

Facioscapulohumeralis izomdisztrófiával asszociált allélok és a hipometiláció szerepe a beteg fenotípus kialakulásában

Pikó Henriett dr.¹ ■ Molnár Mária Judit dr.² ■ Herczegfalvi Ágnes dr.³
Mayer Péter dr.⁴ ■ Karcagi Veronika dr.¹

¹Országos Környezet-egészségügyi Intézet, Molekuláris Genetikai és Diagnosztikai Osztály, Budapest

²Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Neurológiai Klinika,

Molekuláris Neurológiai Központ, Budapest

³Heim Pál Gyermekkórház, Neurológiai Osztály, Budapest

⁴Erzsébet Kórház, Neurológiai Osztály, Hódmezővásárhely

Az autoszomális domináns öröklődésű facioscapulohumeralis izomdisztrófia (FSHD) betegség hátterében a 4q35-régióban található D4Z4 makroszatellita-ismétlődések kontrakciója áll. A patomechanizmusban számos tényező, így epigenetikai módosító hatások is szerepet játszanak. *Célok:* Új diagnosztikai panel bevezetése Magyarországon a betegség teljes körű molekuláris genetikai vizsgálatára, amellyel a fenotípus hátterében álló módosító tényezőkről is teljesebb kép adható. *Módszerek:* Összesen 185, klinikailag FSHD-beteg és 71, tünetmentes hozzátartozó molekuláris genetikai vizsgálata történt meg. A molekuláris diagnosztika a megrövidült 4q35-régió detektálásán alapszik, EcoRI és BlnI restrikciós emésztést követő Southern blot analízissel, p13-E11-próba felhasználásával. Az FSHD-betegséghez kapcsolódó további vizsgálatokhoz a 4qA és 4qB allélasszociáció, a proximális D4Z4-ismétlődés G/C SNP, valamint a metiláció-szenzitív enzimatisz analízisek járultak hozzá. *Eredmények:* A vizsgált betegcsoportból 115 betegnél igazolódott a D4Z4-ismétlődés kontrakciója, míg a 71, tünetmentes hozzátartozó közül öt esetben igazolódott a patológiás fragmentumméret öröklődése. Nyolc, FSHD-betegséggel diagnosztizált családnak kellett magzati vizsgálatot felajánlani és négy magzati mintában igazolódott a kóros fragmentumméret. A D4Z4-ismétlődések metilációs vizsgálata 31 igazolt FSHD-betegben történt meg, és minden betegben hipometilált állapot igazolódott. Mind a 115 igazolt FSHD-betegben a 4qA- és a G-polimorfizmust hordozó allél asszociációja volt kimutatható. Ezenfelül a 4q35 és a homológ, de nem patogén 10q26 kromoszomális locus közötti transzlokációs események is detektálásra kerültek. *Következtetés:* Az FSHD-betegség molekuláris diagnosztikája hazánkban is rutinná vált, a klinikus munkáját, a betegek életvitelét és a családok genetikai tanácsadását segítve. A kutatási eredmények igazolják továbbá, hogy a betegség kialakulásában komplex epigenetikai módosító tényezők kulcsszerepet játszanak.

Orv. Hetil., 2011, 152, 1576–1585.

Kulcsszavak: facioscapulohumeralis izomdisztrófia (FSHD), hipometiláció, kromoszóma telomer régió átrendeződés, D4Z4-ismétlődés, epigenetika

Role of associated alleles and hypomethylation status in the clinical expression of facioscapulohumeral muscular dystrophy

Autosomal dominant facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) is caused by contraction of the D4Z4 repeat region on 4q35. In addition, epigenetic modifying factors play a role in the complex pathomechanism of the disease. Aims: Introduction of a new diagnostic panel in Hungary for the extended molecular analysis of the disease which also provides new insights into the pathomechanism. Methods: In total, DNA samples of 185 clinically diagnosed FSHD patients and 71 asymptomatic relatives were analyzed by EcoRI and BlnI restriction digestion and Southern blot technique with probe p13-E11. Further investigations of the 4q35 alleles associated with the FSHD phenotype utilized qA and qB probes and a restriction analysis of the proximal D4Z4 unit by detecting a G/C SNP and the methylation status. Results: From the patients analyzed 115 had the D4Z4 repeat contraction, whereas from 71 asymptomatic family members five harbored the pathogenic fragment size. In eight families, prenatal testing had to be offered with an outcome of four affected fetuses. Methylation test was performed in 31 genetically confirmed FSHD patients and hypomethylation status was detected in all cases. All the 115 confirmed patients had 4qA alleles

with the G polymorphism. Translocation events between 4q35 and the homologous 10q26 regions were also detected. Conclusion: Molecular diagnosis of FSHD became a routine approach in Hungary thus supporting the work of the clinicians, improving quality of life and genetic counseling of the affected families. The provided results from this research suggest that FSHD is associated with complex epigenetic disease mechanisms. Orv. Hetil., 2011, 152, 1576–1585.

Keywords: facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD), hypomethylation, telomere rearrangements, D4Z4 repeats, epigenetic

(Beérkezett: 2011. június 3.; elfogadva: 2011. július 3.)

A szerkesztőség felkérésére készült közlemény.

Rövidítések

ANT1 = adenin nukleotid transzlokátor 1 gén; ChIP = kromatin-immunoprecipitálás; DNMT1 = DNA (cytosine-5) methyltransferase 1; DNMT3A = DNA (cytosine-5) methyltransferase 3A; DNMT3B = DNA (cytosine-5) methyltransferase 3B; DUX4 = double homeobox 4 gén; FRG1 = FSHD-régió gén 1; FRG2 = (FSHD-related gene 2) FSHD-régió gén 2; FRR-MAR = FSHD-related region-matrix attached regions; FSHD = facioscapulohumeralis izomdisztrófia; G/C SNP = G/C single-nucleotide polymorphism; hhsp3 = GC-rich low copy repeat; Lsau = GC-rich low copy repeat; MBD = methyl binding domain; pLAM = poliadenilációs szignál; S/MAR = scaffold/matrix associated regions; YY1 = Yin-Yang 1 fehérje

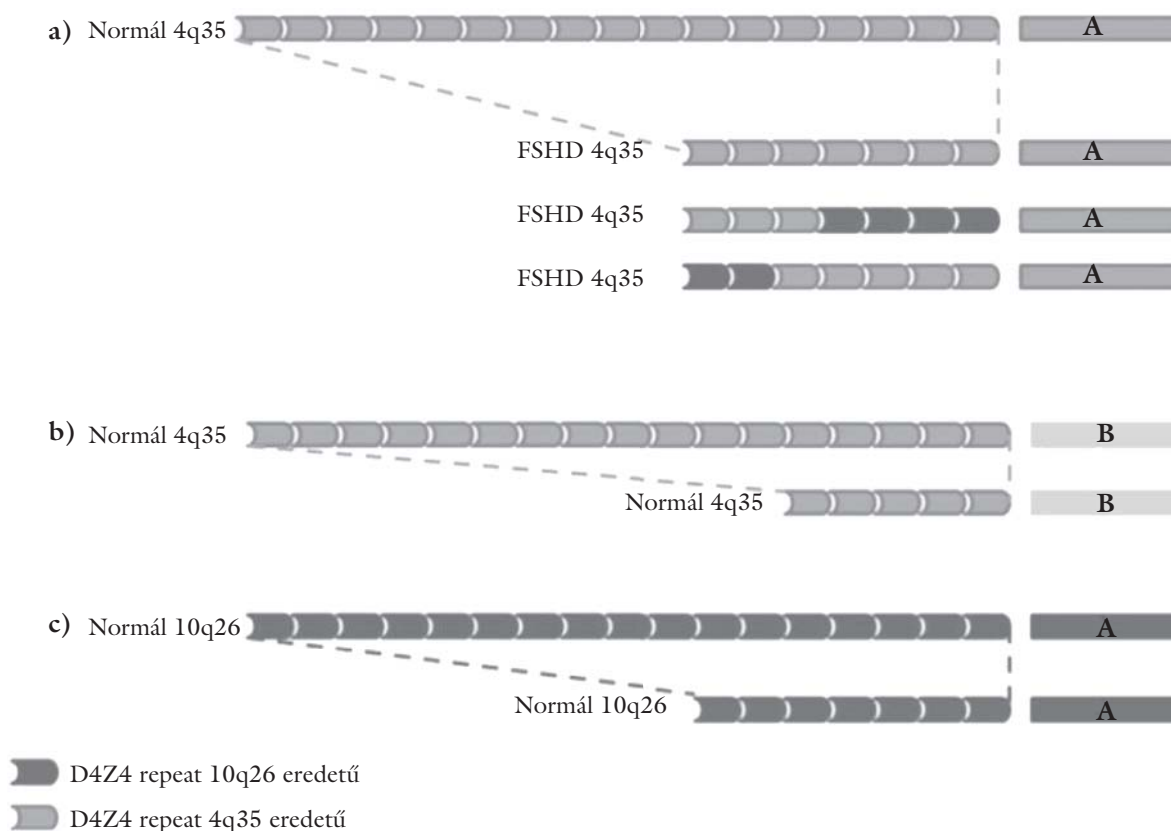
A facioscapulohumeralis izomdisztrófia a harmadik leggyakoribb izomdisztrófia, a Duchenne/Becker izomdisztrófia és a dystrophia myotonica után. Előfordulási gyakorisága 1:20 000, öröklődésmenete autoszomális domináns [1]. Ellentétben a legtöbb monogénes öröklődésű betegséggel, amelyknél a betegség háttérben egy adott gén mutációja áll, az általa kódolt fehérjében strukturális vagy funkcionális eltérést okozva, az FSHD-betegség kialakulásában egy komplex epigenetikai mechanizmus megváltozása játszik szerepet, amely a szubtelomerikus makroszatellita-ismétlődések kontrakciójának a következménye [2, 3].

A betegség teljes penetranciájának (95%) kifejeződése a betegekben körülbelül 20 éves korig várható, de előfordul felnőttkori megjelenés is [2]. Néhány obligát heterozigóta teljesen tünetmentes is lehet. A betegség súlyossága nemcsak a családok között, hanem az adott családon belül is nagy változékonyságot mutat. A izomgyengeség tünetei először az arc- és a vállöv izmainál jelennek meg. Általában az arc izmainak aszimmetrikus gyengesége figyelhető meg. A facialis izmok gyengesége miatt az arc mimika szegényebbé válik, viszont megkíméltebb a musculus oricularis oris. Ezért úgynevezett horizontális mosoly jelenik meg, illetve az arcizmokhoz viszonyítva ez az izomzat tömegesebbnek, vaskosabbnak tűnik; ezt tapírajaknak is szokták nevezni. Bizonyos

esetekben a nyelv megnagyobbodását is megfigyelték. A vállöv esetében a scapula rögzítőizmai érintettek leginkább, a mellkas fő izmainak gyengülése is korán megjelenik és ugyanúgy aszimmetriával jellemezhető. Jellegzetes tünet a periscapularis izmok gyengesége, ezért a scapula elemelkedik a mellkas szintjéből – scapula alát látunk [1, 2]. Az FSHD-betegség úgynevezett infantilis formájára jellemző, hogy a tünetek már korai életkorban megjelennek, és a tipikus FSHD-fenotípus mellett gyakori a sükettség, mentális retardáció, epilepsziás görcsök, macroglossia. Ezekben az esetekben a járásképtelenség korán kialakul és nem ritka a légzészavar sem.

Az FSHD-betegség elsősorban a 4q35-régióban található polimorf D4Z4 makroszatellita-ismétlődések kontrakciójához köthető. Az egyes D4Z4-ismétlődések mérete 3,3 kb, és egészséges egyénekben ezen ismétlődések száma 11–100 egységre tehető. Az FSHD-betegséggel érintett személyeknél a D4Z4-ismétlődések kontrakciója miatt az ismétlődések száma 1–10 értékre csökken [2, 4]. A D4Z4-ismétlődés kontrakciója és a régió metiláltságának megváltozása a szomszédos gének túlkifejeződését eredményezi az izomszövetben, mint például az FRG2 (FSHD-régió gén 2, MIM: 601278), FRG1 (FSHD-régió gén 1, MIM: 609032) és az ANT1 (adenin nukleotid transzlokátor 1 gén, MIM: 103220) [5, 6]. A csökkent méretű D4Z4-ismétlődések hipometilált állapota kulcsszerepet játszhat azokban az epigenetikai kaskádfolyamatokban, amely FSHD-fenotípust alakíthat ki [4, 6]. Tovább bonyolítja az FSHD-betegség patomechanizmusának megértését, hogy a 10q26-régióban található egy homológ polimorf D4Z4-ismétlődéseket tartalmazó DNS-szakasz [4, 7]. A két kromoszómaszakasz (4q35 és 10q26) között a D4Z4-ismétlődések transzlokálódhatnak a nagyfokú homológia miatt. FSHD-fenotípust csak a 4. kromoszóma eredetű D4Z4-ismétlődések kontrakciója okozhat, míg a 10q26 eredetű D4Z4-kontrakció nem patogén (1. ábra).

A betegség molekuláris genetikai vizsgálatával egyre inkább világossá vált, hogy egy komplex epigenetikai



1. ábra

Az FSHD-betegséggel asszociáló allélok és D4Z4-ismétlődések kontrakciójának szerepe (S. M. van der Maarel alapján)

Az FSHD-beteg fenotípus kialakulásáért felelős allélok: a) Az egészséges egyének 4q35 telomer régiójában 11-nél nagyobb számban detektálhatók a D4Z4 makroszatellita-ismétlődések. Az FSHD-érintettség biztosan igazolt, ha 4q35 telomer régióban a D4Z4 makroszatellita-ismétlődések száma <11 és 4qA alléllal asszociál, valamint, ha a 4q35 telomer régióban 10q26 eredetű D4Z4-ismétlődések transzlokálódtak (ezzel csökkentve a 4q35 eredetű D4Z4-ismétlődések számát), és ez a 4qA alléllal asszociál. b) Ha a 4q35 eredetű D4Z4-ismétlődések száma >11 vagy <11 és 4qB alléllal asszociál, az nem jár FSHD-fenotípussal. c) A 10q26 eredetű ismétlődések számának kontrakciója 10qA alléllal asszociálva sem okoz FSHD-genotípust

hatásmechanizmus állhat a beteg fenotípus kialakulásának hátterében.

Epigenetikai hatások az FSHD-beteg fenotípus kialakításában

Bár már 15 éve ismert, hogy az FSHD-betegség a 4q35-régió D4Z4-ismétlődések kontrakciójával jár együtt, a pontos patomechanizmusát még a mai napig nem ismerjük. A kutatások alapján úgy tűnik, hogy nem egy kandidáns gén defektusa okozza az FSHD-fenotípust, hanem egy komplex genetikai és epigenetikai mechanizmus, amely hatással lehet számos további génre mind cisz-, mind transzszabályozással.

DNS-metiláció az FSHD-betegségben

Az emlősök DNS-ében a CpG dinukleotid-ismétlődések citozinbázisát a DNS-metiltransferáz enzim (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B) metilálhatja. Általában a metiláció jelenléte a DNS-ben a kromatinstruktúra kondenzált állapotával jár, azaz az adott gének elcsendesítését jelenti [8, 9]. Minden egyes D4Z4-ismétlődés tartalmaz

két GC-gazdag régiót (hhspm3 és Lsau), amelyek alacsony számú ismétlődéscsoportba tartoznak. Ezek az ismétlődések a genom heterokromatin állapotával társulnak. Az FSHD-betegeknél a D4Z4-ismétlődések száma lecsökken és ezzel együtt a metilációs szint is csökken, amely a heterokromatin állapot változásához vezethet. A metilációs vizsgálatok is igazolták, hogy a D4Z4-ismétlődések kontrakciója hipometilált állapotot eredményez, amely a szomszédos gének epigenetikus elcsendesítését felfüggeszti, így azok átíródnak, FSHD-fenotípust eredményezve [5, 6, 10]. A hipometilált állapotot nemcsak a FSHD1-betegekben, hanem a másik FSHD-csoportban, az úgynevezett FSHD2-betegekben is kimutatták, annak ellenére, hogy ebben a csoportban a D4Z4-ismétlődések nem rövidülnek le [11]. Azoknál az FSHD1-betegeknél, akiknél a D4Z4-ismétlődések kontrakciója 10 és 20 kb méretű a normális, minimum 38 kb helyett, fokozott hipometilált állapotot és súlyos fenotípust igazoltak. Azokban az esetekben, amelyekben a kontrakció mértéke 20 és 31 kb közé esik, mind klinikailag, mind a hipometiláltság szintjén nagy variabilitást mutattak.

Hisztonmodifikálás

A hiszton fehérjék egyik fő feladata a DNS-óriásmolekula csomagolása, hogy a sejtmagban elférjen az örökítőanyag. A feltekeredett DNS információ átírása függ attól is, hogy mennyire kondenzált (feltekeredett) állapotban van az adott DNS-szakasz. A hiszton fehérjék posztranzlációs módosításával (acetiláció, metiláció, foszforiláció és ubiquitinálás) szabályozható az adott DNS-szakasz expressziója. Az FSHD-betegségben kromatin-immunoprecipitálás-analízissel (ChIP) a D4Z4-ismétlődések heterokromatin állapotát vizsgálták, és igazolták, hogy a H4 hiszton acetilációjának mértéke sokkal nagyobb a 4q35 eredetű D4Z4-ismétlődésekben, mint amely a normális heterokromatin állapotot jellemzi. A vizsgálatokkal igazolták, hogy a 4q35 eredetű D4Z4-ismétlődések inkább egy nem expresszálódó eukromatin vagy fakultatív heterokromatin állapotnak felelnek meg, mint egy konstitutív heterokromatinnak [12].

A D4Z4 transzkriptum szerepe az FSHD-betegségben

Minden egyes D4Z4-ismétlődés tartalmaz egy kettős homeodomén (DUX4) gént. Egészséges mintában a D4Z4-ismétlődések heterokromatin állapotban vannak, de az FSHD-val érintett betegeknél a D4Z4-kontrakció következményeként a stabil heterokromatin állapot egy transzkripció aktív eukromatin állapotba alakul át és ennek eredményeként a DUX4 gén upregulálódik. A DUX4 gén túlkifejeződése apoptózist, kaszpáz 3/7 aktivációt indukál. A distalis helyzetű D4Z4-ismétlődésről íródik át az a DUX4 transzkriptum, amely már intronokat és a distalis helyzetű pLAM szekvenciáról poliadenilált farokrészt is tartalmaz (2. ábra) [13, 14]. Kísérletesen igazolták továbbá, hogy az FSHD-betegség speciálisan a 4qA161 haplotípussal asszociál, amely szekvencia a D4Z4-ismétlődések közvetlen közelében helyezkedik el és ennek a haplotípusnak is szerepe van a DUX4 gén transzkripciójában. Ezenfelül a D4Z4-ismétlődés metilációs mértéke is szabályozza a DUX4 gén expresszióját [3].

A szomszédos gének cisz- és transzszabályozásának szerepe az FSHD-betegségben

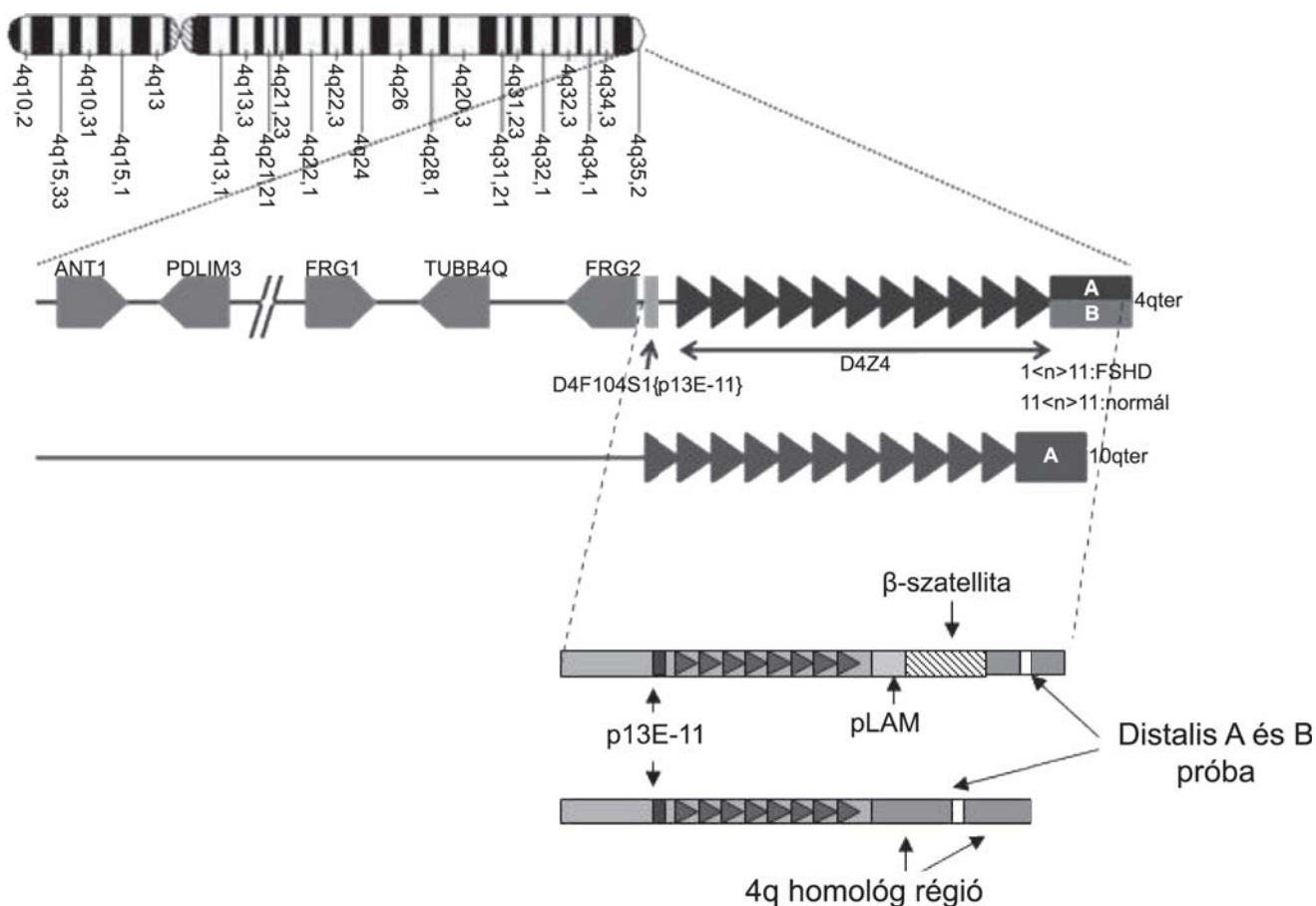
Az FSHD-fenotípus a 4q35-régióban található D4Z4-ismétlődések kontrakciójával társul, de a beteg fenotípus kialakításában szerepet játszik a szomszédos gének expressziójának fokozódása is. A D4Z4-ismétlődések kontrakciója mindig hipometilált állapottal jár együtt, amelynek eredményeként a cisz helyzetű szomszédos gének transzkripció kontrollja elvész. Az FSHD-betegség ciszszabályozását vizsgálva kimutattak egy olyan fehérjekomplexet, amely DNS-specifikus szekvencia felismerésre és megkötésére képes [12, 15]. Ennek a komplexnek a részét képezi YY1 (Yin-Yang 1), HMGB2 (high-mobility group box 2) és a nukleolin fehérje; ezek az adott DNS-szakaszhoz kötődve transzkripció rep-

resszorként funkcionálnak. Az FSHD-betegekben a YY1 HMGB2 és nukleolin fehérjekomplex DNS-hez kötődése erősen lecsökken, így a represszor hatás is megszűnik.

A második mechanizmus, amellyel a szomszédos gének ciszszabályozása befolyásolható, a nuclear matrix attachment (S/MAR) (scaffold/matrix associated regions) rendszerhez kapcsolható. Az eukaryota metafázis kromoszómákban a DNS molekula feltekeredve hurkokba szerveződik, amely közvetlenül kapcsolódhat a nukleáris szkeletonhoz vagy nukleáris mátrixhoz. A DNS-hurkok speciális szekvencián keresztül kapcsolódhatnak; ezt a specifikus szekvenciát S/MAR-nek nevezik, amely 200–1000 bp hosszúságú, A/T gazdag DNS-szakasz és az át nem íródó vagy intronikus részekben helyezkedhet el [12]. Egészséges emberek DNS-mintáiban a D4Z4-ismétlődések és a szomszédos gének két különböző DNS-hurokban helyezkednek el, amelyet fizikailag is elválaszt az S/MAR típusú régió. Ezt a szakaszt az FSHD 4q35-régiójában FRR-MAR (FSHD-related region-matrix attached regions) komplexnek nevezik, amelynek feladata, hogy a magban lévő DNS-t a maghártyához kösse és ezzel biztosítja a normális térbeli elrendeződést [12, 16]. Az FSHD-betegségben a szomszédos gének és a D4Z4-ismétlődések a kontrakció következtében egy DNS-hurokban helyezkednek el, így a fizikai távolság is megszűnik, amely a szomszédos gének (FRG1, FRG2, ANT1) átírását segíti [9, 10, 17] (3. ábra). Az FRG1 gén igen konzervatív szekvenciákat tartalmaz és a humán spliszosoma alkotóeleme, valamint szerepet játszik a pre-mRNS-éresi folyamatokban is. Ezzel további gének szabályozását is befolyásolhatja transz hatásként. Az ANT1 gén fokozott expressziója érzékennyé teszi a sejteket az oxidatív stresszre és apoptózist indukálhat.

Célkitűzések

Olyan molekuláris genetikai módszerek bevezetése volt a cél, amellyel megbízhatóan és pontosan igazolhatjuk az FSHD-betegség előfordulási gyakoriságát a magyar populációban. A D4Z4-fragmentanalízis bevezetésével lehetőség nyílt az FSHD-betegséggel összefüggő D4Z4-makroszatellita-ismétlődés kontrakciójának kimutatására. A transzlokációs analízissel a 4q35- és 10q26-régiók között kialakuló kromoszómaszakasz-kicserélődés vizsgálható, amellyel pontosan elkülöníthetők a 4. és 10. kromoszómaeredetű D4Z4-ismétlődések. Ez azért fontos, mert a 10q26 eredetű D4Z4-repeatek kontrakciója nem okoz FSHD-betegséget, viszont hibrid repeatek is előfordulnak. A 4qA és 4qB allél vizsgálataival pontosíthatjuk a molekuláris genetikai diagnózist, mert az FSHD-betegséggel csak a qA allél asszociál. Az új kutatások eredményeit adaptálva bevezettük a metilációs vizsgálatot is, amellyel a D4Z4-ismétlődések metiláltsági állapotát határozzuk meg, ezzel vizsgálva az epigenetikai hatásokat az FSHD-be-



2. ábra

A 4q és 10q kromoszóma szubtelomer régiójának szerkezete (N. A. Rabaia alapján)

A szomszédos gének elhelyezkedése és orientációja (ANT1 = adenine nucleotide translocator; FRG1 = FSHD region gene 1; FRG2 = FSHD region gene 2; TUBB4q = tubulin beta polypeptide 4; PDLIM3 = PDZ and LIM domain 43.

Az FSHD két alléljának, a qA és qB szerkezeti bemutatása: A qA allél telomer régiójában specifikus szekvencia található, amelyet a qA-próba detektál. Abban is különbözik a qB alléltól, hogy tartalmaz a D4Z4-ismétlődésektől distalisán elhelyezkedő pLAM-régiót, valamint egy β -szatellita-ismétlődést

tegségben. A legújabb kutatások igazolták egy úgynevezett FSHD2-betegségcsoport meglétét is, amelynél minden esetben a D4Z4-ismétlődések hipometilált állapotát mutatták ki, viszont egyik esetben sem találtak D4Z4-kontrakciót. Ezért jövőbeli vizsgálatként tervezük a metilációs analízis elvégzését minden olyan esetben, amely klinikailag teljesen megegyezik az FSHD1 típussal, de nem mutatható ki a D4Z4-ismétlődések kontrakciója.

Módszerek

A betegek klinikai vizsgálata

A betegek és hozzátartozóinak klinikai vizsgálata az európai uniós normáknak, a Humán genetikai 2008. évi XXI. törvény előírásainak, valamint a European Molecular Genetic Quality Network (EMQN) útmutatásainak megfelelően történt a Semmelweis Egyetem Neurológiai Klinikán, a Heim Pál Gyermekkorházban, illetve az ország számos más egészségügyi intézményében.

A vizsgált betegek demográfiai eredményeit az Eredmények fejezetben tüntettük fel, mivel azokat a talált genetikai eredményekkel korreláltattuk. A genetikai vizsgálatba betegeink írásos beleegyezésüket adták. A vizsgálatok a helsinki deklaráció szabályozásának megfelelően történtek.

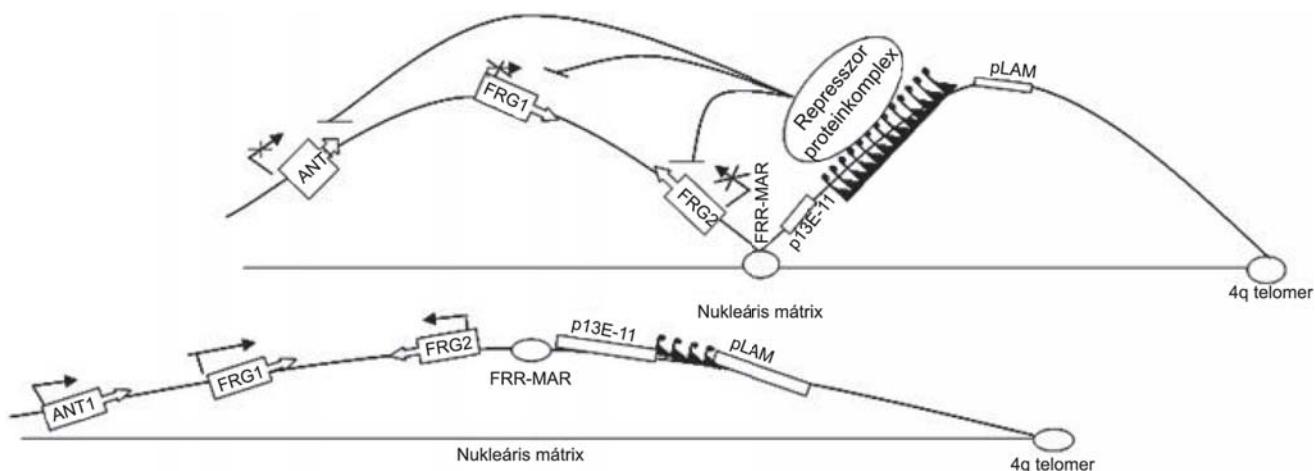
Molekuláris genetikai vizsgálatok

DNS-izolálás

Genomiális DNS-izolálás a perifériás vér lymphocytakultúrájából kisózas módszerrel történt. A kicsapott és tisztított DNS-t TE^{-4} (Tris-EDTA) pufferben oldjuk fel és tároljuk [18].

Southern blot analízisek

Az FSHD-betegség molekuláris genetikai analízisét klasszikus Southern blot technikával végezzük [19], a D4Z4-ismétlődések kontrakciójának, a qA és qB allélokak, valamint a G/C SNP és a D4Z4-ismétlődések metilációs állapotának vizsgálatára is.



3. ábra | A szomszédos gének cisz- és transzszabályozásának szerepe az FSHD-betegségben (A. Petrov alapján)

A felső képen a normális 4q telomer régió nukleáris mátrix organizációjának bemutatása látható. A D4Z4-ismétlődések (fekete háromszögek) és a szomszédos gének (FRG2, FRG1, ANTI1) két különálló DNS-hurokban helyezkednek el. A két hurok között található az FRR-MAR régió (FSHD-related region-matrix attached regions), amellyel a nukleáris mátrixhoz kapcsolódik, ezzel mintegy kihorgonyozva a DNS-t. A D4Z4-ismétlődések metilált állapotban vannak, amely egy transzkripció inaktív állapotot eredményez, valamint a két különálló hurokban elhelyezkedő D4Z4-ismétlődések és a szomszédos gének fizikailag is elkülönülnek, így együttes hatásként a szomszédos gének represszált állapotban vannak. Az alsó képen az FSHD-val érintett betegek esetében a D4Z4-ismétlődések és a szomszédos gének egy DNS-hurokban helyezkednek el, mert a D4Z4-ismétlődés kontrakciójából adódóan az FRR-MAR régió nem rögzül a nukleáris mátrixhoz, valamint a D4Z4-ismétlődések hipometilált állapota egy transzkripcióban aktív állapotot eredményez, így a szomszédos gének upregulálódnak.

D4Z4 makroszatellita-ismétlődések kontrakciós analízise

5 µg genomiális DNS-t restrikciós endonukleáz enzimmal emésztünk két párhuzamos vizsgálattal; az egyik emésztést EcoRI enzimmal, a másik vizsgálatot EcoRI és BlnI enzimmal végezzük egy éjszakán át. A mintákat 0,5% gélen futtatjuk 40 V feszültségen 36 órán keresztül. Kapilláriselven alapuló Southern blot analízist végzünk, amelyet 32P-dCTP radioaktívan jelölt speciális p13-E11 genomiális DNS-próbával hibridizálunk. A hibridizálás munkalépést a speciálisan erre a folyamatra kialakított kamrában (Techne Hybridiser HB-1D) és hibridizálóelegyben végezzük 16 órán keresztül, 65 °C-on. A radioaktívan jelölt minták gyors megjelenítését a hibridizálás után közvetlenül a Packard Instant Imager készülékkel végezzük, majd ezt követi a Kodak X-Omat filmmel ötnapos, -100 °C-on történő exponálás, a fragmentek finomabb megjelenítése céljából (4. ábra).

A 4qA és 4qB allélok analízise

Ennek a vizsgálatnak a lépései megegyeznek a fent leírt D4Z4 makroszatellita-ismétlődések kontrakciós vizsgálatával; az egyetlen eltérés, hogy a hibridizáláshoz speciálisan a 4qA és 4qB allél disztális szekvenciájához kötődő úgynevezett qA és qB DNS-próbát használunk.

A G/C SNP-analízis és dózisteszt

G/C SNP-analízis: 5 µg genomiális DNS-t PvuII és BlnI restrikciós endonukleáz enzimmal emésztünk egy éjszakán át. A mintákat 0,6%-os gélen futattuk 40 V feszültségen 16 órán keresztül, majd Southern blot

analízist végzünk, amelyet 32P-dCTP radioaktívan jelölt speciális p13-E11 DNS-próbával hibridizálunk.

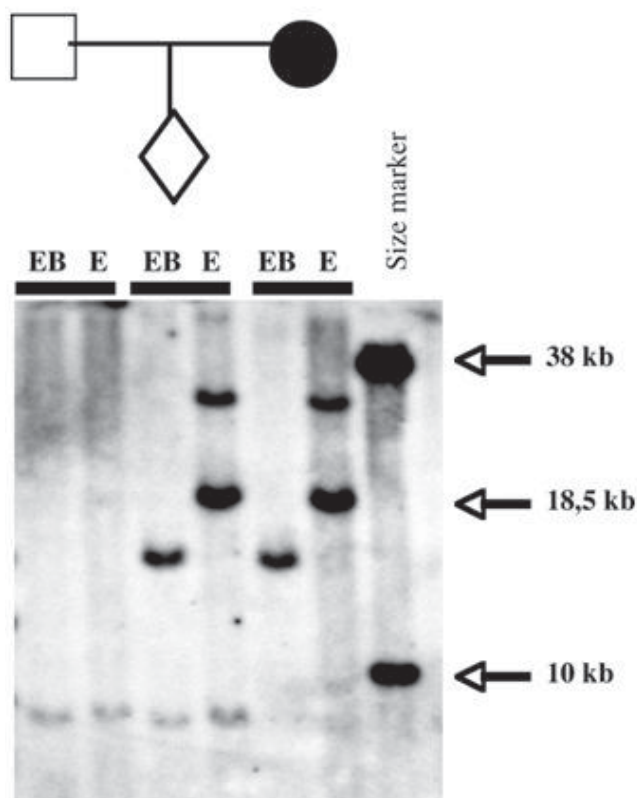
Dózisteszt: A 4 µg genomiális DNS-t két restrikciós endonukleáz enzimmal emésztünk egyszerre; BglII/BlnI enzimmal egy éjszakán át. A mintákat 0,8%-os gélen futtatjuk 40 V feszültségen 16 órán keresztül, majd Southern blot analízist végzünk, amelyet 32P-dCTP radioaktívan jelölt speciális p13-E11 DNS-próbával hibridizálunk. A kvantitatív kiértékelés a kapott jelintenzitás alapján Packard Instant Imager készülékkel történik.

A D4Z4-ismétlődések metilációs állapotának vizsgálata

A 4 µg genomiális DNS-t restrikciós endonukleáz enzimmal emésztünk két párhuzamos vizsgálattal; az egyik emésztést EcoRI és BglII enzimmal, a másikat EcoRI és BlnI enzimmal végezzük egy éjszakán át. Precipitáljuk az emésztett DNS-t és tisztítjuk a csapadékot, majd metilációérzékeny FseI és BsaI restrikciós enzimekkel újabb emésztést végzünk. A mintákat 0,6%-os gélen futtatjuk 40 V feszültségen 16 órán keresztül. Kapilláriselven alapuló Southern blot analízist végzünk, amelyet 32P-dCTP radioaktívan jelölt speciális p13-E11 DNS-próbával hibridizálunk. A hibridizálás 16 órán keresztül, 65 °C-on történik. A hibridizálás után az eredmények kiértékelését a fent említett kvantitatív módon végezzük.

Eredmények

A molekuláris vizsgálatokat mindig a D4Z4 makroszatellita kontrakciójának analízisével kezdjük. Akkor te



4. ábra

Magzati vizsgálat Southern blot analízissel

A Southern blot képen egy FSHD-betegséggel érintett nő, férjének és magzatuknak a genetikai vizsgálata látható. A DNS-mintáknál kettős emésztést végeztünk EcoRI (E) és EcoRI/BlnI (EB) restriktív enzimmekkel. A beteg nő esetében a EcoRI fragmentméret 18,5 kb-nak felelt meg; ezzel igazolódott az FSHD-betegsége. Magzatánál is patológias fragmentméretet detektáltunk (18,5 kb), amelyet az édesanyától örökölt. Az egészséges édesapa mintájában nem detektáltunk <35 kb-nál kisebb EcoRI fragmentet

kintjük genetikailag igazoltnak az FSHD-betegséget, ha az EcoRI-emésztés fragmentje 38 kb érték alatt detektálható, míg az ennél nagyobb méretű fragmentek esetében elvethető az FSHD-betegség fennállása. A BlnI-emésztéssel a 4. kromoszóma eredetű D4Z4-ismétlődéseket jelölő fragment 3 kb-sal rövidebb méretű, mint az EcoRI-emésztésnél detektált fragment. Ennek az a magyarázata, hogy a 4. kromoszóma szubtelomerikus régiója csak egy BlnI-emésztési helyet tartalmaz (úgynevezett BlnI-rezisztens fragment), amely közvetlenül a p13-E11 DNS-próba bekötődési helye előtt helyezkedik el, az EcoRI-hasító hely után 3 kb távolságra. Ugyanakkor a 10. kromoszóma eredetű D4Z4-ismétlődés mindegyike tartalmaz egy BlnI-hasító helyet (úgynevezett BlnI-szenzitív fragment). Ezért abban az esetben, ha a BlnI-emésztésnél nem detektálunk egy, az EcoRI-fragmentnél 3 kb-sal rövidebb DNS-szakaszt, azaz a teljes EcoRI-fragment elemesztődik, akkor feltételezzük, hogy a megrövidült EcoRI-fragment 10q eredetű. Ugyanakkor további analízis szükséges az esetleges transzlokációs események kivizsgálása céljából. A 10. kromoszóma eredetű D4Z4-ismétlődések túlsúlya FSHD-fenotípust eredményez, mivel ebben az esetben az egyik megrövidült repeat régió a 4. kromoszóma telomer régiójában helyezkedik el és ott patogén hatást fejt ki. Ugyanakkor a 4. kromoszóma eredetű ismétlődések túlsúlya nem eredményez FSHD-fenotípust (1. ábra).

1. táblázat | Az FSHD-betegség tüneteinek kezdete és a patogén EcoRI fragmentum mérete közötti összefüggés

Igazolt FSHD-betegek száma összesen	Patogén EcoRI fragmentméret és a tünetek kezdete	D4Z4 makroszatellitaismétlődés száma
2 fő	8,2 kb (7 évesen)	1
4 fő	11,6 kb (8–18 éves korban)	2
7 fő	14,9 kb (10–28 éves korban)	3
35 fő	18,2 kb (20–54 éves korban)	4
34 fő	21,5 (20–25 éves korban)	5
14 fő	24,8 (19–60 éves korban)	6
6 fő	28,1 kb (35–37 éves korban)	7
4 fő	31,7 kb (40–52 éves korban)	8
7 fő	34,7 kb (38–58 éves korban)	9
2 fő	38 kb (41–60 éves korban)	10

Eddig összesen 185, klinikailag FSHD-beteg molekuláris genetikai vizsgálatát végeztük el és 115 betegnél igazoltuk a D4Z4-ismétlődés kontrakcióját. Megvizsgáltunk továbbá 71 tünetmentes hozzátartozót is, és öt esetben kimutattuk a D4Z4-ismétlődések kontrakcióját. Nyolc, FSHD-betegséggel diagnosztizált családnak ajánlottuk fel a magzati vizsgálat lehetőségét a folyamatban lévő terhességben és végeztük el a D4Z4-ismétlődés kontrakcióanalízisét. Négy magzati mintában mutattuk ki a patogén EcoRI- és BlnI-fragmentméretet. Ezekben a terhességekben a szülők a megszületés mellett döntöttek, genetikai tanácsadást követően.

A megvizsgált és igazoltan FSHD-betegek nemi megoszlása 55 nő és 60 férfi, az átlagéletkoruk 37,9 év volt. A D4Z4-ismétlődések kontrakciójának csökkenése és a tünetek kezdete között összefüggés mutatható ki: a gyermek- vagy fiatal felnőttkorban kezdődő és nagy klinikai változatosságot mutató betegek patogén fragmentmérete 10 és 20 kb közé esett, és az előforduló leggyakoribb patogén fragmentméretet a 18,2 és 21,5 kb volt. Összesen 46 esetben igazoltunk 10 és 20 kb közötti patogén fragmentméretet. Egy monozigotikus ikerpárnál igazoltunk egyetlen D4Z4-ismétlődés meglétét, 8,3 kb patogén fragmentmérettel, valamint nagyon súlyos fenotípussal. Ebben az esetben a mutáció de novo esemény volt. További 67 FSHD-betegben 20–35 kb közötti patogén fragmentméretet detektáltunk; a leggyakoribb patogén fragmentméretet a 21,5 és 24,8 kb volt. Erre a csoportra jellemző, hogy a tünetek felnőttkorban és általában az arcizomzat érintettségével kezdődnek. A fenotípus változatosságot mutat, de a tünetek általában enyhék vagy közepesen súlyosak (1. táblázat).

2. táblázat | A 4q35 és 10q26 régiók között kialakuló kromoszómaszakasz-kicserélődés megoszlása az FSHD-betegekben, illetve családtagjaikban, a BglII/BlnI dóziszteszt alapján

	Tetraszómia 4 krm.:10krm. 4:0	Triszómia 4krm.:10krm. 3:1	Diszómia 4krm.:10 krm. 2:2	Monoszómia 4krm.:10krm. 1:3	Nullszómia 4 krm.:10 krm. 0:4
FSHD-betegek (52)	4%	10%	72%	8%	0
Hozzá tartozók (64)	1,50%	3%	74%	20%	1,50%

Az FSHD-betegség mindig az úgynevezett qA alléllal asszociál, míg a qB allélon kimutatott D4Z4-ismétlődés kontrakciója nem okoz FSHD-fenotípust. A qA és qB allél analízisét 115 betegnél végeztük el, akiknél igazoltuk előzetes vizsgálattal a D4Z4-ismétlődés kontrakcióját. A kontrakció és az FSHD kórkép minden esetben a qA alléllal asszociált. A transzlokációs események kimutatását és a 4. és 10. kromoszóma eredetű D4Z4-ismétlődések arányának meghatározását kétféle vizsgálati módszerrel is elvégeztük. A 2002-ben bevezetett dózisztesztet alkalmaztuk először a 4. és 10. eredetű D4Z4-ismétlődések arányának kimutatására, amely alapja, hogy a 10. kromoszóma eredetű proximális D4Z4-ismétlődés tartalmaz egy BlnI-hasító helyet, míg a 4. kromoszóma eredetű proximális D4Z4-ismétlődés nem tartalmaz ilyet. A BglII/BlnI emésztést követően, a p13-E11 próbával detektált fragmentméretet a 4. kromoszóma eredetű D4Z4-ismétlődés esetén 4061 bp, míg a 10. kromoszóma eredetű D4Z4-ismétlődés esetén a BlnI-hasító hely megléte miatt 1774 bp méretűre csökken. Az analízis során a kéttípusú D4Z4-ismétlődések könnyen megkülönböztethetőek, és a két sáv jelintenzitásából meghatározható a 4. és 10. kromoszóma eredetű D4Z4-ismétlődések aránya. 52 FSHD-betegnél végeztük el a dózisztesztet, és 72%-ban (35 betegben) diszómias státust (4. kromoszóma:10. kromoszóma arány → 2:2) igazoltunk, triszómia státust (4. kromoszóma:10. kromoszóma arány → 3:1) 10%-ban (öt betegben), tetraszómia státust (4. kromoszóma:10. kromoszóma arány → 4:0) 4%-ban (két betegben), monoszómia státust (4. kromoszóma:10. kromoszóma arány → 1:3) 8%-ban (öt betegben) és nullszómia státust (4. kromoszóma:10. kromoszóma arány → 0:4) a vizsgált FSHD-betegek közül egyik esetben sem igazoltunk. A dóziszteszt-analízissel öt FSHD-betegnél (10%) mutattuk ki a D4Z4-ismétlődések deletióját, amelynél a 4. kromoszóma:10. kromoszóma arányának vizsgálatakor 1:2 értéket mérünk. További vizsgálatokat végeztünk az egészséges hozzátartozók mintáiban (összesen 64 fő) a 4. kromoszóma és 10. kromoszóma eredetű D4Z4-ismétlődések arányának meghatározására. A legnagyobb gyakorisággal, 74%-ban a diszómia állapotot igazoltuk, míg triszómiát 3%-ban, tetraszómiát 1,5%-ban, monoszómiát 20%-ban és nullszómiát 1,5%-ban mutattunk ki (2. táblázat).

A D4Z4 SNP-analízissel az első (proximális) D4Z4-ismétlődést vizsgáljuk, a PvuII-polimorfizmusra nézve.

3. táblázat | A 4q35 és 10q26 régiók közötti transzlokáció vizsgálata a D4Z4-ismétlődés PvuII G/C SNP-analízise alapján FSHD-betegekben

4qG	4qC	10q	Arány
2	0	2	58%
1	1	2	17%
1	0	3	6,50%
2	2	0	2,50%
2	1	1	9,50%
1	2	1	5,20%
3	1	0	1,30%

Az analízissel pontosan meghatározható az úgynevezett G/C SNP, azaz egy nukleotidpolimorfizmus. Ha a 4. kromoszóma eredetű proximális D4Z4-ismétlődés hordozza a PvuII-polimorfizmust, akkor egy 2849 bp méretű fragmentet detektálunk (C allél), ha nincs PvuII-polimorfizmus, akkor nem hasít az enzim és egy 4559 bp fragmentet detektálunk (G allél). Minden esetben láthatók a 10. kromoszóma eredetű D4Z4-ismétlődések is, amelyek 2464 bp méretnél detektálható fragmentként azonosíthatók. Tehát az egyes fragmentek jelintenzitásából következtethetünk a 4. és 10. kromoszóma eredetű D4Z4-ismétlődések arányára is, így kiváltható a korábban említett klasszikus dóziszteszt. Eddig 76 igazolt FSHD-betegnél végeztük el a G/C SNP-analízist; minden esetben az FSHD-fenotípussal a G allél jelenléte igazolódott, valamint összehasonlítva a 4. és 10. kromoszóma eredetű D4Z4-ismétlődések arányát, 75% gyakorisággal 2:2, 14,7%-ban 3:1, 6,5%-ban 1:3 és 3,8%-ban 4:0 arányt igazoltunk (3. táblázat).

A D4Z4-ismétlődések metilációs vizsgálatát 31 igazolt FSHD-betegben végeztük el és minden betegnél hipometilált állapotot igazoltunk. A metiláció szenzitív FseI-emésztéssel egy 3387 bp, míg a BsaI enzimmal egy 3031 bp méretű fragmentet detektáltunk, amely csak a 4. kromoszóma eredetű D4Z4-ismétlődéseket jellemzi. Minden vizsgálatnál elvégezzük a negatív kontrollminta analízisét is, és az FseI és BsaI fragmentek jelintenzitását lemérjük Packard Instant Imager készülékkel. A negatív kontrollminta FseI és BsaI fragmentjeinek összesített jelintenzitását 100%-osnak vesszük és ehhez viszonyítjuk a vizsgált beteg mintáit. A detektált FseI- és BsaI-fragmentek jelintenzitásából következtethetünk a metilációs állapotra.

Megbeszélés

Az FSHD-betegség molekuláris genetikai diagnózisa gyorsan fejlődött, miután a betegségért felelős locus feltérképezték. Mind a D4Z4-ismétlődések kontrakciója, mind pedig a 4q35 és 10q26 homológ kromoszómaszakkaszok átrendeződése, a qA allél és a G SNP jelenléte, valamint a 4qA161 haplotípus és a hipometilált állapot fontos tényezők az FSHD-fenotípus kialakításában. Az FSHD-betegség kutatásával egyértelművé vált, hogy a beteg fenotípus kialakításában komplex epigenetikai tényezők is szerepet játszanak. Célkitűzésünk volt, hogy olyan diagnosztikai panelt vezessünk be az FSHD differenciáldiagnózisában, amely viszonylag gyors, költséghatékony és legfőképpen megbízható eredményt nyújt. Ezért vezettük be először a D4Z4-ismétlődések kontrakciójának vizsgálatát, amely mind a familiáris, mind pedig a sporadikus esetekben alkalmasnak bizonyult a pontos diagnózis megadásához. A molekuláris genetikai diagnosztikát nehezíti, hogy a szubtelomerikus D4Z4-ismétlődések kicserélődhetnek a 4q35- és 10q26-régiók között. Ennek a problémának a megoldására először az úgynevezett dózistesztet, majd később a G/C SNP-analízist vezettük be. Mind a két esetben lehetőség van a 4. és 10. kromoszóma eredetű D4Z4-ismétlődések arányának kimutatására. Az FSHD-fenotípus csak a 4q35-régióban elhelyezkedő D4Z4-ismétlődések számának csökkenésével asszociál, amely úgy is bekövetkezhet, ha a 4. kromoszómára 10. kromoszóma eredetű D4Z4-ismétlődések transzlokálódnak. Ez a transzlokáció mutatható ki a dózis-, illetve G/C SNP-analízissel (4. kromoszóma:10. kromoszóma arány 1:3 lehet). A vizsgált magyar FSHD-populációban a leggyakoribb 4qG:4qC:10q arány a G/C SNP-analízis alapján 58%-ban 2:0:2 volt, és a többi eloszlás is megfelelt a hollandiai vizsgálatokban tapasztalt értékeknek [11] (I. táblázat). A másik célkitűzésünk az epigenetikai faktorok vizsgálatának bevezetése, amelyet a D4Z4 ismétlődésének metilációs vizsgálatával valósítottunk meg. A metilációs vizsgálatok szükségességét igazolja, hogy a legújabb kutatások szerint az FSHD2-betegeknél a 4q35 D4Z4-ismétlődések kontrakciója nem igazolható, viszont a hipometilált állapot igen [20]. A D4Z4 kontrakciós analízis során negatívnak bizonyult betegek esetében, akiket a klinikus tipikus FSHD-fenotípussal jellemez, minden esetben szükséges lehet a metilációs vizsgálat elvégzése a 4q35-régióban.

A négy bevezetett molekuláris genetikai vizsgálattal sikerült pontos, megbízható diagnózist adni az FSHD-betegséggel érintett családokban. Mivel Magyarországon egyetlen laboratóriumként végezzük a betegség genetikai diagnosztikáját, minden, klinikailag FSHD-beteg mintája hozzánk érkezik 2000 óta. Az igazolt FSHD-s családoknak felajánlható a praenatalis analízis is, amellyel az ismétlődési kockázat csökkenthető ebben a súlyos betegségben. A patogén fragment méretének ismeretében becslés adható a várható fenotípus és a be-

tegség progressziójára vonatkozóan is. A genotípus-fenotípus korreláció alapos vizsgálata nemcsak a patomechanizmus feltárásában nyújthat segítséget. A betegek klinikai és pontos genetikai adatainak adatbázisban való rögzítése lehetőséget biztosíthat a fejlesztés alatt álló nemzetközi gyógyszeres terápiás kipróbálásokban való részvételre is. Mindez elérhetővé válik a magyar FSHD-betegek számára is.

Köszönetnyilvánítás

Az FSHD-betegek klinikai kivizsgálásáért, illetve vérmintájuk küldéséért köszönetet mondunk dr. Tihanyi Mariannak, dr. Almássy Zsuzsának, dr. Bereznai Benjáminnak, dr. Diószeghy Péternek, dr. Tégzes Andreának és dr. Horváth Ritának. Szeretnénk továbbá köszönetünket kifejezni Gönczi Józsefnek, Czimbalmos Andrásné és Gogolák Ferencné szakasszisztenseknek a diagnosztikai munkában nyújtott segítségükért.

Dr. Molnár Mária Judit munkáját a TÁMOP-4-2-1/B-03/1/KMR-2010-001 projekt támogatta.

Irodalom

- [1] Lunt, P. W., Harper, P. S.: Genetic counselling in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *J. Med. Genet.*, 1991, 28, 655–664.
- [2] Van der Maarel, S., Frants, R. R.: The D4Z4 repeat-mediated pathogenesis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.*, 2005, 76, 375–386.
- [3] Pearson, C. E.: FSHD: A repeat contraction disease finally ready to expand (our understanding of its pathogenesis). *PLoS Genet.*, 2010, 6, e1001180.
- [4] Bakker, E., Wijmenga, C., Vossen, R. H. és mtsai: The FSHD-linked locus D4F104S1 (p13E-11) on 4q35 has a homologue on 10qter. *Muscle Nerve*, 1995, 2, S39–S44.
- [5] Gabellini, D., Green, M. R., Tupler, R.: Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell*, 2002, 110, 339–348.
- [6] Van Overveld, P. G., Lemmers, R. J., Sandkuijl, L. A. és mtsai: Hypomethylation of D4Z4 in 4q-linked and non-4q-linked facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat. Genet.*, 2003, 35, 315–317.
- [7] Deidda, G., Cacurri, S., Grisanti, P. és mtsai: Physical mapping evidence for a duplicated region on chromosome 10qter showing high homology with the facioscapulohumeral muscular dystrophy locus on chromosome 4qter. *Eur. J. Hum. Genet.*, 1995, 3, 155–167.
- [8] Tupler, R., Perini, G., Pellegrino, M. A. és mtsai: Profound misregulation of muscle-specific gene expression in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 12650–12654.
- [9] Bickmore, W. A., van der Maarel, S. M.: Perturbations of chromatin structure in human genetic disease: recent advances. *Hum. Mol. Genet.*, 2003, 12 (Suppl. 2), R207–R213.
- [10] Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. és mtsai: Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 2004, 429, 457–463.
- [11] Lemmers, R. J. L. F., Woblgemuth, M., van der Gaag, K. J. és mtsai: Specific sequence variations with in the 4q35 region are associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.*, 2007, 81, 884–894.
- [12] Petrov, A., Allinme, J., Pirozchkova, I. és mtsai: A nuclear matrix attachment site in the 4q35 locus has an enhancer-blocking activity in vivo: Implications for the facio-scapulo-humeral dystrophy. *Genome Res.*, 2008, 18, 39–45.

- [13] Kowaljon, V., Marcowycz, A., Anseau, E. és mtsai: The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein. *Neuromusc. Disord.*, 2007, 17, 611–623.
- [14] Hewitt, J. E., Lyle, R., Clark, L. N. és mtsai: Analysis of the tandem repeat locus D4Z4 associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, 1994, 3, 1287–1295.
- [15] Gabellini, D., Green, M. R., Tupler, R.: Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell*, 2002, 110, 339–348.
- [16] Petrov, A., Pirozhkova, I., Carnac, G. és mtsai: Chromatin loop domain organization within the 4q35 locus in facioscapulohumeral dystrophy patients versus normal human myoblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103, 6982–6987.
- [17] Robertson, K. D.: DNA methylation and human disease. *Nat. Rev. Genet.*, 2005, 6, 597–610.
- [18] Ohyama, K., Gamborg, O. L., Miller, R. A.: Isolation and properties of deoxyribonucleic acid from protoplasts of cell suspension cultures of *Ammi visnaga* and carrot (*Daucus carota*). *Plant Physiol.*, 1972, 50, 319–321.
- [19] Sambrook, J., Russel, D. W.: *Molecular cloning, a laboratory manual*. 3rd edition, Cold Spring Harbor laboratory Press, New York, 2001.
- [20] Filipova, G. N.: Genetics and epigenetics of the multifunctional protein CTCF. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 2008, 80, 337–360.

(Karcagi Veronika dr.,
Budapest, Gyáli út 2–6., 1096
e-mail: karcagi.veronika@oki.antsz.hu)

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola

A Semmelweis Egyetem Doktori Iskolájában az orvostudomány, társadalomtudomány és természettudomány területén folyik szervezett PhD-képzés. Alapítása óta, az 1990-es évek elejétől a PhD-hallgatók létszáma és az évente kiadott PhD-diplomák száma évről évre növekszik; 2010 novemberéig összesen 1286 hallgató szerzett PhD fokozatot, és a 2011/2012-es tanévben több mint 400 PhD-hallgató vesz részt a képzésben. A külföldi hallgatók létszáma is folyamatosan bővül, jelenleg az angol nyelvű képzésben részt vevő PhD-hallgatók a létszám 13%-át teszik ki.

A PhD-hallgatók magas színvonalú képzésének és kutatómunkájának legfontosabb biztosítója, hogy a képzésben részt vevő professzorok, oktatók és témavezetők tudományterületük elismert személyiségei. Az egyetem és más intézetek szakmai kiválóságainak bevonása a PhD-képzésbe a kezdetektől fontos szerepet játszik a Semmelweis Egyetemen megszerzett PhD-diploma elismertségének és értékének megőrzésében.

Tudományági Doktori Iskolák

1. Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola
2. Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
3. Gyógyszertudományok Doktori Iskola
4. Mentális Egészségtudományok Doktori Iskola
5. Sporttudományok Doktori Iskola
6. Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola
7. Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola
8. Patológiai Tudományok Doktori Iskola

Képzési program

A PhD-hallgatók témavezetőik közvetlen irányítása mellett, ún. „egy hallgató – egy tutor” rendszerben végzik munkájukat, és tudományterületük mélyebb ismereteit kurzusokon sajátítják el. A kutatási témában végzett munka eredményei egyben a PhD-értekezés alapjául szolgálnak. A képzés a fokozatszerzési szakasszal zárul, melynek része a doktori szigorlat, a doktori értekezés elkészítése és annak nyilvános megvédése. A doktori értekezéseket a védés előtt a Doktori Iskola saját honlapján is nyilvánossá teszi: <http://phd.sote.hu/hu/>.

PhD-értekezések, -publikációk

A PhD-értekezések tudományos színvonalát és értékét a tudományterületek kiemelten fontos kérdéseire kapcsolódó kutatási témák és a magas színvonalú publikációs követelmények biztosítják. A sikeresen megvédett doktori értekezések összefoglalóját és a legfontosabb tudományos közleményeket a Doktori Iskola Almanac kötetekben publikálja, melyek a <http://phd.sote.hu/hu/> honlapon is elérhetők. A 2010/2011-es tanévtől a PhD-hallgatók a Semmelweis Kutatóegyetem keretében részt vesznek az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával elnyert pályázati projekt megvalósításában.



TÁMOP 4.2.1.B-09/1/KMR-2010-0001