



# A MICROCEPHALIA ÉS A MEGALENCEPHALIA RITKA GENETIKAI OKAI

Ph.D. értekezés tézisei

**Dr. Zombor Melinda**



Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Gyermekgyógyászati Klinika és Gyermek Egészségügyi Központ  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola  
Kísérletes és Klinikai Idegtudományok Alprogram

Témavezető: Prof. Dr. Sztriha László Ph.D., D.Sc.

Szeged

2020.

**A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE**

1. **Zombor M**, Kalmár T, Nagy N, Berényi M, Telcs B, Maróti Z, Brandau O, Sztriha L. A novel *WDR62* missense mutation in microcephaly with abnormal cortical architecture and review of the literature. *J Appl Genet* 2019;60:151-162. **(Impact factor: 1.725)**.
2. **Zombor M**, Kalmár T, Maróti Z, Zimmermann A, Máté A, Bereczki Cs, Sztriha L. Co-occurrence of mutations in *FOXP1* and *PTCH1* in a girl with extreme megalencephaly, callosal dysgenesis and profound intellectual disability. *J Hum Genet* 2018;63:1189-1193. **(IF:3.545)**
3. Alcantara D, Timms AE, Gripp K, Baker L, Park K, Collins S, Cheng C, Stewart F, Mehta SG, Saggari A, Sztriha L, **Zombor M**, Caluseriu O, Mesterman R, Van Allen MI, Jacquinet A, Ygberg S, Bernstein JA, Wenger AM, Guturu H, Bejerano G, Gomez-Ospina N, Lehman A, Alfei E, Pantaleoni C, Conti V, Guerrini R, Moog U, Graham JM, Hevner R, Dobyns WB, O'Driscoll M, Mirzaa GM. Mutations of *AKT3* are associated with a wide spectrum of developmental disorders including extreme megalencephaly. *Brain* 2017;40:2610-2622. **(IF:10.840)**.

## BEVEZETÉS

**Microcephaliában** a fejkörfogat kisebb, mint az életkorra és nemre megállapított 2-3 standard deviáció (SD). Microcephalia kialakulhat prenatalisan (congenitalis microcephalia), vagy postnatalisan, mindkét esetben az ok lehet genetikai rendellenesség, vagy környezeti ártalom. A microcephalia és a társuló rendellenességek spektruma igen széles, az OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) adatbázisban 2019 szeptemberében 1429 tétel jelent meg a „microcephaly” beírásakor.

Bár a microcephaliának számos genetikai oka van, hagyományosan elkülöníthető az autoszomális recesszíven öröklődő primer microcephaliák csoportja (MicroCephal Primary Hereditary, MCPH). 2019 szeptemberéig legalább 18 gént azonosítottak az MCPH hátterében. Ezek közül a gének közül több olyan fehérjét kódol, amely a sejtosztódásban meghatározó szerepet játszó centrosomák normális működéséhez szükséges. Az MCPH egyes formáiban a microcephalia mellett az agytekervények szegényes fejlettségét („simplified gyral pattern”) írták le, később azonban kiderült, hogy számos MCPH formában, különösen a *WDR62* gén mutációjához társuló microcephaliában az agykéreg fejlődési rendellenességeinek széles spektruma látható.

Három agyi fejlődési rendellenességgel társuló autoszomális recesszív primer microcephaliában szenvedő beteg esetét ismertetjük a disszertációban. A kórkép hátterében új, eddig nem közölt nonszensz mutáció igazolódott az *ASPM* génben egy fiúban és ugyanazt az új misszensz mutációt találtuk a *WDR62* génben egy fiúban és egy leányban, akik rokonok voltak.

**Megalencephalia** és macrocephalia esetén a fejkörfogat meghaladja az életkorra és nemre vonatkoztatott 2, vagy több standard deviációt (SD). A nemzetközi szakirodalom alapján megalencephalia az agyi struktúrák fokozott növekedésére utal, míg macrocephaliáról beszélünk hydrocephalus, subduralis folyadékgyülem, vagy egyéb intracranialis térszűkítő folyamat esetén.

A megalencephalia lehet *idiopathiás (benignus)*, társulhat *veleszületett anyagcsere betegséghez*, vagy kialakulhat valamilyen *genetikai szindrómában*. Két megalencephaliában szenvedő beteg fenotípusát és genotípusát ismertetjük a disszertációban. Egy leányban két génben (*FOXP1* és *PTCH1*) találtunk *de novo* heterozigóta patogén variánst. A két mutáció együttes következménye lehetett a kifejezett megalencephalia és a súlyos értelmi fogyatékoság. Megalencephalia, agyi fejlődési rendellenesség (polymicrogyria) és globálisan késlekedő fejlődés jellemezte azt a fiút, akiben *de novo* heterozigóta mutáció igazolódott az *AKT3* génben.

A genetikai eredetű microcephalia és megalencephalia ritka, ezért indokolt ezeknek a betegeknek a tanulmányozása és az eredmények ismertetése egy disszertációban. Munkánk összhangban van azokkal a nemzetközi törekvésekkel, amelyek az új technológiák alkalmazásával kutatják a ritka betegségek genetikai okait.

## CÉLKITŰZÉSEK

Az alábbi célokat tűztük ki:

- 1./ Azonosítani kívántunk ritka genetikai eredetű microcephaliában és megalencephaliában szenvedő betegeket.
- 2./ El kívántuk végezni a microcephaliában és megalencephaliában szenvedő betegek fizikális és neurológiai vizsgálatát, továbbá értékelni kívántuk motoros fejlettségüket és értelmi képességeiket.
- 3./ Értékelni kívántuk az MRI felvételeket.
- 4./ Meg kívántuk szervezni a microcephaliában és megalencephaliában szenvedő betegek molekuláris genetikai vizsgálatát.

## MÓDSZEREK

Átnéztük a SZTE Gyermekklinika B Részlegének Neurológiai Szakrendelésén 2006. január 1 és 2017. december 31 között vizsgált betegek adatait. Autoszomális recesszív primer microcephaliával 3 beteget, megalencephaliával pedig 2 beteget vettünk be a disszertációba.

Részletes anamnézis felvétel, ezt követően fizikális és neurológiai vizsgálat történt. Értékeltek a motoros és szellemi fejlettséget is. Különös figyelmet kapott a minor anomáliák és fejlődési rendellenességek leírása. A látás és hallás vizsgálata is megtörtént, szükség esetén audiológiai illetve szemészeti konzíliumra került sor. A veleszületett anyagcsere betegségek szűrését is elvégeztük. Méhen belüli fertőzés kóroki szerepét kizártuk. Agyi MRI vizsgálat minden esetben történt a szakirodalomban elfogadott szekvenciákkal axiális, coronalis és sagittalis síkban.

Rutin kromoszóma vizsgálat történt Giemsa-festést követően. A vérből minden esetben, az 5. beteg esetében a nyálból is végeztünk DNS izolálás. Array összehasonlító genomiális hibridizációra az Affymetrix 750K platformon került sor.

A három autoszomális recesszív primer microcephaliában szenvedő beteg (*Patients 1-3*) mutációját az *ASPM* és *WDR62* génben teljes exom szekvenálás (WES-trio, CentoXome<sup>®</sup>) derítette ki a Centogene Laboratóriumban, Németországban. Az Illumina

Trusight One Exome Sequencing Panel (Illumina INC., San Diego, California, USA) alkalmazásával sikerült megtalálni a mutációt két génben (*FOXP1* és *PTCH1*) a SZTE Gyermekklinikán egy megalencephaliában szenvedő leányban. Egy fiúban ritka mutációk kimutatására kidolgozott módszerrel, célzott szekvenálással (single molecule Molecular Inversion Probes) derült ki az *AKT3* gén mutációja, mint a megalencephalia oka, kollaborációban egy, az Amerikai Egyesült Államokban dolgozó munkacsoporttal. Minden patogén variáns megerősítést nyert Sanger szekvenálással. A *WDR62* mutációban szenvedő két beteg családja közötti rokonság haplotípus analízissel derült ki.

Az előírásoknak megfelelő felvilágosítás után beleegyezést kaptunk a szülőktől a vizsgálatok elvégzéséhez. A Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ Regionális Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta a vizsgálatokat (3797/2016).

## BETEGEK ÉS EREDMÉNYEK

### Táblázat

A disszertációban tárgyalt gének és mutációk

Betegek	Gének	Exonok	Nukleotid változás	Aminosav változás	Mutáció típusa	Zigótaság	A fenotípus fő jellemzője	Megjegyzés
1	<i>ASPM</i>	Exon 18	c.7323T>A	p.Tyr2441Ter	Nonszensz	Homozigóta	Microcephalia	Nem közölt
2	<i>WDR62</i>	Exon 6	c.668T>C	p.Phe223Ser	Misszensz	Homozigóta	Microcephalia	Nem közölt
3	<i>WDR62</i>	Exon 6	c.668T>C	p.Phe223Ser	Misszensz	Homozigóta	Microcephalia	Nem közölt
4	<i>FOXP1</i> <i>PTCH1</i>	Exon 18 Exon 17	c.1573C>T c.2834delG insAGATGTTG TGGACCC	p.Arg525Ter p.Arg945Glnfs Ter22	Nonszensz Kereteltolás (frameshift)	Heterozigóta <i>de novo</i> Heterozigóta <i>de novo</i>	Megalencephalia	Közölt Nem közölt
5	<i>AKT3</i>	Exon 13	c.1393C>T	p.Arg465Trp	Misszensz	Heterozigóta <i>de novo</i>	Megalencephalia	Közölt

## **MICROCEPHALIA (1-3 beteg)**

### **1. beteg – ASPM mutáció**

Az első terhességből a 36. gesztációs héten született fiú fejkörfogata ~30 cm (-1,8 SD), súlya 2350 g (-0,9 SD), hossza pedig 47 cm (-0,1 SD) volt. A microcephalia egyre kifejezettebbé vált, 10 hónapos korban a beteg fejkörfogata 39 cm (-5,1 SD), 18 hónapos korban 40,5 cm (-5,2 SD), 5,5 évesen pedig 43,5 cm (-5,7 SD) volt. Globálisan késlekedett a gyermek fejlődése, 5 éves korban nem tudott felülni, felállni és nem beszélt. Spasztikus tetraplegia tüneteit észleltük. Tónusos-klónusos konvulziók kezdődtek 18 hónapos korban és az EEG kóros volt. Valproát kezelés rohammentességet eredményezett. Hét hónapos korban az MRI az agykéreg fejlődési rendellenességét mutatta corticalis dysplasiára és polymicrogyriára utaló elváltozásokkal.

A gyermek és a szülők WES vizsgálata (WES-trio) a betegben egy új, homozigóta patogén nonszensz mutációt igazolt az *ASPM* gén 18-as exonjában [c.7323T>A, p.(Tyr2441Ter)]. Ez a mutáció egy stop kodont eredményezett és az MCPH 5-ös típusát okozta. Mindkét szülő heterozigóta hordozó volt.

### **2. beteg – WDR62 mutáció**

A harmadik terhességből terminusra császármetszéssel világra jött fiú fejkörfogata születéskor 30 cm (-3,5 SD), születési súlya 2900 g (-1,0 SD), hossza pedig 50 cm (0,1 SD) volt. A szülők rokonok, a betegnek van egy egészséges fiú és egy egészséges leány testvére. Az évek során a microcephalia egyre kifejezettebbé vált, 2 éves korban a fejkörfogat 40 cm (-6,0 SD), 4 éves korban pedig 41,5 cm (-6,0 SD) volt. A beteg magassága 89 cm (-3,4 SD), súlya pedig 12 kg (-2,4 SD) volt 4 éves korban. Generalizált hypotonia és globálisan súlyosan késlekedő fejlődést észleltünk. Csecsemőkorban vigabatrin kezelésre jól reagáló infantilis spazmusok, később valproáttal kezelhető komplex parciális rohamok jelentkeztek. Öt hónapos korban az MRI az agyi féltekék aszimmetriáját (J>B) és diffúz pachygyriát mutatott széles gyrusokkal, sekély sulcusokkal és kiszélesedett szürke állománnyal.

### **3. beteg – WDR62 mutáció**

Az első terhességből császármetszéssel világra jött leány fejkörfogata születéskor 28 cm (-5,0 SD), súlya 2490 g (-0,4 SD), hossza pedig 46 cm (-1,7 SD) volt. A fej növekedési tendenciája rendkívül lassú volt a megszületés után is, 2 éves korban 39 cm-es (-5,9 SD), 4 éves korban pedig csupán 40 cm-es (-6,6 SD) fejkörfogatot mértünk. A hossznövekedés és a súlygyarapodás is elmaradt: 4 éves korban a beteg magassága 88 cm (-3,4 SD), súlya pedig 12,4 kg (-2,0 SD) volt. Globálisan késlekedő fejlődést észleltünk.

Komplex parciális epilepsziás rohamok jelentkeztek 3 éves kor után, az EEG kóros volt. Valproát kezelés rohammentességet eredményezett. Az agyi MRI 4 éves korban a féltekék aszimmetriáját és pachygyriát mutatott hasonlóan a 2. beteg esetében leírt elváltozásokhoz.

A gyermek és a szülők WES vizsgálata (WES-trio) a 2. és 3. betegben ugyanazt az új homozigóta patogén misszensz mutációt mutatta a *WDR62* gén 6-os exonjában [c.668T>C, p.(Phe223Ser)]. Mindkét beteg szülei és a 2. beteg fiútestvére heterozigóta hordozónak bizonyultak. A 2. és 3. roma etnikumú beteg családtagjai nem tudtak arról, hogy a két család rokonságban áll, haplotípus analízis azonban igazolta a kapcsolatot.

## **MEGALENCEPHALIA (4-5. beteg)**

### **4. beteg – Két gén (*FOXP1* és *PTCH1*) patogén mutációja ugyanabban a betegben**

A második terhességből a 36. gesztációs héten világra jött leány újszülött fejkörfogata 37 cm (1,8 SD), súlya 2,870 g (0,4 SD), hossza pedig 50 cm (0,8 SD) volt. Progresszív fejkörfogat növekedést észleltünk, 4 éves korban 58 cm (6,1 SD), 8 éves korban pedig 61 cm (7,1 SD) volt a beteg fejkörfogata. Több minor anomália mellett generalizált hypotonia, ataxia, és globálisan súlyosan késlekedő fejlődés uralta a klinikai tüneteket. Koponya MRI a corpus callosum részleges hiányát mutatta, a septum pellucidum lemezei pedig nem fuzionáltak.

Klinikai exom (Trusight One panel) szekvenálással heterozigóta *de novo* variánst találtunk a *FOXP1* gén 18-as exonjában [c.1537C>T, p.(Arg525Ter)], és a *PTCH1* gén 17-es exonjában [c.2834delGinsAGATGTTGTGGACCC, p.(Arg945GlnfsTer22)]. A *FOXP1* variánst közölték korábban, mint nonszensz patogén mutációt, míg a *PTCH1* variáns nem szerepel az adatbázisokban és nem fordul elő 140 magyar kontroll személyben. A szülőkben és a beteg leány fiútestvérében nem voltak jelen ezek a mutációk.

### **5. beteg – *AKT3* mutáció**

Eseménytelen terhességből a 36. gesztációs héten császármetszéssel jött a világra a fiú újszülött. Fejkörfogata 37,5 cm (3,3 SD), súlya 3280 g (1,3 SD), hossza pedig 50 cm (1,2 SD) volt születésekor. A beteg fejkörfogata gyorsan nőtt, 51 cm (5,1 SD) volt korrigált 7 hónapos korban. Később a fejkörfogat növekedési üteme mérséklődött, 53 cm (4,5 SD) volt 15 hónaposan és 55 cm (4,1 SD) 28 hónaposan. A legutóbbi életkorban súlya 11,5 kg (-1,3 SD), magassága pedig 82 cm (-2,2 SD) volt. A beteg fejlődése globálisan késlekedett. Tónusos-klónusos konvulziók jelentkeztek 11 hónapos korban,



amelyek levetiracetam kezelésre jól reagáltak. Az MRI 7 hónapos korban kiterjedt kétoldali polymicrogyriát mutatott.

Az újgenerációs szekvenálás *de novo* heterozigóta misszensz variánst mutatott az *AKT3* gén 13-as exonjában [c.1393C>T, p.(Arg465Trp)]. A szülőkben nem volt jelen a mutáció.

## MEGBESZÉLÉS

### MICROCEPHALIA

#### A neurális progenitor sejtek proliferációja

Az agy növekedése alapvetően a neurális progenitor sejtek proliferációs képességétől függ. Szimmetrikus osztódás esetén két azonos neurális progenitor sejt keletkezik gyarapítva az agynövekedéshez szükséges sejt állományt, míg az aszimmetrikus osztódás során csupán egy progenitor sejt keletkezik, a másik sejt pedig a migráció és a neuronná differenciálódás útjára lép. A centrosomák felelősek a sejtosztódásban alapvető szerepet játszó osztódási orsók kialakulásáért.

**Az *ASPM* és a *WDR62* által kódolt fehérjék szükségesek a centrosomák normális funkciójához.**

Az *ASPM* (abnormal spindle-like, microcephaly-associated, 1q31.3 kromoszóma locus) gén mutációi felelnek az MCPH 5-ös típusának (MicroCephalaly Primary Hereditary 5) kialakulásáért, míg a *WDR62* (WD repeat containing protein 62, 19q13.12 kromoszóma locus) gén mutációi MCPH2-t eredményeznek. E két gén mutációi az autoszomális recesszív primer microcephalia leggyakoribb okai. Több mint 200 mutációt írtak már le az *ASPM* génben, genotípus-fenotípus korreláció eddig még nem igazolódott. A betegünkben talált nonszensz mutáció [c.7323T>A, p. (Tyr2441Ter)] stop kodon kialakulását eredményezi, amely feltehetően a fehérje funkció-vesztéséhez vezet.

Az *ASPM* mutációban szenvedő betegekben az MRI legtöbbször egyszerű gyurus mintázatot, olykor corpus callosum malformációt, vagy cerebellaris, illetve híd hypoplasiát mutatott. A korábbi leletekkel ellentétben a mi betegünkben kifejezett corticalis dysplasia ábrázolódott polymicrogyriára emlékeztető rendellenességgel.

A *WDR62* génben 30-nál több mutációt írtak le, genotípus-fenotípus összefüggést nem találtak. Ezekben a betegekben a súlyos microcephalia mellett az agyi fejlődési rendellenességek alábbi széles spektruma látható az MRI képeken: pachygyria, kiszélesedett szürkeállomány, corticalis dysplasia, szürkeállomány heterotopia, polymicrogyria, schizencephalia, rendellenes corpus callosum és kisagyi hypoplasia.

Mindkét betegünkben ugyanaz a misszensz *WDR62* mutáció igazolódott [c.668T>C, p.(Phe223Ser)] és minkettőjükben diffúz pachygyria, széles szürkeállomány és elmosódott fehérállomány-szürkeállomány határ látszott az MRI képeken. A mutáció a *WDR62* fehérjének azt a régióját érinti, amely a nagyjából 40 aminosavból álló ismétlődő szakaszokat tartalmazza (WD40 repeat regions). Az ismétlődő WD40 szakaszok szabályozzák azokat a fehérje-interakciókat, amelyek a normális centrosoma működéshez szükségesek.

#### **Az *Aspm* fehérje és *Aspm* gén kísérletes vizsgálata**

Egér embrióban az *Aspm* fehérje jelentős expressziót mutatott a neuroepithelben szimmetrikus sejtosztódáskor, a neurogenesis későbbi szakaszában azonban csökkent ez az expresszió. Az *Aspm* fehérje az osztódási orsó pólusában a pericentrioláris matrixban halmozódott fel és szerepet játszott abban, hogy az osztódási orsó tengelye merőleges legyen a neuroepitheliális sejtek apico-basalis tengelyére a mitosis során. Az *Aspm* gén kiütése (knockdown) egérben az osztódási orsó tengelyének deviációját eredményezte és ezáltal elősegítette az aszimmetrikus sejtosztódást, ami a neuroepitheliális sejtek tömegének csökkenését és microcephaliát eredményezett. Az újabb kutatások azonban kiderítették, hogy az *Aspm* fehérjének az osztódási orsó tengelyének szabályozásától független hatása is van az osztódási ciklusok időtartamára. Mutáns egérben a neurális progenitor sejtek osztódási ciklusainak meghosszabbodását figyelték meg, ami elősegítheti az aszimmetrikus osztódást.

#### **A *Wdr62* fehérje és a *Wdr62* gén kísérletes vizsgálata**

*WDR62/Wdr62* mutációt hordozó sejtek *in vitro* vizsgálata és a *Wdr62* gén inaktíválása egerekben hasonló eredményeket hozott, mint az *ASPM/Aspm* mutációk vizsgálata. A *WDR62* fehérje intracellularis lokalizációja sejtciklus-függő: osztódáskor felszaporodik az osztódási orsó pólusában, az interfázisban pedig a cytosolban oszlik szét. *WDR62* mutációt hordozó sejtekben azonban nem észlelhető a fehérje halmozódása az osztódási orsó pólusában a mitosis alatt. *In vivo* kísérletek egerekben *Wdr62* mutáció létrehozása után számos rendellenességet igazoltak. Szabálytalan volt a centriolák osztódása, az osztódási orsó pólusának orientációja, felborult a progenitor sejtek szimmetrikus/aszimmetrikus osztódásának egyensúlya. A feltételezések szerint a progenitor sejtek korai delaminációja (a differenciálódás és a migráció korai kezdete) végül is a neuroepitheliális sejtek számának (neuroepitheliális pool) csökkenése révén microcephaliát eredményezhet.

### **Az *Aspm* és a *Wdr62* interakció kísérletes vizsgálata**

Az *Aspm* és a *Wdr62* gének által kódolt fehérjék között interakció áll fenn. Megegyezik a lokalizációjuk és kimutatták, hogy a *Wdr62* fehérje szükséges ahhoz, hogy az *Aspm* és egyéb fehérjék a centrosomában felhalmozódjanak. Az *Aspm*, vagy a *Wdr62* hiánya a centriola duplikációjának defektusát okozza, ami idő előtti delaminációhoz vezethet.

## **MEGALENCEPHALIA**

### **A *FOXP1* gén**

A *FOXP1* fehérje a „forkhead” (FOX) transzkripciós faktor fehérjék családjába tartozik és mint transzkripció represszor funkcionál. A *FOXP1* gén kromoszóma lokalizációja: 3p13. Korábban mintegy 50 betegben írtak le különböző patogén monogén *FOXP1* mutációkat és kromoszóma 3p deléciókat. Genotípus-fenotípus korrelációt nem találtak. Kirajzolódott egy, a *FOXP1* mutációkhoz társuló felismerhető fenotípus képe, amelynek jellemzője egy jellegzetes dysmorphismushoz társuló értelmi fogyatékoság és a beszédfejlődés specifikus zavara olykor autizmussal. A betegünkben talált *de novo* heterozigóta nonszensz *FOXP1* mutáció [c.1573C>T, p.(Arg525Ter)] 152 aminosav terminális kapcsolódásának elmaradásával a *FOXP1* fehérje evolúció során konzerválódott DNS-kötő részének megrövidülését eredményezi. Irodalmi adatok alapján *in vitro* kísérletek valószínűsítették ennek a variánsnak a kóroki szerepét. Fluoreszcens technikával az ép (wild) fehérje kimutatható volt a sejtmagban, míg a mutáns fehérje e helyett a citoplazmában jelent meg aggregátumok formájában. A *FOXP1* fehérjék a gén-expressziót homo- és heterodimer formában, illetve más transzkripciós faktorokkal kölcsönhatásban módosítják. A kísérletek szerint azonban a p.Arg525 mutáns nem volt képes interakcióba lépni más fehérjékkel, károsítva ezzel az agykéreg fejlődését szabályozó fehérje-hálózat működését.

### **A *FOXP1* fehérje és a *FOXP1* gén kísérletes vizsgálata**

A *FOXP1* transzkripciós faktor pontos szerepe az agyfejlődésben nem ismert. A fehérje a neuronok migrációja után jelenik meg a fejlődő agykéregben emberben és a kísérleti állatokban is, ennek alapján feltételezhetjük, hogy szerepe van az idegsejtek differenciálódásában. Agyspecifikus homozigóta *Foxp1* deléció egerekben a striatum dorsalis részének redukcióját és a ventralis régió megnagyobbodását eredményezte. A fejlődés késlekedését és magatartászavart is észleltek ezekben az állatokban, azonban agyvolumen növekedést és corpus callosum rendellenességet nem láttak. Ectopiás

neuronok megjelenésével járó migrációs zavart is leírtak egerekben a *Foxp1* „down”-regulációja után, a mi betegünkben azonban az MRI nem mutatott migrációs zavart.

### **A *PTCH1* (*patched homolog 1*) gén**

A 9q22.3 kromoszóma régióra lokalizálódó *PTCH1* gén egy membrán fehérjét kódol, amely 12 transzmembrán régióból, egy intracelluláris és két extracelluláris kacsból, továbbá egy szterol-érzékelő részből áll. A *PTCH1* fehérje egy sonic hedgehog (SHH) receptor, amely szabályozza a primer ciliumok SHH jelátviteli rendszerét. SHH kapcsolódás hiányában a *PTCH1* gátolja egy másik transzmembrán fehérje, a Smoothened (SMO) funkcióját. SHH-*PTCH1* kötődés felfüggeszti a SMO gátlását, ami a GLI (Glioblastoma-associated oncogene) transzkripciós faktorok aktivációjához vezet.

Heterozigóta *PTCH1* mutációk Gorlin szindrómát okoznak. A fejlődési rendellenességeken túlmenően ebben a szindrómában fokozott a hajlam a daganatképződésre. Több tucat patogén variánst írtak le a *PTCH1* génben, többségük az intracelluláris vagy az extracelluláris kacsot kódoló szakaszokon fordul elő. A betegünkben talált *de novo* heterozigóta kóroki variáns [c.2834delGinsAGATGTTGTGAACCC, p.(Arg945GlnfsTer22)] is az egyik extracelluláris kacs rövidülését (truncation) okozza, bár nonszensz mutáció által közvetített mRNS bomlás (nonsense-mediated mRNA decay) sem zárható ki. Feltételezhető, hogy a kóros szerkezetű *PTCH1* nem gátolja a SMO funkcióját, ami az SHH jelátviteli rendszer kóros működését, valószínűleg aktivációját eredményezheti.

### **A *PTCH1* fehérje és a *PTCH1* gén kísérletes vizsgálata**

A Sonic hedgehog (Shh/SHH) fehérje és következésképpen a receptora (Ptc1/*PTCH1*) rendkívül fontos szerepet játszik az agy prenatális és postnatalis fejlődésében. A *Ptc1* fehérje expressziója az egész egér embrióban kimutatható volt. Kötődött az Shh-hoz és a hedgehog család többi tagjához, továbbá a Smo fehérjéhez. Heterozigóta *Ptc* mutáns egerek a normálisnál nagyobbak voltak és a hátsó lábak fejlődési rendellenessége mellett egy részükben kisagyi medulloblastoma fejlődött ki. Feltételezhető, hogy a normális szomatikus és idegrendszeri fejlődéshez a hedgehog fehérjék és a *Ptc* kölcsönhatása szükséges.

### **A *PTCH1* szerepe az oncogenesisben**

Kísérletesen a *Ptc* gén inaktiválása a cerebellaris szemcsesejtek prekursoraiban, vagy a multipotens neuralis őssejtekben az Shh jelátviteli rendszer aktivációjához és medulloblastoma kialakulásához vezet. Valóban, a klinikai tapasztalat alapján *PTCH1* mutáció hajlamosít medulloblastoma, vagy basalis sejtes carcinoma kialakulására

feltételezhetően az SHH jelátviteli rendszer fokozott aktivitása miatt. Az SHH-medulloblastoma kialakulásáért felelős szemcsesejt-prekursorok proliferációját az SHH jelátviteli rendszer a harmadik trimeszterben és az élet első néhány hónapja alatt szabályozza. A *PTCH1* mutációhoz társuló medulloblastoma legtöbbször a laterális cerebellumban fejlődik ki, mert ez a régió különösen érzékeny az SHH jelátviteli rendszer fokozott aktivitására.

### **Két gén, a *FOXPI* és a *PTCH1* mutációja ugyanabban a betegben**

Betegünkben két gén, a *FOXPI* és a *PTCH1* mutációja társult igen kifejezett megalencephaliával, részleges corpus callosum agenesissel és nagyon súlyos értelmi fogyatékosággal. Az irodalmi adatok alapján csak az egyik gén mutációja nem okoz olyan súlyos fenotípust, mint amelyet a betegünkben láttunk. Feltételezzük, hogy a két gén mutációjának következményei összeadódtak, és a „többszörös csapás” (multiple hits) eredményezte a súlyos klinikai tüneteket. A *FOXPI* mutáció hozzá járulhatott a súlyos értelmi fogyatékoság kialakulásához, míg a megalencephalia és a corpus callosum dysgenesis inkább a *PTCH1* mutáció következménye lehetett.

### **Aktíváló mutációk a PI3K (foszfatidilinositol-3-kináz)-AKT (AK mouse+Transforming or Thymoma)–mTOR jelátviteli rendszer génjeiben és megalencephalia**

A PI3K-AKT-mTOR jelátviteli rendszer egyes tagjait kódoló gének (*PIK3R2*, *PIK3CA*, *PTEN*, *AKT3*, *TSC1*, *TSC2*, *MTOR*, *DEPDC5*) mutációi a jelátviteli rendszer aktivációjához vezetnek, és megalencephaliát, hemimegalencephaliát, corticalis dysplasiát, focalis corticalis dysplasiát, vagy polymicrogyriát okozhatnak. A PI3K-AKT-mTOR rendszer szabályozza a sejtek növekedését, túlélését, anyagcseréjét, az apoptosist és az angiogenezist. Mindezek a folyamatok alapvetőek az agy normális fejlődése során.

#### ***AKT3* gén**

Az *AKT3* gén (kromoszóma lokalizáció: 1q44) mutációja okozza a **megalencephalia-polymicrogyria-polydactylia-hydrocephalus szindróma 2-es típusát (MPPH2, OMIM 615937)**. Ivarsejteket érintő (konstitucionális) és szomatikus (mozaik) mutációkat írtak le az *AKT3* génben megalencephalia és polymicrogyria, továbbá hemimegalencephalia néhány esetében 2017 előtt. Végül 11 korábban diagnosztizált és 14 újan diagnosztizált eset áttekintése során kiderült, hogy az agyi fejlődési rendellenességek széles spektruma társulhat *AKT3* mutációhoz. A konstitucionális mutációkhoz társuló rendellenességek 3 csoportba sorolhatók: (i) megalencephalia-polymicrogyria (pl. az 5. beteg ebben a tanulmányban), (ii) megalencephalia-

polymicrogyria és periventricularis heterotopia, továbbá (iii) megalencephalia corticalis malformáció nélkül autizmus spektrum zavar kíséretében. Tehát az *AKT3* mutációhoz társuló fenotípus nagyobb variációt mutat, mint a megalencephalia-polymicrogyria-polydactylia-hydrocephalus szindróma 2-es típusa.

A betegünkben észlelt *de novo* heterozigóta aktiváló *AKT3* misszenz variánst [c.1393C>T, p.(Arg465Trp)] eddig mindössze 7 betegben közölték. Az aktivált AKT fehérje különböző sejtfunkciók szabályozását befolyásolja, és ezek módosításával vezethet a különböző agyi fejlődési rendellenességek és megalencephalia kialakulásához.

### **Az *AKT3* fehérje és az *AKT3* gén kísérletes vizsgálata**

Hemimegalencephaliában szenvedő betegből sebészileg eltávolított agyszövet *AKT3* mutációt [c.49G>A, p.(Glu17Lys)] mutató óriássejtjeiben a PI3K-AKT-mTOR jelátviteli rendszer funkcionyeréssel járó aktivációját írták le. Hasonlóan az AKT-foszforiláció aktiválódását észlelték hemimegalencephaliában, vagy focalis corticalis dysplasiában szenvedő betegek sebészileg eltávolított agyszövetében. További vizsgálatok kimutatták, hogy a megalencephaliát okozó *AKT3* mutációk a kináz aktivitás fokozódását eredményezik, megerősítve, hogy ezek a mutációk a PI3K-AKT-mTOR jelátviteli rendszer aktivációjához vezetnek.

### **A PI3K-AKT-mTOR jelátviteli rendszer szerepe az oncogenesisben**

Tumorokban a PI3K-AKT-mTOR jelátviteli rendszer működése gyakran sérül. A tirozin-kináz receptorokat, továbbá a PI3K-AKT-mTOR jel-út elemeit kódoló gének mutációi igen gyakoriak az onkológiában. A primer melanomákban például az összes és a foszforilált *AKT3* protein mennyisége emelkedett a normális melanocytákhoz viszonyítva. A PI3K-AKT-mTOR jelátviteli rendszer aktivációjának az oncogenesisben játszott szerepe miatt 5. betegünk szoros megfigyelése szükséges.

## **KÖVETKEZTETÉSEK**

Ebben a tanulmányban három microcephaliában és két megalencephaliában szenvedő beteg fenotípusát és genotípusát jellemezzük. Új generációs szekvenálás új, homozigóta patogén variánsokat tárt fel az *ASPM* és a *WDR62* génben. Ezek a mutációk a centrosomák kóros funkcióját és a sejtosztódás zavarát eredményezhetik és végül autoszomális recesszív primer microcephalia (MCPH) kialakulását okozták. Két génben (*FOXP1* és *PTCH1*) igazolódott heterozigóta *de novo* mutáció ugyanabban a betegben. A két mutáció következményei összeadódva kifejezett megalencephaliát, részleges corpus callosum fejlődési rendellenességet és súlyos értelmi fogyatékoságot eredményeztek.

Aktiváló heterozigóta *de novo* *AKT3* mutáció megalencephalia és polymicrogyria kialakulásához vezetett. A SHH-PTCH1 és a PI3K-AKT-mTOR jelátviteli rendszereknek jelentős szerepük van az oncogenesisben, ezért megalencephaliában szenvedő betegeink szoros megfigyelést igényelnek. Az autoszomális recesszív microcephalia és a megalencephalia ritka betegségek, ezért munkánk része azoknak a nemzetközi törekvéseknek, amelyek ezeknek a kórképeknek a molekuláris hátterét kívánják kideríteni.

## **KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Sztriha László professzor úrnak a hasznos tanácsaiért.

Köszönöm Dr. Bereczki Csaba tanár úrnak, az SZTE Gyermekgyógyászati Klinika igazgatójának támogatását.

Köszönöm továbbá Dr. Kalmár Tibor és Dr. Maróti Zoltán tudományos főmunkatársak segítségét.

Köszönöm a férjemnek és a szüleimnek a végtelen türelmét és támogatását.