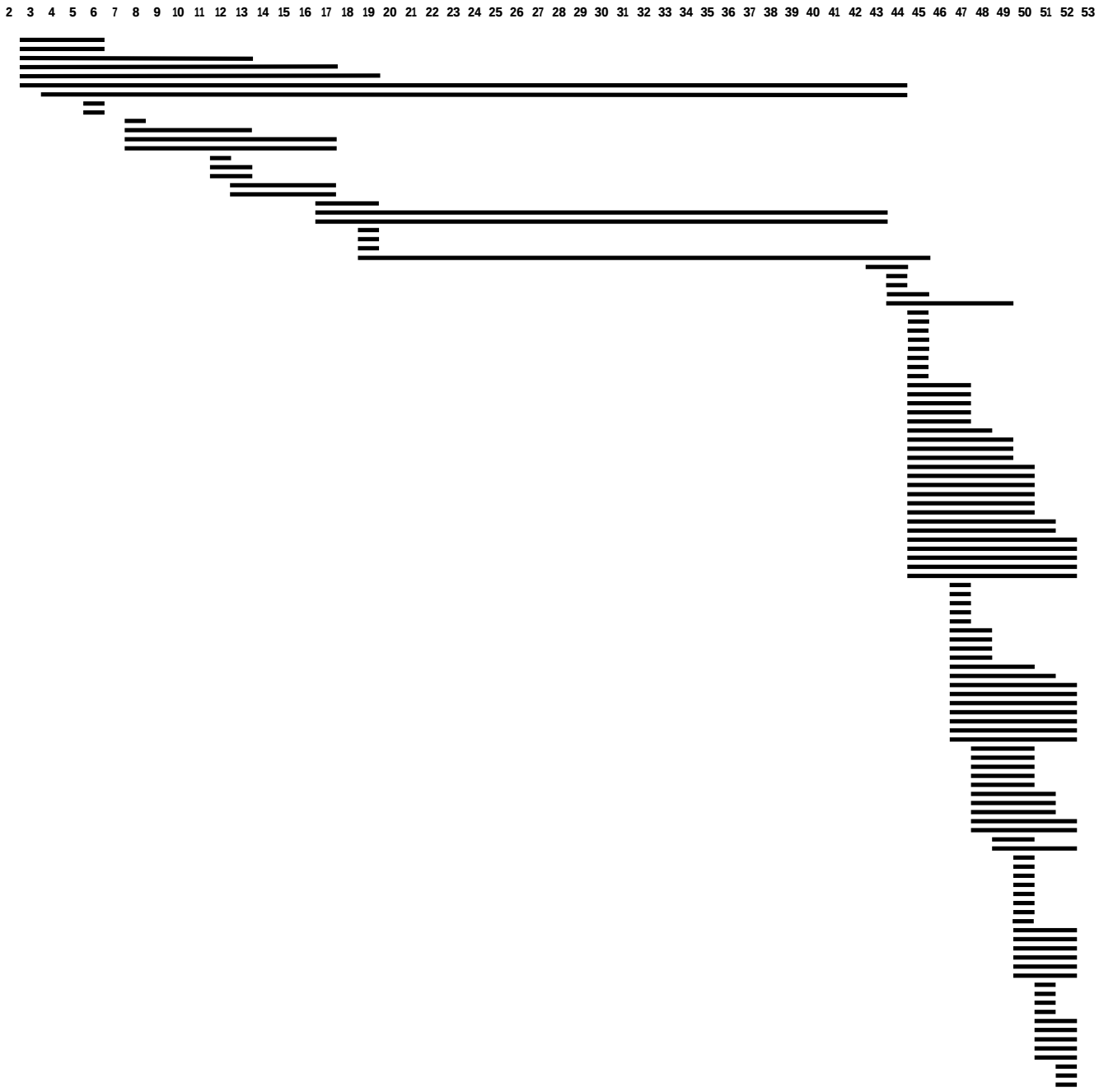
Statisztikai elemzés

A disztrofin-gén töréspontjainak elhelyezkedését a multiplex PCR-reakciók során nyert fragmentumok elektroforetikus mintázata alapján határoztuk meg. Az ismételten nem amplifikálható szakaszokból az adott exon delécióját következtettünk. A töréspontok intronok szerinti gyakoriságát és eloszlását egyéb népcsoportok irodalmi adataival χ^2-formulával számolva hasonlítottuk össze (Danieli és mtsai, 1993; Florentin és mtsai,1995; Shomrat és mtsai, 1994; Todorova és mtsai, 1996; Gökgöz és mtsai, 1993).

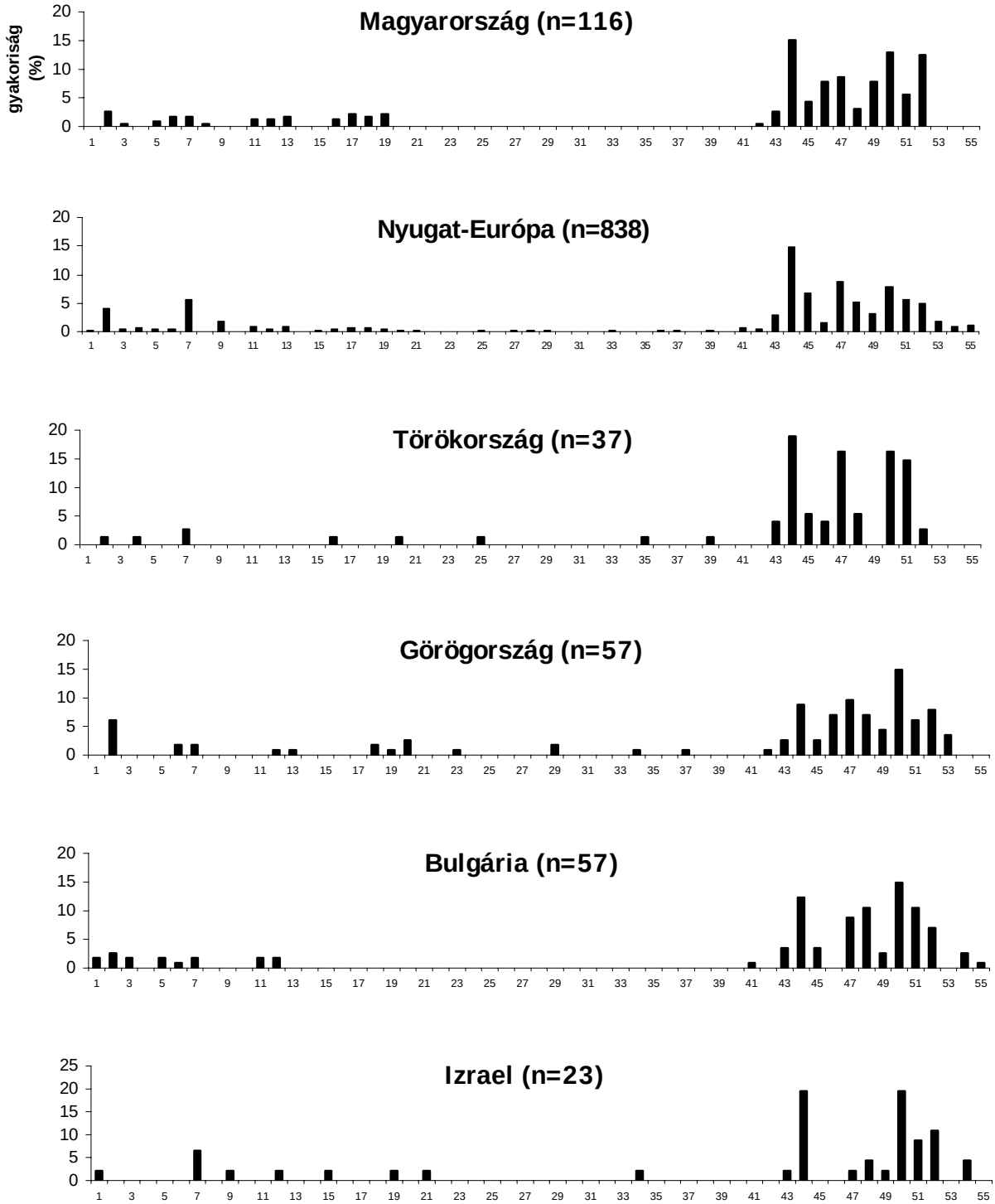
Eredmények

A disztrofin-gén delécióit 159 DMD/BMD beteg DNS-mintájából határoztuk meg. 116 esetben (a betegek 73%-a) sikerült deléciót azonosítanunk (2. ábra). Az észlelt deléció 37 betegnél (31,9%) egy exont, 14 betegnél (12,1%) 2 exont, 17 betegnél (14,7%) 3 exont, 8 betegnél (6,9%) 4 exont, míg 40 gyermeknél (34,4%) 5 vagy több exont érintett. A deléciók 90 esetben (77,6%) a gén 3' végét, 21 esetben (18,1%) a gén 5' végét érintették, míg 5 betegben (4,3%), mind az 5'-,illetve a 3'-régiókba beterjedő deléciókat találtunk. Bár az alkalmazott módszer nem nyújt információt a gén középső részének érintettségére vonatkozóan, feltételezhető, hogy az utóbbi 5 esetben összefüggő, szokatlanul hosszú szakaszok deléciójáról van szó. A gén izom-specifikus promoter régiója egyik beteg esetében sem volt érintett.

A töréspontok gyakoriságának eloszlását a 3. ábrán mutatjuk be. Látható, hogy a legtöbb töréspontot a 44. (n=35, 15,1%), 50., illetve 52. (n=30, 12,9%, illetve n=29, 12,5%) intronokban észleltük.



2. ábra. A disztrofin-gén delécióinak elhelyezkedése és mérete magyar DMD/BMD betegekben. A 2-től 53-ig terjedő számsor a gén exonjait, a vízszintes vonalak az egyes betegekben észlelt delékciókat reprezentálják.



3. ábra. A disztrofin-gén töréspontjainak intronok szerinti eloszlása DMD/BMD betegekben. A hazai adatokat a legfelső grafikon mutatja, amit az irodalomból vett nemzetközi adatokkal hasonlítunk össze.

Megbeszélés

Számos korábbi nemzetközi és nemzeti tanulmány alapján a Duchenne és Becker típusú izom-disztrófiák molekuláris hátterében, a betegek túlnyomó részében (40-70%) a disztrofin-gén kisebb-nagyobb deléciói mutathatók ki (Claustres és mtsai, 1991; Shomrat és mtsai, 1994; Todorova és mtsai, 1996; Gökgöz és mtsai, 1993). A deléciós töréspontok -a vizsgált populáció eredetétől függetlenül- jellegzetes eloszlást mutatnak, a betegekben a töréspontok túlnyomó részét a gén középső harmadának 3' végén, míg kisebb hányadát a gén 5' végén írták le. A két régió egyes intronjaiban a töréspontok eloszlása azonban a vizsgált populáció származásától függően eltér, némely népcsoportokban populáció-specifikusnak tűnő, szignifikáns különbségeket mutat (Danieli és mtsai, 1993; Florentin és mtsai, 1995)

Az általunk vizsgált 159 DMD/BMD betegnél 116 esetben (73%) sikerült a disztrofin-gén delécióját kimutatnunk. A töréspontok többsége (77,6%) a gén 3'-régióját, míg kisebb hányada (18,1%) az 5'-régiót érintette. Eredményeink így a nemzetközi adatokhoz hasonló képet mutatnak (Claustres és mtsai, 1991; Danieli és mtsai, 1993; Gökgöz és mtsai, 1993; Shomrat és mtsai, 1994; Florentin és mtsai, 1995; Todorova és mtsai, 1996). Amint a 3. ábrán látható, a magyar betegekben a 44. intronban találtuk a töréspontok többségét, megegyezően az összevont nyugat-európai adatokkal, illetve a török és az izraeli eredményekkel. A bolgár, török és izraeli betegeket az 50. intron magas érintettsége jellemzi, ami hasonlóságot mutat a magyar eredményekkel. A nyugat-európai adatok szerint az 50. intron érintettsége nem kiemelkedően gyakori. Az 52. intronban észlelt viszonylag nagy számú töréspont magyar sajátságnak tűnik, egyéb népcsoportokban ez nem figyelhető meg. Így a disztrofin-gén 3'-régiójában a 44., 50., 52. intronok kombinációja jellemzi magyar betegekben a töréspontok eloszlását.

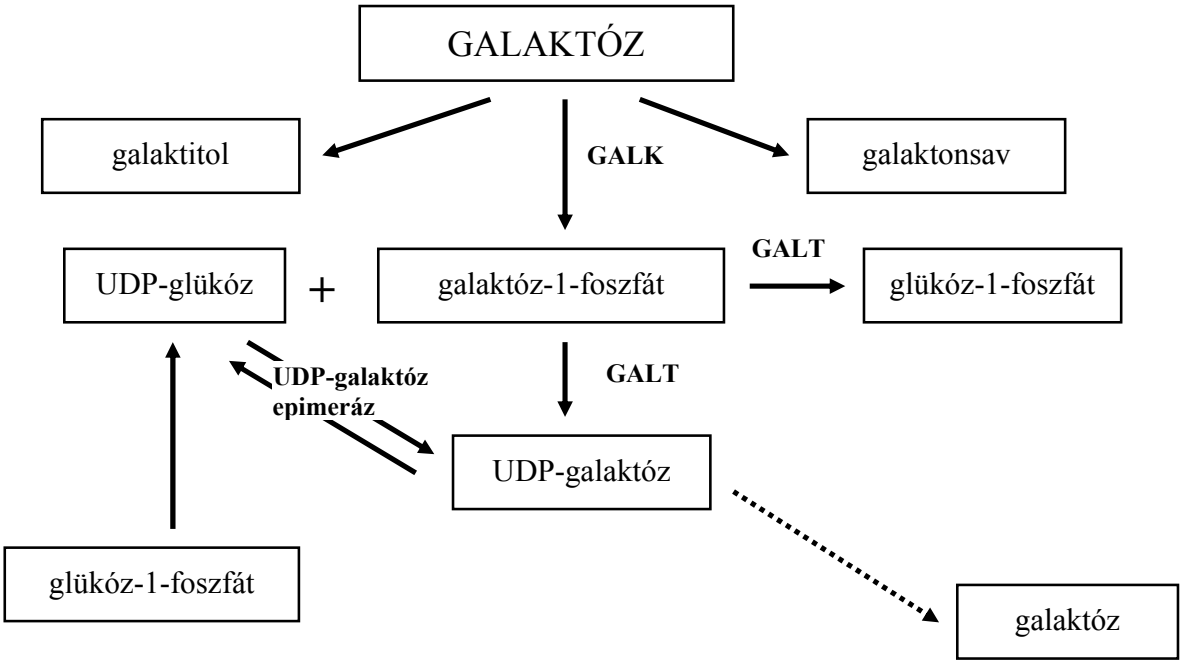
A hazai betegekben a gén 5' végén a töréspontok viszonylag egyenletes eloszlást mutatnak, ami eltér a kontrollcsoportok adataitól. Az 5' régióban a 2. exon szembetűnően gyakran deletálódott a görög, a 7. exon az izraeli, illetve mind a 2. és 7. exon a nyugat-európai betegekben.

Összefoglalásul megállapíthatjuk, a magyar DMD/BMD betegek többségében a betegség molekuláris hátterét, hasonlóan a vizsgált népcsoportok többségéhez, a disztrofin-gén deléciói okozzák. A deléciók a gén két régiójában, a gén középső harmadának 3' végén, illetve az 5' végén halmozódnak. A töréspontok intronok szerinti eloszlása a magyar betegekben eltér -egyes intronok esetében szignifikánsan-a kontrollcsoportoktól. Eredményeink, a korábbi tanulmányokkal egyezően, arra utalnak, hogy a DMD/BMD betegekben a disztrofin-gén deléciós töréspontjai populáció-specifikus eloszlást mutatnak. Ezen megfigyelések alapján felmerül olyan intron-szekvenciák létezésének lehetősége, amelyeknek szerepe lehet deléciók/mutációk kiváltásában (Danieli és mtsai, 1993; Florentin és mtsai, 1995).

A galaktóz-1-foszfát-uridil-transzferáz gén Q188R és N314D mutációinak eloszlása magyar galaktozémiás betegekben

Bevezetés

A galaktozémia azoknak az állapotoknak az összefoglaló elnevezése, amelyek a galaktóznak glükózzá történő átalakulásának zavara következtében alakulnak ki (Segal és Berry, 1995). A kórképet először Goppert, később Mason és Turner (OMIM, 230400) írták le részletesen. A klasszikus galaktozémia autoszomális recesszív módon öröklődik, molekuláris hátterében a galaktóz-1-foszfát-uridil-transzferáz (GALT) enzim defektusa áll, a betegek vörösvértestjeiben enzimaktivitás gyakorlatilag nem mérhető (Beutler és mtsai, 1966; Hsia és Walker, 1961). A GALT enzim elégtelensége miatt gátolt reakció kiindulási terméke, a galaktóz-1-foszfát felhalmozódik (1. ábra). A szöveti károsodásokért valószínűleg a galaktóz-1-foszfát és a galaktózból alternatív reduktív metabolikus utakon kialakuló galaktitol tehető felelőssé (Segal és Berry, 1995).

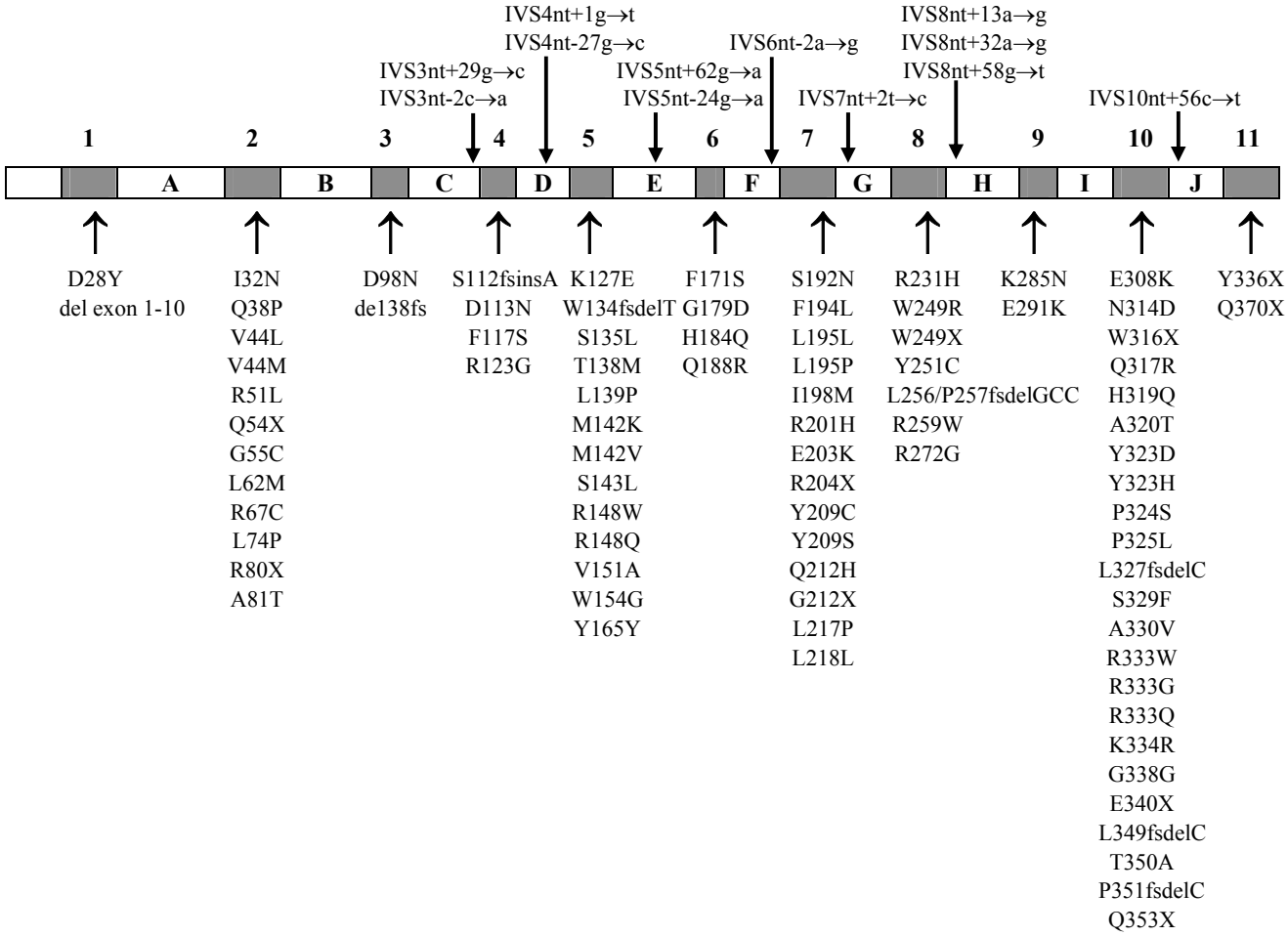


1. ábra. A galaktóz-anyagcsere. GALK: galaktokináz, GALT: galaktóz-1-foszfát-uridil transzferáz. Az ábra jobb alsó szélén szaggatott nyíllal jelöltük az UDP-galaktózból szénhidrát makromolekulákon keresztül, részben ismeretlen metabolikus utakon képződő ún. endogén galaktózt (Segal, 1998).

Az érintett újszülötteknél, bár születésükkor egészségesnek tűnnek, a tejtáplálás bevezetését követően hányással, hasmenéssel, sárgasággal és májmegnagyobbodás tüneteivel jelentkező betegség alakul ki (Hsia és Walker, 1961), amely gyakran Escherichia coli szepszishez vezet (Shih és mtsai, 1971). A korai felismerés végett újszülöttkori szűrőprogramot dolgoztak ki, amely Magyarországon 1975 óta működik (Schuler és mtsai, 1997). Mivel az emberben az exogén galaktóz a táplálékkal bevitt tejcukor lebontásából származik (Segal és Berry, 1995), a pozitív teszt-eredményt mutató, potenciálisan beteg csecsemők táplálására laktózmentes étrendet vezetnek be, amellyel a korai szövődmények megelőzhetők. A korainak nevezhető kezelés ellenére a betegek egy részénél szövődmények alakulnak ki, mint például szellemi fogyatékosság, beszédzavar, illetve nőkben hypogonadismus (Donnell, 1961; Kaufman és mtsai, 1981; Waisbren és mtsai, 1983; Waggoner és mtsai, 1990; Schweitzer és mtsai, 1993; Segal és Berry, 1995). A kórlefolyás megítélését tovább nehezíti, hogy egyes betegek a korán bevezetett laktózmentes diéta ellenére, később neurológiai és pszichológiai eltéréseket mutatnak, másoknak a későn kezdett diéta, illetve a diéta hiánya ellenére is megtartott a pszichoszomatikus fejlődésük (Hsia és Walker, 1961).

A galaktozémiát világszerte meglehetősen ritka betegségnek tartották, azonban az újszülöttkori tömegszűrés elterjedésével kiderült, hogy előfordulási gyakorisága országonként jelentős eltéréseket mutat (Shih és mtsai, 1971; Schweitzer, 1995; Moammar és mtsai, 1996). Egyes országokban az alacsony előfordulási gyakoriság miatt a szűrővizsgálatot nem vezették be, bár a pozítív esetek észlelésének hatékonysága a szűrővizsgálat révén kifejezetten javult (Schweitzer, 1995). A galaktozémia incidenciája például Nyugat-Európában: 1:40.000-100.000, Írországban: 1:19.000, Szaúd-Arábiában 1:8.500, Japánban:1:1.000.000 (Ashino és mtsai, 1995, Schweitzer, 1995; Moammar és mtsai, 1996). A nemzetközi adatok közül kiemelkedik az írországi ún. "Traveller"-közösségben észlelt 1:700 előfordulási gyakoriság (Murphy és mtsai, 1996). Világszerte átlagosan 1:70.000-re becsülik a betegség megjelenését. A különbségek részben az egyes kultúrákban gyakori vérrokonházasságokkal magyarázhatók (Moammar és mtsai, 1996).

A GALT-enzim két, egyenként kb. 44.000D molekulasúlyú monomerből épül fel, dimer formában aktív. Az enzim kimutatására alkalmas módszerek fejlődésével több variánst különítettek el, az enzimaktivitás, gélelektroforetikus mobilitás, illetve később a genotípus különbözőségei alapján (Segal és Berry, 1995).



2. ábra. A GALT-gén mutációi galaktozémiás betegekben. Az ábrán a GALT-gén vázlatos szerkezete mellett (11exon, 10 intron /A-J/) az exonokat (az ábra alsó része) és az intronokat (az ábra felső része) érintő mutációkat tüntettük fel.

A normál GALT-enzim mellett, ún. klasszikus galaktozémia variánst és Duart-, Afro-amerikai-, Los Angeles-, Rennes-, Indiana-, Chicago-, Munich-variánsokat közöltek le (Mellmen és mtsai, 1965; Baker és mtsai, 1966; Beutler és mtsai, 1966; Ng és mtsai, 1973; Ibarra és mtsai, 1979; Elsas és mtsai, 1994; Lai és mtsai, 1996; Langley és mtsai, 1997; Lin és mtsai, 1994; Shin és mtsai, 1998). A biokémiai fenotípus (enzimaktivitás és elektroforetikus mobilitás) és a klinikai fenotípus közötti összefüggések jobb megértéséhez, a GALT-gén szerkezetének meghatározását követően nyílt lehetőség (Leslie és mtsai, 1992).

A GALT-gén a 9-es kromoszóma rövid karján helyezkedik el (9p13), 4kb hosszú, amelyben 11 exon és köztük 10 intron különíthető el. Maga a fehérje 379 aminosavból áll (Leslie és mtsai, 1992). A GALT-gén defektusainak felderítése mind a betegség prognózisa, mind a genetikai besorolás szempontjából is lényeges. A gén egyes anomáliáinak felderítése folyamatosan zajlik, az eddig észlelt mutációkat a 2. ábrán foglaljuk össze (http://www.ich.bris.ac.uk/galtdb/). Az egyes mutációk, illetve esetenként az egyes allélokon koszegregálódó genetikai eltéréseknek a biokémiai, klinikai fenotípussal és a betegség prognózisával való kapcsolata ma is intenzív kutatások tárgya (Wang és mtsai, 1998; Segal, 1998).

Az ismert mutációk közül a Q188R különösen nagy jelentőséggel bír, az ún. nyugati világban a galaktozémiás betegek legalább 60%-ában kimutatható (Leslie és mtsai, 1992; Elsas és mtsai, 1993; Podskarbi és mtsai, 1994; Segal, 1998; Wang és mtsai, 1998). A mutáció következtében érintett allélenként az enzim aktivitása 50%-kal csökken (Elsas és mtsai, 1995). A GALT gén egy másik érdekes eltérése az N314D mutáció, amelynek a prevalenciája a nem-galaktozémiás, ún kaukázusi népcsoportban viszonylag magas, 5,9% (Elsas és mtsai, 1994). A mutáció és a Duarte-allél között nagyon szoros kapcsolatot feltételeznek (Elsas és mtsai, 1994; Podskarbi és mtsai, 1994; Lin és mtsai, 1994; Elsas és mtsai, 1995). Duarte-homozigóta egyénekben az enzimaktivitás kb. 50%-ra csökken, klinikai következmények nélkül (Beutler és mtsai, 1966). Ha azonban, az N314D mutációt hordozó allél egy másik mutáns alléllel együtt fordul elő -az ún. kompound heterozigótákban-, az enzimaktivitás jelentős csökkenéséhez vezet, például N314D/Q188R, N314D/K285N egyénekben az aktivitás kb. 15-25%-ra csökkent (Elsas és mtsai, 1995; Greber-Platzer és mtsai, 1997).

Vizsgálataink céljául az összes ismert hazai, galaktozémiában szenvedő beteg molekuláris analízisét tűztük ki, aminek során az említett két mutáció (Q188R és N314D) előfordulási gyakoriságát kívántuk meghatározni.

Anyagok és módszerek

Az ismert magyarországi, galaktozémiában szenvedő betegek listáját és címét a budapesti és szegedi anyagcsere gondozóktól kaptuk meg. A betegek részére szűrőpapírt küldtünk, azzal a kéréssel, hogy a szűrőpapíron található köröket itassák át teljes terjedelmükben az ujjbegyükből származó vérrel és a szűrőpapírokat szobahőn való megszáradásuk után postai úton a POTE Gyermekklinika laboratóriumának címére küldjék el. A regiszterben szereplő 52 beteg közül 45 betegtől kaptunk beszáradt vérmintát.

A Guthrie-féle szűrőpapíron érkezett beszáradt vérmintákból a DNS-t a következőképpen nyertük ki: A szűrőpapírokból 4x4mm-es négyzeteket vágtunk ki, amelyeket 1 órán át 100µl metil-alkoholban inkubáltunk szobahőn. A szűrőpapírdarabkákat ugyancsak szobahőn megszárítottuk, majd 200µl desztillált vízben 97C^{o}-on 15 percig inkubáltuk. Centrifugálás után (12.000rpm, 3perc) a felülúszót eltávolítottuk és a további vizsgálatokig -20 C^{o}-on tároltuk.

Az extraktumokból a gén 6-os és 10-es exonját vizsgáltuk PCR-reakcióval, illetőleg RFLP-analízissel. A PCR-reakciókhoz az irodalomból (Elsas és mtsai, 1993; Elsas és mtsai, 1994; Elsas és mtsai, 1995) vett primereket használtuk (3. és 5. ábra). A PCR-reakcióelegy összetétele 50µl végtérfogatban a következő volt: 20µl DNS-extraktum, 10pmol minden egyes primerből, minden egyes dNTP-ből 10-10mmol, 2,5mM $MgCl_2$, 2 egység Taq polymerase és Taq polymerase puffer (50mM KCl, 0,1% Triton X-100, 10mM Tris-HCL, pH 8,0). Az amplifikációkat a következő hőprogrammal végeztük: 94C^{o}–on történő 5 perces denaturálás után 30 ciklusban 94C^{o} 1perc, 58C^{o} 30s, 72 C^{o} 1perc; végül 72 C^{o} 10perc. A PCR-reakció eredményességét 1%-os agarózgélen ellenőriztük.

A Q188R és a N314D mutációkat RFLP-analízissel próbáltuk kimutatni. A Q188R mutációt a gén 6-os exonjában, az 1470-es pozícióban levő A→G tranzíció okozza, amely révén egy új *HpaII* hasítási hely keletkezik (3. és 4. ábra). Nem-galaktozémiás egyén DNS-éből amplifikált 608bp hosszú PCR-termék *HpaII* emésztés során egy rendszerint meglevő hasítási hely miatt egy 48bp és egy 560bp hosszú fragmentumra hasad, míg a Q188R mutáció jelenléte esetén az utóbbi szakasz további 287bp illetve 273bp hosszú fragmentumokra válik szét (7. ábra).

```
CACCCCTGGT CGGATGTAAC GCTGCCACTC ATGTCGGTCC CTGAGATC⇓CG  50bp
GGCTGTTGTT GATGCATGGG CCTCAGTCAC AGAGGAGCTG GGTGCCCAGT  100bp
ACCCTTGGGT GCAGgtttgt gaggtcgccc cttcccctgg atgggcaggg  150bp
agggggtgat gaagctttgg ttctggggag taacatttct gtttccacag  200bp
ggtgtggtca ggagggagtt gacttggtgt cttttggcta acagagctcc  250bp
gtatccctat ctgatagATC TTTGAAAACA AAGGTGCCAT GATGGGCTGT  300bp
TCTAACCCCC ACCCCCACTG CCAGgtaagg gtgtcagggg ctccagtggg  350bp
tttcttggct gagtctgagc cagcactgtg gacatgggaa caggattaat  400bp
ggatgggaca gaggaaatat gccaatgatg tggaggcttg gaggtaaagg  450bp
acctgcctgt tcttctctgc ttttgcccct tgacagGTAT GGGCCAGCAG  500bp
TTTCCTGCCA GATATTGCCC AGCGTGAGGA GCGATCTCAG CAGGCCTATA  550bp
AGAGTCAGCA TGGAGAGCCC CTGCTAATGG AGTACAGCCG CCAGGAGCTA  600bp
CTCAGGAA                                                608bp
```

3. ábra. A GALT-gén 5-ös és 7-es exonjaiba tervezett primerekkel felerősített DNS-szakasz. A szekvencia elején és végén félkövérbetűk jelzik a primerek ("foward" illetve "reverse") bekötődésének helyét. Az intronokat kis betűkkel, az exonokat nagybetűkkel tüntettük fel. Az amplikon 48-as pozícióján ⇓-kal jelöljük a *HpaII* enzim hasítási helyét. Az amplikon 323-as helyén inverz karakterként jelölt A(→G) cseréje okozza a Q188R mutációt.

```
                                  HpaII
                                    ⇓
TGC  CAG  gta   ⇒   TGC   CGG  gta
Cys  Gln        ⇒   Cys   Arg
```

4. ábra. A Q188R mutáció. Az ábrán a GALT-gén 1470-es pozíciójában levő (6-os exon) A→G csere okozta "missense" mutáció következtében kialakult aminosavcserét és a keletkező új *HpaII* hasítási helyet mutatjuk be.

A N314D mutációt a 10-es exon 2744 pozíciójában levő A→G tranzíció okozza, amely a génben egy új *AvaII* hasítási helyet okoz (5. és 6. ábra). A G és J jelzésű intronokban levő primerekkel (Elsas és mtsai, 1994) végzett PCR-reakció során képződő 949bp hosszú termék rendszerint 4 *AvaII* hasítási helyet tartalmaz, így emésztve 581bp, 164bp, 91bp, 83bp és 30bp hosszú fragmentumokra hasad. A N314D mutáció esetén az 581bp szakasz további, 479bp és 102bp fragmentumokra válik szét (7. ábra).

ttctgcttcc cttgcctatt tgctgaccac actccggctc ctatgtcacc 50bp

ttgatgactt cctatccatt ctgtcttcct agGAACGTCT G⇓GTCCTAACC 100bp

AGTGAGCACT GGTTAGTACT G⇓GTCCCCTTC TGGGCAACAT GGCCCTACCA 150bp

GACACTGCTG CTGCCCCGTC GGCATGTGCG GCGGCTACCT GAGCTGACCC 200bp

CTGCTGAGCG TGATGgtcag tctcccaagt aggatcctgg ggctaggcac 250bp

tggatggagg ttgctcccag tagggtcagc atctg⇓gaccc caggctgaga 300bp

gtcaggctct gattccagAT CTAGCCTCCA TCATGAAGAA GCTCTTGACC 350bp

AAGTATGACA ACCTCTTTGA GACGTCCTTT CCCTACTCCA TGGGCTGGCA 400bp

TGgtgaggct tttcaagtac ctatatttag ccccaacacc atttctgggc 4520bp

tcctgggctc agcctagtga actgcaacct caaaggagca agccttgaaa 500bp

cagttgctgg gggaagtggc cagagtagag atgctgggac tgagggtgga 550bp

gcagcaaact tggtgaaact acatctccaa tgtgctttct aatctcctgc 600bp

cagctcttct caagcagggg atcctgggag atgtagtttt cagatacctg 650bp

gttgggtttg ggagtaggtg ctaacctgga taactgtaaa agggctctct 700bp

ctccccactg tctctcttct ttctgtcagG GGCTCCCACA GGATCAGAGG 750bp

CTGGGGCCAA CTGGAACCAT TGGCAGCTGC ACGCTCATTA CTACCCTCCG 800bp

CTCCTGCGCT CTGCCACTGT CCGGAAATTC ATGGTTGGCT ACGAAATGCT 850bp

TGCTCAGGCT CAGAGG⇓GACC TCACCCCTGA GCAGgtcagg actcagaaca 900bp

gtctggcgtc tccagactc**t cacatgcagt atgtgcaggc acctgatac** 949bp

5. ábra. A GALT-gén G és J intronjaiba tervezett primerekkel felerősített DNS-szakasz. A szekvencia elején és végén félkövérbetűk jelzik a primerek ("foward" illetve "reverse") bekötődésének helyét. Az intronokat kis betűkkel, az exonokat nagybetűkkel tüntettük fel. Az amplikon 91-es, 121-es, 285-ös és 866-os helyein ⇓-kal jelöljük az *AvaII* enzim hasítási helyeit. Az amplikon 765-ös pozíciójában inverz karakterként jelölt A(→G) cseréje okozza az N413D mutációt.

A *Hpa II* és *Ava II* enzimekkel az emésztést a felhasználási útmutató alapján végeztük, 35µl végtérfogatban, 30µl PCR-elegy felhasználásával. A keletkezett fragmentumokat etídium-bromiddal festett 3%-os agarózgélben választottuk el, állandó feszültséggel, 60V-on.

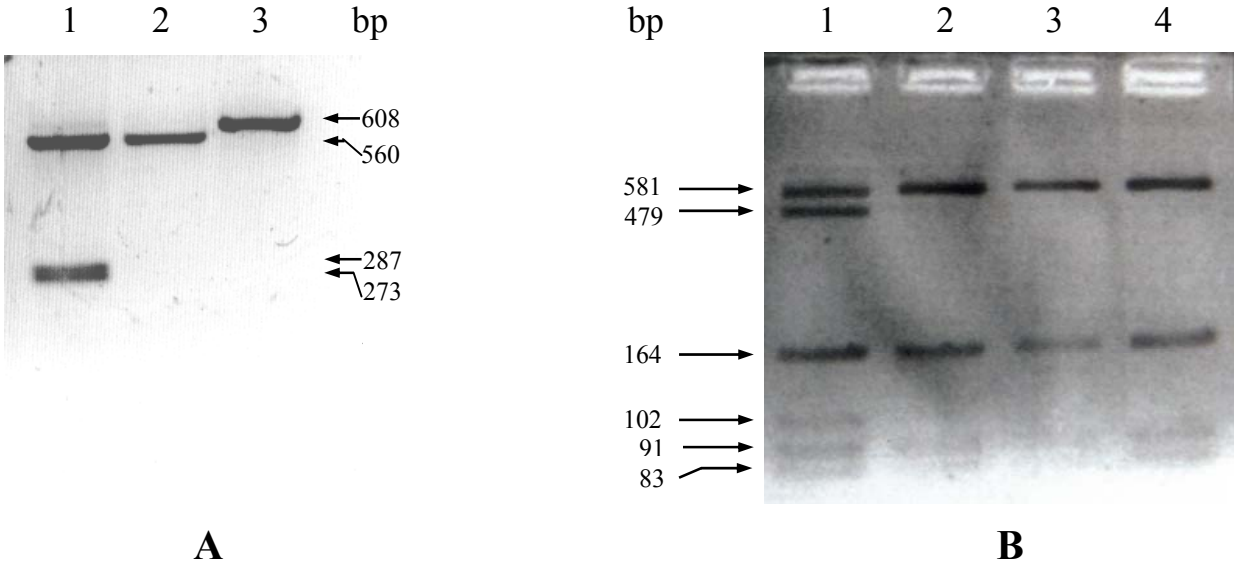
AvaII
⇓

TGG	AAC	CAT	⇒	TGG	GAC	CAT
Trp	Asn	Trp	⇒	Trp	Asp	Trp

6. ábra. Az N314D mutáció. Az ábrán a GALT-gén 2744-es pozíciójában levő (10-es exon) A→G csere okozta "missense" mutáció következtében kialakult aminosav-cserét és a keletkező új *AvaII* hasítási helyet mutatjuk be.

Eredmények

45 magyarországi, megszületése óta regisztrált galaktozémiás beteg beszárított vérmintáját vizsgáltuk a GALT-gén Q188R és N314D mutációinak kimutatása céljából. A mutációkat PCR-módszeren alapuló RFLP analízissel határoztuk meg. Az eredményeket az 1. és 2. táblázatokban foglaltuk össze. A vizsgált 90 allélből 30 esetben találtunk Q188R allélt (33,3%), amely 5 betegben homozigóta formában (G/G), 4 esetben ún. kompound heterozigóta formában (G/D) és 16 esetben heterozigóta formában (G/Nd) fordult elő. 10 allél mutatott N314D mutációt, amely egy betegnél homozigóta formában, 4 betegnél compound heterozigóta formában (G/D) és további 4 betegnél heterozigóta formában fordult elő. A vizsgált 90 allél közül 50 allélnél nem találtunk mutációt az említett módszerrel. A 7. ábrán az *AvaII* (Q188R) és a *HpaII* (N314D) enzimekkel végzett RFLP-vizsgálatokat mutatjuk be.



7. ábra: A GALT-gén Q188R és N314D mutációinak kimutatása PCR-RFLP módszerrel. **A.** Q188R mutáció, *HpaII*-emésztés: 1. minta-heterozigóta, 2. minta-normál homozigóta, 3.minta-emésztetlen amplikon. **B.** N314D mutáció, *AvaII* emésztés. 1. minta-heterozigóta, 2-4. minta-normál homozigóta.

1. táblázat. A Q188R (G) és az N314D (D) genotípusok eloszlása a magyarországi galaktozémiás betegek között.

Genotípus	Betegek száma	Genotípusok gyakorisága
G/G	5	11,1%
G/Nd	16	35,5%
G/D	4	8,8%
D/D	1	2,2%
D/Nd	4	8,8%
Nd/Nd	15	33,3%
Összesen:	45	100%

(klasszikus galaktozémia (G): Q188R allél, Duart (D):N314D allél, Nd: a PCR-RFLP analízissel mutációt nem észleltünk)

2. táblázat. A Q188R és az N314D allélek eloszlása a magyar galaktozémiás betegek között.

Allél megjelölése	Allélek száma	Allélek gyakorisága
Q188R	30	33,3%
N314D	10	11,1%
Nd	50	55,5%
Összesen:	90	100%

Megbeszélés

A galaktozémia a galaktóz-anyagcsere zavara következtében kialakuló állapotok összefoglaló neve. Elsősorban három enzim defektusa játszik kóroki szerepet a galaktóz-anyagcserezavar kialakulásában, a galaktokináz (galaktozémia II, McK-230200), a galaktóz-1-foszfát uridil transzferáz (galaktozémia I, McK-230400) és az UDP-galaktóz-4-epimeráz (galaktozémia III, McK-230350) (Segal és Berry, 1995). Közülük a klinikai tünetek súlyossága és a betegség előfordulási gyakorisága alapján legnagyobb jelentőségű a GALT-enzim defektusa következtében kialakuló ún. klasszikus galaktozémia (Segal és Berry, 1995).

A klasszikus galaktozémia autoszomális recesszív öröklésmenetet mutató betegség, születési prevalenciáját hazánkban 1/50.000-1/70.000-re becsülik (Schuler és mtsai, 1997). A betegség tünetei az általános fejlődési visszamaradottság, hasmenés, sárgaság, hepatomegália és szürkehályog-képződés. A galaktózfogyasztás fennmaradása esetén többnyire halálos kimenetelű szeptikus állapot alakul ki (Segal és Berry, 1995). A laktózmentes étrenddel a korai szövődmények megelőzhetők, azonban a betegek egy részének hosszútávú prognózisa a mai napig sem kielégítő, mert a diagnózis felállításának idejétől, az alkalmazott kezeléstől (diétától) függetlenül késői szövődmények alakulnak ki (Waggoner és mtsai, 1990). A késői szövődmények elsősorban neurológiai zavarokban, hipergonadotrop amenorrhoeában nyilvánulnak meg (Kaufman és mtsai, 1981; Schweitzer és mtsai, 1993; Shield és mtsai, 2000; Guerrero és mtsai, 2000). A neurológiai zavarok összetettek, a betegek értelmi képessége megtartott intellektustól a súlyos fokú szellemi fogyatékosságig változhat, a retrospektív tanulmányokban a motoros beszéd zavarát, a tanulás és a társadalmi beilleszkedés nehezítettségét, továbbá intenciós tremort, ataxiát és microcephalia-t észleltek a neurológiai zavarok részeként (Waisbren és mtsai, 1983; Schweitzer és mtsai, 1993; Shield és mtsai, 2000).

A tünetek hátterében korábban a GALT-enzim aktivitásának teljes hiánya, illetve kifejezett csökkenése következtében felhalmozódott galaktóz-1-foszfát (1. ábra) és a galaktózból alternatív metabolikus utakon képződő galaktitol toxikus hatását feltételezték, azonban az újabb adatok szerint az említett vegyületek szerepe, legalábbis a késői szövődmények vonatkozásában, nem egyértelmű (Gitzelmann, 1995; Jakobs és mtsai, 1995; Segal, 1998).

A késői, elsősorban az idegrendszeri szövődmények okaként felmerült az összetett szénhidrátok és zsírok galaktózzal képzett konjugátumainak megkevesbedése, illetve kóros konjugátumok képződése (Segal, 1995; Segal, 1998).

A kórlefolyás megítélését és a terápiás megközelítést tovább nehezítik azon újabb adatok, hogy a laktózmentes étrend nem biztosítja a galaktóz teljes mértékű kizárását az étrendből, hiszen számos növény (gabonafélék, hüvelyesek, gyümölcsök és diófélék) tartalmaz galaktózt szabad, vagy kötött formában (Acosta és Gross, 1995; Wiesmann és mtsai, 1995). További érdekes megfigyelés, miszerint az emberi szervezetben naponta, ismeretlen forrásból 1.100-1.400mg galaktóz képződik (Segal, 1998). Ezt nevezik endogén galaktóz termelésnek, amely a GALT-elégtelenségben szenvedő egyén autointoxikációjához vezet.

Patkány-modellben végzett kísérletekben megfigyelték, hogy a GALT-gén expressziója szervenként lényeges eltér, amely összefüggésbe hozható a galaktozémiás betegekben észlelt késői szövődmények szervi manifesztációjával (Heidenreich, 1995).

A betegség öszetett klinikai megjelenéséhez hasonlóan komplex molekuláris háttér társul. A GALT-génben napjainkig számos mutációt leírtak, a többségük „missense” mutáció, bár „stop”, „splice site” mutációkat, „frame shift”-et okozó mutációkat, illetve nagy deléciókat is közöltek (http://www.ich.bris.ac.uk/galtdb/). A mutációk többsége ritka, azonban néhány egyes népcsoportokban kimagasló gyakorisággal fordul elő, mint például a Q188R a kaukázusi rasszban, illetve az S135L az afro-amerikaiakban (Podskarbi és mtsai, 1994; Ng és mtsai, 1994; Lai és mtsai, 1996; Wang és mtsai, 1998).

A Q188R mutáció a GALT-gén talán legintenzívebben vizsgált eltérése. A fokozott érdeklődés részben a mutáció gyakoriságával, illetve részben a mutációhoz társuló súlyos klinikai következményekkel magyarázható, miszerint ezen genotípus összefüggést mutat egyes késői szövődmények kialakulásával (Elsas és mtsai, 1993; Guerrero és mtsai, 2000; Shield és mtsai, 2000). A GALT-gén 6-os exonjának 1470. pozíciójában bekövetkező A→G tranzíció következtében a kódolt fehérje 188-as pozíciójában levő neutrális, poláros oldalláncú glutamin a bázikus oldalláncú argininra cserélődik (Leslie és mtsai, 1992). A mutáció így az enzim feltételezett aktív centruma mellett (184-185-186; His-Pro-His) okoz egy pozitív töltés-változással járó aminosavcserét, amely valószínűleg a fehérje konformációjának megváltozását idézi elő.

A gén ezen szakasza fejlődéstanilag rendkívül konzervatív, az E. Coli, élesztőgomba (Saccharomyces cerevisiae), egér, ember vonatkozásában 100%-os homológiát mutat (Reichardt és mtsai, 1991; Elsas és mtsai, 1993). Így érthető, hogy a pontmutáció meglehetősen drámai következményekkel jár, érintett allélonként az enzimaktivitás 50%-os csökkenését okozza. A Q188R mutáció előfordulási gyakorisága sajátos megoszlást mutat a különböző országok között, elsősorban a kaukázusi rasszra jellemző (3. táblázat).

Vizsgálatainkban a Q188R mutáció előfordulási gyakoriságát határoztuk meg magyar galaktozémiás betegekben. 52 regisztrált magyarországi galaktozémiás beteg közül 45 betegtől sikerült vérmintát nyernünk. A szűrőpapírra szárított vérmintákból izolált DNS-ből a Q188R mutációt PCR-módszeren alapuló RFLP analízissel határoztuk meg.

3. táblázat. A Q188R mutáció gyakorisága egyes népcsoportok galaktozémiás betegei között

Népcsoport megjelölése	Allélok gyakorisága
Németország (Podskarbi és mtsai, 1994)	62-66%
Írország (Murphy és mtsai, 1996)	85%
Írország, „Traveler”-közösség (Murphy és mtsai, 1996)	95,5%
USA, angolszász (Elsas és mtsai, 1995)	62%
USA, afro-amerikai (Elsas és mtsai, 1995)	13%
Ausztria (Greber-Platzer és mtsai, 1997)	60%
Lengyelország (Zekanowski és mtsai, 1999)	51,2%
Cseh és Szlovák Közt. (Kozak és mtsai, 1999)	46%
Japán (Ashino és mtsai, 1995)	0%
Magyarország	33,3%

A Q188R allél 33,3%-os előfordulási gyakoriságot mutatott a vizsgált betegekben, következésképpen Q188R mutáció prevalenciája a magyar betegekben köztes értéket mutat a világ különböző vizsgált népcsoportjaihoz képest. A kaukázusi rasszban (amely a nyugat-európai populációt jellemzi) észlelt átlagosan 60%-os gyakoriságnál lényegesen alacsonyabb, míg japán illetve az afro-amerikai betegeknél észlelt gyakoriságoknál jelentősen magasabb (3. táblázat). A lengyel galaktozémiás betegekben a GALT-allélok 51,2%-án (Zekanowski és mtsai, 1999), a cseh és szlovák galaktozémiás betegekben (78%-ban cseh betegek) az allélok 46%-án (Kozak és mtsai, 2000) találtak Q188R mutációt, így Kozak és munkatársai feltételezték, hogy a mutáció gyakorisága Európán belül nyugatról kelet felé haladva csökken (Kozak és mtsai, 2000). A mi eredményeink is ezt a feltevést támasztják alá.

5 betegben találtunk Q188R/Q188R genotípust (1. táblázat), amely a GALT-aktivitás gyakorlatilag teljes elvesztését okozza (Elsas és mtsai, 1993). Az irodalmi adatok alapján ezen genotípusú betegek prognózisa rossz, a késői szövődmények kialakulásával kell számolni (Elsas és mtsai, 1993; Guerrero és mtsai, 2000; Shield és mtsai, 2000).

A GALT-gén egy másik sokat vizsgált és vitatott eltérése a N314D mutáció. A 10-es exon 2744-es helyén A→G tranzíció következtében a fehérje 314-es pozíciójában levő aszparagin aszparaginsavra cserélődik. A mutáció viszonylag nagy gyakorisággal (5.9%) fordul elő a nem-galaktozémiás populációban (Elsas és mtsai, 1994), így polimorfizmusnak tekinthető. Feltételezik, hogy az N314D egy viszonylag ősi genetikai variáns (Kozak és mtsai, 2000), amely még a kaukázusi és ázsiai népcsoportok szétválása előtt kialakult (Ashoni és mtsai, 1995). Számos vizsgálattal igazolták azonban, hogy az N314D eltérés igen szoros kapcsolatot mutat a GALT-gén ún. Duarte-variánsával (Elsas és mtsai, 1994; Podskarbi és mtsai, 1994; Lin és mtsai, 1994; Elsas és mtsai, 1995). Először Beutler és munkatársai ismerték fel, hogy egyes egészséges egyénekben a GALT-aktivitás jelentősen, körülbelül a galaktozémiás betegek heterozigóta szüleiben kimutatható szintre csökkent (az átlagos enzimaktivitás kb. 50%-a). A családfák elemzése során fedezték fel, hogy ezen egyének családjaiban egy, a galaktozémiát okozó kóros „génnel” azonos helyen elhelyezkedő (allélikus) másik „gén” szegregálódik a csökkent enzimaktivitással. Ezt az allélt Duarte-variánsnak (Duart-allél) nevezték el, megléte esetén a GALT-aktivitás viszonylag kis mértékben, homozigóta egyénekben kb. 50%-ra csökken (Beutler és mtsai, 1966).

A Duarte-allélt, mint biokémiai fenotípust a csökkent enzimaktivitás mellett a fokozott elektroforetikus mobilitás is jellemzi (Segal és Berry, 1995). Az N134D mutáció következtében a fehérje savi karaktere fokozódik, ami magyarázza a fokozott mobilitást az anód irányába (Elsas és mtsai, 1995). Több vizsgálat igazolja, hogy az N314D mutáció kimutatható a GALT-enzim ún. Los Angeles variánsának hátterében is (Leslie és mtsai, 1992; Lin és mtsai, 1994). Ezen variáns a Duarte-alléllel azonos elektroforetikus sajátságokat mutat, azonban az enzim aktivitása az átlagos GALT-aktivitást meghaladja. Ezen ellentmondás vizsgálatakor a Los Angeles variánst kódoló allélokon az N314D mellett egy ún. néma mutációt (L218L) találtak (Podskarbi és mtsai, 1996; Langley és mtsai, 1997; Greber-Platzer és mtsai, 1997; Shin és mtsai, 1998;). A Duarte variáns hátterében az N314D mutációval azonos allélon több eltérést is kimutattak, leggyakrabban a 4-es illetve 5-ös intronokban (1105g→c és 1391g→a) észleltek mutációt (Podskarbi és mtsai, 1996; Greber-Platzer és mtsai, 1997; Kozak és mtsai, 2000), míg más szerzők ezt nem erősítették meg (Langley és mtsai, 1997).

A 45 magyar galaktozémiás betegben az allélok 11,1%-ában sikerült N314D mutációt kimutatnunk. A betegek között 4 kompound heterozigóta (Q188R/N314D) genotípust, egy N314D/N314D homozigóta genotípust, illetve 4 heterozigóta (N314D/Nd) genotípust észleltünk (1. táblázat). Az irodalmi adatok alapján az utóbbi 2 genotípus esetében feltételezhető, hogy az enzimaktivitást önmagában kisfokban érintő N314D mutációhoz legalább az egyik allélen egy további, módszerünkkel nem kimutatható mutáció társul.

A Q188R/N314D genotípus jelentősége vitatott (Gitzelmann és Bosshard, 1995). Egyes munkacsoportok az ún. genetikai kompound állapot (a Duatre-allél és galaktozémiát okozó allél társulása) benignusnak vélik és nem tartják szükségesnek a laktózmentes diétát (Levy és mtsai, 1978). Mások szerint azonban a kompound genotípushoz, elsősorban újszülött és kisgyermekkorban, biokémiai eltérések és klinikai tünetek is társulhatnak (Kelly, 1979).

Mivel a vizsgált 90 allél közül 50 allélnél nem találtunk mutációt az említett módszerrel, valószínű, hogy a magyar galaktozémiás betegek között egyéb mutáció(k) dominál(nak). Az ezidáig vizsgált osztrák, cseh-szlovák, illetve lengyel betegeknél gyakori K285N mutáció ígéretes jelölt a további vizsgálatok céljául(Greber-Platzer és mtsai, 1997; Kozak és mtsai, 2000).

A betegek DNS-mintáit megfelelően választott primerekkel, PCR-SSCP módszerrel vizsgálva, a GALT-gén további eltérései meghatározhatók, amely elvezethet a genotípusnak a biokémiai és klinikai fenotípussal való összefüggésének jobb megértéséhez.

Az RPE65-gén mutációinak vizsgálata retina-disztrófiában szenvedő betegekben

Bevezetés

A felnőttkori örökletes látáskárosodás gyakori oka az ideghártya disztrófiája, amely a vaksággal járó kórképek kb 10%-ért tehető felelőssé (Kellner, 1997a; Inglehearn, 1998). Az öröklődő ideghártya-disztrófiák előfordulási gyakorisága Nyugat-Európában és az USA-ban 1:3000-1:5000 között van (Krumpaszyk és Klausz, 1996; Inglehearn, 1998). Az ideghártya disztrófiájával járó kórképek közül a leggyakoribb és a legismertebb a világszerte kb. másfél millió embert érintő retinitis pigmentosa névvel jelölt tünettegyüttes (Bunker és mtsai, 1984; Bundey és Crews, 1984; Berson, 1996). A retinitis pigmentosa elnevezés Donders német orvostól származik. Az elnevezés, ami szó szerint a retina gyulladására utal tulajdonképpen téves, hisz a kórkép hátterében elsősorban öröklődő degeneratív eltérések állnak (Inglehearn, 1998).

A retinitis pigmentosa (RP) mind klinikailag, de különösen genetikailag heterogén kórkép. A klinikai képet szürkületi vakság és a látótér fokozatos beszűkülése jellemzi, amelynek hátterében az ideghártya perifériáján kezdődő degeneráció áll. A folyamat progressziója során előbb-utóbb többnyire a sárgafoltot is érinti (Berson, 1996; Inglehearn, 1998). A szemfenéki képet sárgásfehér, atrófiás papilla, a retina ereinek beszűkülése és a retina perifériáján változó mértékű, jellegzetes, csontsejtszerű pigmentáció jellemzi. A diagnózis a klinikai kép kifejlődése előtt az elektroretinogram (ERG) alapján felállítható, amely szubnormális, csökkent amplitúdójú, vagy kialudt. A kórkép súlyossága széles spektrumot mutat, az egészen korán kezdődő és fiatalkorban teljes vaksághoz vezető esetek mellett felnőttkorban is viszonylag jól megőrzött centrális látással járó kórlefolyás is ismert. A betegség a jelenleg rendelkezésre álló kezelési eljárásokkal nem befolyásolható (Kellner, 1997a).

Az esetek nagy részében az RP-hoz nem társul a látászavaron kívül egyéb tünet, azonban számos szindróma részjelenségeként is megnyilvánulhat, mint például a Laurence-Moon-Bardet-Biedl szindróma, Usher-szindróma, Kearns-Sayre-szindróma és Refsum-szindróma (Kellner, 1997b).

A RP öröklésmenete meglehetősen összetett. Az autoszomális recesszív (arRP), autoszomális domináns (adRP), X-kromoszómához kötött (xRP), mitokondriális és kétgénes öröklésmenetet is leírtak (Kajiwara és mtsai, 1994; Dryja és Li, 1995; Hardcastle és mtsai, 1999). Az öröklésmenet esetenként nehézkesen, illetve nem egyértelműen állapítható meg (Haim, 1993). Egy németországi tanulmány alapján az esetek nagy része (48,4%) izolált, 25,2% autoszomális domináns, 16,4% autoszómális recesszív, 10,0% X-kromoszómához kötött recesszív örökésmenetet mutat (Gerding és Busse, 1994). Az izolált esetek nagy része feltehetően autoszómális recesszív öröklésmenetű, illetve az X-kromoszómán bekövetkező új mutáció következménye. A RP szinte egyedülálló a hátterében álló genetikai eltérések sokszínűségében. A folyamatosan növekvő számú, RP-val kapcsolatba hozható gének aktuális listája a RetNet honlapon található (http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/). Az adRP hátterében 12, az arRP hátterében 15, az xRP-hez kapcsolódóan 5 gén ismert.

A retina elfajulásával kapcsolatba hozható gének többsége a fotoreceptorokban expresszálódik, zömük a fototranszdukcióban szerepet játszó fehérjét kódol. Ezek a rodopszin, transzducin, a ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP), foszfodiészteráz alfa és béta alegysége, a cGMP-szabályozott kation csatorna, a rodopszin-kináz, az arrestin és a guanilát-cikláz (Dryja és mtsai, 1996; Huang és mtsai, 1995; McLaughlin és mtsai, 1995; Dryja és mtsai, 1995; Yamamoto és mtsai, 1997; Fuchs és mtsai, 1995; Perrault és mtsai, 1996). További fotoreceptor-specifikus, struktúrfehérjéket kódoló gének mutációi ugyancsak ideghártya degenerációhoz vezethetnek, mint például a „lassú pálcika-disztrófia” (rds/peripherin) és a „pálcika külső-membrán 1” (rom1) nevű fehérjék, (Shastry, 1997; Kajiwara és mtsai, 1994). Az előbbiek mellett a fotoreceptorok károsodását okozhatják a retina pigmenthám rétegében expresszálódó gének mutációi is, ilyen például a „celluláris retinaldehid-kötő” fehérjét (CRALB) és az RPE65 fehérjét kódoló gén (Maw és mtsai, 1997; Gu és mtsai, 1997; Morimura és mtsai, 1998). Az említett nem-allélikus heterogenitás mellett allélikus heterogenitás is megfigyelhető, a rodopszin-gén közel 100 allélja okozhat RP-t (Dryja és Li, 1995). A gének és a betegségek közti kapcsolat heterogenitását jellemzi, hogy míg az említett és a RetNet honlapon szereplő gének károsodásai gyakran erősen hasonló klinikai képet okoznak, úgy egyes gének változásaihoz több, többé-kevésbé eltérő betegség is kapcsolódhat. Az ABC-transzporter fehérjét kódoló gén (ABCR) mutációi négy különböző, öröklődő retina-disztrófiához kapcsolódóan -Stargardt-betegség, fundus flavimaculatus, csap-pálcika disztrófia és RP-kimutathatók (Shroyer és mtsai, 1999).

A retina pigmenthámja (RPE), mint a retina külső rétege, az érhártya és a fotoreceptorok között helyezkedik el. A pigmenthám sokoldalú feladata révén kulcsszerepet tölt be a látás mechanizmusában és a neuroretina működő- és életképességének fenntartásában. A pigmenthám a külső vér-retina gát része, így részt vesz a retina táplálásban. További lényegesebb feladatai a transz-konfigurációjú retinol 11-cisz retinállá való átalakítása, a fotoreceptorok közti alapállomány kémiai összetevőinek képzése, valamint a fotoreceptorok külső szegmenseiről lefűződő membránkorongok fagocitózisa és lebontása (Schraermeyer és Heimann, 1999). A pigmenthámnak továbbá fontos szerepe van a neuroretina fejlődésének szabályozásában (Jeffery, 1998).

Az RPE-ben nagy mennyiségben kimutatható egy RPE-specifikus és fejlődéstanilag konzervált 61kD súlyú fehérje, az RPE65-fehérje (Nicoletti és mtsai, 1995). A fehérje pontos szerepe még nem ismert (Choo és mtsai, 1998; Hooser és mtsai, 2000), azonban igazolták, hogy a 11-cisz retinál képződéséhez nélkülözhetetlen (Redmond és mtsai, 1998). Az RPE65-fehérjét kódoló gént karakterizálták, mely során kiderült, hogy az 1-es kromoszóma rövid karján (1p31) helyezkedik el, 14 exonból áll és 2,7 kb hosszú transzkriptumot kódol (Nicoletti és mtsai, 1995). Ez tette lehetővé, hogy felismerjék a gén mutációinak kóroki szerepét egyes retina-disztrófiában szenvedő betegekben. Az RPE65-gén volt az első RPE-specifikus gén, amelynek mutációi öröklődő betegséggel kapcsolatba hozhatók (Gu és mtsai, 1997). Az első tanulmányok után, több munkacsoport közölt RPE65-gén mutációkat retina-disztrófiás betegekben, akiknél a kórlefolyás a veleszületett vakságtól kezdődően a felnőttkori RP-ig terjedő széles skálán változott (Morimura és mtsai, 1998; Marlhens és mtsai, 1998; Perrault és mtsai, 1999a).

A hamburgi Humángenetikai Intézetben összegyűjtött nagy számú, retina-disztrófiában szenvedő beteg mintáiban megvizsgáltuk az RPE65-gént, annak esetleges patogén mutációinak meghatározása céljából.

Anyagok és módszerek

Beteganyag

Retina-disztrófiában szenvedő betegek vérmintáit vizsgáltuk az RPE65-gén mutációinak céljából. A hamburgi Humángenetikai Intézetben dolgozó munkacsoport által korábban vizsgált betegek a betegség széles spektrumát mutatták, az én bekapcsolódásomkor elsősorban a korán manifesztálódó, súlyos fokú retina-disztrófiában szenvedő betegeket vizsgáltunk. A mintavétel a betegek hozzájárulásával történt, miután előzetes tájékoztatást kaptak annak céljáról. A kutatási tervet a mintavétel helye szerinti egyetemek (Hamburg, Régensburg, Tübingen) etikai bizottsága jóváhagyta. A klinikai vizsgálat a családi anamnézis felvételéből, a látásélesség, a színlátás és perifériás látás vizsgálatából, szemfenéki réslámpa vizsgálatból és elektroretinogram felvételéből állt.

Összesen 33 beteg DNS-ét vizsgáltuk, akik közül 24 betegnél ez volt az első ilyen irányú genetikai teszt. A további 9 betegnél az első szűrés során egy-egy mutációt kimutattak, célunk egy esetleges második mutáció megkeresése volt.

A betegek és családtagjaik mintái mellett 50 egészséges egyén vérmintáiból izolált DNS-t is vizsgáltuk, mint kontrollcsoportot.

Mutáció-keresés

DNS-izolálás

A betegektől 5-10ml EDTA-val alvadásgátolt vénás vér érkezett vizsgálatra. A magvas vérsejtekből a DNS-t Miller és munkatársai által kidolgozott módon izoláltuk, az első fejezetben leírt módon (Miller és mtsai, 1988). A továbbiakban 100µg/ml koncentrációjú oldatból dolgoztunk.

A kódoló szekvenciák felerősítése PCR-ral

A RPE65-gén kódoló szakaszait (GenBank U20476-88, AF039855, U20510) 10 primer pár segítségével erősítettük fel (1. ábra). A PCR reakciókat PCT100 típusú (MJ Research) termo-ciklométerekkel végeztük. Az egyes exonok felerősítéséhez használt PCR-reakciók körülményeit az 1. táblázatban foglaltam össze. Az erősítésekhez a Promega GmbH és Qiagen GmbH cégek által forgalmazott Taq-polimeráz enzimet, reakció-puffert és $MgCl_2$-t törzsoldatot használtuk. A primereket az 1. ábrán feltüntetett szekvenciák alapján a Metabion GmbH cég szintetizálta.

1. exon

gagagctgaa agcaacttct gttccccctc cctcagctga aggggtgggg aagggctccc aaagccataa
ctccttttaa gggatttaga aggcataaaa aggcccctgg ctgagaactT CCTTCTTCAT TCTGCAGTTG
GTGCCAGAAC TCTGGATCCT GAACTGGAAG AAAATGTCTA TCCAgtaagt atctctggga gactttttta
aaacaccttc **atggattcat gataaatgtg ctat**

2. exon

ctatctctgc ggactttgag catcaacatg ggcttcttcc ttattcttcc accatttcag GGTTGAGCAT
CCTGCTGGTG GTTACAAGAA ACTGTTTGAA ACTGTGGAGG AACTGTCCTC GCCGCTCACA GCTCATGTAA
CAGgttggtc tcgcccatct tgaagccatc ctcttttatg tcagtc**tctc ttctctggc**

3. exon

ggcagggata agaagcaatg.ttctgtctcc ccttcatcac agGCAGGATC CCCCTCTGGC TCACCGGCAG
TCTCCTTCGA TGTGGGCCAG GACTCTTTGA AGTTGGATCT GAGCCATTTT ACCACCTGTT TGATGGGCAA
GCCCTCCTGC ACAAGTTTGA CTTTAAAGAA GGACATGTCA CATACCACAG AAGgtaaagc agcactccat
gccactcctc ctcctcaaag tagggcctag cttggctcct cctcccatgt.ga**gttttcac ctctgaactc**
ag

4-5. exon

ctgtacggat tgctcctgtc tatactcttc cctatgtttc aatgtccttc agGTTCATCC GCACTGATGC
TTACGTACGG GCAATGACTG AGAAAAGGAT CGTCATAACA GAATTTGGCA CCTGTGCTTT CCCAGATCCC
TGCAAGAATA TATTTTCCAG gttactgaac ccaaactgaa tgttactcaa gacattttat attagccctt
tttctctcat ggcttgaaaa ttactggact gaaaaattca tttgtttcta cagGTTTTTT TCTTACTTTC
GAGGAGTAGA GGTTACTGAC AATGCCCTTG TTAATGTCTA CCCAGTGGGG GAAGATTACT ACGCTTGCAC
AGAGACCAAC TTTATTACAA AGATTAATCC AGAGACCTTG GAGACAATTA AGCAGgtggg acacagtgct
aggtgatgtt caggaattta gaatttggaa cttaaaatta attcaacata aattatt**cat gctgcgaatg**
tatgattcta a

6. exon

tataatgtat cttccttctc tcaactggag gacattcact ttacttccgt agGTTGATCT TTGCAACTAT
GTCTCTGTCA ATGGGGCCAC TGCTCACCCC CACATTGAAA ATGATGGAAC CGTTTACAAT ATTGGTAATT
GCTTTGGAAA AAATTTTTCA ATTGCCTACA ACATTGTAAA GATCCCACCA CTGCAAGCAG gtgagtttac
caatctgtcc tcttctgaaa ataagtgtct atatt**gtgag aaagttactg tattgtgag**

7-8. exon

aaataagagg ctgttccaaa gccttttaaa accactttat ttcagACAAG GAAGATCCAA TAAGCAAGTC
AGAGATCGTT GTACAATTCC CCTGCAGTGA CCGATTCAAG CCATCTTACG TTCATAGgta acttgaaggc
ctgctatgaa tcttcaggaa aactcaagtt taaagatttg ctttgcctac ctttgatacc aatcctgatc
acaatatttt tttgcagaaa actaaattta aacataatta atttcatgta ggcactgttg attcttgtaa
ctgagcatac cacatatata caaatttgtc tgtggcttga gaatcagccc tttcattcac aagcccattt
gtgtttctga acagTTTTGG TCTGACTCCC AACTATATCG TTTTTGTGGA GACACCAGTC AAAATTAACC
TGTTCAAGTT CCTTTCTTCA TGGAGTCTTT GGGGAGCCAA CTACATGGAT TGTTTTGAGT CCAATGAAAC
CATGGGGgta agtcttagat atatttgtca agttt**gtgat tctgaagaag atgtgtttaa**

1. ábra. Az RPE65-gén exonjainak és a környező intron-szakaszoknak a nukleotid-sorrendje. Az exonokat nagy, az intronokat kis betűk, a transzláció iniciációs és terminációs kodonját aláhúzás jelzi. A PCR-reakciókhoz használt primerek kapcsolódási helyeit ("forward" és "reverse") félkövér betűkkel jelöltük. Az 1, 2, 3, 6, 9, 10, 14 exonokat külön, míg a 4-5, 7-8 és 11-12-13 exonokat együtt erősítettük fel.

9. exon

gtacactttt ttccttttta aatgcatcaa aatattttcc tcatttttca agGTTTGGCT TCATATTGCT
GACAAAAAAA GGAAAAAGTA CCTCAATAAT AAATACAGAA CTTCTCCTTT CAACCTCTTC CATCACATCA
ACACCTATGA AGACAATGGG TTTCTGATTG TGGATCTCTG CTGCTGGAAA GGgtaagaaa ggacactgga
caaatgggac acctcccatt gttcctggaa attacggggt ttttacagag.ctgctg**cact caatctgaat**
cacatctaaa ac

10. exon

ttgtcattgc ctgtgctcat gtttgacttt ttatttttgc agATTTGAGT TTGTTTATAA TTACTTATAT
TTAGCCAATT TACGTGAGAA CTGGGAAGAG GTGAAAAAAA ATGCCAGAAA GGCTCCCCAA CCTGAAGTTA
GGAGATATGT ACTTCCTTTG AATATTGACA AGtgaacctg cttctctgta gatttcagat ttaa**ccagaa**
tgtttcatct ctctca

11-12-13. exon

gtttgaattc tttcctgctc actgaggttt ctgttatctt ctctcctagG CTGACACAGG CAAGAATTTA
GTCACGCTCC CCAATACAAC TGCCACTGCA ATTCTGTGCA GTGACGAGAC TATCTGGCTG GAGCCTGAAG
TTCTCTTTTC AGGGCCTCGT CAAGgtgaga tgatctagag aaaacttcac acgggagtga acaaatgttt
ctttcaaaga gattaagagt tttcctaagc atgtgctcta tttcgtagCA TTTGAGTTTC CTCAAATCAA
TTACCAGAAG TATTGTGGGA AACCTTACAC ATATGCGTAT GGACTTGGCT TGAATCACTT TGTTCCAGAT
AGGgtaatta atccttctta ctaatatttg aacagtgctt tgagtatatg ctagtcaagt aaagcatatt
gactgattgc ttgattgatt tttctttctc acaaacagCT CTGTAAGCTG AATGTCAAAA CTAAAGAAAC
TTGGGTTTGG CAAGAGCCTG ATTCATACCC ATCAGAACCC ATCTTTGTTT CTCACCCAGA TGCCTTGGAA
GAAGATGATG gtaatgaaag caattgttgt gtctgaatac tcttctta**ct gcagttctgt atgttagttc**

14. exon

agtcagaaaa agaagtcagg tcatatggtt ttctatattt gtcaatgtaa tacctcctat attatttcaa
tgacattcaa tctatagctt gggcttttaa aaactcaata ttgcctaatt tacttctgat aaacagGTGT
AGTTCTGAGT GTGGTGGTGA GCCCAGGAGC AGGACAAAAG CCTGCTTATC TCCTGATTCT GAATGCCAAG
GACTTAAGTG AAGTTGCCCG GGCTGAAGTG GAGATTAACA TCCCTGTCAC CTTTCATGGA CTGTTCAAAA
AATCTTGAGC ATACTCCAGC AAGATATGTT TTTGGTAGCA AAACTGAGAA AATCAGCTTC AGGTCTGCAA
TCAAATTCTG TTCAATTTTA GCCTGCTATA TGTCATGGTT TTAACTTGCA GATGCGCACA ATTTTGCAAT
GTTTTACAGA AA**GCACTGAG TTGAGCAAGC AAT**

1. ábra. (Folytatás.)

A PCR-reakciókhoz a következő hőprogramot használtuk: 2 perc 94C^{o} (kezdeti denaturálás); 30 ciklusban 94C^{o} 1 perc, 55 C^{o} 1 perc, 72 C^{o} 1 perc (ciklikus szakasz, erősítés); végül 72 C^{o} 10 perc (utolsó extenziós lépés). Az optimális „annealing” hőmérséklet az 1. táblázatban megadott módon exononként változott. A PCR-reakciók során kapott végtermékeket agaróz-gélelektroforézissel (1,5-2,0%-os géleken) ellenőriztük.

1. táblázat. RPE65-gén exonjainak felerősítésére végzett PCR-reakciók paraméterei.

	Annealing hőmérséklet	DNS-oldat	Primer (20µM)	Buffer (µl)	$MgCl_2$ (25mM)	DNTP (20mM)	Taq (µl)	H_2O (µl)	amplikon (bp)
Ex1	55 C^o	1,0µl	0,5-0,5µl	2,5	1,5µl	0,5µl	0,1	18,4	279bp
Ex2	60 C^o	1,0µl	0,5-0,5µl	2,5	1,5µl	0,5	0,1	18,4	199bp
Ex3	57 C^o	1,0µl	0,5-0,5µl	2,5	0.75µl	0,5	0,1	18,4	297bp
Ex4-5	57 C^o	1,0	0,5-0,5µl	2,5	1,5µl	0,5	0,1	18,4	501bp
Ex6	57 C^o	1,0	0,5-0,5µl	2,5	1,5µl	0,5	0,1	18,4	269bp
Ex7-8	54 C^o	1,0	0,5-0,5µl	2,5	1,5µl	0,5	0,1	18,4	550bp
Ex9	57 C^o	1,0	0,5-0,5µl	2,5	1,5µl	0,5	0,1	18,4	292bp
Ex10	57 C^o	1,0	0,5-0,5µl	2,5	1,5µl	0,5	0,1	18,4	226bp
Ex11-13	55 C^o	1,0	0,5-0,5µl	2,5	1,5µl	0,5	0,1	18,4	671bp
Ex14	60 C^o	1,0	0,5-0,5µl	2,5	1,5µl	0,5	0,1	18,4	453bp

A kódoló szekvenciákat tartalmazó amplikonok vizsgálata SSCP-analízissel

8µl PCR-elegyhez 10µl formamidos oldatot (98% deionizált formamid, 20mM EDTA, 0,05% brómfenolkék, 0,05% xylene cyanol) kevertünk, a kapott keveréket 5-6 percig 95C^o-on denaturáltuk, majd hirtelen vizes jégen lehűtöttük. A denaturált, egyszálú, illetve a renaturált (vagy nem denaturált), kettős szálú fragmenteket vertikális rendszerben (GibcoBRL, S2 Sequencing Apparatus), poliakrilamid-gélelektroforézissel választottuk el, három különböző módon (Orita és mtsai, 1989; Bunge és mtsai, 1996).

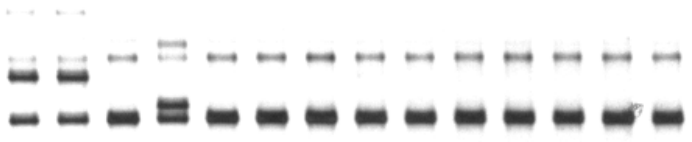
1. 8%-os, glicerinmentes poliakrilamid-gélben (akrilamid:bisakrilamid 29:1), szobahőn, 14-16 órán át állandó 8-9W teljesítménnyel futtatva
2. 10% glicerint tartalmazó 8%-os poliakrilamid-gélben (akrilamid:bisakrilamid 29:1), szobahőn, 16-18 órán át állandó 11-12W teljesítménnyel futtatva
3. 5% glicerint, 5% szacharózt tartalmazó 8%-os poliakrilamid-gélben (akrilamid:bisakrilamid 29:1), 4 C^o-on, 19-24 órán át állandó 21-22W teljesítménnyel futtatva

Minden egyes PCR-amplikont elemeztünk mindhárom leírt körülmény mellett.

Az SSCP-analízist megelőzően a 4-5. exonokat tartalmazó PCR-amplikonokat *SfcI*-enzimmel (258bp és 243bp szakaszok), a 7-8. exonokat és a 11-13. exonokat tartalmazó amplikont az *SSpI*-enzimmel (215bp és 235bp szakaszok, illetve 255bp és 416bp szakaszok) emésztettük. Az emésztéseket a forgalmazó által biztosított útmutatót követve végeztük.

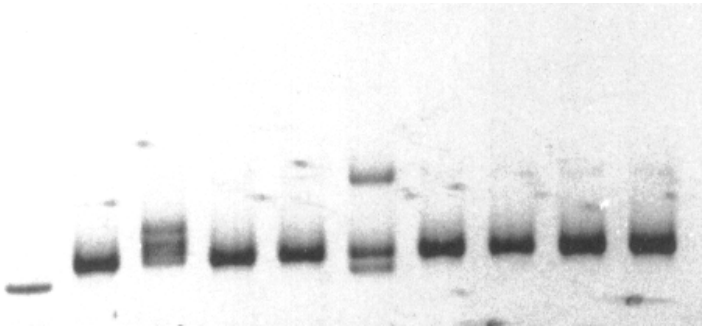
A géleket ezüstözéssel hívtuk elő, a következő módon (Budowle és mtsai, 1991): az elektroforézist követően a géleket 5-10 percig 10%-os alkoholban fixáltuk, majd 1%-os salétromsavban 3 percig oxidáltuk. Desztillált vizes öblítés után 20 perces rázatás következett 12mM-os ezüst-nitrát oldatban, miután a felesleget kétszeri desztillált vizes mosással távolítottuk el. Végül, a DNS-hez kötődött ezüstionokat 0,28M nátrium-bikarbonátot és 0,019% formalint tartalmazó oldatban redukáltuk fémezüstté. Mikor a DNS-csíkok festődése elérte a kívánt intenzitást (sötétbarna, fekete), a redukáló reakciót 10%-os ecetsavval mosással (kb. 2 perc) állítottuk le. Ezt követően a gélt 10-15 percig desztillált vízben mostuk, majd a megőrizni kívánt részletről a felesleget eltávolítva, azt légmentesen, fólia-lapok közé csomagoltuk, a fóliák széleit vákuum-fóliahegesztővel zártuk le. A géleket mind fóliába csomagolt formában, illetve mind a készített fekete-fehér fotók formájában megőriztük.

Az SSCP-géleken az egyes szálú DNS-szakaszok mobilitási eltérései mellett (2. ábra) a renaturáció során képződött ún. heteroduplexek mobilitási eltéréseit is vizsgáltuk (3. ábra). Az eltérést mutató szakaszok (PCR-amplikonokat) bázis-sorrendjét automata szekvenálóval (ABI PRISM 310 Genetic Analyser, Applied Biosystems) határoztuk meg.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

2. ábra. SSCP-analízis. Az 1-es, 2-es és 4-es jelzésű mintákban az egyes szálú DNS-ek mobilitási eltérést mutatnak.



MM 1 2 3 4 5 6 7 8 9

3. ábra. Heteroduplex-analízis. A 2-es és 5-ös jelzésű mintákban heteroduplex képződése látható. MM a mólsúly marker egy szakasza.

A kódoló szenvenciák eltéréseinek kimutatása szekvenálással

Az SSCP-analízis és a heteroduplex analízis alapján a normál mintákhoz képest eltérést mutató minták kérdéses szakaszainak bázissorrendjét automata szekvenálóval határoztuk meg. A 25µl-es PCR-elegyből 3µl-t 2%-os, etídium-bromiddal festett agaróz gélen futtattunk meg, ezzel ellenőrizve a reakció sikerességét. A maradék 20-21µl-t Genommed oszlopon lecentrifugálva tisztítottuk, mely során a PCR-amplikonokat nyertük ki a PCR-elegyből. A tisztított PCR-termékekből ismételten PCR-reakciót végeztünk, amely során fluorescens-festékkel jelölt dideoxynukleotidok épültek a végtermékbe. A reakciót minden vizsgált exon esetében mindkét irányból, mind a „forward”, mind a „reverse” primerrel elvégeztük.

A reakció protokollja (ún. cycle sequencing):

1-5µl tisztított PCR-termék

0,5µl of 8-10pmol/µl primer

1,5µl BDT

H_20 (steril) ad 20µl

egy csepp ásványi olaj (kb 20µl)

Hőprogram: **1**. 96C^o 20s, **2.** 50C^o 7s, **3.** 60C^o 4perc, **4.** Ismétlés az 1. lépéstől 25-ször. **5.** 4C^o

A fluorescens-festékkel jelölt dideoxynukleotidokat tartalmazó PCR-elegyből a végterméket a következő módon különítettük el.

Alkoholos kicsapás:

- az olajmentes PCR-elegyhez 2µl 3M-os Na-acetátot (4C^{o}-os) és 50µl abszolút etanolt (-20C^{o}-os) adtunk
- ezt követte egy centrifugálás, 13.000-es fordulatszámmal 25 percig , a felülúszót leöntöttük
- az üledékhez 700µl 70%-os (-20C^{o}-os) etanolt adtunk, enyhén összeráztuk
- ismét centrifugálás következett, 13.000-es fordulatszámmal, 25 percig
- a felülúszó leöntését követően az eppendorf-csöveket lezárt (sötét) dobozban szárítottuk meg.
- a szekvenálás előtt a beszárított üledéket 20µl TSR-al kevertük össze

Az automata szekvenálóval mért bázissorrendet a referencia szekvenciával vetettük össze (Genbank U20476), az eredményeket nyomtatott formában tároltuk. Az észlelt mutációk létezését egyéb módszerekkel erősítettük meg.

A mutációk ellenőrzése

A szekvenálóval észlelt mutációkat ismételten, független módszerrel is kimutattuk. A DNASTAR programcsomag EditSeq és MapDraw programjaival az észlelt mutációnak megfelelően egy RFLP-t terveztünk, amellyel a hasítási hely keletkezése, illetve elvesztése alapján a mutációra következtethettünk. Azon betegeknél, ahol a családtagoktól is sikerült DNS-t nyernünk, RFLP-vel vizsgáltuk meg a mutáns allél és a betegség koszegregációját.

Az IVS1+5g→a mutáció kimutatásához az 1. ábrán feltüntetett „forward” primer mellett „reverse” primerként „mismatch” primert használtunk, amely révén *SspI* hasítási hely keletkezett a mutáns allélon (a „mismatch” primer: ttaaaaaagtctcccagaaata).

Azon esetekben, ahol a mutáció helyén (sem a normál, sem a mutáns allélon) nem volt restrikciós enzim hasítási hely, lehetőség szerint a családtagoknak és a betegnek a mintáit együtt vizsgáltuk ismételt SSCP-vel. Itt az egyszálú DNS-láncok mobilitási eltéréseinek a fenotípussal való koszegregációja által ellenőriztük a mutáció meglétét.

A promoter régió vizsgálata

A betegek egy részénél (arRPL, arRP76, arRP95, arRP188, arRP192, arRP476, arRP816, arRP821, arRP826, arRP870) megvizsgáltuk az RPE65-gén promoter régiójának egyes szakaszait, szekvencia-variánsokat keresve. Az alkalmazott primer-párokat a transzkripciós faktorok feltételezett kötési helyének megfelelően terveztük (Nicoletti és mtsai, 1998):

RPE65P1forward:5'ctattcgtatccatccctcag3'	RPE65P1reverse:5'aacatcataaaccatttacag3'
RPE65P2forward:5'cagagagcagacaggcattag3'	RPE65P2reverse:5'caccctcattcattaactcac3'
RPE65P3forward:5'tctctgtctggttcataggtg3'	RPE65P3reverse:5'ggcttgctgttcccataacag3'
RPE65P4forward:5'agctcctttctttctaatctg3'	RPE65P4reverse:5'gacattttcttccagttcagg3'

A fenti primer-párokkal végzett reakciókkal a promoter régió -2577bp és -2381bp; -631bp és -368bp; -395bp és -168bp; -218bp és +38bp pozíciók közti szakaszait erősítettük fel. A PCR-reakciók eredményét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Az amplikonokat a leírt körülményeket mellett SSCP-vel vizsgáltuk, az egyes szálú DNS-szakaszok mobilitási különbségeit és a heteroduplex-képződést értékeltük.

Mikroszatellita analízis

Egyes mutációkhoz kapcsolódó haplotípus vizsgálatát az RPE65-gén transzkripciós kezdőpontjától 5' irányba 2,8kb távolságra levő D1S2803 mikroszatellita polimorfizmus elemzésével végeztük el.

A kapott szekvenciák-elemzése

A mutációk során megváltozott szekvenciákra és a mutációkat környező természetes „splice site"-okra vonatkozó „splice site" konszenzus értékeket nemzetközileg elfogadott táblázatok alapján számoltuk ki (Cooper és Krawczak, 1994).

Az aminosav-változással járó mutációk biológiai következményeinek vizsgálatakor 6 faj RPE65-fehérjéinek aminosav-sorrendjét hasonlítottuk össze: humán (GenBank AAC14586), szarvasmarha (Genbank A47143), kutya (GenBank CAA76290), patkány (Genbank NP_446014), tyúk (GenBank BAA75667) és szalamandra (GenBank AF047465).

Az RPE65 fehérje másodlagos szerkezetének és a „missense” mutációk által módosított variánsok szerkezetének becslését a PSIPRED szerveren (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/) és az Európai Bioinformatikai Intézet Jpred szerverén (http://jura.ebi.ac.uk:8888/) végeztem el.

Az RPE65-fehérje esetleges poszttranszlációs módosulásának helyei közül az N-mirisztilezés, N-glükozilálás, valamint a tirozin-, szerin- és treonin foszforilálás helyeit vizsgáltuk. A foszforilálás helyeinek becslése a Prosite adatbázis NetPhos szerverén (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/) történt (Bairoch és mtsai, 1997).

Eredmények

A 33 beteg DNS-mintájában vizsgáltuk meg az RPE65 gén kódoló szakaszait SSCP módszerrel. Az egyes szálú DNS-szakaszok mobilitási eltérései és a heteroduplex-képződés elemzése során a normál szekvenciákhoz viszonyítva 15 egyén DNS-mintájában, 29 amplikonban, összesen 30 eltérést találtunk. A kiválasztott 29 amplikon szekvenciáját automata szekvenálóval meghatároztuk, amelynek során a referencia szekvenciához képest (Genbank U20476) 30 eltérést sikerült azonosítanunk. Az észlelt mutációkat a betegek azonosító kódjával és az eltérés várható hatásával a 2. táblázatban tüntetem fel. A feltüntetett mutációk közül 3 (E352E, 697+22c→t, 1297+29g→a, összesen 10 amplikon) nagy valószínűséggel szekvencia-polimorfizmusnak felel meg. A 1110G→A szekvencia-variáns (E352E) várhatóan nem okoz aminosav változást és egyéb tanulmányok alapján az egészséges egyének között hasonló gyakorisággal mutatható ki, mint a retina-disztrófiás betegekben (Morimura és mtsai, 1998). A 697+22c→t és a 1297+29g→a szekvencia-variánsok az exon/intron határoktól távol az intronban helyezkednek el és a környező nukleotidok alapján valószínűtlen, hogy rejtett „splice site”-ot képviseljenek. Az 50 tünetmentes kontrollként vizsgált egyén mintáiban ezen szekvencia-variánsok legalább 2 allélon előfordultak.

Az észlelt összes szekvencia-variáns közül külön táblázatban (3. táblázat) foglaltam össze, a gén 5’→3’ iránya szerint csoportosítva azokat, amelyek várhatóan aminosav-változást, korai terminációt, illetve az olvasási keret eltolódását okozzák. A feltüntetett betegek közül 8-nál találtunk mindkét allélen feltehetően biológiai jelentőséggel bíró mutációt, 7 betegnél heterozigóta, egynél homozigóta formában. További 4 betegnél csak ilyen eltérést észleltünk. Az arRP870 jelzésű betegnél csak egy, aminosav-cserével járó mutációt észleltünk, ami különösen érdekes, hisz a beteg vérrokon szülők gyermeke. A IVS6+5g→a mutáció következtében a 6-os intron donor „splice site”-jának konszenzus értéke lényegesen csökken (4. táblázat), így feltételezhető, hogy a hogy „splice site” inaktiválódik, ami funkcióképtelen mRNS-t/fehérjét eredményez. A további 2 mutáció (IVS1+5g→a és A132T) feltehetően öszefügg a betegséggel. Az A132T mutáció kóroki szerepét korábbi vizsgálatok során igazolták (Morimura és mtsai, 1998) és időközben más munkacsoportok is közölték (Lotery és mtsai, 2000). A IVS1+5g→a mutáció nem-rokon retina-disztrófiás betegeknél is kimutatható kevert heterozigóta formában, illetve további betegeknél homozigóta formában is észlelték (arRP181 jelzésű beteg a hamburgi Humángenetikai Intézet anyagából; Lotery és mtsai, 2000).

2. táblázat. Az RPE65-gén szekvenciáinak variációi retina-disztrófiában szenvedő betegekben.

Beteg	Exon/Intron	Eltérés	Várható hatás	genotípus
arRPL	Ex4	325C→T	R91W	heterozigóta
	Ex10	1156T→C	Y368H	heterozigóta
	Ex10	1110G→A	E352E	heterozigóta
arRP 76	Ex4	337G→C	E95Q	heterozigóta
	Ex3	289T→C	Y79H	heterozigóta
arRP 95	Ex5	448G→A	A132T	heterozigóta
	Ex10	1110G→A	E352E	heterozigóta
arRP 188	Ex8	831del8	„frame shift”	heterozigóta
	EX6	553G→T	D167Y	heterozigóta
arRP192	Ex4	325C→T	R91W	heterozigóta
	Ex1	56T→C	M1T	heterozigóta
	Ex10	1110G→A	E352E	heterozigóta
arRP 476	Ex6	697+5g→a	„splice site” inaktiválása	heterozigóta
arRP816	Ex6	669delCA	„frame shift”	heterozigóta
	Ex14	1637G→T	G528V	heterozigóta
LCA 821	Int1	65+5g→a	„splice site” inaktiválása	heterozigóta
	Ex12	1361G→T	G436V	heterozigóta
	Ex10	1110G→A	E352E	heterozigóta
	Int6	697+22c→t	polimorfizmus	heterozigóta
LCA 826	Int1	65+5g→a	„splice site” inaktiválása	heterozigóta
	Int6	697+22c→t	polimorfizmus	heterozigóta
847	Ex10	1110G→A	E352E	heterozigóta
849	Ex4	358G→T	E102X	homozigóta
850	Int1	65+5g→a	„splice site” inaktiválása	heterozigóta
	Ex13	1424C→A	T457N	heterozigóta
	Ex10	1114delA	„frame shift”	heterozigóta
	Int6	697+22c→t	polimorfizmus	homozigóta
870	Ex4	308G→A	R85H	heterozigóta
879	Ex11	1297+29g→a	polimorfizmus	heterozigóta
886	Ex10	1110G→A	E352E	heterozigóta

3. táblázat. Az RPE65-gén várhatóan biológiai következménnyel járó mutációi retina-disztrófiában szenvedő betegekben.

Exon/ Intron	Mutáció	A mutáció várható hatása	Emésztési hely	Beteg	Genotípus
E-1	56T→C	M1T	+*MaeII*	arRP192	heterozigóta
I-1	IVS1+5g→a	„splice site" inaktiválása	+*SspI**	LCA821	heterozigóta
				LCA826	heterozigóta
				arRP850	heterozigóta
E-3	**289T→C**	**Y79H**	nincs változás	arRP76	heterozigóta
E-4	325C→T	R91W	-*RsaI*	arRPL	heterozigóta
				arRP192	heterozigóta
E-4	**337G→C**	**E95Q**	+*HinfI*	arRP76	heterozigóta
E-4	**358G→T**	**E102X**	-*ApoI*	arRP849	homozigóta
E-5	448G→A	A132T	nincs változás	arRP95	heterozigóta
E-6	**553G→T**	**D167Y**	-*MboI*	arRP188	heterozigóta
E-6	**669delCA**	**„frame shift"**	+*MunI*	LCA816	heterozigóta
I-6	**IVS6+5g→a**	**„splice site" inaktiválása**	nincs változás	arRP476	heterozigóta
E-8	**831del8**	**„frame shift"**	+*ApoI*	arRP188	heterozigóta
E-10	1114delA	„frame shift"	nincs változás	arRP850	heterozigóta
E-10	**1156T→C**	**Y368H**	+*NlaIII*	arRPL	heterozigóta
E-12	**1361G→T**	**G436V**	+*RsaI*	LCA821	heterozigóta
E-14	**1637G→T**	**G528V**	+*RsaI*	LCA816	heterozigóta

* Az RFLP-vizsgálathoz az 1. exon „reverse" primere helyett „mismatch" primert használtunk. Félkövér betűkkel jelöltük a közleményünkben közölt új szekvencia-variánsokat.

Az arRP850 betegnél 4 szekvencia variáns találtunk, amelyek közül egy (IVS6+22c→t) polimorfizmusnak felel meg. A további 3 mutáció közül kettőt (1114delA és T457N) az apától (11. ábra) örökölt. Az utóbbi jelentősége nem becsülhető meg, mivel a 1114delA mutáció már korábban az olvasási keret elcsúszását okozza.

A promoter régió vizsgálata

A promoter régió fentiekben megjelölt szakaszainak vizsgálatakor az arRP76, arRP476 betegekben a –2483pozícióban a→g és a -2480 pozícióban c→t szekvencia variánsokat azonosítottunk, heterozigóta állapotban. A többi mintában SSCP- és heteroduplex analízissel eltérést nem észleltünk. Az arRP76 és arRP476 mintákat a *Taa I* és *Bsm I* enzimekkel emésztettük. A kettős emésztéssel vizsgálva azt találtuk, hogy az arRP76 mintában az említett a→g és c→t nukleotid-cserék különböző allélokon, míg az arRP476 mintában azonos allélon vannak.

Az aminosav-változást okozó mutációk

Az aminosav-változást okozó mutációk az esetek nagy részében az aminosavak jellegének megváltozásával járnak. A R91W, E95Q, D167Y, Y79H és Y368H mutációk esetében megváltozott az aminosavak oldalláncának töltése, a 91-es pozícióban a pozitív töltésű arginin helyett az apoláros triptofán, a 95-ös pozícióban a negatív töltésű glutaminsav helyett neutrális glutamin, a 167-es helyen az ugyancsak negatív töltésű aszparaginsav helyett a neutrális tirozin szerepel a mutáns fehérjében. A 79-es és 368-as pozíciókban a neutrális oldalláncú tirozin helyét pozitív töltésű hisztidin foglalja el a mutáció következtében. Egy esetben az aminosav oldalláncának polaritása változik meg (A132T), az apoláros alanin helyén poláros oldalláncú treonin lesz. Egy mutáció a transzláció kezdőpontját módosítja (M1T). A további mutációk esetében az aminosavak megváltozása nem eredményezi az adott helyen az aminosav jellegének egyértelmű megváltozását (R85H, G436V, G528V, T457N).

A fentiekben említett „missense” mutációk az RPE65-fehérje konzervált szekvenciáit érintik. Az elemzett 6 faj (humán, szarvasmarha, kutya, patkány, tyúk, szalamandra) RPE65-fehérjéi a fenti mutációk helyein azonos aminosavat tartalmaznak (4. ábra). Kivételt képez a T457N mutáció, mivel a 457-es pozícióban, a többi fajban levő tirozin helyett, a patkányban isoleucin található. 50 egészséges egyén DNS-mintáinak vizsgálatakor a felsorolt eltérések egyikét sem sikerült azonosítanunk. Az aminosav-cserét okozó mutációk és az ún. „splice site” mutációk esetében meghatároztuk az ún. konszenzus értékeket (CV) (4. táblázat). Eredményeink alapján a mutációk következtében kialakult szekvencia variánsok a környező, természetes „splice site”-ok konszenzus értékeinél kisebb értékeket adnak.

```
1    msiqvehpag gykklfetve elsspltahv tgriplwltg sllrcgpglf    Humán
     mssqvehpag gykklfetve elsspltahv tgriplwltg sllrcgpglf    Szarvasmarha
     msiqiehpag gykklfetve elstpltahv tgriplwltg sllrcgpglf    Patkány
     mtnrvdhpag gykklfeste elvapvtaqv tgripvwlsg sllrcgpglf    Szalamandra

51   evgsepfyhl fdgqallhkf dfkeghvtyh rrfirtdayv ramtekrivi    Humán
     evgsepfyhl fdgqallhkf dfkeghvtyh rrfirtdayv ramtekrivi    Szarvasmarha
     evgsepfyhl fdgqallhkf dfkeghvtyy rrfirtdayv ramtekrivi    Patkány
     evgseqfyhl fdgqallhkf efkgghviyh rrfirtdtyv ramtekrivi    Szalamandra

101  tefgtcafpd pcknifsrff syfrgvevtd nalvnvypvg edyyactetn    Humán
     tefgtcafpd pcknifsrff syfrgvevtd nalvniypvg edyyactetn    Szarvasmarha
     tefgtcafpd pcknifsrff syfrgvevtd nalvniypvg edyyactetn    Patkány
     tefgtfafpd pcknifsrfl syfqglevtd nalvnvypvg edyyactetn    Szalamandra

151  fitkinpetl etikqvdlcn yvsvngatah phiendgtvy nigncfgknf    Humán
     fitkvnpetl etikqvdlcn yvsvngatah phiendgtvy nigncfgknf    Szarvasmarha
     fitkinpetl etikqvdlcn yvsvngatah phiesdgtvy nigncfgknf    Patkány
     yitkinpetl etvkkvdlcn yvsingvtah phiehdgtvy nigncfgkhf    Szalamandra

201  siaynivkip plqadkedpi skseivvqfp csdrfkpsyv hsfgltpnyi    Humán
     siaynivkip plqadkedpi skseivvqfp csdrfkpsyv hsfgltpnyi    Szarvasmarha
     tvayniikip plkadkedpi nksevvvqfp csdrfkpsyv hsfgltpnyi    Patkány
     afaynivkip plqadkedpi nkakvvvqfp cserfkpsyv hsfgltpnyi    Szalamandra

251  vfvetpvkin lfkflsswsl wganymdcfe snetmgvwlh iadkkrkkyl    Humán
     vfvetpvkin lfkflsswsl wganymdcfe snetmgvwlh iadkkrkkyi    Szarvasmarha
     vfvetpvkin lfkflsswsl wganymdcfe snesmgvwlh vadkkrrkyf    Patkány
     vfveqpvkin lfkflsswsi wganymdcfe shetmgvwmh vaekhtgeyl    Szalamandra

301  nnkyrtspfn lfhhintyed ngflivdlcc wkgfefvyny lylanlrenw    Humán
     nnkyrtspfn lfhhintyed heflivdlcc wkgfefvyny sylanlrenw    Szarvasmarha
     nnkyrtspfn lfhhintyed ngflivdlcc wkgfefvyny lylanlrenw    Patkány
     nikyrtsafn lfhhintyed hgflivdlcc wkgfefvyny lylanlrenw    Szalamandra

351  eevkknarka pqpevrryvl plnidkadtg knlvtlpntt atailcsdet    Humán
     eevkknarka pqpevrryvl plnidkadtg knlvtlpntt atailcsdet    Szarvasmarha
     eevkrnamka pqpevrryvl pltidkadtg rnlvtlphtt atailcsdet    Patkány
     eevkrsaekp pqpevrryvl pldihkvdtg knlvnlpytt atavlrsdet    Szalamandra

401  iwlepevlfs gprqafefpq inyqkycgkp ytyaygglgln hfvpdrlckl    Humán
     iwlepevlfs gprqafefpq inyqkyggkp ytyaygglgln hfvpdrlckl    Szarvasmarha
     iwlepevlfs gprqafefpq inyqkcggkp ytyaygglgln hfvpdklckl    Patkány
     iwlepevlfs gprqafefpq inykkhggkd ytyaygvgln hfvpdrlskl    Szalamandra

451  nvktketwvw qepdsypsep ifvshpdale eddgvvlsvv vspgagqkpa    Humán
     nvktketwvw qepdsypsep ifvshpdale eddgvvlsvv vspgagqkpa    Szarvasmarha
     nvktkeiwmw qepdsypsep ifvsqpdale eddgvvlsvv vspgagqkpa    Patkány
     nvktketwvw qepdtypsep ifvsqpdaie eddgvvlsvv ispgegqkpa    Szalamandra

501  yllilnakdl sevaraevei nipvtfhglf kks                      Humán
     yllilnakdl sevaraevei nipvtfhglf kks                      Szarvasmarha
     yllvlnakdl seiaraevet nipvtfhglf kkp                      Patkány
     fllilnakdm seiaraevds nipvtfhgmf kka                      Szalamandra
```

4. ábra. Az RPE65-fehérje szekvenciája különböző fajokban. A retina-disztrófiás betegekben észlelt, aminosav eltéréssel járó mutációkat félkövér betűkkel jelöltük.

4. táblázat. A „missense” és „splice site” mutációk által módosult szekvenciák lehetséges konszenzus értékeinek és a természetes exon/intron határok konszenzus értékeinek összehasonlítása.

Mutáció	**A mutáció lehetséges konszenzus értékei mint 5’ „splice site” (CVmin-CVmax)**	**5’ természetes „splice site” CV**	**A mutáció lehetséges konszenzus értékei mint 3’ „splice site” (CVmin-CVmax)**	**3’ természetes „splice site” CV**
M1T (E1)	0,097-0,508	0,792	0,014-0,384	-
Y79H (E3)	0,011-0,299	0,810	0,113-0,647	0,936
R85H (E4)	0,016-0,191	0,758	0,191-0,589	0,967
R91W(E4)	0,095-0,707	0,758	0,129-0,489	0,967
E95Q (E4)	0,153-0,534	0,758	0,107-0,776	0,967
A132T (E5)	0,031-0,357	0,803	0,06-0,516	0,967
D167Y (E6)	0,031-0,643	0,967	0,067-0,439	0,828
Y368H (E10)	0,026-0,705	0,799	0,01-0,666	0,936
G436V (E12)	0,144-0,674	0,778	0,124-0,511	0,714
T457N(Ex13)	0,031-0,552	0,732	0,021-0,511	0,706
G528V (E14)	0,022-0,568	-	0,134-0,747	0,792
IVS1+5g→a	0,648	0,792	-	-
IVS6+5g→a	0,823	0,967	-	-

Az RPE65 fehérje másodlagos szerkezetének becslésekor (PSIPRED és Jpred szerverek alapján) azt találtam, hogy a fehérje nagy része instabil szerkezetű (C), míg egyes rövidebb szakaszai várhatóan alfa-helikális (H) illetve béta szerkezetűek (E) (5. ábra).

```
MSIQVEHPAGGYKKLFETVEELSSPLTAHVTGRIPLWLTGSLLRCGPGLFEVGSEPFYHL  Seq60
CCEECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEEEECCCCCCCEEEECCCCCCCCCCCCCC   Str
941126766432223554333357510158986188535058955688677888888776  Konf

FDGQALLHKFDFKEGHVTYHRRFIRTDAYVRAMTEKRIVITEFGTCAFPDPCKNIFSRFF  Seq120
CCHHHEEEEEEEECCEEEEEEEEECCHHHHHHHHCCCEECCCCCCCCCCCHHHHHHHHHH   Str
332231457885288899999632278889887528611256776678730134677665  Konf

SYFRGVEVTDNALVNVYPVGEDYYACTETNFITKINPETLETIKQVDLCNYVSVNGATAH  Seq180
HHCCCCCCCCCCCEEEEECCEEEEEECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEC   Str
420456788876411797288389932499773206665200003465674678712103  Konf

PHIENDGTVYNIGNCFGKNFSIAYNIVKIPPLQADKEDPISKSEIVVQFPCSDRFKPSYV  Seq240
CCCCCCCCEECCCCCCCCCCEEECCCEECCCCCEEEECCCCCEEEEEEECCCCCCCEEE   Str
761888640123111133420200320057530220057785014788756888887047  Konf

HSFGLTPNYIVFVETPVKINLFKFLSSWSLWGANYMDCFESNETMGVWLHIADKKRKKYL  Seq300
EECCCCCCEEEEEECCCCCHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEEECCCCCCCC   Str
872467405999717862057787235887666433454446778747998768888312  Konf

NNKYRTSPFNLFHHINTYEDNGFLIVDLCCWKGFEFVYNYLYLANLRENWEEVKKNARKA  Seq360
CEEEECCCCEEEEEEEEEEECCEEEEEEEECCCCCHHHHHHHCHHHCCCCCCCCCCCCCC   Str
206772883399864766408868999987588621455430101002343223334446  Konf

PQPEVRRYVLPLNIDKADTGKNLVTLPNTTATAILCSDETIWLEPEVLFSGPRQAFEFPQ  Seq420
CCCCCCEEEEECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC   Str
776543058843467676655200367752056515775200112101355444567885  Konf

INYQKYCGKPYTYAYGLGLNHFVPDRLCKLNVKTKETWVWQEPDSYPSEPIFVSHPDALE  Seq480
CCHHHCCCCEEEEEEEEECCCCCCCCEEEEEEECCCEEEEECCCCCCCCCEEEECCCCCC   Str
165454773010588840588778617999831881778625997442310630888887  Konf

EDDGVVLSVVVSPGAGQKPAYLLILNAKDLSEVARAEVEINIPVTFHGLFKKS         Seq533
CCCCEEEEEEECCCCCCCCCEEEEEECCCCCEEEEEEECCCCCCCCCCEEECC          Str
788589999877888987215999766987726899956525766640001 19         Konf
```

5. ábra Az RPE65 fehérje elsődleges és becsült másodlagos szerkezete. Str: másodlagos szerkezet, H:helikális, E: béta-szál, C: instabil, Konf: a becslés megbízhatósági foka (0-9). A félkövér betűkkel és aláhúzással jelölt aminosavak az aminosav-változással járó mutációk helyét jelzik.

A vizsgált, aminosav-változással járó mutációk közül a Y79H, R85H, R91W, D167Y, G436V, T457N és G528V mutációk esetében az aminosav-változás az elemzés alapján várhatóan nem okoz változást a másodlagos szerkezetben (az adatokat nem mutatom be).

Az M1T mutáció következtében a 13-as és 14-es helyen levő K aminosavaknál a normál fehérje instabil szerkezete várhatóan (alacsony konfidencia szinten) helikálissá módosul (6. ábra).

```
93212566752022046554456751026888608853505896568867     Konf-m
CCEECCCCCCCHHHCCCCCCCCCCCCEEEEEEECCCCCCCEEEEECCCCC     Str-m
TSIQVEHPAGGYKKLFETVEELSSPLTAHVTGRIPLWLTGSLLRCGPGLF    Seq1-50m
CCEECCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEEEECCCCCCCEEEEECCCCC     Str-n
94112676643222355433335751015898618853505895568867     Konf-n
```

6. ábra. Az M1T mutációt (félkövér, aláhúzott karakter) tartalmazó RPE65-fehérje és a normál variáns becsült másodlagos szerkezete. Konf-n(m): a becslés megbízhatósági foka (0-9)(normál, mutáns), Str-n: a normál fehérje másodlagos szerkezete, Seq1-50m: a mutáns fehérje szekvenciájának részlete az 1-50. pozíciók között, Str-m: a mutáns fehérje másodlagos szerkezete. A másodlagos szerkezetben eltérést mutató szakaszt félkövér betűk jelzik.

A 95-ös pozícióban E helyett Q-t tartalmazó RPE65-fehérje (E95Q mutáció) másodlagos szerkezete a normál szerkezethez képest eltérést mutat. A becsült eltérések jelentősége az alacsony konfidencia értékek alapján megkérdőjelezhető (7. ábra).

```
608754157777777501234677664312467787876402797188189820699762316776101 0    Konf-m
HCCCEEECCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCEEEECCCEEEEEECCCCCCEECCCCCHHC    Str-m
TQKRIVITEFGTCAFPDPCKNIFSRFFSYFRGVEVTDNALVNVYPVGEDYYACTETNFITKINPETLETI   Seq94-163m
HCCCEECCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCEEEEECCEEEEEECCCCCCCCCCCCCCC    Str-n
5286112567766787301346776654204567888764117972883899324997732066652000    Konf-n
```

7. ábra. Az E95Q mutációt tartalmazó RPE65-fehérje és a normál variáns becsült másodlagos szerkezete.

Az A132T mutációt hordozó RPE65-fehérje másodlagos szerkezete a 154-155-ös és a 201-208-as pozíciókban mutat eltérést normál variánshoz képest (8. ábra).

```
7750279608838995249976141666 62....2311135553033410447     Konf-m
CCCCEEEEECCEEEEEECCCCCCEECCCCC....CCCCCCCCCCEEEEEEEECC     Str-m
NTLVNVYPVGEDYYACTETNFITKINPETL....NIGNCFGKNFSIAYNIVKIP  Seq131-210m
CCCCEEEEECCEEEEEECCCCCCCCCCCCC....CCCCCCCCCCEEECCCEECC     Str-n
7641179728838993249977320666 52....2311113342020032005 7   Konf-n
```

8. ábra. Az A132T mutációt tartalmazó RPE65-fehérje és a normál variáns becsült másodlagos szerkezete.

Az Y368H mutációt hordozó RPE65-fehérje másodlagos szerkezete a 352-357-es és a 372-373-es pozíciókban mutat eltérést normál variánshoz képest (9. ábra).

```
3223432011011111001467777733787123667667          Konf-m
HHHHHHHCCCCHHHHHHCCCCCCCCCCEEEEEECCCCCCC          Str-m
LYLANLRENWEEVKKNARKAPQPEVRRHVLPLNIDKADTG       Seq341-380m
HHCHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCCCCC            Str-n
3010100234322333444677654305884346767665          Konf-n
```

9. ábra. A Y368H mutációt tartalmazó RPE65-fehérje és a normál variáns becsült másodlagos szerkezete.

Az aminosav-változással járó mutációk nem érintették az RPE65-fehérje esetleges posztranszlációs módosulásának (N-glükozilálás, N-mirisztilezés, szerin-, treonin- és tirozin-foszforilálás) helyeit. Az N-glükozilálás az aszparagint módosítja, a mutációk nem érintettek aszparagint. Az N-mirisztilezés az N-terminális glicinen történhet, ilyen pozícióban szintén nem észleltünk mutációt. A foszforilálás helyei a Prosite adatbázis NetPhos2.0 szervere (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/) alapján:

Szerin-foszforilálás helyei: 121, 221, 238, 307, 410, 465, 474, 492

Treonin-foszforilálás helyei: 27, 94, 162, 255, 379

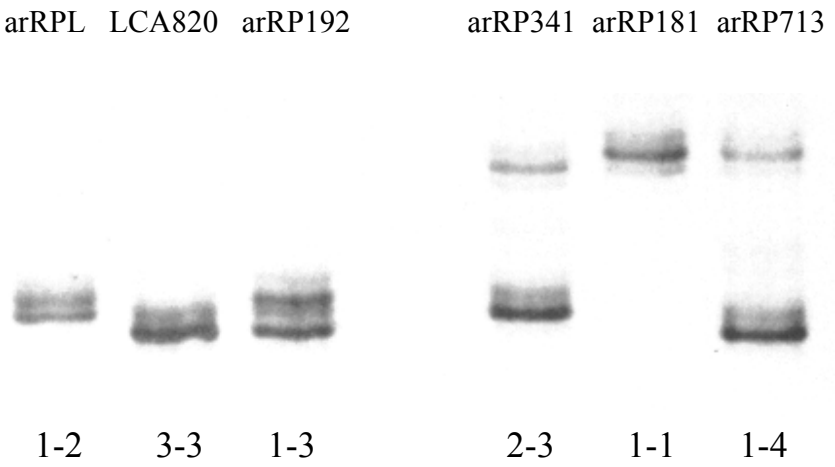
Tirozin-foszforilálás helyei: 58, 89, 144, 171, 239, 299, 318, 338, 466, 501

A várhatóan funkcióképtelen fehérjét kódoló szekvencia eltérések

Az észlelt mutációk közül kettő az RPE65-gén intronjaiban helyezkedett el, közel az exon/intron határhoz (IVS1+5g→a, IVS6+5g→a). A mutációk következtében a „splice site”-ok konszenzus értékei lényegesen csökkentek (4. táblázat), így várható, hogy a természetes „splice site” ezáltal inaktiválódott. A IVS1+5g→a mutáció esetében az 1-es intronban +122 helyen elhelyezkedő `tggtgggg` szakasz lehet az új donor, ún. rejtett “splice site”, mivel konszenzus értéke mint esetleges “splice site” 0,7358, amely a természetes (CV=0,792) és mutáns (CV=0,648) “splice site” konszenzus értékei között van. Ez esetben az mRNS 40 kodonnal hosszabb lenne és a +2-4 pozíciókban levő `taa` kodon a transzláció korai terminációja révén az 533 aminosavból álló fehérje helyett MSIQ tetrapeptidet eredményezne. A IVS6+5g→a mutáció esetében azonban a 6-os intronban és a 7-es exonban sem található olyan szakasz amelynek konszenzus értéke (mint esetleges „splice site”) elérné a mutáns „splice site” konszenzus értékét (CV=0,823). A 6-os intron donor „splice site”-jától 3’ irányban a következő, magasabb konszenzus értéket mutató szekvencia a 7-es intron 5’ „splice site”-ja (CV=0,858).

A kis deléciókat okozó mutációk (669delCA, 831del8, 1114delA) az olvasási keret eltolódását eredményzik. A 669delCA mutáció következtében a 7-os exon 750-751-752 pozícióiban TGA kodon keletkezik, amely -feltételezve, hogy az új mRNS félélet-ideje nem csökken jelentősen- a transzláció korai terminációjához, 205 normál és 26 idegen aminosavból álló, csonkolt és igen valószínűen funkcióképtelen fehérje képződéséhez vezet. A 831del8 mutáció a 8-as exon `TAACCTGT` szakaszának deléciója révén ugyancsak TGA kodon képződését eredményezi, a 891-893. pozíciókban. Eredményes transzláció esetén 277 aminosavból álló (ebből az utolsó 17 idegen) csonkolt fehérje képződne. A 1114delA mutáció szintén TGA kodon képződéséhez vezet a 1168-1170. pozíciókban. Sikeres transzláció esetén 372 aminosavat (a C-terminális végén 16 idegen aminosavat) tartalmazó csonkolt fehérje képződne.

Az E102X mutáció a transzláció korai befejezése révén ugyancsak csonkolt, 102 aminosavból álló, funkcióképtelen fehérje képződéséhez vezet.



10. ábra. Mikroszatellita-analízis. Az RPE65-gén R91W, illetve IVS1+5g→a mutációit hordozó, retina-disztrófiában szenvedő betegek genotípus analízise a D1S2803 markerrel.

Genotípus analízis

Az RPE65-gén egyes mutációi több retina-disztrófiában szenvedő betegben is kimutathatók. Az LCA820, arRP192, arRP341, arRP181, arRP713 betegek adatait a hamburgi Humángenetikai Intézet anyagából vettem. Az arRPL és arRP192 betegek kompound heterozigóták, az LCA820 jelzésű beteg homozigóta az R91W mutációra. Az arRP341 és az arRP713 jelzésű minták heterozigóták, az arRP181 minta homozigóta az IVS1+5g→a mutációra. Az RPE65-géntől 5' irányba levő D1S2803 mikroszatellita markerrel elemeztük az említett két mutációt hordozó betegek DNS-ét (10. ábra). A haplotípus analízis eredményeképpen megállapíthatjuk, hogy mind az R91W és az IVS1+5g→a mutáció legalább két különböző genetikai háttérre vezethető vissza.

A vizsgált betegek klinikai adatai

A retina-disztrófiában szenvedő, a betegség lefolyásának és súlyosságának széles skáláját mutató betegek közül egy előzetesen szelektált csoportot vizsgáltunk. A vizsgált betegeknél a betegség viszonylag korán, csecsemő, vagy gyermekkorban került felismerésre. A látászavarokhoz többnyire szemtekerezgés, szürkületi vakság és a fényforrásra való fixálás társult. Többnyire már gyermekkorban mérhető volt a látótér beszűkülése. Szemfenék-tükrözéssel a retina sápadtságát és a pigmenthám perifériás elvékonyodását észlelték, pigment-felhalmozódás nélkül. Ha végeztek a kórkép felismerésekor elektroretinogramot (ERG), akkor a pálcikákról nem, míg a csapokról is csak csökkent amplitúdójú elektromos jelet sikerült elvezetni. A folyamat progressziója következtében iskoláskorú betegeknél már a csapok sem adtak értékelhető elektromos jelet. Az ERG-lelet ellenére

megfelelően erős fényben a betegek látásteljesítménye meglepően megtartott volt, ami lehetővé tette, hogy az általános iskolai tanulmányaikat normál osztályokban kezdjék. Később, esetleg középiskolás korra a látásteljesítmény többnyire nagyfokban romlott, huszonéves korban mind centrálisan és perifériásan csak látótér-szigetek maradtak. Az RPE65-gén különböző típusú patogén mutációit hordozó betegeknél észlelt klinikai kép nem mutatott lényeges különbséget, például a két „missense" mutációt hordozó arRPL jelzésű beteg és két potenciálisan funkcióképtelen fehérjét kódoló allélt hordozó arRP850 jelzésű beteg kórlefolyása erősen hasonló.

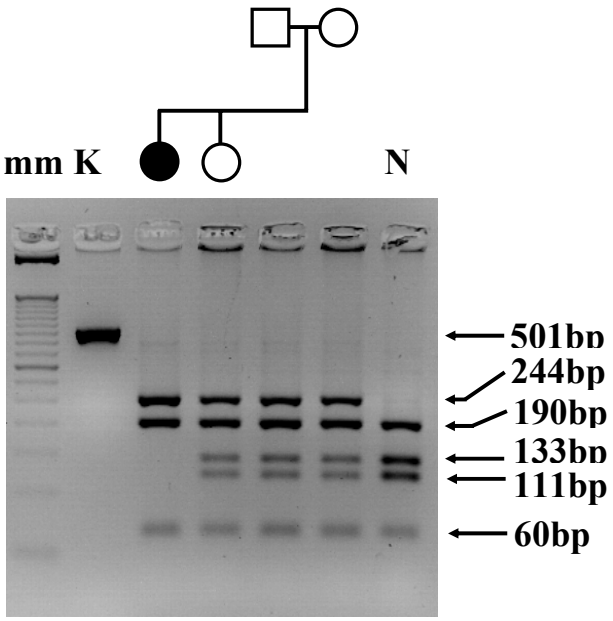
A mutáns allélok és a betegség koszegregációja családokban

Azon mutáns RPE65-allélt hordozó betegeknél, ahol a családtagoktól is sikerült DNS-t nyernünk, megvizsgáltuk a mutáns allélok és a fenotípus koszegregációját. A következőkben 5 családot mutatok be, RFLP (és SSCP) módszerekkel kimutatva a mutáns és normál allélokat (11-15. ábrák). Az észlelt RPE65-mutációk kóroki szerepét a fentiek mellett ezen adatok is megerősítik, minthogy a betegek a mutáns allélokra homozigóták, vagy kevert heterozigóták, a szülők heterozigóták, az egészséges testvérek pedig vagy heterozigóták, vagy a normál allélre homozigóták.

Az arRP850 jelzésű beteg és családja

Az arRP850 jelzésű beteg nem vérrokon szülők egyetlen gyermeke. Az apa második házasságából egészséges lánygyermek született. A kórelőzményben szereplő adatok szerint eseménymentes terhességet és szülést követően csecsemőkorban jelentős látászavart és nystagmust észleltek. Félhományban a gyerek gyakorlatilag vak volt. 4 éves korában került a munkacsoportunkkal kollaboráló szemészorvoshoz. A szemfenék vizsgálat során a sárgafolt enyhe fokú szemcsézettségét, a retina ereinek minimális mértékű beszűkülését, a periférián a pigmenthám fokozott szemcsézettségét és peripapillárisan a szemfenék elhalványodását találták. 6 éves korban készített ERG-n a csapok és pálcikák elektromos tevékenysége nem volt kimutatható. 7 éves korban a látásteljesítmény és a szemfenéki kép a 4 éves kori lelethez képest változást nem mutatott. Az RPE65 génben észlelt 3 mutációt RFLP és SSCP módszerekkel mutatom be a betegben és a szülőkben (11. ábra).

11. ábra. Az arRP850 jelzésű betegben és szüleiben észlelt mutációk kimutatása. **a.** A T457N mutáció új *Tsp509 I* hasítási helyet eredményez. A 11-13-as exonokat tartalmazó amplikonból keletkező 226bp hosszú szakasz további szakaszokra hasad (93bp és 133bp). A mutáció az apában és a betegben mutatható ki. **b.** A 1114delA mutáció a 10-es exont tartalmazó amplikon egyes szálú DNS-ének mobilitási eltérését (SSCP) és heteroduplex képződését okozza. Az apában és a betegben azonos elektroforetikus mintázat látható, az anyában a normál allélre jellemző mintázat látható. **c.** Az egyes intron +5g→a mutációjának kimutatása RFLP-vel. A „mismatch" primerrel kapott PCR-amplikonban a mutáció új *SspI* hasítási helyet okoz. Az anya és a beteg hordozzák a mutációt, míg az apában nem mutatható ki.



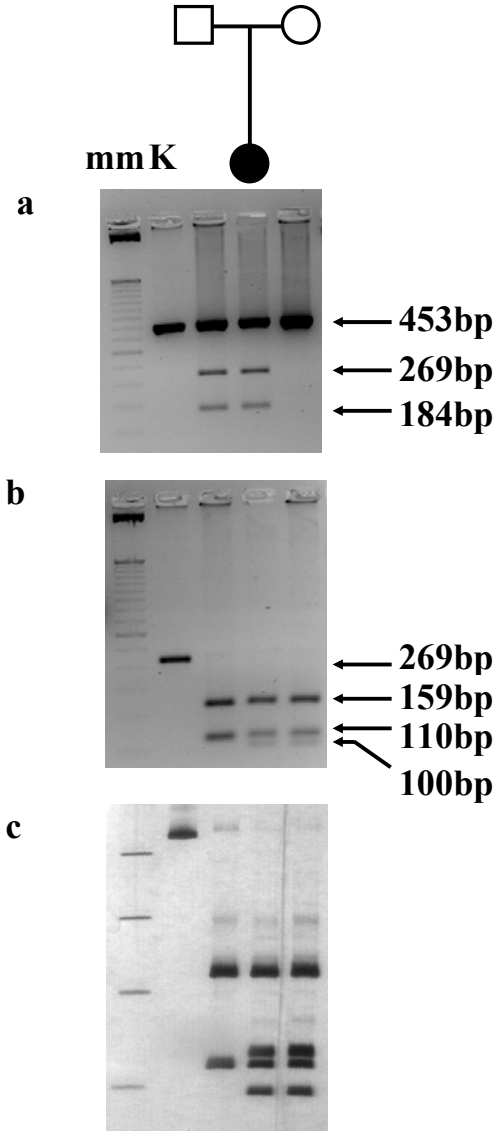
12. ábra. Az arRP849 jelzésű betegben és családtagjaikban észlelt E102X mutáció RFLP vizsgálata. A mutáció egy *ApoI* hasítási hely elvesztésével jár. A normál allél *ApoI* enzimmel emésztve 190bp, 133bp, 111bp 60bp hosszú szakaszokra hasad. A mutáció következtében a 111bp és 133bp hosszú szakaszok nem válnak el, így egy új, 244bp hosszú szakasz keletkezik. A beteg szülei és leánytestvére a mutációra nézve heterozigóták, míg a beteg homozigóta. K:emésztetlen kontroll, N: normál kontroll, mm: mólsúly marker

Az arRP849 jelzésű beteg és családja

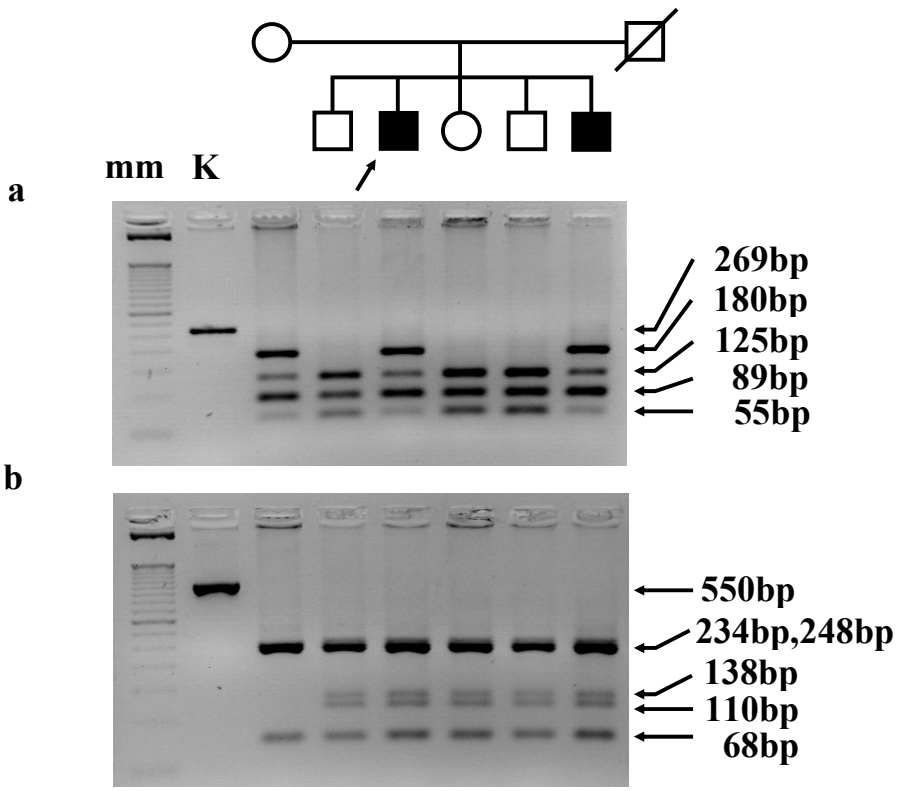
A szülők között rokoni kapcsolat nem ismert. A csecsemőkorban észlelték betegségét, amely nagyfokú látászavarral, nystagmussal és szürkületi vaksággal jelentkezett. 6 éves korában gyűrű alakú látótérkieséseket mértek, a pálcikák ERG-jele kioltott volt. 12 éves korában a csapokról sem tudtak ERG-jelet elvezetni. Az RPE65-gén mutációját RFLP módszerrel mutatom be a 12. ábrán.

Az arRP816 jelzésű beteg és családja

Nem vérrokon szülők gyermeke. 6 hónapos korában észlelték nagyfokú látászavarral, nystagmussal és szürkületi vaksággal jelentkező betegségét. 15 éves korában látótere nagyfokban beszűkült, a retináról ERG-jelet nem tudtak elvezetni. Látószervi fogyatékosok számára fenntartott speciális iskolába járt, 30 éves korára a látótere felvehetetlen volt a nagyfokú beszűkülés miatt, gyakorlatilag megszűnt a fényérzékelése. Az RPE65-gén mutációit RFLP módszerrel a 13. ábrán mutatom be.



13. ábra. Az arRP816 jelzésű betegben és szüleiben észlelt RPE65-gén mutációk RFLP vizsgálata. **a.** A 14-es exon G528V mutációja. A mutáció következtében új *RsaI* hasítási hely keletkezik, a 453bp amplikon 269bp és 184bp fragmentumokra hasad. Az apa és a proband heterozigóták, az anyában a mutáció nem mutatható ki. A G528V mutációt a beteg az apától örökölte. **b.** A 6-os exon del669CA mutációja. A mutáció egy további, új *MunI* hasítási helyet eredményez, 269bp hosszú amplikon normál allélja 159bp és 110bp fragmentumokra hasad, míg CA deléció esetén a 110bp hosszú szakaszból további 10bp és 100bp hosszú szakaszok keletkeznek. Az anya és a proband heterozigóták, míg az apában a deléció nem mutatható ki. **c.** A b. ábrán látható, agarózgélen szeparált fragmentumokat a jobb felbontás érdekében poliakrilamid-gélen is megfuttattuk, a gélt ezüstözéssel festettük. K: emésztetlen kontroll, mm: mólsúly marker



14. ábra. Az arRP188 jelzésű betegben (nyíl) és családtagjaiban észlelt D167Y és 831del8 mutációk RFLP vizsgálata. **a.** A 6-os exon D167Y mutációja egy *MboI* hasítási hely elvesztését okozza, amelynek következtében az 55bp hosszú és 125bp hosszú szakaszok nem válnak el, egy új 180bp hosszú szakasz keletkezik. Az anya és a két beteg fiútestvér heterozigóták a mutációra nézve, míg a további két fiútestvér és a leánytestvér a normál allélre homozigóták. **b.** A 8-as exon 831del8 mutációja révén az 550bp hosszú PCR-amplikonban új *ApoI* hasítási hely keletkezik. A normál allélből *ApoI* emésztéssel kapott 248bp hosszú fragmentum további 110bp és 138bp hosszú szakaszokra hasad. Mind az 5 testvér heterozigóta, míg az anya a normál allélre nézve homozigóta. K:emésztetlen kontroll, mm: mólsúly marker

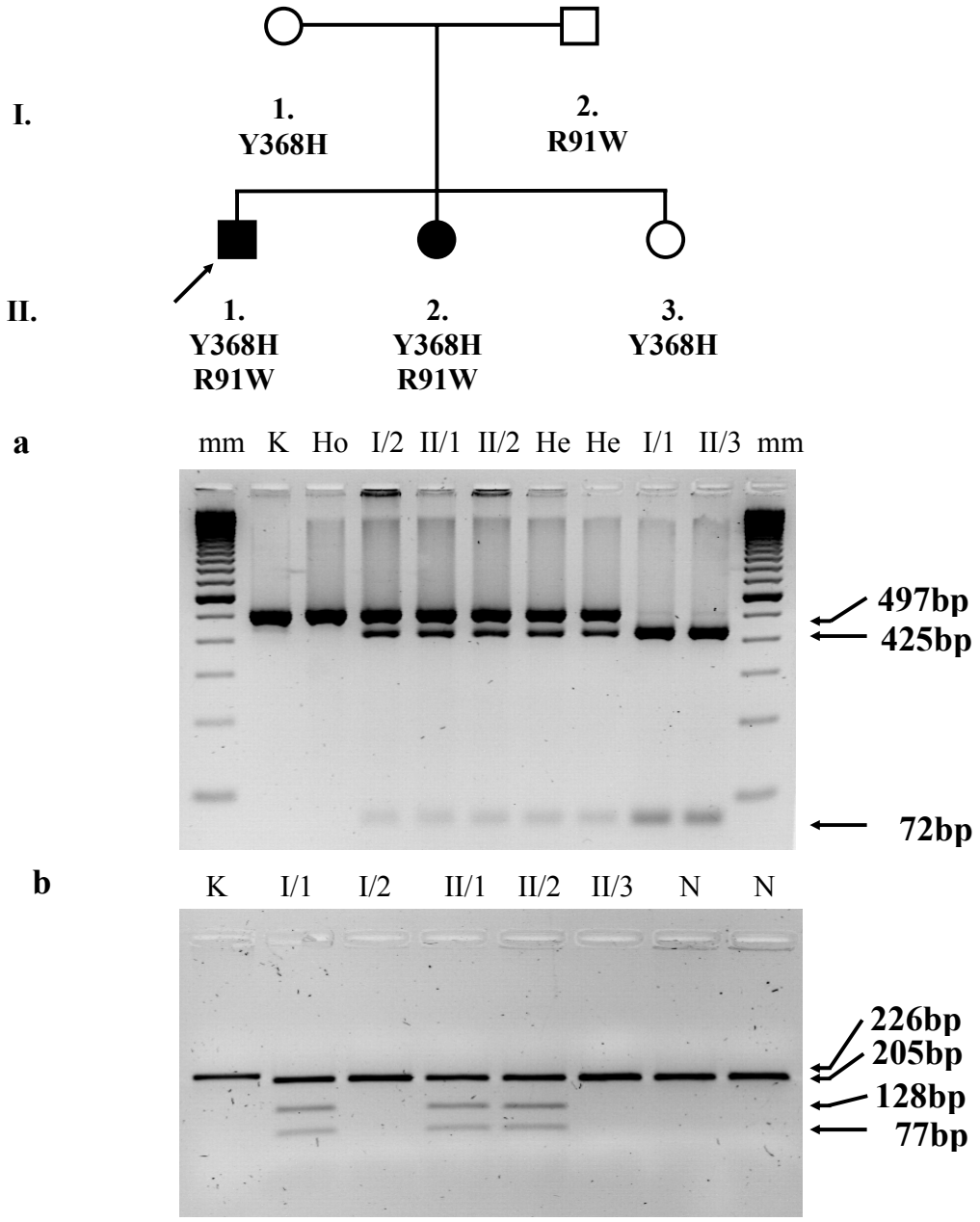
Az arRP188 jelzésű beteg és családja

Születése után nem sokkal megfigyelték, hogy látása jelentősen károsodott, tekintetével csak a fénylő tárgyakat követte. Iskolás korában már súlyos fokú látászavara volt, 20 éves korára már csak ismert környezetben tudott tájékozódni. 25 éves korára teljesen elvesztette fényérzékelő képességét. Az RPE65-gén mutációit a 14. ábrán mutatom be.

Az arRPL jelzésű beteg és családja

A háromgyermekes családban a két idősebb testvér szenvedett retina-disztrófiában. A szülők nem voltak vérrokonok. Mindkét beteg gyermek esetében a terhesség és a szülés eseménytelen volt. Az idősebb fiútestvér látászavarát csecsemő korában észlelték, 7 hónapos korában csak a fényforrásra való fixálást tudták kiváltani. A munkacsoportunkkal kollaboráló szemészorvos 4 éves

korában vizsgálta először. Ekkor nystagmusa nyilvánvaló volt, a heteroanamnézisben szürkületi vakság is szerepelt. A szemfenék-vizsgálat során elhalványult papillát, a sárgafolt enyhén fokozott szemcsézettségét, szabályos érrajzolatot és a periférián a pigmenthám fokozott szemcsézettségét találták. 7,5 éves korában az ERG kialudt volt. A gyermek a látószervi fogyatékosok számára fenntartott speciális iskolába jár, szellemi fejlődése átlagos. Az RPE65-gén mutációit a 15. ábrán mutatom be.



15. ábra. Az arRPL jelzésű betegben (nyíl) és családtagjaiban észlelt R91W és Y368H mutációk RFLP vizsgálata. **a.** A 4-es exon R91W mutációja egy *RsaI* hasítási hely elvesztését okozza, amelynek következtében egy új 497bp hosszú szakasz keletkezik (72bp és 425bp szakaszokból). Az apa és a két beteg testvér heterozigóták, az egészséges leánytestvér és az anya két normál allélt hordoznak. **b.** A 10-es exon Y368H mutációja a 226bp hosszú PCR-amplikonban új *NlaIII* hasítási helyet okoz. A normál allélből *NlaIII* emésztéssel kapott 205bp fragmentum további szakaszokra (77bp és 128bp) hasad. Az anya és a beteg testvérek heterozigóták, míg az apa és az egészséges leánytestvér a normál allélre homozigóták. K:emésztetlen kontroll, mm: mólsúly marker, Ho: homozigóta mutáns kontroll, He:heterozigóta mutáns kontroll, N: normál homozigóta

Megbeszélés

Az ideghártya örökletes disztrófiáit klinikai és genetikai (allélikus és nem-allélikus) heterogenitás jellemzi. Napjainkig legalább 114 lokusz és 51 gén hozható összefüggésbe a retina különböző degeneratív elváltozásaival (RetNet honlap, (http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/). Az RPE nélkülözhetetlen a neuroretina fejlődéséhez és működéséhez, így várható volt, mint ahogy állatkísérletek során igazolták (Mullen és Lavail, 1976), hogy az RPE funkciózavara a retina károsodásához, elfajulásához vezethet. Az RPE65 fehérjét kódoló gén volt az első RPE-specifikus gén, amelynek mutációit kapcsolatba hozták emberi megbetegedéssel. Az RPE65-gén mutációi változatos kórlefolyást mutató ideghártya-elfajulást okozhatnak, a különböző munkacsoportok által észlelt szekvencia-variánsok összefoglaló listája a Mutation Database honlapján tekinthető meg (http://www.retina-international.com/sci-news/rpe65mut.htm). Az RPE65 fehérje funkciója pontosan nem ismert, az eddigi adatok alapján működése a 11-cisz retinol képzéséhez nélkülözhetetlen (Redmond és mtsai, 1998). Vizsgálatainkban retina-disztrófiás betegekben észlelt RPE65-gén mutációkat és a társuló fenotípust hasonlítottuk össze.

A hamburgi Humángenetikai Intézet RP-munkacsoportjával kollaboráló német és amerikai munkacsoportok összesített eredményei alapján a korán manifesztálódó, súlyos fokú retina-disztrófia háttérében az RPE65-gén mutációi gyakran, az esetek 11,4%-ában kimutathatók. Ezen adat hozzávetőlegesen egyezik az RPE65-gén mutációinak, más munkacsoportok által a Leber-féle veleszületett vakságban szenvedő betegeknél észlelt előfordulási gyakoriságával (Morimura és mtsai, 1998; Perrault és mtsai, 1999a).

Az RPE65-gén mutációi által okozott betegség autoszomális recesszív természetéből következik, hogy a missense mutációk a fehérje funkciójának nagymérvű csökkenését, funkcióképtelenségét eredményezik. Az R91W mutáció *igen valószínűen* patogénnek tekinthető, mivel Morimura és munkatársai (Morimura és mtsai, 1998) és mi is észleltük betegekben, homozigóta formában. A M1T és A132T mutációk hasonlóan, *igen valószínűen* összefüggenek a retina-disztrófiájával, mivel betegekben homozigóta formában is kimutatták (Morimura és mtsai, 1998). A további mutációk (Y79H, E95Q, D167Y, Y368H, G436V, G528V) *valószínűen* kóroki jelentőséggel bírnak, a fenotípussal való koszegregáció alapján.

Az R85H és a T457N mutációk biológiai jelentősége nem világos. Feltehető, hogy RPE65-gén ritka szekvencia-variánsainak felelnek meg, amelyek önmagukban nem játszanak kóroki szerepet, azonban egyéb (meg nem határozott) eltérésekkel együtt egy későn manifesztálódó multifaktoriális retina-megbetegedéshez vezethetnek (Halushka és mtsai, 1999).

A közelmúltban megjelent tanulmány szerint (Danciger és mtsai, 2000) egyes aminosav-változással járó mutációk az RPE65 fehérje aktivitását kismértékben módosítják. Beltenyésztett egerek ideghártyájának fokozott, illetve csökkent fogékonysága a fény károsító hatásával szemben, kapcsolatot mutat az RPE65-gén egyes szekvencia-variánsaival (Wenzel és mtsai, 2001). Ahogy az A-vitamin metabolizmusának molekuláris mechanizmusait az RPE és fotoreceptorok között egyre jobban megismerjük, egyre inkább tudunk olyan kísérleteket tervezni, amelyekkel több gén szimultán eltérésének interaktív, betegséget okozó hatása megismerhetővé válik.

Azon molekuláris mechanizmus(ok), amely(ek) által az RPE65-gén mutációi patogénné válnak egyenlőre nem ismert(ek). A patomechanizmus megismerésének előfeltétele lenne a fehérje élettani szerepének pontos tisztázása, ami azonban ezidáig még nem sikerült. Az észlelt aminosav-változással járó mutációk a fehérje konzervált szakaszait érintik, a fehérje elsődleges szerkezetében nem mutatnak egyértelmű halmozódást, továbbá nem befolyásolják az esetleges poszttanszlációs módosulások helyeit valamint nem, illetve csak bizonytalan mértékben változtatják meg a fehérje másodlagos szerkezetét. Ezek a mutációk befolyásolhatják a fehérjék közti kölcsönhatásokat, a sejten belüli elhelyezkedést, a jelátviteli anyagok megkötését, illetve a 11-cisz retinol képzésében fontos „intrinsic” enzimaktivitást. Az említett feltevések vizsgálatához elengedhetetlen az RPE65 fehérje funkciójának mérésére alkalmas módszerek kifejlesztése.

Két betegnél, az egyik allélt érintő, *nagyon valószínűen* patogén mutációk mellett (IVS1+5g→a, A132T) a másik allélen nem sikerült egy feltehetően kóroki szereppel bíró szekvencia-variánst azonosítani. Ez egy viszonylag általános, más munkacsoportok által is észlelt probléma (Morimura és mtsai, 1998; Perrault és mtsai, 1999a; Lotery és mtsai, 2000). Magyarázatául szolgálhat egy, az alkalmazott módszerekkel (SSCP, szekvenálás) nem kimutatható viszonylag nagy deléció, illetve előfordulhat, hogy a promoter régió nem vizsgált szakaszain van az eltérés. A promoter aktivitásért felelős szakaszok az emberi RPE-génben nem teljesen ismertek (Nicoletti és mtsai, 1998), ezen lehetőség vizsgálatára csak ezt követően kerülhet sor. A további elméleti lehetőség, hogy ezen esetekben a betegség kétgénes öröklésmenetet mutat (Kajiwara és mtsai, 1994) és az észlelt RPE65-gén mutációhoz egy másik gén mutációja társul. Nem zárható ki továbbá, hogy a betegségért egy általunk nem vizsgált, az RPE65-géntől független gén károsodása felelős. A további vizsgálatok érdekes célja lehet, hogy az észlelt heterozigóta mutációk jelentenek-e fokozott kockázatot a hordozók látóképességére, különösen idősebb korban.

A vizsgált betegekben az RPE65-gén mutációi okozta betegség kórlefolyása nem mutat összefüggést a kórokozó mutáció típusával. Korábbi tanulmányok azt sugallják, hogy a mindkét allélt érintő, várhatóan funkcióképtelen fehérjét kódoló eltérések (az ún. „null” mutációk) súlyosabb látáskárosodással járó betegséget okoznak, míg ha egyik, vagy mindkét allél aminosav-változással járó mutációt hordoz, illetve ha az aminosav-változás nem jár az aminosav jellegének megváltozásával, a kórkép enyhébb tünetekkel jelentkezik (Marlhens és mtsai, 1998; Morimura és mtsai, 1998). Az ABCR-gén mutációi és az okozott betegség súlyossága között hasonló összefüggést feltételeznek, miszerint a mutációk típusának függvényében autoszomális recesszív Stargardt-betegség, fundus flavimaculatus, csap-pálcika disztrófia és RP alakulhat ki (Shroyer és mtsai, 1999). A mi adataink alapján azonban mint a „null”, mint az aminosav-változással járó mutációk kapcsolódhatnak súlyos látáskárosodást mutató fenotípushoz. Ezen körülmény arra utalhat, hogy egyes „missense” mutációk gyakorlatilag funkcióképtelen fehérjét eredményeznek, míg mások a fehérje aktivitását mérsékelten befolyásolják. A megfigyelés egy másik magyarázata lehet, hogy az RPE65-génhez kapcsolódó molekuláris mechanizmusokat egyéb gének módosítják. A kérdés megválaszoláshoz ismét az RPE65 fehérje élettani szerepének tisztázása és a mutáns fehérje működésének vizsgálatára alkalmas módszerek kifejlesztése szükséges.

Az RPE65-gén és a retina-disztrófiák közti kapcsolatot leíró első közlemények (Gu és mtsai, 1997; Marlhens és mtsai, 1997) az RPE65-gén mutációihoz kapcsolódó fenotípust gyermekkori, súlyosfokú retina disztrófiának és a Leber-féle veleszületett vakságnak (LCA) nevezték. Ezt követően egyes szerzők javasolták, hogy az RPE65-gén és a fotoreceptor-specifikus guanilát- cikláz (RetGC1) gén mutációihoz kapcsolódó LCA esetek a klinikai kép alapján megkülönböztethetők (Perrault és mtsai, 1999a; Perrault és mtsai, 1999b). Vizsgálataink alapján úgy véljük, hogy az RPE65-gén patogén mutációit hordozó betegek fenotípusa meglehetősen hasonló, amit fiatal gyermekkorban nagyfokban károsodott, de megfelelő fényviszonyok mellett jól használható látóképesség és ERG-vel a csapok kimutatható elektromos tevékenysége jellemez. A betegek látásteljesítménye az iskolás évek alatt többnyire jelentősen romlik, azonban a betegek egy részénél látótér-szigetek megmaradnak a huszas éveik végére is. Így, a mutációkhoz társuló fenotípus nagyfokú hasonlósága alapján valószínű, hogy a különböző típusú mutációk hasonló mértékben befolyásolják az RPE65 fehérje működését.

Az RPE65-gén mutációi következtében kialakuló kórkép megjelölésére különböző klinikai elnevezések használatosak, mint például LCAII; korai, súlyos fokú retina-disztrófia; autoszomális recesszív RP; korai, súlyos fokú RP. Eredményeink alapján felmerül annak a lehetősége, hogy az említett diagnózisok nem az észlelt kórképek klinikai megjelenéseinek lényeges eltéréseire utalnak, hanem inkább a szemész szakorvosok által alkalmazott diagnosztikus elnevezések egyéni különbségeit jelzik.

Az RPE65-génhez kapcsolódó retina-disztrófiát állatmodellekben is vizsgálták, a betegséget leírták természetes körülmények között kutyában és kísérleti körülmények között egérben (Redmond és mtsai, 1998; Veske és mtsai, 1999). Az A-vitamin metabolizmusának állat-modellekben való vizsgálata és befolyásolása alapján várhatóan a gyógykezelés lehetőségei is körvonalazhatók. Mivel ezen betegekben a betegséget többnyire kora gyermekkorban felismerik és a látásteljesítményük viszonylag hosszú ideig megtartott, az esetleges terápiás beavatkozások megfelelő alanyai lennének. Jelenleg számos laboratóriumban vizsgálják a terápia különböző lehetőségeit. A génterápia alkalmazásával egy közelmúltban megjelent tanulmány szerint sikerült a beteg állatok látóképességét visszaállítani, kutya modellben (Acland és mtsai, 2001). A RPE65-fehérje hiányában a trans-retinil észterek felhalmozódnak és a 11-cisz retinol képződése lényegesen csökken (Redmond és mtsai, 1998). Az A-vitamin anyagcserében észlelt blokk alapján felmerül a gyógyszeres beavatkozás lehetősége (Van Hooser és mtsai, 2000). A metabolikus funkcióit megtartó RPE-sejttenyészetek kialakításával, az RPE-átültetés ezen betegség gyógyításának egyik kézenfekvő módszere lehet (von Recum és mtsai, 1999).

A kezelés lehetőségének reményében (Bessant és mtsai, 2001) továbbra is különösen fontos a retina-disztrófiás betegek fenotípusának, a betegséget okozó genetikai eltéréseknek és ezek kapcsolatának mind pontosan jellemzése.

Az eredmények összefoglalása

A populációgenetikai tárgyú vizsgálatainkat az alábbiakban foglalom össze:

- A bázishármas ismétlődések eloszlását 5 neuromuszkuláris manifesztációjú betegség lokuszán vizsgáltuk (HD, MD, SCA-1, SBMA, DRPLA). A HD és MD lokuszokon az allélek eloszlása nem tért el szignifikánsan a kontroll csoportokétól.

- Az SCA-1 lokuszon az allélek eloszlása mindkét kontroll csoporttól eltért, a rövidebb trinukleotid sorozatok irányába eltolódott.

- Az SBMA-allélek eloszlása a kaukázusi mintától szignifikánsan eltért, míg az ázsiai mintához viszonyítva statisztikailag különbség nem volt kimutatható.

- A magyar Duchenne/Becker izomdisztrófiás betegekben a disztrofin-gén deléciós töréspontjai a nemzetközi adatokkal egyezően sajátos megoszlást mutattak, a töréspontok nagy része (77,6%) a gén 3'-végén, míg kisebb hányaduk az 5'-végen helyezkedett el.

- A magyar betegekben a disztrofin-gén 3'-régiójában a töréspontok eloszlását a 44., 50. és 52. intronok kombinációja jellemzi.

- Eredményeink felvetik, a korábbi tanulmányokkal egyezően, a disztrofin-gén töréspontjainak populáció-specifikus eloszlását.

- A magyar galaktozémiás betegekben a GALT-gén Q188R mutációjának gyakorisága a nyugat-európai adatokhoz képest lényegesen alacsonyabb, valószínű, hogy a hazai a populációban a kaukázusi rasszra nem jellemző mutációk dominálnak.

- A szomszédos országokban végzett hasonló vizsgálatokkal összhangban valószínűsíthetjük, hogy a GALT-gén Q188R mutációjának gyakorisága Európán belül nyugatról kelet felé haladva csökken.

Az ideghártya örökletes disztrófiái nagy számú, részben ismeretlen gén károsodására vezethetők vissza. A gének karakterizálása, a génmutációk és a betegség közti kapcsolat intenzív kutatások tárgya. Az ideghártya pigmenthám rétege alapvetően fontos szerepet játszik a neuroretina fejlődésében és működésének fenntartásában. Egyes RPE-specifikus gének mutációi a RPE funkciójának károsodásához és ezáltal a fotoreceptorok degenerációjához vezethetnek. A génmutációk és a betegség kapcsolatának megismerése a gyógykezelés egyéb lehetőségei (génterápia, RPE-átültetés) előtt is megnyitja az utat.

Az RPE65-gén vizsgálatának eredményei alapján a következőket állapítom meg:

- A súlyos fokú, korai ideghártya-disztrófiák viszonylag gyakran az RPE65-gén mutációira (11,4%) vezethetők vissza.

- Az RPE65-gén ideghártya-elfajulással kapcsolatba hozható mutációi lehetnek aminosav-változással járó mutációk, kis deléciók, inszerciók és „splice site” mutációk.

- Az RPE65-gén különböző típusú mutációnak következtében kialakuló retina-degeneráció nagy fokban hasonló klinikai képet eredményez.

- A fentiek alapján feltételezhető, hogy az észlelt aminosav-cserével járó mutációk nagy mértékben károsítják az RPE65-fehérje működését, gyakorlatilag funkcióképtelen fehérje képződik. A patomechanizmus feltárásához az RPE65-fehérje működésének pontos megismerése és a funkcionális vizsgálómódszerek kialakítása szükséges.

- A PCR-SSCP technikával a betegek egy részében csak az egyik allélen találtunk valószínűen biológiai jelentőséggel bíró szekvencia-eltéréseket, így feltételezhető, hogy az RPE65-gén egyenlőre pontosan nem ismert promoter régiójának mutációi, illetve nagy gén-deléciók is szerepet játszanak a retina-disztrófiákban.

Rövidítések:

ABC	ATP binding cassette
arRP	autoszomális recesszív retinitis pigmentosa
adRP	autoszomális domináns retinitis pigmentosa
BMD	Becker muszkuláris disztrófia
DMD	Duchenne muszkuláris disztrófia
DRPLA	Dentatorubralis pallidoluysian atrófia
GALT	Galaktóz-1-foszfát-uridil-transzferáz
HD	Huntington-betegség
IVS	intron szekvencia
LCA	Leber-féle veleszületett vakság
MD	Dystrophia myotonica
Mt-PK	myotonin-protein kináz
mRNS	hírvívő ribonukleinsav
dNTP	dezoxiribonukleotid
PCR	Polimeráz láncreakció
RFLP	Restrikciós fragmentum hosszúság polimorfizmus
RP	Retinitis pigmentosa
RPE	a retina pigmenthámja
SBMA	Spinalis és bulbaris muszkuláris atrófia
SCA	Spinocerebellaris ataxia
SSCP	Single strand conformation polymorphism
UDP	Uridin-difoszfát
UTR	nem-transzlálódó régió
xRP	X-kromoszómához kötött retinitis pigmentosa

Saját közlemények, absztraktok és előadások jegyzéke

Közlemények:

1. Horváth A., Kis A., Gyűrűs P., Melegh B.: A galaktozémiát okozó Q188R és N314D típusú mutációk kimutatása beszárított vércseppből. Klin Kisérl Lab Med 1998; 25:21-23.

2. Herczegfalvi Á., Tóth G., Gyűrűs P., Endreffy E., Fodor F., Mechler F., László A., Raskó I., Melegh B.: Deletion patterns of dystrophin gene in Hungarian patients with Duchenne/Becker muscular dystrophies. Neuromuscul Disord 1999. 9(8):552-4

3. Gyűrűs P., Molnár J., Melegh B., Tóth G., Morava É., Kosztolányi Gy., Méhes K.: Trinucleotide repeat polymorphism at five disease loci in mixed Hungarian population. Am J Med Gen 1999. 87(3): 245-250

4. Horváth A., Gyűrűs P., Kis A., László A., Schuler Á., Kosztolányi Gy., Melegh B. Distribution of Q188R and N314D mutations in the Hungarian galactosaemic population. Hum Mutat 2000. 16(1):91

5. Lorenz B., Gyűrűs P., Preising M., Bremser D., Gu S., Andrassi M., Gerth C., Gal A.: Early-onset severe rod-cone dystrophy in young children with RPE65 mutations. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000. 41(9):2735-42

6. Laudahn B. M., Gyűrűs P., Orth U., Gal A., Nienaber C. A.: Die indirekte Genotypanalyse als diagnostisches Verfahren beim Marfan-Syndrom. Z Kardiol 2000. 10: 939-948

7. Thompson D.A., Gyűrűs P., Fleischer L. L., Bingham E. L., McHenry C. L., Apfelstedt-Sylla E., Zrenner E., Lorenz B., Richards J. E., Jacobson S. G., Sieving P. A., Gal A.: Genetics and phenotypes of RPE65 mutations in inherited retinal degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000 Dec;41(13):4293-9.

Folyóirat „supplement-jében“ megjelent abstractok

1. Tóth G., Gyűrűs P., Morava É., Kosztolányi Gy., Melegh B.: Trinucleotide repeat polymorphism at five disease loci in Hungarian population. Eur. J. Hum. Genet 1999. 7. P615. A149

2. Thompson D.A., Lorenz B., Gyűrűs P., Gao J., Hanna D.B., Andrassi M., Fleischer L., Sieving P.A., Jacobson S.G., Gal A.: RPE65 mutations in childhood-onset, severe retinal degenerations. IOVS 1999 40(4):S575 (3030)

3. Gyűrűs P., Lorenz B., Müller-Myhsok B., Moazami-Benab B., Finckh U., Gal A. Mapping a locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa between D2S391-D2S441 on 2p14-p16.1. Medizinische Genetik 2000 12(1) März:S74 (P-I-1.32)

Kongresszusi előadások

1. Gyűrűs P., B. Lorenz, B. Moazami-Benab, U. Finckh, A. Gál: Autoszomális recesszív retinitis pigmentosa locus genetikai térképezése az 1q43 illetve a 2p14-16.1 régiókba „homozygosity maping“ módszerrel egy német családban. Magyar Humángenetikusok II. Kong., Pécs, 1999

2. Kosztolányi Sz., Nádasi E., Gyűrűs P., Czakó M., Melegh B.:Mitokondriális DNS polimorfizmusok magyar populációmintában. Magyar Humángenetikusok II. Kong., Pécs, 1999

3. Laudahn B., Gyűrűs P., Orth U., Gal A., Nienaber C. A. Segregationsanalyse zur Diagnostik bei Marfan-Syndrom. 66 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft füt Kardiologie-Herz- und Kreislaufforschung 27.-29. April 2000. Mannheim

Kongresszusi poszterek

1. Gyűrűs P., Lorenz B., Müller-Myhsok B., Moazami-Benab B., Finckh U., Gal A.: Mapping a locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa between D2S391-D2S441 on 2p14-p16.1. 12. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für HumangenetikLübeck, 2000.

2. Horváth A., Kiss A., Gyűrűs P., Morava É., Melegh B.: A magyar galaktozémiás populáció tipizálása a Q188R és az N314D mutációkra. Magyar Humángenetikusok Kong. Szeged, 1998.

3. Kovács E., Molnár J., Nádasi E., Czakó M., Gyűrűs P., Morava É., Melegh B.: Friedreich ataxia szűrésére alkalmas molekuláris genetikai módszer. Magyar Humángenetikusok Kong. Szeged, 1998.

4. Nagy M., Gyűrűs P.: A case of univentricular heart causing non-immun hydrops foetalis. PECO-Euchromic Kongresszus, Bp, 1997

Elöadások egyéb tudományos összejöveteleken

Gyűrűs P.: Az epithelioid haemangioma (1995 április, Pécs, Dunántúli Pathológusok Társasága, Metszetkonzultáció)

Gyűrűs P.: A Burkitt-szerü T-sejtes lymphoma és a T-sejt differenciálódás. (1995 június, Györ, Biomeda Workshop: Lymphoma diagnosztika)

Gyűrűs P.: Mapping the disease locus to Xp11.22-q21.31 in a family with non-specific mental retardation. (1999 október, Århus, Dánia, Århus Meeting of Human Geneticists)

Irodalomjegyzék

Abbs S, Yau SC, Clark S, Mathew CG, Bobrow M. A convenient multiplex PCR system for the detection of dystrophin gene deletions:a comparative analysis with cDNA hybridisation shows mistypings by both methods J Med Genet 1991;28:304-311

Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV, Pearce-Kelling SE, Anand V, Zeng Y, Maguire AM, Jacobson SG, Hauswirth WW, Bennett J. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. Nat Genet 2001;28:92-5

Acosta PB, Gross KC. Hidden sources of galactose in the environment. Eur J Pediatr 1995; 154(Suppl 2):S87-S92

Ashino J, Okano Y, Suyama I, Yamazaki T, Yoshino M, Furuyama JI, Lin HC, Reichardt JKV, Isshiki G. Molecular characterization of galactosemia (Type I) mutations in Japanese. Hum Mut 1995;6:36-43

Bairoch A, Bucher P, Hofmann K. The Prosite database, its status in 1997. Nucleic Acid Res 1997;25:217-221

Baker L, Mellman WJ, Tedesco TA, Segal S: Galactosemia: symptomatic and asymptomatic homozygotes in one Negro sibship. J Pediatr 1966;68:551-558

Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. Hum Genet 1990;86:45-48

Bessant DA, Ali RR, Bhattacharya SS. Molecular genetics and prospects for therapy of the inherited retinal dystrophies. Curr Opin Genet Dev 2001;11:307-16

Berson EL. Retinitis pigmentosa: Unfolding its mystery. Proc Natl Acad Sci 1996;93:4526-4528

Beutler E, Baluda MC, Sturgeon P, Day RW. The genetics of galactose-1-phosphate uridyl transferase deficiency. J Lab & Clin Med 1966;68:646-658

Bodrug SE, Ray PN, Gonzalez IL, Schmickel RD, Sylvester JE, Worton RG. Molecular analysis of a constitutional X-autosome translocation in a female with muscular dystrophy. Science 1987; 237:1620-4

Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, Hunter K, Stanton VP, Thirion JP, Hudson T, Sohn R, Zemelmen B, Snell RG, Rundle SA, Crow S, davies J, Shelbourne P, Buxton J, Jones C, Juvonen V, Johnson K, Harper PS, Shaw DJ, Housman DE. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member.Cell 1992;68:799-808

Budowle B, Chakraborty R, Guisti AM. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high resolution PAGE. Am J Hum Genet 1991;41:137-144

Bundey S, Crews SJ. A study of retinitis pigmentosa in the City of Birmingham.II. Clinical and genetic heterogeneity. J Med Genet 1984;21:421-428

Bunge S, Fuchs S, Gal A. Simple and nonisotopic methods to detect unknown gene mutations in nucleic acids. In: Methods in molecular genetics vol 8 (ed. Adolph KW) 26-39 (Academic, Orlando, Florida, 1996).

Bunker CH, Berson EL, Bromley WC, Haves RP, Roderick TH. Prevalence of retinitis pigmentosa in Maine. Am J Ophthalmol 1984;97:357-365

Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. Science 1996;271:1423-7

Caskey CT, Pizzuti A, Fu YH, Fenwick RG Jr, Nelson DL. Triplet repeat mutations in human disease.Science 1992;256:784-9

Chamberlain JS, Gibbs RA et al: Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy via multiplex DNA amplification. Nucl Acid Res 1988:16:11141-11156.

Claustres M, Tuffery S, Chevron MP et al. Molecular deletion patterns in families from southern France with Duchenne/Becker muscular dystrophies. Hum Genet 1991;88:179-184

Choo DW, Cheung E, Rando RR. Lack of effect of RPE65 removal on the enzymatic processing of all-trans-retinol into 11-cis-retinol in vitro. FEBS 1998;440:195-198

Cooper DN, Krawczak M. Single base-pair substitutions in human gene MRNA splice junctions and their phenotypic consequences. In: Human Gene Mutation (Cooper DN, Krawczak M) p239-260 (BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, 1994)

Czeizel A, Benkmann H-G, Goedde HW, editors. Genetics of the Hungarian population. 1991 Budapest: Akadémiai Kiadó.

Danciger M, Matthes MT, Yasamura D, Akhmedov NB, Rickabaugh T, Gentleman S, Redmond TM, La Vail MM, Farber DB. A QTL on distal chromosome 3 that influences the severity of light-induced damage to mouse photoreceptors. Mamm Genome 2000;11:422-427

Danieli GA, Mioni F, Müller CR, Vitiello L, Mostacciuolo ML, Grimm T. Patterns of deletions of the dystrophin gene in different European populations. Hum Genet 1993;91:243-346

Darras BT, Blattner P, Harper JF, Spiro AJ, Alter S, Francke U. Intragenic deletions in 21 Duchenne muscular dystrophy (DMD)/Becker muscular dystrophy (BMD) families studied with the dystrophin cDNA: location of breakpoints on HindIII and BglII exon-containing fragment maps, meiotic and mitotic origin of the mutations. Am J Hum Genet 1988;43:620-9

(a)Deka R, Shriver MD, Yu LM, Ferrell RE, Chakraborty R. Intra- and inter-population diversity at short tandem repeat loci in diverse populations of the world. Electrophoresis 1995;16:1659-64

(b)Deka R, Jin L, Shriver MD, Yu LM, DeCroo S, Hundrieser J, Bunker CH, Ferell RE, Chakraborty R. Population genetics of dinukleotide (dC-dA)n (dG-dT)n polymorphisms in world populations. Am J Hum Genet 1995;56:461-474

Donnell GN, Collado M, Koch R. Growth and development of children with galactosemia. J Pediatr 1961;58:836-844

Dryja TP, Li T. Molecular genetics of retinitis pigmentosa. Hum Mol Genet 1995;4:1739-1743

Dryja TP, Finn JT, Peng YW, McGee TL, Berson EL, Yau KW. Mutations in the gene encoding the alpha subunit of the rod CGMP-gated channel in autosomal recesszive retinitis pigmentosa. Proc Natl Acad Sci USA 1995;9210177-10181

Dryja TP,Hahn LB, Reboul T, Arnaud B. Missense mutation in the gene encoding the alpha subunit of rod transducin in the Nougaret form of congenital stationary night blindness. Nat Genet 1996;13:358-360

Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. Genomics 1992;12:241-253

Elsas LJ II, Fridovich-Keil JL, Leslie ND. Galactosemia: A molecular approach to the enigma. Int Pediatr 1993;8:101-109

Elsas LJ, Dembure PP, Langley S, Paulk EM, Hjelm LN, Fridovich-Keil J. A common mutation associated with the Duarte galactosemia allele. Am J Hum Genet 1994;54:1030-1036

Elsas LJ II, Langley S, Paulk EM, Hjelm LN, Dempure PP. A molecular approach to galactosemia. Eur J Pediatr 1995;154(Suppl 2):S21-S27

Fadda S, Mochi M, Roncuzzi L, Sangiorgi S, Sbarra D, Zatz M, Romeo G. Definitive localization of Becker muscular dystrophy in Xp by linkage to a cluster of DNA polymorphisms (DXS43 and DXS9). Hum Genet 1985;71:33-6

Florentin L, Mavrou A, Kekou K, Metaxotou C. Deletion patterns of Duchenne and Becker muscular dystrophies in Greece. J Med genet 1995;32:48-51

Fu YH, Kuhl DPA, Pizutti A, Pieretti M, Sutcliffe J, Richards S, Verkerk AJMH, Holden JJA, Fenwick RGJ, Warren ST, Oostra BA, Nelson DL, Caskey CT. Variation of the CGG repeat at the fragile-X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. Cell 1991;67:1047-1058

Fuchs S, Nakazawa M, Maw M, Tamai M, Oguchi Y, Gal A. A homozygous 1-base pair deletion in the arrestin gene is a frequent cause of Oguchi disease in Japanese. Nat genet 1995;10:360-362

Gerding H und Busse. Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Mendel-Erbgänge bei familien mit Retinopathia pigmentosa. Ophthalmologe 1994;91:322-328

Gitzelmann R. Galactose-1-phosphate in the pathophysiology of galactosemia. Eur J Pediatr 1995; 154(Suppl 2):S45-S49

Gitzelmann R, Bosshard NU. Partial deficiency of galactose-1-phosphate uridyltransferase. Eur J Pediatr 1995;154(Suppl 2): S40-S44

Gospe SM Jr, Lazaro RP, Lava NS, Grootscholten PM, Scott MO, Fischbeck KH. Familial X-linked myalgia and cramps: a nonprogressive myopathy associated with a deletion in the dystrophin gene. Neurology 1989;39:1277-80

Gouw LG, Kaplan CD, Haines JH, Digre KB, Rutledge SL, Matilla A, Leppert M, Zoghbi HY, Ptacek LJ. Retinal degeneration characterizes a spinocerebellar ataxia mapping to chromosome 3p. Nat Genet 1995;10:89-93

Gökgöz N, Kuseyri F, Topaloglu H, Yüksel-Apak M, Kirdar B. Screening of deletions and RFLP analysis in Turkish DMD/BMD families by PCR. Clin Genet 1993;43:261-266

Greber-Platzer S, Guldberg P, Scheibenreiter S, Item C, Schuller E, Patel N, Strobl W. Molecular heterogeneity of classical and Duarte galactosemia: Mutation analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. Hum Mutat 1997;10:49-57

Gu SM, Thompson DA, Srikumari CRS, Lorenz B, Finckh U, Nicoletti A, Murthy KR, Rathmann M, Kumaramanickavel G, Denton MJ, Gal A. Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. Nar Genet 1997;17:194-197

Gu Y, Shen Y, Gibbs RA, Nelson DL. Identification of FMR2, a novel gene associated with the FRAXE CCG repeat and CpG island. Nat Genet. 1996;13:109-13

Guerrero NV, Singh RH, Manatunga A, Berry GT, Steiner RD, Elsas LJ II. Risk factors for premature ovarian failure in females with galactosaemia. J Pediatr 2000;137:833-841

Haim M. Retinitis pigmentosa: problems associated with genetic classification. Clin Genet 1993;44:62-70

Halushka MK, Fan JB, Bentley K, Hsie L, Shen N, Weder A, Cooper R, Lipshutz R, Chakravarti A. Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. Nat Genet 1999;22:239-47

Hardcastle AJ, Thiselton DL, Van Maldergem L, Saha BK, Jay M, Plant C, Taylor R, Bird AC, Bhattacharya S. Mutations in the RP2 gene cause disease in 10% of families with familial X-linked retinitis pigmentosa assessed in this study. Am J Hum Genet 1999;64:1210-1215

Heidenreich RA. Regulation of galactose-1-phosphate uridyltransferase gene expression. Eur J Pediatr 1995;154(Suppl 2):S28-S32

Van Hooser JP, Aleman TS, He YG, Cideciyan AV, Kuska V, Pittler SJ, Stone EM, Jacobson SG, Palczewski K. Rapid restoration of visual pigment and function with oral retinoid in a mouse model of childhood blindness. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:8623-8628

Hsia DYY, Walker FA. Variability in the clinical manifestations of galactosemia. J Pediatr 1961;59:872-883

Hu XY, Burghes AH, Ray PN, Thompson MW, Murphy EG, Worton RG. Partial gene duplication in Duchenne and Becker muscular dystrophies. J Med Genet 1988;25:369-76

Huang SH, Pittler SJ, Huang X, Oliveira L, Berson EL, Dryja TP. Autosomal recesszive retinitis pigmentosa caused by mutations in the alpha subunit of rod CGMP phosphodiesterase. Nat Genet 1995;11:468-471

Ibarra B, Vaca G, Sanchez-Corona J, Hernandez A, Raimerez ML, Cntu JM. Los Angeles variant of galactose-1-phosphate uridyltranferase (EC 2.7.7.12) in a Mexican family. Hum Genet 1979;48:121

Imbert G, Saudou F, Yvert G, Devys D, Trottier Y, Garnier JM, Weber C, Mandel JL, Cancel G, Abbas N, Durr A, Didierjean O, Stevanin G, Agid Y, Brice A. Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. Nat Genet 1996;14:285-91

Inglehearn CF. Molecular genetics of human retinal dystrophies. Eye 1998; 12:571-579

Jakobs C, Schweitzer S, Dorland B. Galactitol in galactosemia. Eur J Pediatr 1995;154(Suppl 2): S50-S52

Jeffery G. The retinal pigment epithelium as a developmental regulator of the neural retina. Eye 1998;12:499-503

Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP. Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. Science 1994;264:1604-1608

Kaminski HJ, al-Hakim M, Leigh RJ, Katirji MB, Ruff RL. Extraocular muscles are spared in advanced Duchenne dystrophy. Ann Neurol 1992;32:586-8

Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. Nat Genet 1994;8:221-8

Kaufman FR, Kogut MD, Donnel GN, Goebelsmann U, March C, Koch R. Hypergonadotropic hypogonadism in female patients with galactosemia. N Eng J Med 1981;304:994-998

(a)Kellner U. Hereditäre Netzhautdystrophien. Ophthalmologe 1997;94:164-183

(b)Kellner U. Hereditäre Netzhautdystrophien. Ophthalmologe 1997;34:450-465

Kelly S. Significance of the Duarte/classical galactosemia genetic compound. J Pediatr 1979;94:937-940

Khurana TS, Prendergast RA, Alameddine HS, Tome FM, Fardeau M, Arahata K, Sugita H, Kunkel LM. Absence of extraocular muscle pathology in Duchenne's muscular dystrophy: role for calcium homeostasis in extraocular muscle sparing. J Exp Med. 1995;182:467-75

Koide R, Ikeuchi T, Onodera O, Tanaka H, Igarashi S, Endo K, Takahashi H, Kondo R, Ishikawa A, Hayashi T. Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). Nat Genet 1994;6:9-13

Koob MD, Moseley ML, Schut LJ, Benzow KA, Bird TD, Day JW, Ranum LP. An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). Nat Genet 1999;21:379-84

Kozak L, Francova H, Fajkusova L, Pijackova A, Macku J, Stastna S, Peskovova K, Martincova O, Krijt J, Bzduch V. Mutation analysis of the GALT gene in Czech and Slovak galactosemia populations: identification of six novel mutations, including a stop codon mutation (X380R). Hum Mutat 2000;15:206

Krumpaszyk HG, Klausz V. Epidemiology of blindness and eye disease. Ophthalmologica 1996;210:1-84

Kunkel LM, et al. Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. Nature 1986;322:73-77.

Lai K, Langley SD, Singh RH, Dembure PP, Hjelm LN, Elsas LJII. A prevalent mutation for galactosemia among black Americans. J Pediatr 1996;128:89-95

Langley SD, Lai K, Dembure PP, Hjelm LN, Elsas LJ. Molecular basis for Duarte and Los Angeles variant galactosemia. Am J Hum Genet 1997;60:366-372

La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. Nature 1991;352:77-79

Leslie ND, Immerman EB, Flach JE,Florez M, Fridovich-Keil JL, Elsas LJ. The human galactose-1-phosphate uridyltransferase gene. Genomics 1992;14:474-480

Levy HL, Sepe SJ, Walton DS, Shih VE, Hammersen G, Houghton S, Beutler E. Galactose-1-phosphate uridyl transferase deficiency due to Duarte/galactosemia combined variation: Clinical and biochemical studies. J Pediatr 1978;92:390-393

Liechti-Gallati S, Koenig M, Kunkel LM, Frey D, Boltshauser E, Schneider V, Braga S, Moser H. Molecular deletion patterns in Duchenne and Becker type muscular dystrophy. Hum Genet 1989;81:343-8

Lin HC, Kirby LT, Ng WG, Reichardt JKV. On the molecular nature of the Duarte variant of galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT). Hum Genet 1994;93:167-169

Lindenbaum RH, Clarke G, Patel C, Moncrieff M, Hughes JT. Muscular dystrophy in an X; 1 translocation female suggests that Duchenne locus is on X chromosome short arm. J Med Genet 1979;16:389-92

Lotery AJ, Namperumalsamy P, Jacobson SG, Weleber RG, Fishman GA, Musarella MA, Hoyt CS, Heon E, Levin A, Jan J, Lam B, Carr RE, Franklin A, Radha S, Andorf JL, Sheffield VC, Stone EM. Mutation analysis of 3 genes in patients with Leber congenital amaurosis. Arch Ophthalmol 2000;118:538-43.

Marlhens F, Bareil C, Griffoin JM, Zrenner E, Amalric P, Eliaou C, Liu SY, Harris E, Redmond TM, Arnaud B, Claustres M, Hamel CP. Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. Nat Genet 1997;17:139-141

Marlhens F, Griffoin JM, Bareil C, Arnaud B, Claustres M, Hamel CP. Autosomal recessive retinal dystrophy associated with two novel mutations in the RPE65 gene. Eur J Hum Genet 1998; 6:527-531

Maw MA, Kennedy B, Knight A, Bridges R, Roth KE, Mani EJ, Mukkadan JK, Nancarrow D, Crabb JW, Denton MJ. Mutation of the gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in autosomal recessive retinitis pigmentosa. Nat Genet. 1997;17:198-200.

Mclaughlin ME, Ehrhart TJ, Berson EL, Dryja TP. Mutation spectrum of the gene encoding the beta subunit of rod posphodiesterase among patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:3249-3253

Mellman WJ, Tedesco TA; Baker L. : A new genetic abnormality. (Letter) Lancet 1965;I:1395-1396

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Res 1988;16:1215

Moammar H, Ratard R, Cheriyan G, Mathew P. Incidence and features of galactosaemia in Saudi Arabs. J Inher Metab Dis 1996,19:331-334

Morimura H, Fishman GA, Grover SA, Fulton AB, Berson EL, Dryja TP. Mutations in the RPE65 gene in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa or Leber congenital amaurosis. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:3088-3093

Mullen RJ, Lavail MM. Inherited retinal dystrophy: primary deffect in pigment epithelium determined with experimental rat himeras. Science 1976;192:799-801

Murphy M, Sexton D, O'Neill C, Croke DT, Mayne PD, Naughten ER. Frequency distribution of the Q188R mutation in the Irish galactosemic population. J Inher Metab Dis 1996;19:217-219

Murray, J. M.; Davies, K. E.; Harper, P. S.; Meredith, L.; Mueller, C. R.; Williamson, R. : Linkage relationship of a cloned DNA sequence on the short arm of the X chromosome to Duchenne muscular dystrophy. Nature 1982;300:69-71

Nagafuchi S, Yanagisawa H, Sato K, Shirayama T, Ohsaki E, Bundo M, Takeda T, Tadokoro K, Kondo I, Murayama N. Dentatorubral and pallidoluysian atrophy expansion of an unstable CAG trinucleotide on chromosome 12p. Nat Genet. 1994 Jan;6(1):14-8

Nei M. Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press, 1987; pp176-207

Ng WG, Bergren WR, Donnell GN. New variant of galactose-1-phosphate uridyltransferase in man: The Los Angeles variant. Ann Hum Genet 1973;37:1

Ng WG, Xu YK, Kaufman FR, Donnel GN, Wolff J, Allen RJ, Koritala S, Reichardt JKV. Biochemical and molecular studies of 132 patients with galactosemia. Hum Genet 1994;94:359-363

Nicoletti A, Wong DJ, Kawase K, Gibson LH, Yang-Feng TL, Richards JE, Tompson DA. Molecular characterisation of the human gene encoding an abundant 61kDa protein specific to the retinal pigment epithelium. Hum Mol Genet 1995;4:641-649

Nicoletti A, Kawase K, Tompson DA. Promoter analysis of RPE65, the Gene Encoding a 61-kDa Retinal Pigment Epithelium-Specific Protein. IOVS 1998;39:637-644

OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics 1989;5:874-879

Orr HT, Chung MY, Banfi S, Kwiatkowski TJ Jr, Servadio A, Beaudet AL, McCall AE, Duvick LA, Ranum LP, Zoghbi HY. Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. Nat Genet 1993;4:221-6

Oudet C, Heilig R, Hanauer A, Mandel JL. Nonradioactive assay for new microsatellite polymorphisms at the 5' end of the dystrophin gene, and estimation of intragenic recombination. Am J Hum Genet 1991;49:311-9

Pérez-Lezaun A, Calafell F, Mateu E, Comas D, Ruiz-Pacheco R, Bertranpetit J. Microsatellite variation and the differentiation of modern humans. Hum Genet 1997;99:1-7

Perrault I, Rozet JM, Calvas P, Gerber S, Camuzat A, Dollfus H, Chatelin S, Souied E, Ghazi I, Leowski C, Bonnemaison M, Le Paslier D, Frezal J, Dufier JL, Pittler S, Munnich A, Kaplan J. Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis. Nat Genet. 1996;14:461-464.

(a)Perrault I, Rozet JM, Ghazi I, Leowski C, Bonnemaison M, Gerber S, Ducroq D, Cabot A, Souied E, Dufier JL, Munnich A, Kaplan J. Different functional outcome of RetGC1 and RPE65 gene mutations in Leber congenital amaurosis. Am J Hum Genet. 1999;64:1225-8

(b)Perrault I, Rozet JM, Gerber S, Ghazi I, Leowski C, Ducroq D, Souied E, Dufier JL, Munnich A, Kaplan J. Leber congenital amaurosis. Mol Genet Metab 1999;68:200-208

Podskarbi T, Reichardt J, Shin YS. Studies of DNA in galactose-1-phosphate uridyniltransferase deficiency and the Duarte variant in Germany. J Inher Metab Dis 1994;17:149-150

Podskarbi T, Kohlmetz T, Gathof BS, Kleinlein B, Bieger WP, Gresser U, Shin YS. Molecular characterization of Duarte-1 and Duarte-2 variants of galactose-1-phosphate uridyltransferase. J Inher Metab 1996;19:638-644

Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen XN, Lopes-Cendes I, Pearlman S, Starkman S, Orozco-Diaz G, Lunkes A, DeJong P, Rouleau GA, Auburger G, Korenberg JR, Figueroa C, Sahba S. Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. Nat Genet 1996;14:269-76

von Recum HA, Okano T, Kim SW, Bernstein PS. Maintenance of Retinoid Metabolism in Human Retinal Pigment Epithelium Cell Culture. Exp Eye Res 1999;69:97-107

Reddy PS, Housman DE. The complex pathology of trinucleotide repeats. Curr Opin Cell Biol. 1997;9:364-72

Redmond TM, Yu S, Lee E, Bok D, Hamasaki D, Chen N, Goletz P, Ma JX, Crouch RK, Pfeifer K. RPE65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. Nat Genet 1998;20:344-351

Reichardt JKV, Packman S, Woo SLC. Molecular characterization of two galactosemia mutations: Correlation of mutations with highly conserved domains in galactose-1-phosphate uridyl transferase. Am J Hum Genet 1991;49:860-867

Rubinsztein DC, Wyttenbach A, Rankin J. Intracellular inclusions, pathological markers in diseases cused by expanded polyglutamine tracts? J Med Genet 1999;38:265-270

Sanpei K, Takano H, Igarashi S, Sato T, Oyake M, Sasaki H, Wakisaka A, Tashiro K, Ishida Y, Ikeuchi T, Koide R, Saito M, Sato A, Tanaka T, Hanyu S, Takiyama Y, Nishizawa M, Shimizu N, Nomura Y, Segawa M, Iwabuchi K, Eguchi I, Tanaka H, Takahashi H, Tsuji S. Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT. Nat Genet 1996;14:277-84

Schraermeyer U, Heimann K. Current understanding on the role of retinal pigment epithelium and its pigmentation. Pigment Cell Res 1999;12:219-36

Schuler Á, Somogyi Cs, Tőrös I, Váradi I, Kiss E, Nagy A. Veleszületett anyagcsere-betegségek újszülöttkori tömegszűrési és gondozási eredményei. Gyermekgyógyászat 1997;2:136-138

Schweitzer S, Shin Y, Jakobs C, Brodehl J. Long-term outcome in 134 patients with galactosaemia. Eur J Pediatr 1993;152:36-43

Schweitzer S. Newborn mass screening for galactosemia. Eur J Pediatr 1995;154[Suppl 2]:S37-39

Segal S. Defective galactosylation in galactosemia: is low cell UDPgalactose an explanation? Eur J Pediatr 1995;154[Suppl 2]:S65-S71

Segal S, Berry GT: Disorders of galactose metabolism. In: Scriver D, Beaudet A, Sly W, Valle D, eds. The metabolic basis of inherited disease. New York: McGraw-Hill, 1995:967-1000

Segal S. Galactosaemia today: The enigma and the challenge. J Inher Metab Dis 1998;21:455-471

Shastry BS. Signal transduction in the retina and inherited retinopathies. Cell Mol Life Sci 1997;53:419-429

Shield JPH, Wadsworth EJK, MacDonald A, Stephenson A, Tyfield L, Holton JB, Marlow N. The relationship of genotype to cognitive outcome in galactosaemia. Arch Dis Child 2000;83: 248-250

Shih VE, Levy HL, Karolkewicz V, Houghton S, Efron ML, Isselbacher KJ, Beutler E, MacCready RA. Galactosemia screening of newborns in Massachusetts. N Eng J Med 1971;284:753-757

Shin YS, Koch HG, Köhler M, Hoffmann G, Patsoura A, Podskarbi T. Duarte-1 (Los Angeles) and Duarte-2 (Duarte) variants in Germany: Two new mutations in the GALT gene wich cause a GALT activity decrease by 40-50 % of normal in red cells. J Inher Metab Dis 1998;21:232-235

Shomrat R, Gluck E, Legum C Shiloh Y. Relatively low proportion of dystrophin gene deletions in Israeli Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. Am J Med Genet 1994;49:369-373

Shroyer NF, Lewis RA, Allikmets R, Singh N, Dean M, Leppert M, Lupski JR. The rod photoreceptor ATP-binding cassette trnsporter gene, ABCR, and retinal disease: from monogenic to multifactorial. Vis Res 1999;39:2537-2544

Tautz D, Schlotterer C. Simple sequences. Curr Opin Genet Dev 1994;4:832-7

The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinukleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. Cell 1993;72:971-983

Timchenko LT, Caskey CT. Trinucleotide repeat disorders in humans: discussions of mechanisms and medical issues. FASEB J 1996;10:1589-97

Todorova A, Bronzova J, Miorin M, Rosa M, Kremensky I, Danieli GA. Mutation analysis in Duchenne and Becker muscular dystrophy patients from Bulgaria shows a peculiar distribution of breakpoints by intron. Am J Med Genet 1996;65:40-43

Towbin, J. A.; Zhu, X. M.; Gelb, B.; Bies, R.; Chamberlain, J.; Maichele, A.; Ohlendieck, K.; Campbell, K.; McCabe, E. R. B.; Swift, M. : X-linked dilated cardiomyopathy (XLCM): molecular characterization. (Abstract) Am. J. Hum. Genet 1991;49 (suppl.): 421

Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. Cell 1991;65:905-14

Veske A, Nilsson SD, Narfström K, Gal A. Retinal dystrophy of Swedish briard/briard-beagle dogs is due to a 4-bp deletion in RPE65. Genomics 1999;57:57-61

Waggoner DD, Buist NR, Donnell GN. Long-term prognosis in galactosaemia: results of a survey of 350 cases. J Inherit Metab Dis 1990;13:802-818

Waisbren SE, Norman TR, M.A.,Schnell RR, Levy HL. Speech and language deficits in early-treated children with galactosemia. J Pediatr 1983;102:75-77

Wang BBT, Xu YK, Ng WG, Wong LJC. Molecular and biochemical basis of galactosemia. Mol Genet Metab 1998;63:263-269

Watkins WS, Bamshad M, Jorde LB. 1995. Population genetics of trinucleotide repeat polymorphisms. Hum Mol Genet 4:1485-1491

Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G, Lathrop M. A second-generation linkage map of the human genome. Nature 1992;359:794-801

Wenzel A, Reme CE, Williams TP, Hafezi F, Grimm C. The Rpe65 Leu450Met variation increases retinal resistance against light-induced degeneration by slowing rhodopsin regeneration. J Neurosci 2001;21:53-8

Wiesmann UN, Rosé-Beutler B, Schlüchter R. Leguminosae in the diet: the raffinose-stachyose question. Eur J Pediatr 1995;154[Suppl 2]:S93-S96

Yamamoto S, Sippel KC, Berson EL, Dryja TP. Deffects in the rhodopsin kinase gene in the oguchi form of stationary night blindness. Nat Genet 1997;15:175-178

Zekanowski C, Radomyska B, Ball J. Molecular characterisation of Polish patients with classical galactosaemia. J Inher Metab Dis 1999;22:679-682

Zerylnick C, Torroni A, Sherman SL, Warren ST. Normal variation at the myotonic dystrophy locus in global human populations. Am J Hum Genet 1995;56:123-30

Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY, Lee CC. Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. Nat Genet 1997;15:62-9

Köszönetnyílvánítás

Mindenekelőtt Melegh Béla professzor úrnak szeretnék köszönetet mondani. Nehéz néhány mondatban összefoglalni mindazt, amit neki köszönhetek. 1996-ban az Ő segítségével nyertem betekintést a molekuláris biológiába, így kezdeti próbálkozásaimtól fogva, az általa szervezett külföldi tanulmányúton át, mindmáig a tanítómesterem volt. Folyamatos szakmai és lelki támogatása, biztatása nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

1997/98-ban a Pécsett töltött egy év alatt kaptam ízelítőt a genetika tudományából. Méhes Károly professzor úr és Kosztolányi György professzor úr vezetése alatt kiegyensúlyozott és kollegiális légkörben dolgozhattam, ezúton is köszönöm támogatásukat és segítségüket. Közvetlen munkatársaimnak ugyancsak sokat köszönhetek, nélkülük ezen időszak sokkal nehezebb lett volna. Különösen jó érzéssel gondolok vissza Molnár János, Czakó Márta és Nádasi Edit baráti támogatására.

Hamburgban, Gál András professzor úr által vezetett humángenetikai intézetben eltöltött 20 hónap alatt mind gyakorlati, mind elméleti téren nélkülözhetlen ismeretekre tettem szert. Köszönöm Gál professzor úrnak, hogy általa megismerhettem egy modern, sokoldalú, nyugati genetikai intézet munkáját és a hozzá kapcsolódó tudományos közéletet. A hamburg-eppendorfi humángenetikai intézet dolgozói sokban hozzájárultak szakmai fejlődésemhez, azzal, hogy befogadtak, nagyban mérsékelték otthonom iránti hiányérzetemet. Különösen sokat köszönhetek Andres Veskenek, aki időt és fáradságot nem kímélve tanított, tőle a módszertan és a szemléletmód terén is sokat tanultam. Maróti Zoltán gyakorlatilag velem egy időben dolgozott a hamburgi intézetben, az informatikai problémák leküzdésében nyújtott segítségét nagyon köszönöm.

Hálával és köszönettel tartozom a Petz Aladár Megyei Oktató Kórház igazgató főorvosának, Dr. Bugovics Elemérnek és a Patológia Osztály osztályvezető főorvosának, Dr. Goda Máriának, amiért hosszúra nyúlt tanulmányutamat lehetővé tették és mindvégig támogatásukat élvezhettem.

Az elmúlt évek akadályainak leküzdésében Bock Ildikó barátomtól is nagyon sok segítséget kaptam. A modern kommunikációnak hála, a nagy távolság ellenére is, szinte folyamatosan számíthattam szakmai tanácsaira és baráti támogatására.

Az elkövetkező évek nem kis feladata lesz, hogy megpróbáljam feledtetni családommal azt a sok időt, amit elvettem Tőlük. Igen köszönöm Anikóm, Ádikám és Bogikám, hogy ilyen türelmesek voltatok, Erzsikének és Imrének, hogy a hosszú tanulmányutam alatt a mi gondjainkat tekintették elsőnek. Szüleimnek köszönöm, hogy az egyetemes emberi értékeknek, a munka és a tudás megbecsülésnek szellemében neveltek fel és a nehéz időszakok leküzdéséhez minden tőlük telhető segítséget megadtak.