

# Molekularna analiza gena *MECP2* u bolesnica sa sindromom Rett

Ivona Sansović, Katja Dumić Kubat, Ingeborg Barišić\*

*Mutacije u genu MECP2, smještenom na kromosomu Xq28, uzrokuju Rettov sindrom, najčešći uzrok intelektualnih poteškoća u žena. Uz klasični oblik, mutacije u ovom genu kod ženske djece mogu uzrokovati atipični Rettov sindrom te blage poteškoće u učenju. Do danas je otkriveno više od 390 patogenih mutacija, a 8 najčešćih čini više od 50% svih mutacija. C-terminalna domena gena je sklona malim delecijama (20-100 pb) koje čine oko 7% patogenih mutacija. Pronađene su i velike delecije (kilobazne veličine) koje brišu cijele egzone, a nalazimo ih u 8% bolesnica s klasičnim i u 3% s atipičnim Rettovim sindromom. Cilj je prikazati novije strategije molekularnog testiranja gena MECP2 u bolesnica sa sumnjom na Rettov sindrom. Dvosmjerno sekvenciranje cijele kodirajuće regije gena MECP2 detektira mutacije koje uzrokuju bolest u ~80% bolesnika s klasičnim Rettovim sindromom. Česte mutacije u egzonima 3 i 4 gena MECP2 ispituju se tehnikama probira osnovanim na PCR-u i sekvenciranjem, a kvantitativnim tehnikama, poput metode višestrukog umnažanja vezanih sonda, testiraju se veliki rearanžmani. Spektar fenotipova s mutacijama u genu MECP2, osim klasičnog i atipičnog Rettovog sindroma, obuhvaća i druge neurološke poremećaje, a u manjem dijelu bolesnika s Rettovim sindromom ne nalazimo mutacije u genu MECP2. Stoga otkrivanje mutacije u MECP2 može potvrditi kliničku dijagnozu, ali je ne može u potpunosti isključiti. Molekularno testiranje pogotovo je važno u razjašnjavanju dijagnoze atipičnih oblika. Strategija molekularnog ispitivanja Rettovog sindroma: 1. sekvenciranje kodirajuće regije gena MECP2, 2. testiranje nekodirajuće regije MECP2, 3. probir na velike rearanžmane MECP2 i 4. testiranje gena CDKL5 i FOXP1 uključenih u inačice Rettovog sindroma.*

**Ključne riječi:** Rettov sindrom; *MECP2*; mutacije; delecije

## UVOD

Klasični Rettov sindrom (RTT, MIM 312750) progresivan je neurološki poremećaj koji zahvaća poglavito žensku djecu. Nasljeđuje se X dominantno. Obilježava ga normalni porođaj i naizgled uredan psihomotorni razvoj u prvih 6-18 mjeseci života. Djevojčice tada ulaze u kratko razdoblje razvojne stagnacije praćeno brzom regresijom u govornim i motornim vještinama. Glavno obilježje bolesti je gubitak svrhovite uporabe ruke i pojava stereotipnih repetitivnih kretnji. Uz to u dobi od 18-24 mjeseca života često se javljaju napadaji vrisanja i neutješnog plakanja. Ostala obilježja sindroma su simptomi pervazivnog razvojnog poremećaja, napadaji slični panici, bruksizam, epizode apneja i/ili hiperpneja, ataksija i apraksija u hodu, tremor i smanjenje opsega glave koja je u ranom dojenačkom razdoblju normalno rasla. Nakon razdoblja brzog pogoršanja bolest se stabilizira, ali će se kod djevojčica s vremenom razviti distonija i deformacije ruku i stopala (1). Konvulzivni napadaji se javljaju u 90% ženske

djece s RTT-om; generalizirani klonično-tonični napadaji i parcijalno kompleksni napadaji su najčešći (2). Napadaji se češće javljaju kad se bolest stabilizira. Ženska djeca s Rettovim sindromom obično prežive do zrele dobi, ali incidencija nagle i neobjašnjive smrti je značajno viša nego kod kontrola iste dobi (3).

U oko 99,5% slučajeva javljanje RTT-a je sporadično. Sporadični slučajevi rezultiraju ili iz *de novo* mutacija u genu *MECP2* na kromosomskom lokusu Xq28 kod djece s RTT-om ili od

\* Referentni centar Ministarstva zdravlja RH za praćenje kongenitalnih anomalija, Klinika za pedijatriju Klinike za dječje bolesti Zagreb Medicinskog fakulteta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

### Adresa za dopisivanje:

Dr. sc. Ivona Sansović, Referentni centar Ministarstva zdravlja i socijalne skrbi RH za praćenje kongenitalnih anomalija, Klinika za pedijatriju, Klinika za dječje bolesti Zagreb, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Klaićeva 16, 10 000 Zagreb, Hrvatska, E-mail: ivona.sansovic@kdb.hr

Primljeno/Received: 30. 9. 2013., Prihvaćeno/Accepted: 16. 10. 2013.

nasljeđivanja mutacije od roditelja koji ima somatski ili germinativni mozaicizam. Majka koja je nositeljica može imati povoljnu nasumičnu inaktivaciju X kromosoma koja rezultira samo blagim ili nikakvim očitovanjem bolesti. Kad se nađe da majka bolesne osobe ima *MECP2* mutaciju otkrivenu kod njenog bolesnog djeteta, rizik nasljeđivanja mutiranog *MECP2* alela za potomke je 50%. No ako i nije otkrivena patogena *MECP2* mutacija od probanda u leukocitima kod roditelja, mora se uzeti u obzir germinativni mozaicizam kod roditelja (4, 5).

Prevalencija klasičnog RTT-a kod ženske djece do 15. godine života je procijenjena na 1:8 500 (6).

Uočeno je da su *MECP2* mutacije prisutne i kod bolesnika s autizmom (7), blagim poteškoćama u učenju (8), klinički suspektim, ali molekulski nepotvrđenim Angelmanovim sindromom (9, 10) ili X-vezanim intelektualnim poteškoćama (11, 12), uključujući PPM-X sindrom i sindrom s duplikacijom *MECP2* (13-15). Nađeni su i muškarci koji ispunjavaju kliničke kriterije za RTT, a kod kojih je otkriven ili 47, XXY kariotip (16) ili postzigotna *MECP2* mutacija koja je rezultirala mozaicizmom (17). Muška djeca sa 46,XY kariotipom i *MECP2* mutacijom mogu patiti od teške neonatalne encefalopatije i obično umru prije druge godine života (4). Budući da se mutacije u genu *MECP2* ne vežu samo za RTT i da izostanak mutacije u *MECP2* ne znači odbacivanje kliničke dijagnoze RTT-a, predloženo je da se sva bolesna stanja kod osoba s kliničkom slikom i mutacijom u genu *MECP2* nazivaju *MECP2* srodni poremećaji. Tako spektar fenotipova u *MECP2* srodnih poremećaja kod ženskih osoba osim klasičnog RTT-a uključuje i njegove inačice te (rijetko) blage poteškoće s učenjem.

### Specifični oblici atipičnog RTT-a

Za dijagnozu atipičnog RTT-a osoba mora imati razdoblje regresije praćeno oporavkom ili stabilizacijom. To jasno razlikuje ove slučajeve od brojnih tvrdokornih degenerativnih stanja. Osobe također moraju imati najmanje dva od četiriju glavnih kriterija i pet od jedanaest suportivnih kriterija (tablica 1). Prepoznate su brojne specifično definirane inačice RTT-a s različitim kliničkim obilježjima. Hagberg i Gillberg (1993.) opisali su pet mogućih oblika atipičnog RTT-a (18), no prema revidiranim dijagnostičkim kriterijima iz 2010. godine (19) atipični RTT se svrstava u tri osnovna oblika: inačica s očuvanim govorom (20), kongenitalna inačica (21) i inačica s ranim konvulzijama (22). Inačica s očuvanim govorom je najbolje opisana, ima dobro definirana klinička obilježja, a mutacije u *MECP2* su otkrivene u većini slučajeva (23). Za razliku od nje kod kongenitalne i inačice s ranim konvulzijama mutacije u *MECP2* su samo rijetko nađene. No mutacije u genu *CDKL5* nađene su kod slučajeva inačice s ranim kon-

TABLICA 1. Revidirani dijagnostički kriteriji za Rettov sindrom (RTT), Neul i sur. (2010.) (19)

|                                                                                                                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Dijagnozu bi trebalo uzeti u obzir kada se uoči smanjeni postnatalni rast glave.                                                          |
| Potrebno za tipični ili klasični RTT                                                                                                      |
| 1. Razdoblje regresije praćeno oporavkom ili stabilizacijom                                                                               |
| 2. Svi glavni kriteriji i svi kriteriji za isključenje                                                                                    |
| 3. Suportivni kriteriji nisu potrebni, premda su često prisutni u tipičnom RTT                                                            |
| Potrebno za atipični RTT ili inačicu RTT-a                                                                                                |
| 1. Razdoblje regresije praćeno oporavkom ili stabilizacijom                                                                               |
| 2. Najmanje 2 od 4 glavnih kriterija                                                                                                      |
| 3. 5 od 11 suportivnih kriterija                                                                                                          |
| Glavni kriteriji                                                                                                                          |
| 1. Djelomičan ili potpuni gubitak savladane svrhovite uporabe ruke.                                                                       |
| 2. Djelomičan ili potpuni gubitak savladanog govorenog jezika                                                                             |
| 3. Abnormalnosti hoda: oštećenje (dispraksija) ili izostanak sposobnosti.                                                                 |
| 4. Stereotipne kretnje rukama kao što su zavrtnje/stiskanje, pljeskanje/tapšanje rukama, stavljanje u usta i automatizmi pranja/trljanja. |
| Kriteriji isključenja za tipični RTT                                                                                                      |
| 1. Povreda mozga nakon traume (peri- ili postnatalno), neurometaboličke bolesti ili teške infekcije koje uzrokuju neurološke probleme.    |
| 2. Uglavnom abnormalan psihomotorni razvoj u prvih 6 mjeseci života.                                                                      |
| Suportivni kriteriji za atipični RTT                                                                                                      |
| 1. Smetnje disanja u budnosti                                                                                                             |
| 2. Bruksizam u budnosti                                                                                                                   |
| 3. Poremećaj obrasca spavanja                                                                                                             |
| 4. Abnormalni tonus mišića                                                                                                                |
| 5. Periferni vazomotorni poremećaji                                                                                                       |
| 6. Skolioza/kifoza                                                                                                                        |
| 7. Retardacija rasta                                                                                                                      |
| 8. Male hladne šake i stopala                                                                                                             |
| 9. Neprimjereno sricanje uz smijanje/vrskanje                                                                                             |
| 10. Smanjen odgovor na bol                                                                                                                |
| 11. Izražena komunikacija očima - "pokazivanje očima"                                                                                     |

vulzijama (24), a mutacije u genu *FOXG1* u slučajevima kongenitalnog oblika (25).

### Građa i uloga proteina MeCP2

Smatra se da široko eksprimirani nuklearni protein MeCP2 (engl. *methyl-CpG-binding protein 2*) posreduje transkripcijsko utišavanje i epigenetsku regulaciju metilirane DNA preko njegove veze s 5-metilcitozin-bogatim heterokromatinom (26). Protein MeCP2 ima dvije glavne funkcijske domene; metil CpG-vezujuća domena (MBD) vezuje se za simetrično metilirane CpG dinukleotide; transkripcijsko represorska domena (TRD) stupa u interakciju s korepresor-

skim proteinima te oni zajedno pokreću histonske deacetilaze (26, 27). Kad se ostatci lizina histona jezgre H3 i H4 deacetiliraju, kromatin se kondenzira. Tada DNA postaje nepristupačna transkripcijskoj mašineriji, što ima za posljedicu da se geni u području DNA na koji se veže MeCP2 ne eksprimiraju. Represija ovisna o DNA metilaciji važna je za inaktivaciju X kromosoma (XCI) i upisanih gena. *Buschdorf & Stratling* (2004.) mapirali su domen u unutar MeCP2 koja je sposobna specifično se vezati na WW domene Skupine II. čimbenika prekranja (eng. *splicing factors*) formirajućeg proteina (FBP) 11 i HYPC. Područje vezanja WW domene Skupine II. smješteno je od ostatka 325 do C-terminalnog kraja, s interaktivnom prolinom bogatom sekvencom u središtu (28). C-terminalna domena dijeli homologiju s neuronsko specifičnim transkripcijskim čimbenicima. Ova regija također sadrži evolucijski konzervirane polihistidinske i poliprolinske regije koje mogu igrati ulogu u interakciji MeCP2 s nukleosomskom jezgrom (29).

MeCP2 se eksprimira u svim tkivima i početno se smatralo da djeluje kao globalni transkripcijski represor (26). No zbuđujući je da tako globalno eksprimirani gen daje predominantno neurološki fenotip. Tkivo mozga je možda ranjivije za prilagođavanje učinku MeCP2, ili postoje tkivno specifične razlike u razinama MeCP2 ekspresije. Naime, postoje alternativni transkripti koji se različito eksprimiraju u mozgu za vrijeme razvoja (30). Osim toga, postmitotska priroda neurona može ih činiti osjetljivijima na poremećeni učinak MeCP2. Danas se smatra da MeCP2 posreduje ekspresiju skupine specifičnih ciljnih gena u mozgu; postoje dokazi kako se MeCP2 specifično veže za određene DNA sljedove. Identificirano je nekoliko takvih ciljeva MeCP2: *Hairy2a*, *Bdnf* (engl. *brain derived neurotrophic factor*), *Dlx5* i *sgk*. (31-34). Nedavne studije na miševima dovele su do spoznaje da MeCP2 može biti i aktivator transkripcije (35). Također je nađeno da MeCP2 ima ulogu u prekranju (engl. *splicing*) gena (36) i u dalekosežnom remodeliranju kromatina (33), pa je moguće da poremećaji ove uloge mogu pridonijeti patofiziologiji povezanom s deficitom MeCP2.

Većina mutacija u *MECP2* javlja se *de novo* i smatra se da u većini slučajeva mutacija nastaje na očevom X kromosomu (37). Vodeća hipoteza drži da disfunkcija MeCP2, koja rezultira iz mutacija u MBD-u ili TRD-u, ometa osjetljivu preciznost ekspresije gena za vrijeme razvoja. Neke mutacije utječu na ostatke koji su važni za vezivanje DNA, dok druge mogu ometati nativnu strukturu proteina i/ili njegovu interakciju s drugim proteinima. Zabilježene besmislene mutacije (engl. *nonsense mutation*), mutacije pomaka okvira čitanja (engl. *frameshift mutation*) i mutacije prekranja (engl. *splicing mutation*), od kojih se većina nalazi distalno MBD-u, vjerojatno rezultiraju preuranjenim završetkom proteina. Tako skraćeni (okrnjeni) proteini još se mogu vezati za meti-

lirani DNA, ali nisu u mogućnosti stupiti u interakciju s korepresorom Sin3A; također je moguće da mutacije u karboksij terminalnom kraju proteina onemogućavaju DNA vezivanje (29). U svakom slučaju, kompleks za utišavanje neće biti pravilno sastavljen i ciljni geni ne mogu biti pravilno utišani.

### Normalne inačice gena *MECP2*

Gen *MECP2* sadrži četiri egzona, transkribirana od telomere prema centromeri. Gen ima dvije izoforme (transkripti) *MECP2\_e1* i *MECP2\_e2* koji nastaju alternativnim cijepanjem egzona 2 i uporabom dvaju različitih start kodona. Transkript *MECP2\_e1* je duži, kodira polipeptid od 498 aminokiselina i sastoji se od egzona 1, 3 i 4. On je dominantni oblik izražen u mozgu (30). Transkript *MECP2\_e2* kodira polipeptid od 486 aminokiselina i sastoji se od egzona 2, 3 i 4. Većina egzona 4 kodira neobično dugu (8.5 kb) 3' neprepisujuću regiju (engl. *untranslated region*, UTR); naizmjenična poliadenilacijska mjesta ovdje rezultiraju u različito eksprimiranim transkriptima različitih dužina, koji svi kodiraju protein jednake dužine.

### Patološke inačice gena *MECP2*

Mutacije u genu *MECP2* mogu biti mutacije krivog smisla (engl. *missense mutation*), besmislene mutacije, mutacije pomaka okvira čitanja, mutacije prekranja kao i velike delecije/rearanžmani. Iako su mutacije rasute preko cijelog gena, postoji jedna nakupina mutacija krivog smisla uglavnom u MBD-u i zadnjem dijelu TRD-u druga nakupina (skupina) besmislenih mutacija i mutacija s pomakom okvira čitanja nalazi se nizvodno od MBD-a, uglavnom u TRD-u. Većina *MECP2* mutacija otpada na mutacije krivog smisla i besmislene mutacije koje su uzrokovane C>T tranzicijama u osam CpG dinukleotida, tj. u CpG *vrućim točkama* (engl. *hotspot*). Do danas je otkriveno više od 390 patogenih mutacija, a više od 50% svih mutacija se nalazi u CpG *vrućim točkama*; R106W, R133C, T158M, R306C kao mutacije krivog smisla i R168X, R255X, R270X, R294X kao besmislene mutacije. C-terminalna domena je sklona malim delecijama (20-100 pb) koje leže u *vrućim točkama* i čine oko 7% patogenih mutacija (RettBASE; <http://mecp2.chw.edu.au/>). Nedavno su pronađene velike delecije (kilobazne veličine) koje brišu cijele egzone, u dijelu bolesnika za koje se prije smatralo da nemaju mutacije u genu *MECP2*. Takve delecije su češće kod klasičnog (8% slučajeva) nego atipičnog (3% slučajeva) RTT-a (38, 39).

### Povezanost genotipa s fenotipom

Analize povezanosti genotipa s fenotipom zasad su dale nedosljedne rezultate, ali općenito se može reći da mutacije

krivog smisla rezultiraju blažom kliničkom slikom nego mutacije koje skraćuju protein (engl. *truncating mutations*). Isto tako *truncating* mutacije smještene više prema 3' kraju kodirajuće sekvence proizvode blaži fenotip nego *truncating* mutacije smještene više prema 5' kraju kodirajuće sekvence (40). Nekoliko studija je utvrdilo da se klinička težina može dijelom predvidjeti na osnovi vrste mutacije (mutacije krivog smisla-*truncating* mutacije), njenog smještaja, pogotovo ako je smještena u funkcionalnoj domeni, i načina nasumične XCI (41, 42). Nasumična XCI može značajno utjecati na kliničku težinu poremećaja, tako da ista patogena mutacija u određenoj obitelji može rezultirati potpuno drukčijim fenotipom, a pojedine žene s povoljnom XCI-om uopće nemaju simptoma bolesti (40, 43). Korelaciju genotipa s fenotipom kompliciraju i varijacije ljestvice težine primijenjene u opisu fenotipa, ali se ovaj problem može riješiti ako su svi dosljedni u opisima kojima se služe.

### Ostali geni povezani s RTT-om

#### CDKL5

Gen *CDKL5* je također smješten na X kromosomu i kodira kinazu 5 ovisnu o ciklinu (engl. *cyclin-dependent kinase like 5*). Mutacije u ovom genu otkrivene su u osoba s fenotipom sličnom RTT-u. U početku su osobe s mutacijama u *CDKL5* opisivane kao inačica RTT-a s ranim početkom konvulzija, tzv. Hanefeld varijanta (24, 44). No čini se da su mutacije u *CDKL5* prisutne u samo malom dijelu osoba s fenotipom sličnom RTT-u. Osim toga, različiti klinički profil, uključujući blaža dismorfna obilježja, doveo je do prijedloga da se osobe s mutacijama u *CDKL5* razmatraju kao da imaju zaseban poremećaj, različit od RTT-a (45).

#### FOXG1

Mutacije u *FOXG1* povezane su s kongenitalnim oblikom RTT-a (25, 46). FoxG1 je transkripcijski čimbenik uključen u telencefalični razvoj koji promovira neurogenezu i antagonizira diferencijaciju neurona (47). Gen je prvi put povezan s RTT-om otkrićem mikrodelecija na njegovom lokusu na 14q12 (48). Otkriveno je devet slučajeva mikrodelecija te 20 točkastih mutacija, uglavnom kod osoba s kratkim normalnim razdobljem razvoja prije pojave regresije koja vodi teškom intelektualnom oštećenju, razvojem zaostajanja, postnatalnoj mikrocefaliji, konvulzijama, diskineziji i hipotoniji. Ova obilježja i slični izgled lica među osobama s mutacijama u *FOXG1* vodili su pretpostavci da ove osobe treba razmatrati u sklopu FOXG1 sindroma prije nego kao inačicu RTT-a (49).

Za razliku od *MECP2* i *CDKL5*, *FOXG1* je autosomni gen, pa mutacije s istom vjerojatnošću pogađaju muške i ženske osobe.

### DIJAGNOZA/TESTIRANJE

Dijagnoza RTT-a oslanja se na kliničkim dijagnostičkim kriterijima utvrđenim za klasični/atipični RTT i/ili molekularnom testiranju gena *MECP2*. Genetsko testiranje otkriva mutacije u oko 80-90% klasičnog RTT-a, tj. 40-50% slučajeva atipičnog RTT-a, a ostalo mogu biti mutacije u drugim regijama gena *MECP2* (regulatorni elementi i nekodirajuće regije) ili mutacije u drugim genima.

To se testiranje primjenjuje:

- za potvrdu dijagnoze kod bolesnika s klasičnim RTT-om ili s inačicama RTT-a, ali i
- kod žena s blagim poteškoćama u učenju, pojedinih slučajeva Angelmanovog sindroma, autizma, kod muških osoba s teškom neonatalnom encefalopatijom te sindromskim (PPM-X sindrom, sindrom s duplikacijom *MECP2*) ili nesindromskim X-vezanim intelektualnim poteškoćama,
- u prenatalnoj dijagnostici.

Dvosmjerno sekvenciranje cijele kodirajuće regije gena *MECP2* otkriva mutacije koje uzrokuju bolest u 70-90% bolesnika s klasičnim RTT-om te 40% bolesnika s onim atipičnim (<http://mecp2.chw.edu.au/>). Kliničko testiranje je moguće primjenom direktnog sekvenciranja ili kombinacijom jedne od metoda probira sa sekvenciranjem. Postoje brojne metode probira koje se mogu primijeniti prije samog sekvenciranja, npr. denaturirajuća tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *denaturing high performance liquid chromatography*, DHPLC) kao jedna od metoda analize heterodupleksa, ili polimorfizam konformacije jednolančane DNA (engl. *single-strand conformation polymorphism*, SSCP). Metoda koja ispituje polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (engl. *restriction fragment length polymorphism*) te lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) u stvarnom vremenu (engl. *real-time PCR*) primjenjuje se za ciljano testiranje poznatih mutacija. Velike preraspodjele (delecije i duplikacije kilobazne veličine) gena, koje se prethodnim metodama probira i Sangerovim sekvenciranjem osnovanim na PCR-u ne mogu otkriti, testiraju se kvantitativnim tehnikama kao što su kvantitativni PCR, PCR velikog dosega, a u novije vrijeme tehnikom višestrukog umnažanja vezanih sonda (engl. *multiplex ligation probe amplification*, MLPA) i analizom kromosoma na mikropostroju (engl. *chromosomal microarray*, CMA).

Preporučena strategija molekularnog testiranja uključuje:

1. Najprije testiranje mutacija u egzonima 3 i 4 primjenom tehnika probira osnovanih na PCR-u (uglavnom DHPLC) i sekvenciranja, jer se više od 90% mutacija nalazi u ovoj regiji, a zatim (ako se patogena mutacija ne nađe)

2. Molekularno testiranje egzona 1 i 2. Prema podacima iz najveće baze registriranih mutacija u RTT-u (RettBASE; <http://mecp2.chw.edu.au/>), nije otkrivena niti jedna patogene mutacija u egzonu 2, a mutacije u egzonu 1 rijetke su kod bolesnika s RTT-om (manje od 1% svih mutacija) (50).
3. Kod onih bolesnika kod kojih nisu nađene patogene mutacije u egzonima 1-4 preporuka je napraviti probir na velike delecije kvantitativnim tehnikama (npr. metodom MLPA primjenom komercijalnog kompleta sonde, MRC-Holland, Nizozemska). Smatra se da se velike delecije mogu naći u ~30% osoba s klasičnim RTT-om te u ~7% osoba s atipičnim RTT-om kod kojih se nisu našle mutacije sekvenciranjem (39).
4. Sve ostale ispitanike negativne na *MECP2* mutacije koji imaju kliničku dijagnozu RTT-a, a pogotovo ako imaju epileptičke napadaje koji su se rano javili, trebalo bi testirati na mutacije u genu *CDKL5*.
5. Ako je nalaz negativan, treba uzeti u obzir analizu drugih gena kao što je npr. *FOXG1* u slučaju kongenitalne inačice RTT-a (slika 1).

Analiza XCI ne primjenjuje se rutinski. Analiza je korisna u specifičnim situacijama, npr. u obitelji u kojoj nekoliko djece ima različite fenotipove *MECP2* mutacije, a u kojima je majka

bez simptoma. U ovom slučaju često se otkrije da majka zaista ima mutaciju *MECP2* otkrivenu kod bolesnih članova obitelji, ali njezin oblik XCI-a je tako povoljan da ona ne pokazuje kliničku sliku (43).

Prenatalno testiranje se može raditi kod rizičnih trudnoća ako je mutacija gena *MECP2* otkrivena kod člana obitelji. Prenatalnu dijagnozu treba ponuditi i parovima koji su imali dijete s RTT-om ili intelektualnim poteškoćama uzrokovanim *MECP2* mutacijom, bez obzira na to je li otkrivena patogene mutacija kod roditelja u leukocitima, a zbog mogućnosti postojanja germinativnog mozaicizma.

## ZAKLJUČAK

Glavno obilježje RTT-a je njegova značajna varijabilnost u težini i progresiji poremećaja i bar u ranim stadijima teško ga je dijagnosticirati. Baš stoga molekularno genetičko testiranje gena *MECP2*, koje otkriva mutacije u oko 80-90% klasičnog RTT-a, može bitno pomoći u potvrdi kliničke dijagnoze. Pritom treba imati na umu da pronalazak mutacija u genu *MECP2* nužno ne upućuje na dijagnozu RTT-a, jer spektar fenotipova s *MECP2* mutacijama osim klasičnog RTT-a i njegovih inačica obuhvaća i kliničku sliku nalik na Angelmanov sindrom, autizam, blage poteškoće s učenjem, a kod muškaraca nespecifične i sindromske X-vezane intelektualne poteškoće i neonatalnu encefalopatiju. Osim toga u ~10% bolesnika s klasičnim RTT-om ne nalazimo mutacije u genu *MECP2*, što upućuje na to da su i drugi geni uključeni u patogenezu. Stoga otkrivanje *MECP2* mutacije može potvrditi kliničku dijagnozu, ali je ne može u potpunosti isključiti. Pronađene mutacije gena *MECP2* mogu biti od velike koristi u razjašnjavanju dijagnoze atipičnih inačica RTT-a, u stvaranju novih dijagnostičkih kriterija pri klasifikaciji klasičnog i varijanti ovog sindroma te u boljem povezivanju genotipa s fenotipom.

## NOVČANA POTPORA/FUNDING

Nema/None

## ETIČKO ODOBRENJE/ETHICAL APPROVAL

Nije potrebno/None

## DOPRINOSI AUTORA/DECLARATION OF AUTHORSHIP

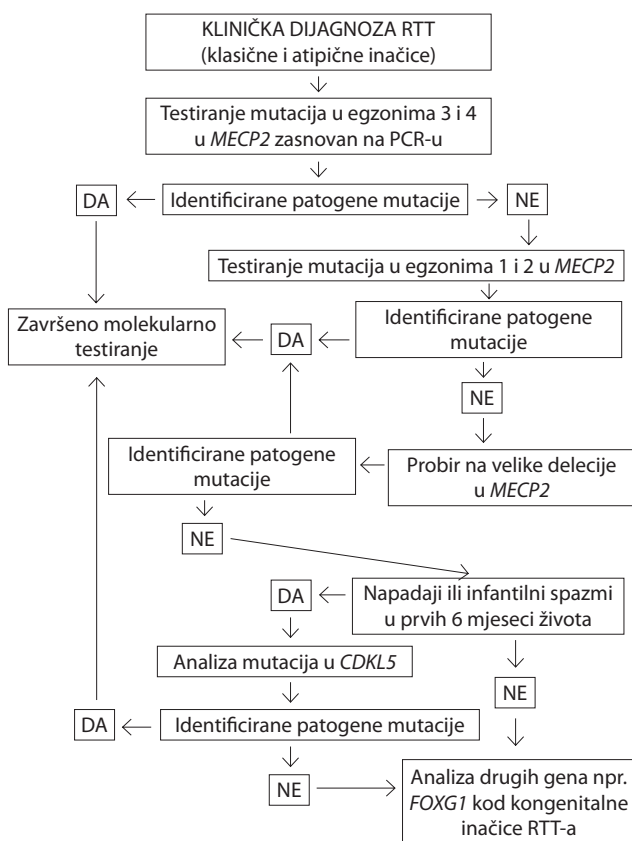
Sansović I. – pretraživanje literature, izrada slika, analiza i tumačenje podataka, pisanje rada/literature search, making pictures, analysis and interpretation of data, writing papers

Dumić Kubat K. – tumačenje podataka/data analysis

Barišić I. – savjetovanje prilikom pisanja rada/consultation during the paper writing

## SUKOB INTERESA/CONFLICT OF INTEREST

Autori su popunili the Unified Competing Interest form na [www.icmje.org/coi\\_disclosure.pdf](http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf) (dostupno na zahtjev) obrazac i izjavljuju: nemaju potporu niti jedne organizacije za objavljeni rad; nemaju financijsku potporu niti jedne organizacije koja bi mogla imati interes za objavu ovog rada u posljednje 3 godine; nemaju drugih veza ili aktivnosti koje bi mogle utjecati



SLIKA 1. Strategija genetičkog testiranja Rettovog sindroma



na objavljeni rad./All authors have completed the Unified Competing Interest form at [www.icmje.org/coi\\_disclosure.pdf](http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf) (available on request from the corresponding author) and declare: no support from any organization for the submitted work; no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.

## LITERATURA

- Hagberg B. Clinical manifestations and stages of Rett syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2002;8:61-5. <http://dx.doi.org/10.1002/mrdd.10020> PMID:12112728
- Steffenburg U, Hagberg G, Hagberg B. Epilepsy in a representative series of Rett syndrome. *Acta Paediatr.* 2001;90:34-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1651-2227.2001.tb00252.x> PMID:11227330
- Kerr AM, Julu PO. Recent insights into hyperventilation from the study of Rett syndrome. *Arch Dis Child.* 1999;80:384-7. <http://dx.doi.org/10.1136/adc.80.4.384>
- Zeev BB, Yaron Y, Schanen NC, et al. Rett syndrome: clinical manifestations in males with MECP2 mutations. *J Child Neurol.* 2002;17:20-4. <http://dx.doi.org/10.1177/088307380201700105> PMID:11913564
- Mari F, Caselli R, Russo S, et al. Germline mosaicism in Rett syndrome identified by prenatal diagnosis. *Clin Genet.* 2005;67:258-60. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0004.2005.00397.x> PMID:15691364
- Laurvick CL, de Klerk N, Bower C, et al. Rett syndrome in Australia: a review of the epidemiology. *J Pediatr.* 2006;148:347-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2005.10.037> PMID:16615965
- Coutinho AM, Oliveira G, Katz C, et al. MECP2 coding sequence and 3' UTR variation in 172 unrelated autistic patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2007;144B:475-83. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.b.30490> PMID:17427193
- Orrico A, Lam C, Galli L, et al. MECP2 mutation in male patients with non-specific X-linked mental retardation. *FEBS Lett.* 2000;481:285-8. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01994-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01994-3)
- Watson P, Black G, Ramsden S, et al. Angelman syndrome phenotype associated with mutations in MECP2, a gene encoding a methyl CpG binding protein. *J Med Genet.* 2001;38:224-8. <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.38.4.224> PMID:11283202 PMCID:PMC1734853
- Hitchins MP, Rickard S, Dhalla F, et al. Investigation of UBE3a and MECP2 in Angelman syndrome (AS) and patients with features of AS. *Am J Med Genet A.* 2004;125A:167-72. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.20343> PMID:14981718
- Gomot M, Gendrot C, Verloes A, et al. MECP2 gene mutations in non-syndromic X-linked mental retardation: phenotype-genotype correlation. *Am J Med Genet A.* 2003;123A:129-39. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.20247> PMID:14598336
- Lesca G, Bernard V, Bozon M, et al. Mutation screening of the MECP2 gene in a large cohort of 613 fragile-X negative patients with mental retardation. *Eur J Med Genet.* 2007;50:200-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmg.2007.02.001> PMID:17383248
- Klauck SM, Lindsay S, Beyer KS, Splitt M, Burn J, Poustka A. A mutation hot spot for nonspecific X-linked mental retardation in the MECP2 gene causes the PPM-X syndrome. *Am J Hum Genet.* 2002;70:1034-7. <http://dx.doi.org/10.1086/339553> PMID:11885030 PMCID:PMC379098
- Van Esch H, Bauters M, Ignatius J, et al. Duplication of the MECP2 region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males. *Am J Hum Genet.* 2005;77:442-53. <http://dx.doi.org/10.1086/444549> PMID:16080119 PMCID:PMC1226209
- Friez MJ, Jones JR, Clarkson K, et al. Recurrent infections, hypotonia, and mental retardation caused by duplication of MECP2 and adjacent region in Xq28. *Pediatrics.* 2006;118:e1687-95.
- Schwartzman JS, Bernardino A, Nishimura A, Gomes RR, Zatz M. Rett syndrome in a boy with a 47,XXY karyotype confirmed by a rare mutation in the MECP2 gene. *Neuropediatrics.* 2001;32:162-4. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2001-16620> PMID:11521215
- Topcu M, Akyerli C, Sayi A, et al. Somatic mosaicism for a MECP2 mutation associated with classic Rett syndrome in a boy. *Eur J Hum Genet.* 2002;10:77-81. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200745> PMID:11896459
- Hagberg B, Gillberg C. Rett variants +/- rettoid phenotypes. In: Hagberg B, Anvret M, Wahlstrom J, editors. *Rett Syndrome: Clinical and Biological Aspects.* London, UK: MacKeith Press; 1993:40-60.
- Neul JL, Kaufmann WE, Glaze DG, et al. Rett syndrome: revised diagnostic criteria and nomenclature. *Ann Neurol.* 2010;68:944-50. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.22124> PMID:21154482 PMCID:PMC3058521
- Zappella M. The Rett girls with preserved speech. *Brain Dev.* 1992;14:98-101. [http://dx.doi.org/10.1016/S0387-7604\(12\)80094-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0387-7604(12)80094-5)
- Rolando S. Rett syndrome: report of eight cases. *Brain Dev.* 1985;7:290-6. [http://dx.doi.org/10.1016/S0387-7604\(85\)80030-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0387-7604(85)80030-9)
- Hanefeld F. The clinical pattern of the Rett syndrome. *Brain Dev.* 1985;7:320-5. [http://dx.doi.org/10.1016/S0387-7604\(85\)80037-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0387-7604(85)80037-1)
- Renieri A, Mari F, Mencarelli MA, et al. Diagnostic criteria for the Zappella variant of Rett syndrome (the preserved speech variant). *Brain Dev.* 2009;31:208-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.braindev.2008.04.007> PMID:18562141
- Bahi-Buisson N, Nectoux J, Rosas-Vargas H, et al. Key clinical features to identify girls with CDKL5 mutations. *Brain.* 2008;131:2647-61. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awn197> PMID:18790821
- Ariani F, Hayek G, Rondinella D, et al. FOXG1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome. *Am J Hum Genet.* 2008;83:89-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.05.015> PMID:18571142 PMCID:PMC2443837
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature.* 1998;393:386-9. <http://dx.doi.org/10.1038/30764> PMID:9620804
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet.* 1998;19:187-91. <http://dx.doi.org/10.1038/561> PMID:9620779
- Buschdorf JP, Stratling WH. A WW domain binding region in methyl-CpG-binding protein MeCP2: impact on Rett syndrome. *J Mol Med.* 2004;82:135-43. <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-003-0497-9> PMID:14618241
- Chandler SP, Guschin D, Landsberger N, Wolffe AP. The methyl-CpG binding transcriptional repressor MeCP2 stably associates with nucleosomal DNA. *Biochemistry.* 1999;38:7008-18. <http://dx.doi.org/10.1021/bi990224y> PMID:10353812

30. Mnatzakanian GN, Lohi H, Munteanu I, et al. A previously unidentified MECP2 open reading frame defines a new protein isoform relevant to Rett syndrome. *Nat Genet.* 2004;36:339–41.  
<http://dx.doi.org/10.1038/ng1327>  
PMid:15034579
31. Chen WG, Chang Q, Lin Y, et al. Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science.* 2003;302:885–9.  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1086446>  
PMid:14593183
32. Stancheva I, Collins AL, Van den Veyver IB, Zoghbi H, Meehan RR. A mutant form of MeCP2 protein associated with human Rett syndrome cannot be displaced from methylated DNA by notch in *Xenopus* embryos. *Mol Cell.* 2003;12:425–35.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00276-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00276-4)
33. Horike S, Cai S, Miyano M, Cheng JF, Kohwi-Shigematsu T. Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. *Nat Genet.* 2005;37:31–40.  
PMid:15608638
34. Nuber UA, Kriaucionis S, Roloff TC, et al. Up-regulation of glucocorticoid-regulated genes in a mouse model of Rett syndrome. *Hum Mol Genet.* 2005;14:2247–56.  
<http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddi229>  
PMid:16002417
35. Chahrour M, Jung SY, Shaw C, et al. MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science.* 2008;320:1224–9.  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1153252>  
PMid:18511691 PMCID:PMC2443785
36. Young JL, Hong EP, Castle JC, et al. Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:17551–8.  
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0507856102>  
PMid:16251272 PMCID:PMC1266160
37. Trappe R, Laccone F, Cobilanschi J, et al. MECP2 mutations in sporadic cases of Rett syndrome are almost exclusively of paternal origin. *Am J Hum Genet.* 2001;68:1093–101.  
<http://dx.doi.org/10.1086/320109>  
PMid:11309679 PMCID:PMC1226090
38. Ravn K, Nielsen JB, Skjeldal OH, Kerr A, Hulten M, Schwartz M. Large genomic rearrangements in MECP2. *Hum Mutat.* 2005;25:324.  
<http://dx.doi.org/10.1002/humu.9320>  
PMid:15712379
39. Archer HL, Whatley SD, Evans JC, et al. Gross rearrangements of the MECP2 gene are found in both classical and atypical Rett syndrome patients. *J Med Genet.* 2006;43:451–6.  
<http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2005.033464>  
PMid:16183801 PMCID:PMC2564520
40. Cheadle JP, Gill H, Fleming N, et al. Long-read sequence analysis of the MECP2 gene in Rett syndrome patients: correlation of disease severity with mutation type and location. *Hum Mol Genet.* 2000;9:1119–29.  
<http://dx.doi.org/10.1093/hmg/9.7.1119>  
PMid:10767337
41. Weaving LS, Williamson SL, Bennetts B, et al. Effects of MECP2 mutation type, location and X-inactivation in modulating Rett syndrome phenotype. *Am J Med Genet A.* 2003;118A:103–14.  
<http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.10053>  
PMid:12655490
42. Charman T, Neilson TC, Mash V, et al. Dimensional phenotypic analysis and functional categorisation of mutations reveal novel genotype-phenotype associations in Rett syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2005;13:1121–30.  
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201471>  
PMid:16077736
43. Amir RE, Van den Veyver IB, Schultz R, et al. Influence of mutation type and X chromosome inactivation on Rett syndrome phenotypes. *Ann Neurol.* 2000;47:670–9.  
[http://dx.doi.org/10.1002/1531-8249\(200005\)47:5<670::AID-ANA20>3.0.CO;2-F](http://dx.doi.org/10.1002/1531-8249(200005)47:5<670::AID-ANA20>3.0.CO;2-F)
44. Evans JC, Archer HL, Colley JP, et al. Early onset seizures and Rett-like features associated with mutations in CDKL5. *Eur J Hum Genet.* 2005a;13:1113–20.  
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201451>  
PMid:16015284
45. Fehr S, Wilson M, Downs J, et al. The CDKL5 disorder is an independent clinical entity associated with early-onset encephalopathy. *Eur J Hum Genet.* 2013;21:266–73.  
<http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2012.156>  
PMid:22872100
46. Mencarelli MA, Spanhol-Rosseto A, Artuso R, et al. Novel FOXP1 mutations associated with the congenital variant of Rett syndrome. *J Med Genet.* 2010;47:49–53.  
<http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2009.067884>  
PMid:19578037
47. Brancaccio M, Pivetta C, Granzotto M, Filippis C, Mallamaci A. Emx2 and Foxg1 inhibit gliogenesis and promote neuronogenesis. *Stem Cells.* 2010;28:1206–18.  
PMid:20506244
48. Jacob FD, Ramaswamy V, Andersen J, Bolduc FV. Atypical Rett syndrome with selective FOXP1 deletion detected by comparative genomic hybridization: case report and review of literature. *Eur J Hum Genet.* 2009;17:1577–81.  
<http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2009.95>  
PMid:19623215 PMCID:PMC2987032
49. Kortüm F, Das S, Flindt M, et al. The core FOXP1 syndrome phenotype consists of postnatal microcephaly, severe mental retardation, absent language, dyskinesia, and corpus callosum hypogenesis. *J Med Genet.* 2011;48:396–406.  
<http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2010.087528>  
PMid:21441262
50. Evans JC, Archer HL, Whatley SD, Kerr A, Clarke A, Butler R. Variation in exon 1 coding region and promoter of MECP2 in Rett syndrome and controls. *Eur J Hum Genet.* 2005b;13:124–6.  
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201270>  
PMid:15367913

## SUMMARY

## Molecular analysis of the *MECP2* gene in female patients with Rett syndrome

Ivona Sansović, Katja Dumić Kubat, Ingeborg Barišić

*Mutation in the MECP2 gene located on the Xq28 chromosome can cause Rett syndrome, the most common cause of intellectual disability in females. In addition to classic form, the mutations in MECP2 could result in atypical Rett syndrome and mild learning disabilities in females. To date, more than 390 pathogenic mutations have been described, and eight most commonly occurring account for more than 50% of all mutations. C-terminal domain of the gene is prone to small deletions (20-100 bp) that account for 7% of pathogenic mutations. More recently, large deletions (kilobases in size) that delete whole exons have been identified. These are more commonly found in females with classic (8%) than atypical Rett syndrome (3%). The aim is to present a recent molecular testing strategy of the MECP2 gene in female patients with clinical diagnosis of Rett syndrome. Bidirectional sequencing of the entire MECP2 coding region detects disease-causing mutations in approximately 80% of individuals with classic Rett syndrome. Frequent mutations in exons 3 and 4 in MECP2 are tested by screening methods based on PCR and sequencing, and large rearrangements are tested by quantitative methods. In conclusion, the spectrum of phenotypes in MECP2-related disorders includes not only classic and atypical Rett syndrome, but also other neurologic disorders. Besides, in the minority of Rett patients, mutations in MECP2 have not been identified. Therefore, the identification of MECP2 mutation can support a clinical diagnosis, but cannot exclude it completely. Molecular testing is particularly important in elucidating cases of atypical Rett. The molecular testing strategy of Rett syndrome includes: 1) sequencing of MECP2 coding region; 2) analysis of MECP2 noncoding region; 3) screening for large rearrangements in MECP2; and 4) analysis of CDKL5 and FOXP1 genes involved in the atypical forms of Rett syndrome.*

**Keywords:** Rett Syndrome; Methyl-CpG-Binding Protein 2; mutation; deletion