

## **A nemi differenciálódás zavarainak genetikai háttere**

### *Bevezetés*

A nemi kromoszómákon lévő géneknek kulcsszerepe van azon génkaszkád aktiválásában vagy gátlásában, aminek eredményeként az indifferens gonadkezdeményből here vagy petefészek alakul ki a korai magzati élet során. A belső és külső nemi szervek differenciálódásának iránya a gonadalis hormonok hatásától függ. A külső nemi szervek magzati maszkulinizációjának foka az androgének termelési ütemétől és a célszervek érzékenységétől függ. Vizsgálatainkat két irányban folytattuk.

### ***1. Az Y-kromoszóma génjeinek szerepe a gonad differenciálódás zavaraiiban.***

Vizsgálataink konkrét tárgya az Y-kromoszóma DNS-szekvenciáinak szűrése volt Turner-syndromába sorolt betegeknél.

*Háttér.* A Turner-syndroma (TS) gyakorisága újszülöttben 1:2500-3000 (Sybert és McCauley 2004). A betegség hátterében nemi kromoszóma rendellenesség és a petefészekben a folliculusok korai apoptosisa (csikgonad) áll. A klasszikus kariotipus 45,X monoszómia, de a betegek közel felében mozaicizmus mutatható ki. A mozaicizmus kimutatása függ a vizsgált sejtszámtól (Hook és Watburton 1983), a vizsgált szövet típusától, és az alkalmazott módszer érzékenységétől (Held és mtsai 1992). Ha a strukturálisan károsodott kromoszómák kicsik vagy csak kevés sejtvonalban vannak jelen, hagyományos citogenetikai módszerrel nem mindig kerülnek detektálásra. A mozaik Turner esetek egy részében Y-kromoszóma vagy annak töredéke azonosítható (Lindgren és mtsai 1992, Canto és mtsai 2004). Az Y-kromoszóma anyagot is hordozó gonad dysgenesises betegek fokozott mértékben veszélyeztetettek gonad neoplasia kialakulására (Gravholt és mtsai 2000). A malignus elfajulás főleg a serdülőkor után jelentkezik, és gyakorisága a harmadik évtizedre 10-30 százalékra emelkedhet.

*Vizsgálatunk célkitűzése* az volt, hogy a magyar Turner-syndromás betegek között is felmérjük az Y-kromoszóma ill. Y-kromoszóma szekvenciák előfordulási arányát, és a betegek adatainak elemzésével hozzájáruljunk a gonad differenciálódás zavarainak értelmezéséhez.

*Betegek és módszerek.* A magyarországi Turner-syndromás betegek adatbázisának kibővítésével és felhasználásával, a gyermekendokrin centrumok segítségével végülis 124 olyan Turner-syndromás beteg adatait dolgoztuk fel, akiktől DNS mintát is tudtunk nyerni. A cytogenetikai vizsgálat perifériás vér limfocita-tenyészetéből történt. Kariotipus vizsgálat mellett FISH vizsgálatra is sor került teljes X- és Y-próba alkalmazásával. A fehérvérsejtekből izolált DNS mintákban négy Y-specifikus szekvencia jelenlétét vizsgáltuk. Kettő a rövid karon (SRY, TSPY), kettő a hosszú kar proximális részén helyezkedik el (DBY,

HSFY). Real-time PCR módszert alkalmaztunk, melynek részleteit közlés alatt álló cikkünkben ismertetjük (Sallai és mtsai 2006).

*Eredményeink.* A betegek kariotípusának megoszlása a következő volt: 45,X monoszómia 70 esetben (56,5 %), mozaicizmus 37 esetben (29,8 %), a hosszú kar izokromoszómája 9 esetben (7,3 %), a hosszú vagy rövid kar deléciója 7 esetben (5,6 %), monoszómia azonosítatlan markerrel egy esetben (0,8 %). A 124 betegből tiznél volt kimutatható Y-szekvencia. Közülük négyenél már a citogenetikai vizsgálat alapján is ismert volt Y-kromoszóma jelenléte. Egy betegnél pedig marker kromoszóma miatt végzett FISH vizsgálat tárta fel az Y-kromoszóma anyag jelenlétét. Öt betegnél viszont csak a molekuláris genetikai vizsgálat igazolta Y-szekvencia jelenlétét. Ezen öt betegnél utólag végzett FISH vizsgálat azt mutatta, hogy az Y-próbával pozitív sejtek aránya háromnál 22 és 58 % között volt, kettőnél azonban csak 3 % alatt. A betegek további adatainak részletes leírását tervezzük.

*Megbeszélés és következtetés.* Turner-syndromás betegeinknél talált Y-kromoszóma szekvencia gyakoriság a más tanulmányokban közölt gyakoriságok középmezőnyében van. A hagyományos citogenetikai módszer alapján Y-negatív TS-s betegek között az Y-kromoszóma DNS szekvencia hordozást 6/120-nak találtuk (5 %). A citogenetikai módszerrel is azonosított TS betegekkkel együtt az Y-szekvenciát hordozó TS-s betegek arányát 10/124-nek (8 %) találtuk. Gonadoblastomára való fokozott hajlamuk miatt, ezen betegek speciális ellátása indokolt. A 45,X/46,XY mozaik betegek egy részénél a külső nemi szervek mérsékelt maszkulinizációja figyelhető meg. Vannak azonban olyan klasszikusan TS-nak diagnosztizált betegek is, akiknél Y-szekvencia azonosítható. Ezért javasolt az összes TS-s beteg szűrése Y-kromoszóma gén állomány irányában. Az Y-pozitív betegeknél gonadectomia elvégzése javasolt már a gyermekkorban.

## IRODALOM

Canto, P., Kofman-Alfaro, S., Jiménez, A.L., Söderlund, D., Barrón, C., Reyes, E., Méndez, J.P., Zenteno, J.C.: Gonadoblastoma in Turner syndrome patients with nonmosaic 45,X karyotype and Y chromosome sequences. *Cancer Genet. Cytogenet.* 150: 70-72, 2004.

Gravholt, C.H., Fedder, J., Naeraa, R.W., Müller, J.: Occurrence of gonadoblastoma in females with Turner syndrome and Y chromosome material: a population study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85: 3199-3202, 2000.

Held, K.R., Kerber, S., Kaminsky, E., Singh, S., Goetz, P., Seemanova, E., Goede, H.W.: Mosaicismus in 45,X Turner syndrome: does survival in early

pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes? Hum. Genet. 88: 288-294, 1992.

Hook, E.B., Watburton, D.: The distribution of chromosomal genotypes associated with Turner's syndrome: livebirth prevalence rates and evidence for diminished fetal mortality and severity in genotypes associated with structural Y abnormalities or mosaicism. Hum. Genet. 64: 24-27, 1983.

Lindgren, V., Chen, C., Bryke, C.R., Lichter, P., Page, D.C., Yang-Feng, T.L.: Cytogenetic and molecular characterization of marker chromosomes in patients with mosaic 45,X karyotypes. Hum. Genet. 88: 393-398, 1992.

Sybert, V.P., McCauley, E.: Turner's syndrome. N. Engl. J. Med. 351: 1227-1238, 2004.

Sallai Á., Ugocsai P., Halász Z., Hosszú É., Ságodi L., Erhardt É., Kozári A., Niederland T., Szabó J., Sólyom J., Dobos M., Fekete Gy.: Y-kromoszóma DNS szekvenciák szűrése Turner-szindrómában. Gyermekgyógyászat 2006 (közlésre elfogadva).

## **2. Az androgen érzékenység szerepe a genitalis differenciálódás zavaraiiban.**

Vizsgálataink aktuális tárgya androgen insensitivitasban syndromában szenvedő gyermekek fenotípusa és genotípusa közti kapcsolat elemzése volt.

*Háttér.* Az androgen insensitivitas a férfiak elégtelen virilizációjának leggyakoribb oka (Hughes 2002). Az androgen insensitivitas syndroma (AIS) jellemzői: férfi kromoszómális nem (46,XY kariotípus), férfi gonadalis nem (mindkét oldalon normálisan differenciálódott herék), férfira jellemző nemi hormon termelés (tesztoszteron és Müller-cső-gátló hormon), megfelelő androgen aktiválódás a célszervben (dihidrotesztoszteronra alakulás) ellenére elégtelen androgen hatás (elégtelen intrauterin maszkulinizáció és posztnatalis virilizáció). A betegséget az androgen receptor (AR) gén hibájával magyarázzák (Quigley és mtsai 1995, Ahmed és mtsai 2000). Az androgen insensitivitas az egy gén egy betegség elve alapján klinikai entitásnak tekinthető, tüneti megjelenése azonban széles spektrumot alkot, amit a mutációk különböző jellegével, az androgen receptor működésének különböző mértékével, azaz az androgen érzékenység ill. rezisztencia különböző fokozataival magyaráznak (Sólyom és mtsai 2001). Az androgen receptor génje az Xq11-12 régióban helyezkedik el. Ez magyarázza a betegség X-hez kötött öröklésmenetét. A gén 8 exonból áll. Az 1. exon az androgen receptor modulátor régiójának kialakításáért felelős. A 2. és 3. exon a DNS-kötő, a 4-8. exon pedig az androgenkötő régióért felelős génszakasz.

*Vizsgálatunk célkitűzése* az volt, hogy az AIS-re klinikailag gyanús betegeknél az AR-gén vizsgálatával összefüggést keressünk a genotípus és a fenotípus között. Az egyedi eredmények a betegellátást is segítik, amennyiben a mutáció azonosítása esetén magasabb szintű genetikai tanácsadás végezhető, ill. ha mutációt nem találunk, akkor a klinikai diagnózis helyességének mérlegelése indokolt.

*Beteganyag és módszerek.* A vizsgálatok első fázisában 8 család összesen 10 olyan gyermekét vizsgáltuk, akiknél AIS diagnózisát állítottuk fel. A perifériás vér limfocitáiból extraháltuk a DNS-t. Az AR-gén vizsgálata PCR-alapú SSCP-vel és direkt fluoreszcens szekvenálással történt. A módszer részletes leírását közleményünk tartalmazza (Scheiber és mtsai 2003). Vizsgálataink második fázisában DNS-t izoláltunk hypospadiasisos betegekből (n=20), valamint további AIS-nek tartott betegekből (n=13). Náluk az AR-gén mutációs analízise folyamatban van.

*Eredmények.* Az első fázisban vizsgált 8 családból ötben azonosítottuk az AR-gén hibáját. Közülük egy novel mutációt találtunk (868insM). Három beteg AR-génjében nem találtunk eltérést a vad típustól, bár a klinikai és laboratóriumi adataik alapján az AIS diagnózisa valószínű. A második fázisban vizsgált betegek közül egy klinikailag inkomplett AIS-nek megfelelő beteg DNS-ében olyan AR-gén mutációt találtunk (D690G), ami nem szerepel a nemzetközi adatbázisban. A beteg további adatai közlés alatt vannak (Luczay és mtsai 2006).

*Megbeszélés és következtetés.* Eddig már több mint 500 fajta mutációt írtak le az AR-génben (Gottlieb és mtsai 2004). Megfigyeléseink az irodalmi közlésekkel együtt arra utalnak, hogy AIS-ben a genotípus és a fenotípus korrelációja nem szoros (Deeb és mtsai 2005, Holterhus és mtsai 2005). Az AR-gén mutációs analízise azt sugallja, hogy vannak olyan AIS betegek, akiknél az androgen érzékenység elégtelensége nem az AR strukturális gén hibájára vezethető vissza. Ezért a jövőbeni kutatások feladata az, hogy tisztázzák, melyek azok a járulékos molekuláris mechanizmusok, amelyek csökkentik az AR expresszióját a célszervben.

## IRODALOM

Ahmed S.F., Cheng A., Dovey L. és mtsai: Phenotypic features, androgen receptor binding, and mutational analysis in 278 clinical cases reported as androgen insensitivity syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85: 658-665, 2000.

Deeb A., Mason C., Lee, Y.S., Hughes I.A.: Correlation between genotype, phenotype and sex of rearing in 111 patients with partial androgen insensitivity syndrome. *Clin. Endocrinol.* 63: 56-62, 2005.

Gottlieb B., Beitel L.K., Wu J.H., Trifiro M.: The androgen receptor gene mutations database (ARDB): 2004 update. *Human Mutations* 23: 527-533, 2004.

Holterhus P.M., Werner R., Hoppe U. és mtsai: Molecular features and clinical phenotypes in androgen insensitivity syndrome in the absence and presence of androgen receptor gene mutations. *J. Mol. Med.* 83: 1005-1013, 2005.

Luczay A., Sólyom J., Hiort O., Nemes-Nagy Gy., Dobos M., Jenővári Z., Fekete Gy.: Incomplett androgen insensitivitas syndroma. *Orvosi Hetilap* 2006 (közlés tervezve)

Hughes I.A.: Intersex. *Brit. J. Urol. Internat.* 90: 769-776, 2002.

Quigley C.A., DeBellis A., Marschke K.B. és mtsai: Androgen receptor defects; historical, clinical and molecular perspectives. *Endocrine Review* 6: 271-321, 1995.

Scheiber D., Barta Cs., Halász Z. és mtsai: Mutational analysis of Hungarian patients with androgen insensitivity syndrome. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 16: 367-373, 2003.

Sólyom J., Scheiber D., Fekete Gy.: Androgen insensitivitas syndroma. Klinikai és molekuláris genetikai spektrum. *Orvosi Hetilap* 142: 1659-1665, 2001.