

חקר תסמונת רט באמצעות הגן MECP2 כמודל להפרעת פיגור שכלי האחוזה בכרומוזום X

יעל פטל גליל

בהדרכת: ד"ר אווה גאק ופרופ' בולסלב גולדמן

עבודת גמר המוגשת כמילוי חלק מהדרישות
לקבלת התואר "דוקטור לפילוסופיה"
אוניברסיטת תל אביב, הפקולטה לרפואה ע"ש סאקלר
החוג לגנטיקה מוליקולרית ולביוכימיה קלינית



מחקר זה נערך בסיוע מענק מחקר מקרן שלם

הקרן לפיתוח שירותים לאדם עם מוגבלות שכלית התפתחותית ברשויות

המקומיות 2006

עבודה זו נעשתה בתמיכת:

קרן שלם לפיתוח שירותים לאדם המפגר ברשויות המקומיות.

המרכז הישראלי לתסמונת רט.

מוקדשת באהבה להורי,

לאה ושלמה פטל,

בהוקרה ובשמחה רבה

על שזכיתי בכם

לאורך כל הדרך,

לאלון אישי ולעינב בתי

הבסיס האיתן והאור של חיי.

תודותיי:

לד"ר אוה גאק על הדרכתה המסורה, הגיבוי המלא ואמונתה בי.

לד"ר ברוריה בן זאב על שיתוף פעולה וההדרכה קלינית.

תוכן העניינים

א-ב	תקציר בעברית
1	א. מבוא
20	ב. השערה ומטרות המחקר
21	ג. כלים ושיטות
42	ד. תוצאות
81	ה. סיכום ודיון
97	ו. רשימת מקורות
a-e	תקציר באנגלית

רשימת סמלים וקיצורים

Δ – חסר נוקליאטידים וחומצות אמינו, או פער בין מדידות שונות

BSA – Bovine Serum Albumin

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO – Dimethylsulfoxide

dNTPs – dATP, dCTP, dGTP, dTTP

EDTA – Ethylene Diamine Tetra Acetate

EGTA - Ethylene Glycol Tetra Acetate

FCS – Fetal Calf Serum

HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazineethane-Sulfonic acid

PBS – Phosphate Buffered Saline

PMSF – Phenyl Methylsulfonyl Fluoride

SDS – Sodium Dodecyl Sulfate

SSC – Sodium Chloride Citrate

TE - Tris (hydroxymethyl) aminomethane and Ethylenediaminetetraacetic acid

TBS- Tris-Buffered Saline

TEMED – Tetra- Methyl-Ethylene-Diamine

תקציר

מבוא

תסמונת רט היא הפרעה עצבית-התפתחותית חמורה ששכיחותה האוניברסלית כ 1 ל 10,000 עד 15,000 לידות של בנות. הצורה הקלאסית של תסמונת רט מאופיינת בעיקר באיחור התפתחותי ניכר החל מגיל 6-18 חודשים, בהידרדרות התפתחותית הכוללת איבוד כישורים מוטוריים ותקשורתיים, האטה בגדילת הראש, פיגור שכלי קשה, תנועות ידיים סטריאוטיפיות ופרכוסים. ההגדרה המורחבת של תסמונת רט כוללת חמש צורות לא טיפוסיות (אטיפיות) עם מאפיינים קלים או קשים לעומת ההגדרה הקלאסית: צורה קלה, צורה עם דיבור שמור, צורה עם הידרדרות מאוחרת, צורה מולדת וצורה עם פרכוסים מוקדמים. מרבית המקרים של תסמונת רט קלאסית (כ 85%) וחלק מהמקרים האטיפיים נגרמים ע"י מוטציות בגן *MECP2* (methyl CpG binding protein 2) שממוקם ב Xq28. ב 2004 התגלתה בגן זה מסגרת קריאה חדשה על בסיס שחבור חליפי של האקסון השני. לאיזופורם החדש (*MECP2_e1*) קצה N שונה וארוך יותר מהאיזופורם הישן (*MECP2_e2*). *MECP2_e2* שכיח יותר מ *MECP2_e1* בדם ההיקפי אך במוח הבוגר היחס הפוך. רוב המקרים (99%) של חולות רט קלאסיות הם ספוראדיים ומרבית המוטציות הגורמות לתסמונת זו (>99%) מתרחשות באלל האבהי של הגן.

במרבית המחקרים אודות הקשר גנוטיפ-פנוטיפ בתסמונת רט, נמצאה עליה בחומרת המופע הפנוטיפי במוטציות קוטעניות לעומת מוטציות חלף (missense) ב *MECP2*, אולם לא נמצאה עקביות בין המחקרים ביחס למיקום המוטציות באתרים הפונקציונאליים של הגן. בין מוטציות חלף נמצאה שונות פנוטיפית ניכרת הנגזרת כנראה מאופי השינוי ומיקומו הספציפי. השפעת התפלגות האינאקטיבציה של כרומוזום X (*XCI*) על הפנוטיפ הודגמה בעיקר במקרים קיצוניים מבחינה פנוטיפית או גנוטיפית כמו נשאות מוטציות אסימפטומטיות וחולות קלאסיות עם מוטציות קוטעניות מוקדמות מאוד. התפלגות *XCI* בדם, היא אקראית במרבית חולות רט אולם במקרים עם התפלגות נטויה יש העדפה לאינאקטיבציה של הכרומוזום האבהי שהוא המוטנטי במרבית המקרים. בספרות יש מעט עדויות על הקשר בין התפלגות *XCI* לבין מיקום המופע הקליני על גבי הטווח הפנוטיפי הרחב של תסמונת רט, ביחס לסוגי מוטציות שונות.

החלבון *MECP2* משתייך למשפחת חלבוני methylation binding domains (MBD) שמהווים חוליה מקשרת בין מתילציית DNA, לבין אצטילאזות של היסטונים וקו-רפרסורים. *MECP2* כולל שני אזורים תפקודיים עיקריים: MBD שנקשר לדינוקליאוטידים CpG ממותלים בפרומוטרים ו TRD (Transcription Repression Domain) המגייס קו-רפרסורים הגורמים לשינוי מבנה הכרומטין דרך דאצטילציה של היסטונים.

מטרות

מטרתנו הראשונית היתה גיבוש ואפיון קליני וגנטי מקיף של עוקבת חולים המתאימים לתסמונת רט בהגדרתה המורחבת, כבסיס להמשך המחקר. במטרה ללמוד על השפעת מוטציות ספציפיות ודפוס XCI על חומרת הפנוטיפ של חולות תסמונת רט ביצענו מחקר שכלל אפיון פנוטיפי שיטתי של החולות ביחס למוטציות השונות ומיקומן הפונקציונאלי. כמו כן, ביקשנו לבדוק את השפעתה הפונקציונאלית הביוכימית של מוטציית חלף חדשה ותורשתית שגילינו ב TRD, במערכות ביטוי in vitro ביחס למוטציות ידועות ב TRD. המטרה שבה מיקדנו את מירב מאמצנו, היא פיתוח גישה חדשנית לאבחון מוליקולרי של פגיעות ב *MECP2* באמצעות בדיקת רמות הביטוי של גן זה בדם היקפי. גישה זו רלוונטית במיוחד כמענה לאבחון חולות רט ללא ממצאי מוטציות שחלקן, על פי רוב המחקרים הוא כ 15% מכלל חולות רט הקלאסיות ומרבית מחולות רט האטיפיות.

שיטות

עוקבת החולים עם חשד קליני לתסמונת רט או הפרעות שיכולות להיקשר ב *MECP2*, כללה 54 חולות עם תסמונת רט קלאסית, 28 חולות עם תסמונת רט אטיפית ו 54 חולות וחולים עם אנצפלופתיה קשה או פיגור שכלי ותסמינים חלקיים של תסמונת רט. חיפוש מוטציות ב *MECP2* נעשה באמצעות אנליזות רצף ישירות של מקטעי PCR שכיסו בחפיפה את ארבעת האקסונים ובדיקת multiplex ligation probe amplification (MLPA) לגילוי חסרים או דופליקציות גדולים באקסונים ואזור 3'UTR. חולי רט ללא ממצאי מוטציות מקודדות, עברו גם אנליזות רצף של הפרומוטר ואזורים שמורים באינטרונים. בנוסף ביצענו אנליזות מקטעים של קצה 5' של אינטרון 2 עקב רצף חוזרני. אזור 3'UTR נסרק בחלק מהחולות בשיטת DHPLC בגיבוי של קריאות רצף ישירות. שינויים תורשתיים נבדקו אל מול מאגרי המידע של SNPs ונסרקו במדגמי ביקורת בשיטת RFLP או באנליזות רצף ישירות.

התפלגות XCI נבדקה באמצעות תבחין HUMARA המתבסס על עיכול דנ"א גנומי באנזים רגיש למתילציה, הגברת אתר פולימורפי בגן AR הממוקם ב Xq11.2, והשוואת עוצמת הסיגנלים של תוצרי ההגברה עם ובלי העיכול האנזימטי. בכל המקרים עם התפלגות XCI לא אקראית נבדק גם אחד ההורים על מנת להתחקות אחר המקור ההורי של כל אחד מהכרומוזומים.

לצורך בדיקת הקשר גנוטיפ-פנוטיפ, פותח סולם חומרת פנוטיפ המתבסס על שבעה מדדים הקשורים לתסמיני המחלה ומתאים לחולות מגיל 5 ומעלה. הציונים נקבעו על פי חוות דעתם של הרופאים העוקבים אחר החולות במסגרת מרפאת נוירולוגית ילדים בשיבא. ניתוחים סטטיסטיים של הנתונים שהתקבלו, בוצעו באמצעות תוכנת SPSS 12.0.

בדיקת רמות ביטוי *MECP2* בדם נעשתה על פי דגימות רנ"א כולל שהופקו מדם היקפי של 15 חולות עם מוטציות, 12 חולות ללא ממצאי מוטציות ו 12 מתנדבות נורמאליות. דגימות אלו עברו ריאקציית reverse transcription ליצירת cDNA וריאקציית quantitative Real-Time PCR לכימות רמות הביטוי של שני האיזופורמים של *MECP2*, באופן יחסי לגן מדווח RNAaseP. בריאקציה זו השתמשנו בגלאי TaqMan המכוונים לצמתי אקסון-אקסון היחודיים לאיזופורמים השונים.

הערכה תפקודית של מוטציה חדשה שזוהתה ב TRD (p.A275V) בוצעה באמצעות ביטוי בתרבית תאי אוסטאוסרקמה הומניים. המיקום התוך תאי של *MECP2* עם מוטציה זו נבדק באנליזה מיקרוסקופית. מיצויי חלבונים היסטוניים מתרבית זו עברה אנליזת western לשם גילוי רמת האצטילציה של ההיסטונים H3 ו H4, באמצעות נוגדנים ספציפיים. הממצאים הושוואו לאלו שהתקבלו במערכות ביקורת של *MECP2* תקין או עם מוטציות ידועות ב TRD.

תוצאות

מבין 54 חולות רט קלסיות שנכללו בעוקבה, גילינו מוטציות בכ 83%, וב 20% מבין 28 חולות רט אטיפיות. מבין 54 החולים עם פיגור שכלי שאינם מתאימים להגדרת תסמונת רט, מצאנו מוטציית חלף נדירה ב TRD (p.K304E) בילדה אחת עם הפרעת שפה ואנצפלוגרם לא תקין. 65% מהמוטציות שהתגלו היו hotspots, 8% היו חסרים קטנים בקצה C ו 5% חסרים גדולים שכללו אזורים לא מקודדים והתגלו בשיטת MLPA. בין המוטציות המיוחדות שגילינו נמנות מוטציית חלף ספוארדית חדשה ב MBD (p.D151E) בחולה

עם תסמונת רט ודיבור שמור, מוטציה קוטענית חדשה מוקדמת מאוד (p.E55fs57X) בחולת רט קלאסית עם אקטיבציה מועדפת של כרומוזום X האימהי ומוטציה נדירה ספואדית של חסר אתר שחבור אינטרוני (c.62+1delGT), שהתגלתה בשתי חולות רט קלאסיות. פרט למוטציה זו לא נמצאו מוטציות ספואדיות לא מקודדות נוספות ב *MECP2*. בנוסף, נמצאו עוד 11 שינויים תורשתיים שחלקם ידועים כפולימורפיזמים והאחרים חדשים. אחד השינויים התורשתיים החדשים גרם להחלפת חומצה אמינית שמורה ב TRD (p.V275A). ממצא זה התגלה בחולה קלאסית ממוצא אתיופי ובאמה, על רקע דפוסי XCI נטויים בכיוונים הפוכים ונשלל ב 100 כרומוזומים תואמי מוצא.

בבדיקת הקשר גנוטיפ-פנוטיפ מצאנו שלחולות עם מוטציות קוטעניות יש פנוטיפ חמור יותר מלחולות עם מוטציות חלף. אולם, לא מצאנו הבדלים בין חולות עם מוטציות באתרים התפקודיים השונים של החלבון. לעומת זאת, מוטציות חלף שכיחות (hotspots) נבדלו באופן ניכר אלו מאלו, בעוד המוטציות p.R106W, p.T158M שממוקמים ב MBD היו קשורות בפנוטיפים חמורים בדומה למוטציות עצר, מוטציות החלף p.R133C שב MBD ו p.R306C ב TRD היו קשורות בפנוטיפים קלים יחסית. בחולות רט עם אותה מוטציה, נמצאה שאקטיבציה נטויה של כרומוזום X לטובת הכרומוזום האימהי תורמת לביטוי פנוטיפי קל יותר.

במבחן ביטוי *MECP2* בדם היקפי בקבוצת ביקורת, שכללה 12 נשים נורמאליות בגילאי 17-40, נמצא טווח ביטוי צר יחסית של שני האיזופורמים. לעומת זאת, מבין החולות עם מוטציות, נמצאו רמות ביטוי *MECP2* נמוכות בחולות עם חסר אתר השחבור התורם באינטרון 1 ובחולות עם חסרים גדולים הכוללים חלקים מאזור 3'UTR. בחולות עם מוטציות קוטעניות נמצאו רמות נמוכות גבוליות ואילו בחולות עם מוטציות חלף וחסרים לא קוטעניים נמצאו רמות ביטוי *MECP2* בטווח הנורמאלי. במספר חולות רט ללא ממצאי מוטציות מקודדות נמצאו רמות ביטוי נמוכות בדומה לחולות עם מוטציות בקרה וחסרים גדולים. למרות זאת, לא הצלחנו לזהות בהן מוטציות באזורים לא מקודדים שמורים ב *MECP2*.

בבדיקת המוטציה החדשה (p.V275A) ב TRD במערכת ביטוי תאית של *MECP2* רקומביננטי, נמצא מיקום צפוי של התוצר בגרעין אך לא נמצאה השפעה על רמות האצטילציה של ההיסטונים בדומה למה שנראה במערכת ביטוי של מוטציית החלף הידועה p.R306C הממוקמת אף היא ב TRD. לעומת זאת, בנוכחות המוטציה p.R255X הקוטעת את TRD, היתה רמת אצטילציה מוגברת של היסטון H3.

סיכום ומסקנות

עוקבת חולות רט הארצית שהוקמה במסגרת זו עברה אבחון מעמיק מבחינה קלינית וגנטית ובכך הונחה תשתית לאבחון גנטי של תסמונת רט ולמחקרים נוספים בנושא זה. רמת גילוי מוטציות בגן *MECP2*, בקרב החולות הקלאסיות הייתה 83% וכ 20% מהמקרים האטיפיים, שרובם מהקצה המתון של טווח הפנוטיפים של התסמונת כגון חולות בעלות יכולת דיבור שמורה. מעבר לטווח הפנוטיפי המוגדר כתסמונת רט יכולות להתגלות מוטציות גם במקרים קלים שאינם נכללים בהגדרת תסמונת רט.

בבדיקת הקשר בין גנוטיפ לפנוטיפ מצאנו כי מוטציות חלף קשורות בפנוטיפ קל יותר לעומת מוטציות קוטעניות. כמו כן מצאנו כי מוטציות ספציפיות קשורות בדרגת חומרה פנוטיפית אופיינית ולכן לשם ניבוי מדויק יותר של חומרת הפנוטיפ יש להתבסס על הפרופיל האופייני לכל מוטציה בשילוב התפלגות *XCI*. לביסוס ממצאים אלו יש צורך בהרחבת המדגם באמצעות שיתופי פעולה עם עוקבות נוספות מחו"ל, כפי שאכן נעשה במסגרת פרויקט בינלאומי בו אנו לוקחים חלק.

לבדיקת השפעת מוטציית חלף חדשה, *p.V275A* על תפקוד אזור ה *TRD* מדדנו את רמות אצטילציה של ההיסטונים במערכות ביטוי *MECP2* בתאים הומניים, במקביל לחלבון תקין או עם מוטציות ידועות ב *TRD*. בדיקה זו הראתה אצטילציה מוגברת של *H3* כתוצאה ממוטצית עצר בלבד. מכאן שרמות האצטילציה של היסטונים אינן רגישות דיין בכדי לשיקף את ההשלכות התפקודיות של מוטציות חלף ב *TRD*.

תרומתה העיקרית של העבודה הנוכחית היא פיתוח שיטה חדשה לבדיקת ביטוי *MECP2* בדם היקפי של חולים, אשר יכולה להצביע בעקיפין על נוכחות מוטציות עצר או חסרים בגן. מתוקף זה יש בכוחה של הבדיקה לסייע באבחון מוליקולרי של התסמונת. בבדיקת ביטוי *MECP2* בדם היקפי, מצאנו כי תוצר השעתוק של *MECP2_e2* רווח פי 8 יותר מאשר *MECP2_e1*, באופן המשקף את יחסי הביטוי של התוצרים החלבוניים. בחלק מחולות רט ללא ממצאי מוטציות מצאנו ירידה בביטוי *MECP2* בדם ההיקפי בדומה לזו שנמצאה בחולות עם מוטציה באתר שחבור או חסרים הכוללים את *3'UTR*. ממצאים אלו יכולים להעיד על נוכחות מוטציות באתרים המבקרים את השעתוק והשיחבור של הגן *MECP2*. באמצעות בדיקה זו נתאפשר לתת תימוכין ברמה המוליקולרית לחולות רט שאבחנתן התבססה עד כה על אבחנה קלינית. עם זאת, אין הבדיקה שוללת את האפשרות כי הפגיעה בביטוי *MECP2* ומקרי רט ללא ממצאי מוטציות נובעים ממעורבותו של גן אחר.

א. מבוא

התסמונת על שם ד"ר רט (Rett syndrome, MIM #312750) תוארה לראשונה על ידי רופא הילדים האוסטרי אנדריאס רט (Rett, 1966) לאחר שהבחין בחדר ההמתנה שלו בשתי ילדות לא קשורות, שהציגו תמונה קלינית חופפת של פגיעה פסיכומוטורית קשה עם תנועות ידיים סטריאוטיפיות ומיקרוצפליה. ד"ר רט והרופאים הראשונים שתארו את התסמונת אחריו (Hagberg et al 1983) הגדירו אותה כפרוגרסיבית לאור ההידרדרות התפקודית והופעת התסמינים במהלך השנה הראשונה והשניה לחיים. כיום ההגדרה המקובלת לתסמונת רט היא של הפרעה עצבית-התפתחותית היות ותסמיניה מתייצבים ואף משתפרים משהו לאחר שלב ההידרדרות. הגבלת הופעתה בנקבות, כיוונה את הגנטיקאים לכרומוזום X. עקב נדירותם הרבה של מקרים משפחתיים, מופתה תסמונת רט לאזור Xq28 רק כעבור 32 שנים מגילויה, על ידי שתי קבוצות מחקר לא קשורות (Xiang et al 1998, Narriani et al 1998). מכאן ועד לזיהוי הגן האחראי לא ארכה הדרך. ב 1999 פרסמו החוקרת הישראלית רות אמיר ועמיתה מאוניברסיטת ביילור, את- הגילוי הראשוני של מוטציות בגן *MECP2* Methyl CpG binding protein 2 בחמש חולות תסמונת רט קלאסיות (Amir et al 1999). רמות גילוי המוטציות בגן זה במקרים הקלאסיים של תסמונת רט, מגיעות כיום לכדי 75-85%, על פי מרבית הדיווחים. מוטציות נמצאו גם בחלק מהחולים עם וריאנטים של תסמונת רט ברמות גילוי התלויות בסוג הווריאנט. מוטציות או וריאציות בגן *MECP2* נמצאו במידה מועטה, גם בהפרעות עצביות-התפתחותיות אחרות כגון פיגור שכלי בזכרים ואיטיזם (Shibayama et al 2004, van Esch et al 2005).

MECP2 הוא חלבון נוקליארי שכיח המווסת תהליכים אפיגנטיים החיוניים להתפתחות ותפקוד הנורונים במערכת העצבים המרכזית. חשיפת השפעתו על ההתפתחות המוחית בחולות רט ובהפרעות נאורולוגיות התפתחותיות אחרות, מעלה את האפשרות של קיום מסלול מוליקולרי התפתחותי מרכזי במוח בבסיס הפרעות אלו. מכך נובעות שאלות נוספות רבות לגבי השפעת תהליכים גנטיים, אפיגנטיים ותפקודיים הקשורים ב *MECP2*, על המופע הקליני של תסמונת רט בפרט ותסמונות עצביות-התפתחותיות בכלל. מאידך, התבקשה השאלה האם הגן *MECP2* הוא הגן היחיד הקשור בתסמונת רט ומהו ההסבר הגנטי של חולות רט ללא מוטציות באזור המקודד של הגן. שאלות אלו היוו את התשתית הרעיונית של עבודת מחקר זו, שהחלה בד בבד עם גילוי הבסיס הגנטי של תסמונת רט.

תסמונת רט קלאסית (Classical Rett Syndrome)

תסמונת רט היא תסמונת עצבית-התפתחותית הנכללת בספקטרום של אוטיזם (DSM-IV) כהפרעת PDD pervasive developmental disorder). בתור הפרעת PDD היא היחידה עד כה שנקשרה ברובה הגדול בגן יחיד. שכיחות התסמונת כ 1:10,000 עד 1:15,000 לידות בת, ללא הבדלי מוצא וגזע והיא מהווה הגורם השני לפיגור שכלי בבנות אחרי תסמונת דאון (Hagberg et al 1997, Leonard et al 1997). האבחנה של תסמונת רט היא בבסיסה קלינית ומסתמכת על קריטריונים מוסכמים המותנים בסדר זמנים מוגדר. מקובל לתאר את המהלך הקליני של התסמונת הקלאסית בארבעה שלבים, שהוצגו לראשונה על ידי Hagberg and Witt-Engerstorm (1986). ונוסחו מחדש בפאנל מיוחד של European Paediatric Neurology Society meeting (Hagberg et al 2002) כמסוכם בטבלא א.1.

שלב I : התפתחות איטית אך נורמאלית עד גיל 18-6 חודשים. הילדות נולדות עם היקף ראש תקין, ובמהלך השבועות עד חודשים ראשונים לחייהן מראות עיכובים התפתחותיים לא ספציפיים. כבר בגיל חודשיים עד ארבעה חודשים חלה האטה בגדילת הראש שניכרת יותר לקראת גיל שנה. ההתפתחות הכללית בשלב זה נתפסת כבלתי חורגת מהטווח הנורמאלי.

שלב II : הידרדרות התפתחותית בגיל 3-1 שנים. בגיל שנה במוצע, נראית נסיגה בתקשורת החברתית, איבוד יכולות שהושגו כגון מלמול או מילים, חיוכים וקשר עין. במקביל הולכות ומתמעטות התנועות התפקודיות של הידיים ותחתן מופיעות תנועות ידיים סטריאוטיפיות ייחודיות לכל ילדה, כגון תנועות חיכוך דמויות רחצה, מעיכה, ספירת כסף או מחיאות כף, הכנסת כף יד לפה ונשיכתה או נגיעה באיברי גוף. בחולות קשורות ידיים, מתפתחות לעיתים תנועות סטריאוטיפיות של הגפיים התחתונות. חלק מהחולות עוברות התקפי חרדה המתבטאים בסימני מצוקה רגשית, התנשמויות ובכי בלתי נשלט. התמונה הקלינית בשלב זה דומה מאוד לזו של autism infantile והאבחנה הקלינית נעשית ודאית רק על פי הופעת השלב הבא. רוב החולות (80%) מפתחות הליכה שהופכת להיות לא מאורגנת (דיספרקטית) עם תעייה חסרת תכלית, או הליכה לא יציבה על בסיס רחב (אטקסיה). בכל החולות כמעט נמדד בשלב כלשהו EEG אבנורמלי המעיד על פעילות אפילפטיפורמית (Glaze et al 2004) אך רק בכ 50-80% מהחולות מופיעים פרכוסים. קריטריונים תומכים נוספים באבחנת תסמונת רט בשלב זה הם: אי סדירות נשימתית (50%), הפרעות שינה (50%), שחיקת שיניים (30%) ועקמת (30%). לעיתים קרובות מאופיינות החולות בסימנים של הפרעות בפעילות מערכת העצבים האוטונומית, כגון עצירות, סף כאב גבוה וקצוות גפיים קטנות וקרות.

שלב III: התייצבות התסמונת החל מגיל 4-7 שנים. בשלב זה נעצרת ההידרדרות קוגניטיבית והחולות נראות מעוניינות יותר באינטראקציה עם סביבתן. חלקן רוכשות מחדש יכולת תקשורת משמעותית עם מטפליהן באמצעות מבטים (Hagberg et al 2005) ומסוגלות ללמוד להביע רצונותיהן גם באמצעות מחוות ראש או יד. תכיפות הפרכוסים הולכת ויורדת, לעיתים קרובות ביחס הפוך להפרעות בתרשימי ה EEG שהופכים להיות דרמטיים יותר (Glaze 2004). בהעדר טיפול תומך אינטנסיבי, עלולות היכולות המוטוריות להידרדר ולהגיע לכדי תת אקטיביות חמורה שתמשיך להתקיים בהמשך חייהן. שלב זה בתסמונת יכול להמשך שנים בודדות עד עשרות שנים.

שלב IV: הידרדרות מוטורית מאוחרת. הידרדרות זו איטית והרבה פחות דרמטית מההידרדרות המוקדמת (שלב II). היא מאופיינת בפגיעה נוספת ביכולות ההליכה והתנועה והופעת הפרעות מוטוריות נרחבות הכוללות פרקינסוניזם, החמרת העקמת, ניוון שרירים ודפורמציות של קצות הגפיים. רמות התפקוד של חולות רט בשלב זה וכן תוחלת חייהן משתנות מאוד, בתלות באיכות הטיפול ובסוג המוטציה. עד גיל 10 שנים אין הבדל בתוחלת החיים של חולות רט קלאסיות לבין האוכלוסיה הנורמאלית אולם עד גיל 35 אחוזי התמותה עולים ל 30% בחולות רט לעומת 2% באוכלוסיה הנורמאלית. רוב מקרי המוות בגיל צעיר הם פתאומיים כתוצאה מאי תפקוד נשימתי, מהפרעות קצב הלב או פרכוסים חמורים (Hagberg et al 2002). חולות רט המבוגרות שדווחו הן בעשור השביעי לחייהן ומאופיינות במוטציות חלף (missense) או חסרים בקצה 3' של הגן (Smeets et al 2003).

טבלא א.1. קריטריונים מוסכמים לתסמונת רט קלאסית (Hagberg 2002)

תסמינים תומכים	תסמינים הכרחיים
אנצפלוגרם לא תקין ± פרכוסים	מצב מולד תקין
עקמת	התפתחות מוקדמת נורמאלית או תת-אופטימלית
ספסטיות וניוון שרירים	עצירת גדילת הראש בשלב פוסט-נטאלי.
פיגור בגדילה	איבוד תנועות ידיים תפקודיות שהושגו כגון הושטת יד ותפיסה
כפות רגליים וידיים קרות	ליקויי הליכה: פגיעה בארגון תנועות (דיספרקסיה) או חוסר ניידות
הפרעות נשימה	תנועות ידיים סטריאוטיפיות

וריאנטים אטיפיים של תסמונת רט

לתסמונת רט יש חמש צורות אטיפיות (atypical) עיקריות שהגדרתן מסתמכת על גיל התחלת התסמינים וחומרתם. שלוש מהצורות האטיפיות קלות יותר מהתסמונת הקלאסית; צורה קלה (forme fruste), תסמונת עם דיבור שמור (PSV - preserved speech variant) ותסמונת עם ההידרדרות מאוחרת (late regression). הצורות הקשות יותר הן: תסמונת מולדת (congenital form) ותסמונת עם פירכוסים מוקדמים (ES - early onset seizures). וריאנטים רחוקים יותר מבחינה קלינית שקשורים בתסמונת רט על בסיס גנטי משותף חלקי הם וריאנט דמוי תסמונת אנגלמן (Angelman-like), תסמונת רט בזכרים (male-Rett) והפרעות עצביות-התפתחותיות אחרות בזכרים. להלן פירוט המאפיינים של הצורות האטיפיות של רט והפרעות אחרות הקשורות ב *MECP2*.

תסמונת רט קלה (Forme fruste) - צורה זו מאופיינת בפיגור שכלי בינוני, הנסיגה בין גיל שנה לגיל שלוש שנים, היא הדרגתית וממושכת מבצורה הקלאסית. שימוש מכוון בידיים נשמר ותנועות ידיים סטריאוטיפיות לא מופיעות בהכרח. תסמיני רט פחות בולטים בגיל הצעיר ולפיכך האבחנה הקלינית ניתנת לגיבוש רק בגיל מאוחר יחסית לצורה הקלאסית. צורה אטיפית זו היא השכיחה מבין הוריאנטים וחלקה מוערך בסביבות 10%-15% ממקרי תסמונת רט (Hagberg et al 2002, Erlandson and Hagberg 2005). תסמונת רט עם נסיגה מאוחרת (late regression) דומה לצורה הקלה בכך שהנסיגה מתרחשת בגיל מאוחר יחסית, שנתיים עד ארבע שנים ובכך שלפני הנסיגה נראה שמדובר בפיגור שכלי לא ייחודי, אך בהבדל מהצורה הקלה חולות עם נסיגה מאוחרת מציגות לאחר מכן את מלוא התמונה הקלינית של תסמונת רט קלאסית (Hagberg and Skjeldal 1994).

תסמונת רט עם דיבור שמור (preserved speech variant) - בתסמונת רט הטיפוסית השפה שנרכשה נפגעת בשלב הנסיגה. אבל, חולות עם סוג זה משמרות את היכולת לומר מספר מילים או אף צירופי מילים, לעיתים בצורה חוזרנית או נטולת הקשר. על שום כך, בחולות אלו שכיחה אבחנה ראשונית של אוטיזם (Hagberg and Skjeldal 1994). במרבית המקרים של תסמונת רט עם דיבור שמור נמצאה בגן *MECP2* מוטציה חלפה ספציפית - pR133C (Erlandson and Hagberg 2005).

תסמונת עם התקפי כפיון מוקדמים (early onset seizures) - סוג זה מאופיין בהתקף כפיון ראשון, היכול להתבטא כ infantile spasms, במהלך השנה הראשונה לחיים עוד לפני הופעת שלב ההידרדרות.

בהמשך החיים מתקבלת תמונה אופיינית לתסמונת רט, לרוב עם פיגור שכלי ומגבלות מוטוריות בדרגות חומרה קשות יותר מבתסמונת הקלאסית. במקרים הנמנים על הגדרה זו, לא נמצאו עד כה מוטציות ב *MECP2*. לעומת זאת התגלו מוטציות בחלק ממקרים אלו בגן *CDKL5* (X-linked cyclin dependent kinase like 5) המקודד חלבון נוקליארי האחראי על זרחון חלבונים, ביניהם גם *MECP2* (Tao et al. 2004).

תסמונת רט מולדת (congenital onset) – המייחד את הווריאנט הזה הוא העדר שלב הנסיגה, והופעת התסמינים האופייניים מלידה. צורה זו נדירה ביותר וכן נדיר למצוא בה מוטציות בגן *MECP2*.

תסמונת דמוית אנגלמן (Angelman like) - תסמונת אנגלמן היא תסמונת עצבית-התפתחותית הקשורה בגן *UBE3A* על כרומוזום 15. גן זה עובר החתמה גנומית (imprinting) ובמצב תקין, מתבטא רק האלל האימהי שלו. בתסמונת אנגלמן נפגע תהליך החתמה זה, לרוב כתוצאה מחסר באלל האימהי או unipaternal disomy. בין תסמונת אנגלמן ותסמונת רט יש חפיפה קלינית חלקית: בשניהן יש מיקרוצפלי, פיגור שכלי, פרכוסים, אטקסיה, אפרקסיה ותנועות ידיים סטריאוטיפיות אלא שבתסמונת אנגלמן סימנים אלו מולדים ללא שלב נסיגה ובנוסף יש דיסמורפיזם קל בפנים, שאינו אופייני לתסמונת רט. מוטציות ב *MECP2* נמצאו במקרים ספורים של תסמונת אנגלמן ללא חסרים בגן *UBE3A*, בבנות (Watson et al 2001, Milani et al 2005).

תסמונת רט בזכרים (*male Rett*) או מוטציות *MECP2* בזכרים- הביטוי הפנוטיפי של מוטציות ב *MECP2* בזכרים יכול להיות מסווג לשלוש קבוצות המשתרעות על פני טווח חומרה רחב, החל מאנצפלופתיה מולדת, עבור דרך תסמונת רט קלאסית וכלה בפיגור שכלי קל לא ספציפי. זכרים עם מוטציות קלאסיות של תסמונת רט מציגים תמונה קלינית של אנצפלופתיה מולדת קשה (severe neonatal encephalopathy), היפוטוניה חמורה בלידה ודיסטוניה מגוונת בהמשך, מיקרוצפלי נרכש, קשיי האכלה ואי שגשוג, התקפי כפיון ואירועי דום נשימה המביאים למוות בשנה הראשונה לחייהם (Villard et al 2000, Ben Zeev et al 2002). הופעת תסמונת רט קלאסית בזכרים נדירה ביותר ומופיעה בדרך כלל במצב של מוטציה ב *MECP2* על רקע קריוטיפ 47,XXY או מוזאיקה סומטית (Naidu et al 2003, Moog et al 2003) אם כי יש דיווחים ספורים על זכרים עם תסמונת רט קלאסית על רקע קריוטיפ תקין (Masuyama et al 2005, Ravn et al 2003). בניגוד לסברה כי תסמונת רט היא דומיננטית ולתאלית בזכרים, לא נמצאו עדויות לכך שמוטציות בגן *MECP2* גורמות למוות תוך רחמי של זכרים. לפיכך נראה שהסיבה לנדירות זכרים עם מוטציות הגורמות לתסמונת רט, היא שמרבית המוטציות מתרחשות באופן ספוראדי באלל האבהי, בדומה לרוב המוטציות הגורמות להפרעות גנטיות ספוראדיות באדם (Trappe et al 2001). במספר מקרים של זכרים הלוקים בפיגור שכלי עם או בלי סימנים נוספים, נמצאו מוטציות חלף או חסרים קטנים ללא פגיעה במסגרת הקריאה בקצה 3' של *MECP2*.

מוטציות אלו לא נקשרו בתסמונת רט קלאסית בבנות וקרובות משפחה נשאות של זכרים אלו, היו תקינות או בעלות ביטוי גבולי (Meloni et al 2000, Couvert et al 2001, Zoghbi et al 2003). בסקירת 185 זכרים עם פיגור שכלי לא ספציפי למוטציות בגן *MECP2*, נמצאו מוטציות חלף בתדירות של כ 2%, המתקרבת לתדירות 3-4% של התרחבות אזור החזרות בגן *FMR1* באוכלוסיה זו (Couvert et al 2001). מחקרים דומים שבוצעו במדגמים קטנים יותר של זכרים עם פיגור שכלי לא הצליחו לשחזר שכיחות זו (Yntema et al 2002, Mooncla et al 2002, Gomot et al 2003, Yisaukko-Oja et al 2005).

קשרים נוירו-גנטיים בין תסמונת רט ואוטיזם

אוטיזם היא הפרעה עצבית-התפתחותית שכיחה שמוגדרת ע"י DSM-IV (2002) כפיגור בנטיה ליחסי גומלין חברתיים, תקשורת ומשחק. לתסמונת רט ולמרבית הפרעות האוטיזם יש מהלך דומה: מצב מולד תקין, התפתחות תקינה לכאורה במהלך החודשים הראשונים לחיים ולאחריה, בגיל שנה עד שלוש, חלה נסיגה בקשר עין, בתקשורת שפתית וחברתית והופעת תנועות סטריאוטיפיות חוזרות. בנוסף, יש דמיון גם בממצאים הנאורופתולוגיים בקורטקס ובהיפוקמפוס הכוללים גופי תאים קטנים וצפופים וירידה בהסתעפויות הדנדריטיות של תאי עצב פירמידליים (Kemper and Bauman 1998; Armstrong et al 1995), אלא שבעוד תסמונת רט מאופיינת בהאטת גדילת הראש בשלב הפוסט-נטלי, היקפי הראש האופייניים לטווח האוטיזם גדולים מהנורמה החל מגיל 6-12 חודשים (Zoghbi 2003). באוטיסטים אין פגיעות בתפקודים המוטוריים, עקמת, חולשה או עיוותים בקצות הגפיים שנראים לעיתים קרובות בתסמונת רט ולעומת זאת לרוב מוצאים אצלם משחק סטריאוטיפי והיקשרות עודפת לחפצים (Mount et al 2003) שאינה נמצאת בחולות רט. הבדל עקרוני נוסף הוא כי בעוד תסמונת רט נקשרת ברובה הגדול במוטציות בגן יחיד, אוטיזם היא הפרעה הטרוגנית מולטיגנית ומולטיפקטוראלית (Muhle et al 2004). מספר מחקרים שסקרו אוכלוסיות אוטיסטים לא מצאו מוטציות מקודדות ב *MECP2* (Lobo-Menendez et al 2003, Vourc'h et al 2002) אולם בעבודה אחת נמצאו באזור 3'UTR של *MECP2* שתי וריאציות שחזרו ב 24 מקרים לעומת פעם אחת באוכלוסיית ביקורת תואמת מוצא (Beyer et al 2002; Shibayama et al 2004). 3'UTR של *MECP2* כולל אזורים שמורים הידועים כחיוניים לוויסות תהליכי שעתוק ותרגום ביוקריוטיים (Zhao et al 1999) ורק לאחרונה החל להתברר כי וויסות זה מתווך באמצעות microRNAs שנקשרים בעיקר ל 3'UTRs וקשורים בדיכוי התרגום (Yang et al 2005). השינויים שנמצאו באזור זה בעיקר באוטיסטים, מעידים ש *MECP2* מעורב במסלולים עצביים-התפתחותיים מרכזיים האחראים על כישורים תקשורתיים. ההטרוגניות הפנוטיפית הרחבה שנמצאה בחולים וחולות עם מוטציות או שינויים ב *MECP2* מעלה את השאלה אלו הפרעות נוספות קשורות במוטציות ב

MECP2, באזורים המקודדים או מחוצה להם ומה היקפן. במחקר זה נסרקו האזורים המקודדים של הגן וגם אזורים לא מקודדים שמורים במדגם רחב היקף מבחינה מספרית ופנוטיפית.

אנליזה מבנית והיסטוכימית של מוחות תסמונת רט

לחולות תסמונת רט יש מורפולוגיה אופיינית מאוד של המוח, הכוללת ירידה של כ 30% בנפח ובמשקל לעומת מוחות ביקורת אולם מראה גס תקין של המבנים המוחיים. הירידה בנפח נובעת מפגיעה בחומר האפור בעיקר באזורים הפרונטליים והטמפורליים ובגרעינים הבזאליים השולטים בתנועות. הנוריונים בקורטקס הצרברלי נראים קטנים ודחוסים יותר ללא עדות לאיבוד תאים או דגנרציה (Bauman et al 1995). בגרעינים הכהים כגון הסובסטנציה ניגרה יש מלנין מופחת. בנוירונים הפיראמידליים שיוצאים מהקורטקס המוטורי הפרונטלי נצפו שלוחות דנדריתיות מועטות עם הסתעפויות קצה קצרות יותר מבנוירונים נורמאליים (Armstrong 2001). פתולוגיה דומה נמצאה גם בהפרעות נאורו-התפתחותיות אחרות כתסמונת דאון, תסמונת אנגלמן, תסמונת ה X השביר ואוטיזם (Percy et al 2003). תמונה נוירופתולוגית דומה זו מוסיפה נדבך התומך בקיום מסלול עצבי-התפתחותי משותף בבסיסן של תסמונות אלו.

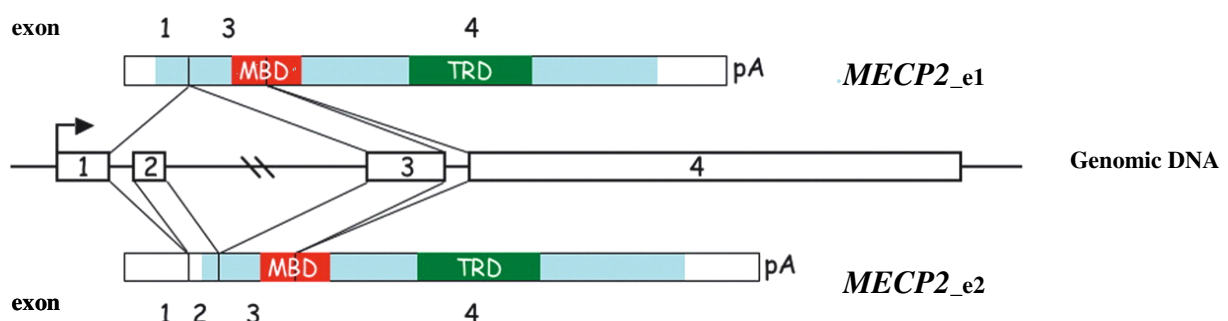
הגן *(MECP2) Methyl CpG binding protein 2*

מרביתם הגדולה של מקרי תסמונת רט (>99%) הם ספוראדיים כתוצאה ממוטציות חדשות באלל האבהי של הגן *MECP2* (Girard et al 2001, Trappe et al 2001). מוטציות באזור המקודד של הגן מתגלות בכ 80% מהחולות עם תסמונת רט קלאסית ובמידה נמוכה יותר בצורות האטיפיות של התסמונת. החלק היחסי של המקרים עם מוטציות משתנה לפי סוג הוריאנט ולכן קשה יותר לאומדן מדויק (Bourdon et al 2001a, Lee et al 2001, Colvin et al 2004, Percy et al 2005).

הגן *MECP2* ממוקם ב Xq28 בקצה התת-טלומרי של כרומוזום X והוא משתרע על פני כ 76Kb וכולל ארבעה אקסונים. עד לא מכבר, סברו שהחלבון *MECP2* מורכב רק משלושת האקסונים 2,3,4 והאקסון הראשון מהווה חלק מ 5'UTR. ב 2004 דווחו שתי קבוצות מחקר על זיהוי איזופורם חדש של *MECP2*, המורכב מהאקסונים 1-3-4 (Mnatzakanian et al 2004, Kriaucionis & Bird 2004). שני תוצרי השעתוק האיזופורמיים נבדלים בקצה N, על פי שחבור אלטרנטיבי של האקסון השני, ללא הבדל באזורים התפקודיים: methyl CpG binding domain ו transcription repression domain (תרשים 1.א). במפגש בינלאומי של חוקרי תסמונת רט ו *MECP2* הוחלט לכנות את האיזופורם החדש *MECP2_e1* לעומת

האיזופורם הקודם *MECP2_e2*, על פי האקסון שבו מתחיל תרגומו של כל אחד מהם (אם כי יש עדיין פרסומים המשתמשים בכינויים *MECP2B* ו *MECP2A* בהתאמה). תוצר השעתוק *MECP2_e2* כולל את ארבעת האקסונים של הגן אולם תרגומו מתחיל מסוף אקסון 2, בעוד אקסון 1 ורובו של אקסון 2 מהווים את האזור הלא מתורגם 5'UTR. באיזופורם *MECP2_e1* יש שחבור אלטרנטיבי והוצאה (splicing out) של אקסון 2, והתרגום מתחיל בערך מהשליש השני של אקסון 1 כך שאזור 5' UTR של איזופורם זה קצר יותר (תרשים א.1). שני האיזופורמים משועתקים ברוב הרקמות בעכבר ובאדם. בדם, רמת הביטוי של *MECP2_e2* גבוהה פי 8 לעומת *MECP2_e1*, אולם במוח בוגר של אדם ושל עכבר, דווקא רמתו של *MECP2_e1* גבוהה פי 10-12 לעומת *MECP2_e2* פער זה נובע מהפרשי הרמות בתאי העצב יותר מאשר בתאי גליאה et al (Mnatzakanian 2004).

בקצה 3' הלא מתורגם של תוצרי השעתוק (3'UTR), קיימים שלושה אתרי פוליאדנילציה אלטרנטיביים היוצרים שלושה תוצרי שעתוק שונים באורכם, 1.9Kb, 7.5Kb ו 10.1Kb ששכיחותם משתנה על פי סוג הרקמה והגיל. תוצר השיעתוק השכיח ביותר במוח הוא 10.1Kb ואילו תוצר השיעתוק הקצר ביותר שכיח יותר בכל הרקמות האחרות שנבדקו כגון שרירי השלד, הלב, הכבד ובטחול. תוצר השיעתוק באורך 7.5Kb הוא נדיר יותר או שאורך מחצית חייו קצרה יותר (Coy et al 1999, Reichwald et al 2000). כמו כן נמצא ששכיחות תוצר השיעתוק הארוך יורדת עם הגיל (Balmer et al 2003, Pelka et al 2006). יתכן לפיכך שהמעבר בין אתרי פולי אדנין אלטרנטיביים קשור בעליה הכללית ברמת *MECP2* עם הגיל. אזור 3'UTR של תוצר השיעתוק של *MECP2* השכיח במוח הוא ארוך מהרגיל ובעל דרגת שימור אבולוציונית גבוהה (74%) ביחס לעכבר (Coy et al 1999). כיום הולך ומתברר תפקידו של אזור זה בבקרת התרגום, באמצעות קישור גורמים המעורבים או מבקרים תהליך זה כגון, micro RNAs, ריבוזומים או FMRP associated mRNA שמשועתק מהגן FMR1 וייחודי למוח (de Moor et al 2005).



תרשים א.1. תוצרי השיעתוק האלטרנטיביים של *MECP2*

מסגרות הקריאה מסומנת בתכול. האזורים הפונקציונליים MBD ו TRD משותפים לשני האיזופורמים. אתר פוליאדנין ראשון מסומן כ **pA**.

שני שלישים מהמקרים הקלאסיים והאטיפיים של תסמונת רט נובעים משמונה מוטציות hotspots באתרי CpG: R106W, R133C, T158M, R168X, R255X, R270X, R294X, R306C (Amir et al 2000,) Lee et al 2001, Percy et al 2003). מוטציות אלו נובעות מהפיכת ציטוזין לתיאמין כתוצאה מדאמינציה ספונטנית של ציטוזין ממותל, כפי שנכון לגבי 35% מהמוטציות הנקודתיות בגנום (Yussoufian and Cooper) 1988. כעשירית מהמוטציות הגורמות לתסמונת רט הם חסרים בקצה C של הגן, בין הנוקלאוטידים 1050-1200, המתאפיין ברצפים חוזרניים עתירי CG (Wan et al 1999). מוטציות באקסונים 1-2 מסבירות רק מיעוט קטן מהחולים (Amir et al 2005, Evans et al 2005).

השיטות המקובלות לגילוי מוטציות ב *MECP2* בעולם, באמצעות DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography) או קריאות רצף ישירות בלבד, מבוססות על ריאקציות PCR סטנדרטיות (Buyse et al 2000, Nicolao et al 2000). הניסיונות לשפר את מידת גילוי המוטציות בחולות תסמונת רט, עודדו שימוש בטכנולוגיות מוליקולריות מתקדמות כגון MLPA (multiple ligation probe dependent amplification) וכימות עותקי הגן באמצעות Real-Time PCR (Nicolao et al 2001,) (Erlandson et al 2003, Raven et al 2005, Laccone et al 2004). טכנולוגיות אלו החליפו למעשה את אנליזת Southern לגילוי חסרים או שינויי סדר גנומיים. בעקבות הכנסת השימוש בשיטות אלו התגלו לאחרונה חסרים גדולים ודופליקציות שחמקו מגילוי בשיטות שהתבססו על ריאקציות PCR סטנדרטיות.

על אף המאמצים המושקעים בחיפוש מוטציות וחסרים בגן *MECP2* באוכלוסיית חולות רט ברחבי העולם, והרחבת השימוש בטכנולוגיות מתקדמות עדיין נותרים כ-20% מהמקרים הקלאסיים של תסמונת רט (Weaving et al 2004; Percy et al 2005) וחלק גדול הרבה יותר מהמקרים האטיפיים, ללא אבחנה גנטית. תעלומתם נפתרה באופן חלקי ביותר עם גילוי מוטציות ב *CDKL5* (X-linked cyclin dependent kinase like 5) בחולים אטיפיים עם פרכוסים מוקדמים על רקע ספוראדי או משפחתי (Tao et al 2004, Scala et al 2005). במקרים עם תסמונות רט אטיפיות קלות כגון רט עם ביטוי קל (FF) או דיבור שמור (PSV), רמות הגילוי של מוטציות ב *MECP2* גבוהות יחסית (Percy et al 2005). על פי חיפוש בספרות ובבמאגר המידע RettBase לא דווחו מוטציות באזורים הרגולטוריים של *MECP2*, מחוץ לאקסונים ולאתרי השחבור. לעומת זאת, במספר גנים אחרים אכן תועדו חסרים ומוטציות אינטרוניות הפוגעות בתהליך השעתוק או השחבור וגורמות למחלות, כגון תסמונת אלפורט (Alport) שקשורה בגן *COL4A3* (Knebelmann et al 1995), פולידקטיליה שנגרמת על ידי מוטציות בגן *Lmbr1* (Lettice et al 2003) ותסמונת ע"ש טורט שנקשרה לאחרונה בגן *SLITRK1* (Abelson et al 2005). אחת מהשערות המחקר הנוכחי היא כי מקרי תסמונת רט,

ללא ממצאי מוטציות באזור המקודד של *MECP2*, יכולים להיות מוסברים באמצעות מוטציות באזורים הכוללים אתרי קישור לגורמים המוסתים את תהליכי השחבור או השיעתוק. לאישוש השערה זו פיתחנו שיטה ייחודית לבדיקת רמת הביטוי של *MECP2* וסקרנו אזורים לא מקודדים המועמדים לכלול רצפי בקרה.

תסמונת רט והתפלגות האינאקטיבציה של כרומוזום X (XCI)

על פי מחקרים ראשוניים בנושא X chromosome inactivation (XCI) בעוברי עכברים, התקבלה התפיסה כי דגם ה XCI נקבע בתחילת שלב הגסטרוולציה ונשמר קבוע בכל הרקמות שמתפתחות משלושת השכבות העובריות הקיימות בשלב זה (Monk et al 1992). לעומת זאת, במחקר אמפירי שבדק את דפוס התפלגות XCI ב 350 ילדות ונשים בגילאים שונים נמצא כי שכיחות skewed XCI עולה באופן מובהק עם הגיל. המתאם של דפוס התפלגות XCI ברקמות שונות הינו גבוה ומובהק אם כי עוצמתו יכולה לרדת מעט עם הגיל (Sharp et al 2000). מכאן שדפוס ההתפלגות של XCI הינו תהליך דינאמי הנמשך לאורך החיים ועשוי להיות נתון ללחצי הישרדות סלקטיביים ברקמות שונות.

כבר בשלב שבו מופה הגן של תסמונת רט ל Xq28 על סמך מחקרי תאחיזה במשפחות עם מקרים חוזרים, ובטרם התגלה הקשר לגן *MECP2*, נמצאה בנשאות אובליגטוריות אינאקטיבציה מועדפת של הכרומוזום שנשא את האללים האחוזים במחלה. ממצאים אלו אושררו לאחר זיהוי הגן (Zoghbi et al 1990, Wan et al 1999). אמנם ברוב החולות רט הספוראדיות יש התפלגות XCI אקראית, אך בקבוצת המקרים עם נטית XCI לא אקראית נמצאה שכיחות יתר של אינאקטיבציית כרומוזום X האבהי (Amir et al, 2000, Weaving et al 2003,) (Smeets et al 2003). ממצאים אלו עולים בקנה אחד עם מחקריהם של Trappe ועמיתיו ושל Girade ועמיתיו (2001) שהראו כי מעל 99% מהמוטציות החדשות בגן *MECP2* מתרחשות בכרומוזום האבהי. לפיכך, ניתן לפרש את הנטייה להעדפת האינאקטיבציה של הכרומוזום האבהי בחולות רט, כתוצאת תהליך סלקציה לטובת התאים התקינים (Zoghbi et al 1990, Amir et al 2000, Takagi et al 2001).

מסקירת הספרות עולה כי התפלגויות XCI נטויות, נמצאו בעיקר במקרים קיצוניים מבחינה פנוטיפית או גנוטיפית כגון נשאות אסימפטומטיות או חולות קלאסיות עם מוטציות קוטעניות מוקדמות. מכך התבקשה שאלת ההשפעה של דפוס ה XCI על הפנוטיפ בכלל חולות רט. על מנת לענות על שאלה זו כלל מחקר זה הערכות של דפוס ה XCI בדגימות דם היקפי של רוב חולות רט והאינטראקציות בין מדד זה לבין חומרת הפנוטיפ ורמת ביטוי mRNA נבחנו בקרב חולות עם אותה מוטציה או מוטציות דומות.

הביטוי הקליני של מוטציות ב *MECP2* בתסמונת רט קלאסית ואטיפית

המחקרים הראשוניים לגבי היחס בין סוגי מוטציות לבין המופע הקליני של תסמונת רט, העלו ממצאים לא עקביים, שנבעו כנראה ממדגמים קטנים או משוני בקטגוריזציה של המוטציות והגדרת המשתנים הקליניים. גם השוני האנדידואלי בהתפתחות התסמינים והשפעת התפלגות האינאקטיבציה של כרומוזום X יכולים היו להקשות על זיהוי קשר גנוטיפי-פנוטיפי מובהק. רות אמיר ושותפיה (Amir et al 2000) לא מצאו קשר מובהק בין סוגי מוטציות לבין הערכה כללית של חומרת התסמונת, אלא רק ביחס לשלושה תסמינים ספציפיים. במחקרים שבוצעו במדגמים גדולים יותר, ניכר כי לחולות עם מוטציות עצר (nonsense) מופע חמור יותר מאשר בחולות עם מוטציות חלף (missense), ברוב המדדים הקליניים שנבדקו (Cheadle et al 2000). השפעה גם למיקום המוטציות. בחולות עם מוטציות קוטעניות מוקדמות נמצא פנוטיפ חמור יותר מבחולות עם מוטציות קוטעניות בקצה C (Cheadle et al 2000, Huppke et al 2003, Charman et al 2005). ממצאים אלו נתמכו במבחנים מולקולריים שהראו ש *MECP2* קטוע בקצה 3' שומר על תפקוד שאירתי המתבטא ברמה מסוימת של דיכוי שעתוק בדרוזופילה (Kudo et al 2003).

מניתוחי אינטראקציות גנוטיפ-פנוטיפ במוטציות הגורמות לשינוי רצף *MECP2* ללא קטיעת תרגומו עולה תמונה מורכבת יותר. ונראה כי קיים קשר בין מוטציות חלף ספציפיות לבין הפנוטיפ הנובע מהן. השפעת מוטציות חלף או in-frame deletion/insertion תלויה במיקומן, שכן אזורים שונים בגן נקשרים לחלבונים או קומפלקסים ספציפיים (Kudo et al 2003). גם אופי החומצות האמיניות שמוחלפות יכול להשפיע על חומרת הפנוטיפ. החומצות האמיניות ואלין ואלנין לדוגמא, הן בעלות מבנה ומטען חשמלי דומה מאוד ובהתאמה לכך, מוטציות חלף המערבות אותן נמצאו במקרים אטיפיים קלים יחסית, כגון p.A140V בזכרים עם פיגור שכלי לא ספציפי (Couvert et al 2001, Cohen et al 2002). באופן כללי נמצאו בחולות רט עם וריאנטים קלים רק מוטציות חלף (בעיקר p.R133C ו p.R306C) או חסרים קטנים ללא פגיעה במסגרת הקריאה בקצה C (RettBase). גם בחולות רט בוגרות עם מוטציות frameshifts בקצה C של הגן, הגורמות לחלבון ארוך מהרגיל נמצאה התנהגות אדפטיבית ותקשורת משופרת יחסית לעומת הידרדרות חדה של התפקודים המוטוריים (Smeets et al 2005). מאידך, מוטציית החלף R106W נקשרה בפנוטיפ קליני ומוליקולרי חמור יותר מאשר מוטציות קוטעניות בקצה C (Kudo et al 2003, Colvin et al 2004).

לאור מורכבות הקשר בין גנוטיפ לפנוטיפ תסמונת רט והסתירות עולות בהשוואה בין מחקרים שונים, שיערנו את קיומם של גורמים גנטיים ואפיגנטיים נוספים המשפיעים על יחס ביטוי הגן המוטנטי לעומת הגן התקין. לשם בדיקת השערה זו פיתחנו שיטה ייחודית למדידת רמת תוצרי שעתוק של *MECP2* ביחס למוטציות שונות וכן בדקנו את השפעת התפלגות האינאקטיבציה של כרומוזום X על רמות ביטוי ועל השונות הפנוטיפית בחולות עם אותה מוטציה.

החלבון *MECP2* – מבנה, ביטוי ותפקוד

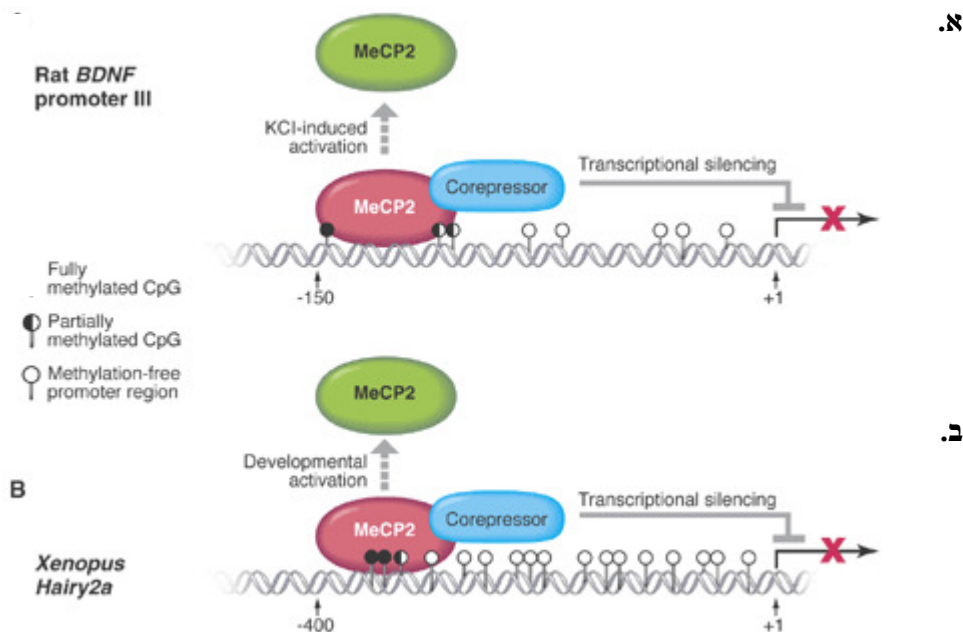
MECP2 הוא חלבון כרומוזומלי שכיח שמשקלו המולקולרי כ 75 Kd. איזופורם *MECP2_e2* מורכב מ 486 חומצת אמיניות והאיזופורם *MECP2_e1* כולל 498 ח"א. שני החלבונים האיזופורמיים הללו נבדלים בקצה N שבו יש באיזופורם *MECP2_e1* שרשרת בת 21 חומצות אמיניות, עתירת גליצין ואלנין. החלבונים היחידים שלהם שרשראות פוליגליצין ופוליאלנין משתייכים לממשפחת homeobox אשר מווסתים תהליכי שעתוק התפתחותיים (Mnatzakanian et al 2004). שרשרת זהה לזו של *MECP2_e1* נמצאת גם בקצה N של extracellular signal regulated kinase-1 (ERK1) קינאז המקשר בין פעילות פוסט סינפטית לבין ויסות השעתוק. מאפיין משותף נוסף לשני חלבונים אלו, ERK1 ו *MECP2_e1* הוא ששניהם מסתמנים בתאי העצב בגרעין וגם במבנים פוסט-סינפטיים. מאפיינים משותפים אלו מרמזים ש *MECP2_e1* עשוי לשאת גם בתפקיד התיווך בין פעילות סינפטית לבין ויסות שעתוק, בדומה ל ERK1 (Aber et al 2003).

לעומת קצה N המבחין בין שני האיזופורמים, המשך החלבון הכולל את האתרים התפקודיים העיקריים MBD ו TRD, הינו זהה בשני האיזופורמים. Methyl CpG Binding Domain (MBD) ממוקם בחומצות אמיניות 78-162 של *MECP2_e2* (או 93-177 של האיזופורם *MECP2_e1*) ונקשר לדינוקליאטידים CpG הממותלים באופן סימטרי וממוקמים בעיקר בפרומוטרים (Nan et al 1993). אתר זה הומולוגי לארבעה חלבוני MBD ידועים נוספים: Mbd3, Mbd2, MeCP1 ו Mbd4 (Hendrich & Bird 1998). מחקר עדכני הראה כי MBD של *MECP2* נוטה להיקשר לדינוקליאטידים CpG ממותלים יחידים אשר בקרבתם יש דנ"א עתיר בנוקליאטידים A/T ($[A/T]_{\geq 4}$), בניגוד לחלבוני MBD אחרים שאינם זקוקים למוטיב זה לצורך התקשרותם לכרומטין (Klose et al 2005). זהו סימן לכך של *MECP2* יש תפקיד ייחודי שאינו מגובה על ידי יתר חלבוני MBD. לאחרונה הוכח כי אזור ה MBD קושר אליו histone methyltransferase שגורם למתילציה של שייר ליזין 9 בהיסטון H3. מתילציית היסטונים מאפיינת אזורי הטרוכרומטין קונסטיטוטיביים (Fuks et al 2003, Horike et al 2005).

Transcription Repression Domain (TRD) ממוקם ב *MECP2_e2* בחומצות אמיניות 207-310 (222-325 באיזופורם *MECP2_e1*). אתר זה נקשר לקו-רפרסור Sin3A המתווך עם פקטורים מדכאי שעתוק שהעיקריים בהם הינם histon deacetylases 1-2 (HDACs), הקומפלקס SMRT (Silencing mediator of retinoic acid and thyroid receptors) ופקטור Co-REST (RE1 silencing transcription factor) (Stancheva et al 2003). שאחראיים לבקרת שיעתוק של גנים המעורבים בהתמיינות תאי עצב במח המרכזי (Lunyak et al 2002). HDAC1 גורם לדאצטילציה של ליזין 14 בהיסטון H3 ושל ליזין 16 בהיסטון H4 (Wan et al 2001). כתוצאה מכך מתגברת האפינויות בין ההיסטונים הטעונים חיובית לבין הדנ"א הטעון שלילית ומביאים להידחסות הכרומטין ולהפחתת נגישותו לגורמי שעתוק. הפרת האיזון שבין אצטילציה ודה-אצטילציה של היסטונים נמצאה גם בבסיס הפרעות גנטיות נוירו-התפתחותיות אחרות (Ausio et al 2003). העבודה הנוכחית כוללת בדיקת רמת האצטילציה של היסטונים במערכת ביטוי של מוטציות חלף חדשה ב TRD, על מנת לברר את השלכותיה על תפקוד אתר זה. אתר Nuclear Localization Signal (NLS) ממוקם בתוך TRD, בין החומצות האמיניות 255-271 ב *MECP2_e2*. סיגנל זה מזוהה בתא ההומני ומאפשר את העברתם של חלבונים הנושאים אותו לגרעין. קצה C של *MECP2*, מוגדר ב 63 החומצות האמיניות האחרונות והוא חשוב ליציבותו של החלבון דרך קשירת חלבונים המגנים מפני דגרדציה (Yusufzai and Wolffe 2000). כמו כן הוא תורם לחיזוק ההתקשרות של *MECP2* להטרוכרומטין (Cheadle et al 1999). במסגרת העבודה הנוכחית נבדקה, בין השאר, השפעתם של מוטציות חסר בקצה C על רמת תוצרי השיעתוק.

החלבון *MECP2* קיים בכל הרקמות אולם רמתו גבוהה ביותר במוח בוגר, ברוב הנזירים אך לא בתאי הגליאה. במהלך התפתחות המוח ביטוי של *MECP2* נמוך והוא עולה במקביל לסדר הבשלת המבנים המוחיים; עמוד השדרה וגזע המוח שהינם מבנים מוחיים ראשוניים, הופכים חיוביים לנוכחותו לפני מבנים חדשים יותר כגון ההיפוקמפוס והקורטקס. עליית רמה זו נמצאה בתיאום זמנים עם שלב היווצרות הסינפסות במבנים חדשים אלו, האחראים בעיקר על תפקודי חשיבה ולמידה, ובהם מגיעה רמתו של *MECP2* לשיאה במוח הבשל ונשארת כך לאורך כל החיים הבוגרים (Coy et al 1999, LaSalle et al 2001, Kishi et al 2004). רמתו של *MECP2_e1* במוח גבוהה פי 10-12 בערך מרמת *MECP2_e2* (Mnatzakanian et al 2004). ממצאי מחקרים אלו תומכים בכך שתאי העצב במוח המרכזי הם מקום הפעילות העיקרי של *MECP2* וכי פעילותו יכולה להיות קשורה ביצירת ותפקוד הסינפסות. תזמון הופעת *MECP2* ביחס להתפתחות המוח מרמז גם על הסבר אפשרי להופעה הפוסטנאטלית המעוכבת של תסמיני רט.

לאחרונה הצטברו ממצאים הממחישים כיצד MeCP2 מעורב ביצירת שינויים סינפטיים ארוכי טווח (synaptic plasticity) דרך וויסות ביטוי גנים נוירונלים בתגובה לגירויים עצביים. הדוגמא הבולטת ביותר לכך היא וויסות ביטוי הגן *BDNF* (brain-derived neurotrophic factor) כפי שמומחש בתרשים א.2 על פי Klose and Bird (2005). שינויים ארוכי טווח באופן פעולת הסינפסות, כתוצאה מגירויים עצביים הם הביטוי הפיזיולוגי של תהליכי למידה וזיכרון, כך שקל לזהות את הקשר בין פגיעה בבקרתם לבין תסמיני רט והפרעות עצביות-התפתחותיות אחרות הקשורות במוטציות ב *MECP2*.



תרשים א.2. בקרת שיעתוק באמצעות MeCP2

המחשת אופן פעולתו של MeCP2 בוויסות שיעתוק של הגנים *BDNF* בחולדה ו *Hairy2a* ב *Xenopus*. בשני המקרים MeCP2 נקשר לדינוקליאוטידים CpG ממותלים (עיגולים שחורים או שחורים למחצה) שנמצאים בפרומוטרים של גנים ספציפיים המעורבים בהתפתחות ותפקוד תאי העצב. א. במצב מנוחה של תא עצב, *MECP2* קשור לפרומוטר III הממותל של *BDNF* ומגייס קו-רפרסורים שמשנים את מבנה הכרומטין באזור ומפחיתים את נגישות גורמי השיעתוק. כשתא העצב מעורר ומתרחשת דה-פולאריזציה של הממברנה, מתרחשת דה-מתילציה של הפרומוטר או פוספורילציה זמנית של MeCP2 הגורמים להנתקו מהפרומוטר. עקב כך מיוצר *BDNF* שהופך גירויים עצביים חולפים לשינויים ארוכי טווח בפעילות המוח. ב. MeCP2 פועל באופן דומה גם בהפעלת הגן *Hairy2a* במהלך ההתפתחות מערכת העצבים המרכזית של *Xenopus*.

התרשים לקוח מאת - Klose and Bird. 2003. Science, 302 p. 794

חיות מודל לתסמונת רט

עכברים טרנסגניים עם *MECP2* מוטנטי או חסר, מדגימים פנוטיפים דומים לתסמונת רט, בוריאציות התלויות בזוויג ובאופי הפגיעה. נקבות עכבר הטרנזיגוטיות להעד *Mecp2* ($Mecp2^{null/X}$) הציגו התפתחות נורמלית לכאורה עד גיל 6 חודשים בערך, אז הופיעו תסמינים נוירולוגיים שמזכירים את אלו של תסמונת רט (Guy et al 2001). הופעת הסימפטומים בגיל זהה להופעתם בחולות רט ולא בשלב התפתחותי מקביל, יכולה לרמז שהמחלה היא תלוית זמן. זכרים המיזיגוטיים ($Mecp2^{null/Y}$) ונקבות הומוזיגוטיות להעד *Mecp2* ($Mecp2^{null/null}$) נראים בריאים בהמלטה ומתחילים לפתח סימפטומים דמויי תסמונת רט אחרי גיל 6 שבועות ומתים כשבועיים לאחר מכן. עכברים טרנסגניים ל *null-MECP2* רק בתאי אב של מערכת העצבים לא הראו פנוטיפ שונה מזה של העכברים הטרנסגניים ל *null-MECP2* בכל תאי גופם (Guy et al 2001). במקביל פיתחו Chen ועמיתיו (2001) עכברים שבהם נפגע *Mecp2* בתאי עצב פוסט-מיטוטיים בלבד. העכברים נראו נורמאליים עד גיל 5 שבועות בערך, אז החלו לבטא מחלה נוירולוגית שהביאה למותם בין גיל 6 עד 12 שבועות. בבדיקה פתולוגית והיסטולוגית של מוחות עכברים אלו: נראתה הארכיטקטורה הכללית של המוחות תקינה אולם בבחינה מדוקדקת יותר התגלתה ירידה בגודל הנוירונים ועליה בצפיפות הנוירונים בהיפוקמפוס ובקורטקס, באופן התואם את אשר תואר במוחות של חולות תסמונת רט (Armstrong et al 1995, Hendrich et al 1998). שתי קבוצות חוקרים אלו הדגימו כי המוח הוא מקום פעולתו החיוני העיקרי של *MeCP2*.

לאור הדמיון התפקודי בין חלבוני MBD השונים, נבדקה השאלה האם יש ביניהם שיתוף פעולה סינרגי. לשם כך הושרתה בעכברי *MECP2 null* פגיעה נוספת ב *Mbd2* אולם זו לא החמירה את הפנוטיפ. לעומת זאת פגיעה ב *Mbds* האחרים היתה לתאלית (Guy et al 2001). הפנוטיפ הנוירולוגי הבלעדי של מוטציות ב *MECP2* כמעט ללא מעורבות ישירה של מערכות אחרות, מאשש גם הוא את ההכרה כי לחלבון זה יש תפקודים ספציפיים בתאי עצב שאינם מתבצעים על ידי שאר חלבוני MBD. במטרה לבדוק השפעת מוטציות עצר (nonsense) ב *MECP2*, נוצרו עכברי מודל עם מוטציה כזו בעמדה 308. בעכברים אלו הזכרים ההמיזיגוטיים ($Mecp2^{308/Y}$) הציגו הפרעה שדומה לתסמונת רט, הם היו אסימפטומטיים עד גיל 4-5 חודשים אז הסתמנו רעד, קיפוזיס וחוסר תפקוד מוטורי. בנקבות ההטרנזיגוטיות ($MECP2^{308/X}$) הופיעה פגיעה מוטורית בגיל 10 חודשים בערך והן הראו שונות פנוטיפית התלויה בהתפלגות האינאקטיבציה של ה *X*. אף על פי כן, תוצאות מבחני הזיכרון והלמידה שלהן היו בטווח הנורמה (Shabazian et al 2002b).

שתי קבוצות המחקר התמודדו בהמשך עם השאלה האם החזרת ביטוי *MECP2* לחיות מודל של תסמונת רט בשלבים עובריים, יכולה למנוע את התפתחות התסמינים הנוירולוגיים. Tucker ועמיתיו (2001) ביטאו *MECP2* תחת בקרת הפרומטר של החלבון *Tau*. חלבון ה-*Tau* מתחיל להתבטא בתאי עצב פוסט-מיטוטיים עכבריים בסביבות היום התשיעי להתפתחות העובר וביום ה-10-11 הוא מופיע בכל מערכת העצבים. עכברים זכרים עם *null-MECP2* שהוחדר לתוכם *Tau-MECP2* לא נבדלו מעכברים זכרים נורמאליים. אולם כאשר הוחדר טרנסגן זה לעוברי *WT* התקבלה בהם הפרעה חמורה בתפקוד המוטורי (Collins et al 2004). בהמשך לכך, נבדקה שאלת ההצלה במודל עכבר עם *MeCP2*^{308/Y} וטרנסגן של *MECP2* אנושי. העכברים הטרנסגניים הציגו בתחילת חייהם כישורי למידה משופרים אולם לאחר מכן פיתחו הפרעה נוירולוגית מתקדמת שחריפותה עמדה ביחס ישר לרמות הביטוי של *MECP2* (Sweatt et al 2004).

ממחקרים אלו ניתן ללמוד כי חריגות מנורמת הביטוי של *MECP2* בכל כיוון, עלולות לגרום להפרעות נוירולוגיות שונות באופיין. בהשראת מסקנה זו, נבדקו במסגרת עבודה זו, רמות הביטוי של תוצרי השעתוק של *MECP2* בדם היקפי של חולות רט קלאסיות ואטיפיות, עם ובלי מוטציות באזור המקודד של הגן. כמו כן, תפקידו של *MECP2*, בהתפתחות, בהבשלה תפקוד המוח, מחזק את ההכרה כי ניתן לראות בתסמונת רט מודל להפרעות פיגור שכלי אחרות החולקות עימה את מסלולי ההתפתחות העצביים הנפגעים ואולי גם את הגורם הגנטי. הכרה זו הניעה אותנו לחפש מוטציות ב-*MECP2* מחוץ לגבולות האזור המקודד ומעבר להגדרות הקליניות של תסמונת רט.

הערכת ההשפעה הפונקציונאלית של מוטציות ב-*MECP2*

השפעותיהן הפונקציונליות של מוטציות ב-*MECP2*, נבדקו בחולות רט ביחס לאופי המוטציות ומיקומן. המדדים התפקודיים שנבחרו על ידי קבוצתו של Kudo (2000,2003) להערכת השפעותיהן של מוטציות ב-*MBD* וב-*TRD* במערכות ביטוי זמניות היו אופן ההיקשרות להטרוכרומטין ורמות השעתוק, בהתאמה. מוטציות עצר שגורמות להשמטת *TRD* התבטאו ברמה נמוכה של *MECP2* ושינו את רמות השעתוק במערכות ביטוי זמניות של *MECP2* בתאי עכבר ובתאי דרוזופילה. השפעתן של מוטציות חלף על רמות השעתוק, ניכרה רק לגבי אלו הממוקמות ב-*MBD* (Yusufzi and Wolffe 2000). על מנת להסביר את ההבדלים התפקודיים בין מוטציות חלף שונות הממוקמות ב-*MBD*, בדקו Kudo ועמיתיו (2003) את השפעתן על רמת ההיקשרות לכרומטין ועל רמת דיכוי השעתוק בתאי דרוזופילה. הם מצאו כי המוטציות נבדלו בהשפעתן על פי מיקומן ביחס למבנה לולאתי ב-*MBD* שחיוני לשם היקשרות לציטוזין

ממותל בכרומוטין. למוטציות בשיירים הממוקמים בתוך הלולאה כגון R106W R106Q ו D156E או D156G, הייתה השפעה בולטת על מידת השעתוק וההיקשרות להטרוכרומוטין, לעומת מוטציות שמחוץ למבנים אלו. המוטציה p.T158M נמצאה בתבחין זה כבעלת השפעה בינונית ואילו מספר מוטציות, כגון p.R133C שהיא hotspot של תסמונת רט ו p.A140V שגורמת לפיגור שכלי בזכרים (Couvert et al 2002, Cohen et al 2001) לא הראו אפקט נבדל מהמצב הנורמלי. חוסר יכולתם של מבחני תפקוד אלו לגלות הפרעה בתפקוד החלבון עם המוטציה p.R133C, ו p.A140V שוללת את יכולתם לתת מענה אמיתי למלוא המורכבות התפקודית של *MECP2*.

מדד נוסף ששימש להערכת תפקוד *MECP2* במצב מוטנטי לעומת נורמאלי, הוא רמת האצטילציה של היסטונים. בעכברי מודל זכרים לתסמונת רט עם מוטציית עצר (nonsense) בשייר 308 של *MECP2* נמצאה עליה באצטילציה של ליזין 9 בהיסטון H3 (H3K9) במוח ובטחול בסדרי גודל של פי 2-3, על אף היקשרות תקינה של *MECP2* להטרוכרומוטין (Shahbazian et al 2002b, Young & Zoghbi 2004). ממצא זה מעיד על מודיפיקציה פתולוגית של הכרומוטין ודיסרגולציה של ביטוי גנים ברקמה זו. מבין המחקרים שבוצעו בתאים מחולות רט עם מוטציות פסק ב TRD, קבוצה אחת (Wan et al 2001) הדגימה עליה סלקטיבית באצטילציה H4K16 בלימפובלסטים משתי חולות, לעומת שני מחקרים שלא הדגישו תופעה זו בתרביות לימפוציטים T מדם חולות (Balmer et al 2002; Kaufmann et al 2005). יתכן כי פער זה נובע ממיסוך האפקט של כרומוזום X המוטנטי על ידי הכרומוזום התקין בתרביות הלימפוציטים בעוד שמיסוך זה אינו קיים בעכברים המיזוגוטיים וכן לא בשבטי לימפובלסטים שבהם אותו כרומוזום X הוא האקטיבי בכל התאים.

מוטציות חלף באתר TRD זכו להתייחסות מועטת במחקרי פונקציונליות. במחקר שהשתמש בעוברי *Xenopus* כמערכת ביטוי זמנית של *MECP2* באמצעות הזרקת רנ"א עם מוטציית חלף R306C בסוף TRD ומוטציית עצר R168X, נבדקה מידת ההיקשרות של קומפלקסים מעכבי שעתוק ל-TRD: HDAC1, Sin3A, SMRT. נמצא כי בעוברי *Xenopus laevis* שביטאו R168X לא נמדדה כלל היקשרות לקומפלקסים אלו ואילו בעוברים עם R306C נמצאה היקשרות מופחתת (Stancheva et al 2003). קיימת סתירה לכאורה בין ממצאי שתי הקבוצות שלא מצאו עליה ברמות האצטילציה של היסטונים כפונקציה של מוטציות פסק ב TRD (Balmer et al 2002, Kaufmann et al 2005) לבין הממצא של ירידה בהיקשרות HDAC1 האחראי לדאצטילציה של ההיסטונים, אפילו בנוכחות מוטציית חלף p.R306C באותו אזור (Stancheva et al 2003). במחקר זה שולבה אנליזה של רמת האצטילציה

של היסטונים בדגימות חלבונים היסטוניים שהופקו ממערכות ביטוי זמניות של *MECP2_e1* עם מוטציות חלף ב TRD. זהו נסיון ראשון להדגים השפעה של מוטציית חלף על אצטליציה של היסטונים במערכות ביטוי זמניות של *MECP2* תקין ומוטנטי בתרבויות תאים הומניים. אנליזה זו שימשה גם להערכת השפעתה התפקודית של מוטציית חלף פוטנציאלית חדשה שנמצאה ב TRD, בחולת רט ישראלית.

סיכום

התופעה של תסמונות עצביות-התפתחותיות שונות האחוזות באותו גן ידועה על פי דוגמאות קודמות. מוטציות בגן XH2 למשל, הממוקם ב Xq13 ומקודד חלבון המווסת שיעתוק, אחראיות ל 5 תסמונות שונות שהמשותף לכולן הוא פיגור שכלי (Gibbons et al 1995), בדומה לכך, הגן L1CAM שממוקם ב Xq28, אחראי לפיגור שכלי עם הידרוצפלוס וגם לתסמונת MASA (Rosenthal et al 1992). הגן UBA3E האחוז בכרומוזום 15 אחוזות תסמונת אנגלמן ותסמונת Prater-Willie בהתאם למקור ההורי של האלל הפגוע. תסמונת רט נקשרת במידה רבה (80% מהמקרים הקלאסיים) במוטציות בגן *MECP2* אולם בנוסף לכך נקשרו בגן זה הפרעות נוירו-התפתחותיות אחרות כגון פיגור שכלי לא ספציפי (Couvert et al 2001), תסמונות פיגור שכלי עם סכיזופרניה וסימנים פיראמידליים (Meloni et al 2000) או אוטיזם (Shibayama et al 2004). בעבודה זו נקראו רצפי האקסונים ואתרי השחבור באוכלוסיית חולים רחבה שכללה מלבד תסמונת רט קלאסית ואטיפית גם חולים עם תסמונת אנגלמן ללא מוטציות בגן UBA3E, זכרים עם אנצפלופתיה מולדת, אוטיסטים ובעלי פיגור שכלי ספציפי או לא ספציפי.

שיטות האבחון המולקולרי של מוטציות בגן *MECP2* הנהוגות כיום כוללות קריאת רצפי האקסונים ואתרי השחבור של הגן וכן חיפוש אברציות רחבות היקף במתחם הגן באמצעות כימות יחסי של דנ"א בשיטת MLPA. גם לאחר שימוש משולב בשיטות אלו נותרו כ 20% מחולות רט הקלאסיות ויותר מ 80% מחולות רט אטיפיות ללא אבחון גנטי. היות וכל המוטציות שהתגלו עד היום בחולות רט מביאות לירידה בתפקוד *MECP2* ובהנחה שתסמונת רט היא מונוגנית, התבקש אבחון אלטרנטיבי של חסרים ברמת הביטוי של *MECP2*. הערכת רמת הביטוי היחסית של תוצרי השעתוק של *MECP2* יכולה לחשוף חולים המועדים לשאת מוטציות באזורים רגולטוריים מחוץ לאזור המקודד של הגן. באופן כזה ניתן יהיה להשתמש בשיטות האבחון הישירות לחיפוש מושכל של מוטציות באזורים הכוללים אתרי היכרות לפקטורי שיעתוק או שחבור בפרומוטר, באינטרונים ובאזור 3'UTR (היות ו 5'UTR מורכב מהאקסונים 1 ו 2 בעלי שחבור או תרגום אלטרנטיבי הוא נכלל ממילא בשלב חיפוש מוטציות מקודדות).

הקשר בין סוגי המוטציות בגן *MECP2* לבין התמונות הקליניות הנגזרות מהן, נחקר עד כה תוך כדי שימוש בקטגוריות שונות של שני המשתנים, ללא התחשבות בהשפעות האפיגנטיות של התפלגות האינאקטיבציה של ה-*X* על הביטוי היחסי של האלל המוטנטי. הממצאים שהתקבלו ממחקרים אלו נתנו תמונה מורכבת ולא מספקת להסברת הטווח הפנוטיפי הרחב בין המוטציות השונות ואפילו בין מקרים שונים עם אותה מוטציה. במחקר זה נבדק הקשר גנוטיפ-פנוטיפ תוך חלוקת המוטציות לכאלו המביאות לקטיעה מוקדמת של התרגום לעומת קטיעה מאוחרת. מדידת הפנוטיפ הסתמכה על ציינון רשימת התסמינים המחויבים והתומכים של תסמונת רט תוך בקרת גורם הגיל והתפלגות האינאקטיבציה של ה-*X*.

שינויים אפיגנטיים הקשורים בתפקוד *MECP2* נמצאו בתסמונות עצביות התפתחותיות שונות כתסמונת אנגלמן ואוטיזם, בלא זיהוי מוטציות בגן *MECP2* עצמו (Glaze 2004) ואילו בעכברים שבהם הושרה ביטוי יתר קל של *MECP2* הופיעו תסמינים נוירולוגיים ייחודיים שונים מאלו של תסמונת רט בעכבר (Sweatt et al 2004). ניתן ללמוד מממצאים אלו כי דיסרגולציה של *MECP2* יכולה להיות מעורבת גם בהפרעות עצביות-התפתחותיות שונות מתסמונת רט וכי קיים מנגנון מוליקולרי משותף בבסיסן של הפרעות עצביות-התפתחותיות הנבדלות הן מבחינה קלינית והן מבחינה גנטית. הגן *MECP2* מקודד שני חלבונים איזופורמיים ממשפחת MBD שמוסטים שעתוק באמצעות ארגון מחדש של הכרומטין. ל *MECP2* תפקיד ייחודי בנוירונים של מערכת העצבים המרכזית, הקשור בהיווצרות, בשימור ובפלסטיות של סינפסות בעיקר בהיפוקמפוס ובקליפת המוח. תפקודו העיקרי של *MECP2* מתבצע באמצעות היקשרות לפרומוטרים ממותלים וגיוס פקטורי דיכוי שעתוק הגורמים לדה-אצטילציה של היסטונים, הידחסותם וחסמת נגישות הגן הסמוך לפקטורי השעתוק. רובן המכריע של המוטציות הפתוגניות הן ספוראדיות. במקרה של מוטציה חלף חדשה שהורשה מהאם אך נשללה בקבוצת ביקורת תואמת מוצא, מתבקשת שאלת ההבחנה בין פולימורפיזם נדיר לבין מוטציה פתוגנית עם הצלה אפיגנטית בזכות התפלגות XCI נטויה באם. לשם כך, פיתחנו מערכת ביטוי זמנית של *MECP2* תקין או מוטנטי, בתרבית תאים הומניים. השפעת המוטציה תוכננה להיבדק באמצעות מדידת רמת האצטילציה של היסטונים בתאי תרבית שביטאו את החלבון עם המוטציה הנבדקת. שיטת בדיקה זו עשויה לשמש גם לבדיקת הפתוגניות של שינויים אחרים ב-TRD.

ב. השערה ומטרות המחקר

עבודת המחקר הנוכחית מתמקדת בבסיס הגנטי של תסמונת רט כמודל של תסמונת פיגור שכלי אחוז בכרומוזום X. השערת המחקר היא כי שילובים של שונות גנטית כאופי ומיקום המוטציות ב *MECP2*, יחד עם שונות אפיגנטית של התפלגות האינאקטיבציה והשפעה על רמות הביטוי, יכולים להסביר את הטווח הפנוטיפי הרחב של תסמונת רט. המטרות הספציפיות של העבודה מפורטות להלן.

1. הקמת עוקבה (cohort) ארצית של חולים ישראלים החשודים לתסמונת רט או הפרעות עצביות התפתחותיות אחרות שיכולות להיות קשורות במוטציות ב *MECP2*, איסוף מפורט של נתונים הקליניים ואבחונם המקיף מבחינה גנטית ואפיגנטית.
2. בדיקת מתאמים בין גורמים גנטיים ואפיגנטיים לבין המופע הקליני של תסמונת רט.
3. פיתוח כלי לאיבחון חולות עם פגיעה ברמת הביטוי של *MECP2*.
4. הקמת מערך סריקת אזורים רגולטוריים בגן *MECP2*, בפרומוטר, באזורים לא מתורגמים (UTRs) ובאינטרונים, במטרה לתת אבחנה גנטית למקרי רט ללא מוטציות באזור המקודד.
5. בדיקת ההשלכות המולקולריות הישירות של מוטציות חלף חדשה בTRD, באמצעות מדידת המודיפיקציות ההיסטוניות במערכת ביטוי זמנית בתרבית תאים הומניים, לצורך הבחנה בין מוטציה פתוגנית לבין פולימורפיזם באזור זה.

ג. כלים ושיטות

נבדקים

העוקבה הישראלית של חולים עם חשד קליני למוטציות בגן *MECP2* שהוקמה במהלך עבודה זו מנתה 136 נבדקים. הרכב העוקבה היה הטרוגני וכלל 54 חולות עם תסמונת רט קלאסית, שבע חולות עם וריאנט של התקפי כפיון מוקדמים (ES –early onset infantile seizures), שש חולות עם תסמונת רט קלה (forme fruste), ארבע חולות עם תסמונת רט מולדת (congenital), ארבע חולות עם תסמונת רט ודיבור שמור (PSV- preserved speech variant), ארבע חולות ושלושה חולים עם וריאנט דמוי אנגלמן (Ag. like), תשעה זכרים עם אנצפלופתיה קשה מולדת (congenital encephalopathy), שמונה זכרים עם פיגור שכלי לא ספציפי או יחד עם סכיזופרניה, שלושה זכרים עם פיגור שכלי משפחתי אחוז ב X ללא אבחנה גנטית וזכר עם תסמיני רט קלאסיים על רקע קריוטיפ 47,XXY. כמו כן נבדקו 33 חולות עם פיגור שכלי וחפיפה חלקית לתסמונת רט, שרובן נשללו לתסמונת ה X השביר ולאברציות כרומוזומיות, והיו בעלות חלק מהתסמינים הבאים: מיקרוצפלי, פרכוסים או תרשים אלקטרואנצלוגרם לא תקין בגיל צעיר, האטה או נסיגה התפתחותית, אוטיזם, תנועות ידיים סטריאוטיפיות ו/או אטקסיה. ממוצע גיל החולים בזמן הבדיקה, היה 10.8 שנים, סטיית התקן 7.4 שנים וטווח הגילאים: 1.5-42 שנים. רוב המקרים הופנו מאת מרפאת נוירולוגיה ילדים במרכז הרפואי שיבא, חלק ממקרי הפיגור השכלי הופנו מאת מחלקת היעוץ הגנטי במכון הגנטי במרכז הרפואי שיבא או מתוך מאגר דגימות של מחקר אחר שנערך במעבדתה של ד"ר אווה גאק לגבי הבסיס הגנטי של פיגור שכלי וסכיזופרניה. מספר מקרים של תסמונת רט קלאסית או אטיפית הופנו על ידי מרכזים רפואיים אחרים בארץ. מהדסה עין כרם הופנו 2 חולות וחולה זכר, מוולפסון הופנו שתי חולות, חולות יחידות הופנו גם מבתי החולים סורוקה בריזלי נהריה וקפלן. חמש מהחולות שנכללות בעוקבה אובחנו גנטית לראשונה במעבדתו של יובל ירון במכון הגנטי ע"ש סוראסקי באיכילוב. דגימות של החולים החשודים לתסמונת רט התקבלו לרוב יחד עם דגימות דם של האם או שני ההורים. התסמינים הקליניים של מרבית החולות החשודות לתסמונת רט אובחנו ותועדו על ידי ד"ר ברוריה בן זאב, נוירו-פדיאטרית מומחית למחלות נוירולוגיות ופרכוסיות בילדים, שמנהלת את מרפאת רט הפועלת בבית החולים שיבא. מרפאה זו מרכזת את עוקבת חולי רט הגדולה בארץ ופועלת בשיתוף פעולה עם המכון הגנטי בתחום האבחון הגנטי, ייעוץ ואבחון טרום לידתי. במרפאת רט זוכות החולות למעקב וטיפול רב תחומי נאורולוגי, אורטופדי, גסטרואנטרולוגי ותזונתי מאת צוות רב-תחומי שמתמחה בטיפול בחולות תסמונת רט.

אופן גיוס הנבדקים, איסוף המידע הקליני והגנטי ושמירתו וטפסי ההסכמה מדעת אושרו על ידי ועדת הלסינקי לניסויים בבני אדם. הורי הנבדקים האפוטרופסים קיבלו הסבר על מטרות המחקר הוחתמו על טפסי הסכמה מדעת להשתתפות במחקר, מאת עורכת המחקר או הרופא/ה המטפל/ת. דגימות הדנ"א אוחסנו במעבדה המוליקולרית במכון הגנטי בשיבא.

1. אנליזת מוטציות בגן *MECP2*

חיפוש מוטציות ב *MECP2* נעשה כהליך רב שלבי שכלל קריאת רצפי מקטעים שכיסו, בחפיפה חלקית, את ארבעת האקסונים ואת הפרומטר. בחולות עם קריאת רצף תקינה בוצעה בדיקת MLPA לאיתור חסרים או דופליקציות גדולות. בחולות רט קלאסיות ואטיפיות שנותרו שליליות למוטציות גם לאחר בדיקות אלו בוצעה אנליזת מקטעים לקצה 5' של אינטרון 2, בדיקות DHPLC לאזור 3'UTR, וקריאת רצפי מקטעים מהקצוות השמורים של האינטרונים הגדולים הראשון והשני ומכל אינטרון 3. הממצאים הושוו לרצף הגן התקין על פי GeneBank Accession # AF030876, וחריגות נבדקו גם בהורים והושוו לנתונים במאגרי מידע על וריאציות ב *MECP2* (RettBase).

הפקת DNA גנומי

דגימות דם פריפרי נלקחו מהנבדקים במבחנות המכילות EDTA למניעת קרישה. דנ"א גנומי גבה מוליקולרי הופק מ 3 מ"ל דם, באמצעות ערכת Purigene (Gentra Systems, USA). פרוטוקול ההפקה מבוסס על ליזיס אוסמוטי של תאי דם אדומים, דנטורציה של לימפוציטים, השקעת חלבונים בנוכחות אמוניום-אצטט והשקעת דנ"א באמצעות מלח ואתנול. איכותו של דנ"א גנומי מכל דגימה נקבעה לפי מדידת צפיפות האופטית בספקטרוטומטר GeneQuant (Amersham Biosciences, USA) על פי יחס הבליעה A260/A280 באורכי הגל 260 nm ו 280 nm, כשהיחס הרצוי גדול מ 1.75. כמות הדנ"א שהופקה נעה בסביבות 100-300 µg. דגימות הדנ"א נשמרו ב 4°C.

קריאות רצף ישירות

דנ"א גנומי עבר הגברה בריאקציות PCR של 5 מקטעים הכוללים את ארבעת האקסונים של *MECP2* וצמתי אקסון-אינטרון. בנוסף הוגברו שני מקטעים מאזור הפרומטר המקיפים בחפיפה אזור בן 1.5 Kb בקצה 5' של הגן. רצפי התחלים (primers) ששימשו להגברת מקטעים מתוך הגן *MECP2* ולקריאתם, מובאים בנספח א'. ריאקציות PCR בוצעו בתנאים אחידים: נפח סופי 25µl, על בסיס כ

200ng דנ"א, $1\mu\text{M}$ מכל תחל, $1.25\mu\text{l}$ DMSO, $12.5\mu\text{l}$ תערובת Reddymix (ABgene, USA) הכוללת, Taq Gold polymerase, dNTPs, בופר צבע הטענה ו 1.5 mM MgCl_2 . תנאי הריאקציות היו אקטיבציה של האינזים ב 95°C למשך 5 דקות, 35 מעגלים של דקת דנטורציה ב 95°C , דקה של הקשרות תחלים בטמפרטורת 60°C - 58°C , ודקה של סינטיזה ב 72°C . בסיום מחזורי הריאקציה, הומשכה סינטיזה של מקטעים לא מושלמים למשך 7 דקות ב 72°C . תוצרי PCR ספציפיים התואמים את הגדלים המצופים, זוהו באלקטרופורזה בג'ל אגרוז בריכוז 1.5% בנוכחות אתידיום ברומיד בבופר TBE, אחר כך נוקו בערכה של PCR purification kit (Qiagen, USA). במקרים של חסרים שהתבטאו בדגם ריצה הטרוזיגוטי של תוצר ה PCR בג'ל אגרוז, הופק ונוקה התוצר המוטנטי מהג'ל בעזרת ערכת HiYield (UBI, Canada) ועבר קריאת רצף נפרדת. כל מקטע PCR עבר קריאת רצף משני קצותיו באמצעות ערכת ABI PRISM dye terminator cycle sequencing ready reaction (Perkin-Elmer) במכשיר רצוף אוטומטי ABI Sequencer 310 (Applied Biosystems, USA). הערכה פועלת על בסיס שיטת Sanger המשתמשת ב dNTPs ו ddNTPs המסומנים בארבעה צבענים פלורוכרומיים שונים. קריאות הרצף הראשונות בוצעו באופן עצמי במכון הגנטי ובהמשך נמסרו לקריאה במעבדת שירות מסחרית של חברת Hy-Labs. הרצפים שהתקבלו הושוו לרצף הגן המוסכם AF030876(GenBank) בעזרת תוכנת blastn (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq). כל חריגה מהרצף התקין אוששה בקריאת רצף בלתי תלויה מתוצר ראקציית PCR נפרדת. המוטציות באקסונים 2-4 כונו על פי מספורם החל מקודון ATG הראשון באקסון 2 (GenBank X99686). המוטציות באקסון 1 נספרו מקודון ATG הראשון באקסון זה (GenBank BX538060), בהתאמה לשיטת המספור המקובלת על פי RettBase) International Rett Syndrome Association. במקרה של זיהוי חריגה מהרצף התקין, שאושר לפחות בשתי קריאות רצף בלתי תלויות, נבדקו הרצפים המקבילים בדגימות דנ"א של ההורים במידת האפשר. המוטציות ושינויי הרצף הושוו למאגר המידע של שינויי רצף ב *MECP2* (RettBase), למאגר המידע של SNPs ב NCBI ולפרסומים קודמים.

סקירת מוטציות מורשות בשיטת Restriction Fragments length polymorphism (RFLP)

שיטת RFLP שימשה לסקירת שתי חריגות רצף תורשתיות באוכלוסיית ביקורת תואמת מוצא: השינוי c.378-19delT או g.22939delA (לפי # AF030876GeneBank) הממוקם באינטרון 3 ומוטציית החלפה c.824C>T או p.V275A שמוקמת ב TRD (GeneBank # NM_004992.2). השינוי c.378-19del נסרק בקבוצת ביקורת שמנתה 80 נשים ממוצא אשכנזי שעברו בדיקות סקר

גנטיות, במכון הגנטי שיבא לפני או במהלך הריון. דגימות הדנא נלקחו ממאגר הדנ"א של בדיקות הסקר של המכון הגנטי, על פי מין ומוצא ללא התייחסות לגילאים. סריקת השינוי נעשתה באמצעות חיתוך באינזים BbsI (New England Biolabs #R0539) המזהה את הרצף הוריאנטי בלבד. הפעלת האינזים על תוצרי PCR של מקטע 4A (נספח א') גרמה בנוכחות השינוי לקבלת שני מקטעים באורך 416 ו 82 זוגות בסיסים. השינוי c.824T>C נסקר באוכלוסיית ביקורת באמצעות התחל 9209R (נספח א') הכולל החלפה של dCTP ב dGTP במיקום c.828, שהופעל יחד עם התחל SNPF (נספח א'), להגברת מקטע בן 584bp. בתוצרי PCR הכוללים את השינוי c.824T>C נוצר אתר חיתוך חדש של האנזים BSiEI (NEB #R0554) שגורם להיווצרות שני מקטעים בני 46 ו 538 בסיסים. תוצרי החיתוך הופרדו באלטרופוריזה אופקית בג'ל אגארוז 1.5% וזוהו בנוכחות אתידיום ברומיד.

אנליזת שינויי רצף תורשתיים חדשים באמצעים ביואינפורמטיים

מוטציות תורשתיות הושוו לרצפי נוקלאוטידים וחומצות אמינו של 17 מיני אורגניזמים שונים באמצעות תוכנת BLAT, אשר פותחה ע"י ד"ר Jim Kent וניתנת לשימוש חופשי באתר של אוניברסיטת סנטה קרוז קליפורניה; (<http://www.genome.ucsc.edu/>). בבדיקה זו הוערכה דרגת השימור האבולוציוני של הקודון הגנטי במקום השינוי. שינויי רצף שקטים (silent mutations), נבדקו באמצעות תוכנת ESEfinder (Cartengi et al 2003) אשר מזהה רצפי התקשרות של אלמנטים המבקרים את תהליכי השעתוק או השחבור של הגן באקסונים, היא פותחה במעבדות cold spring harbor במדינת ניו יורק, ארה"ב וניתנת לשימוש חופשי ברשת (<http://exon.cshl.edu/ESE/>). הזנת הרצפים התקינים לעומת החריגים אפשרה לבדוק האם השינויים משפיעים על התקשרות אלמנטים רגולטוריים אלו לאזור.

אנליזת גודל מקטעים

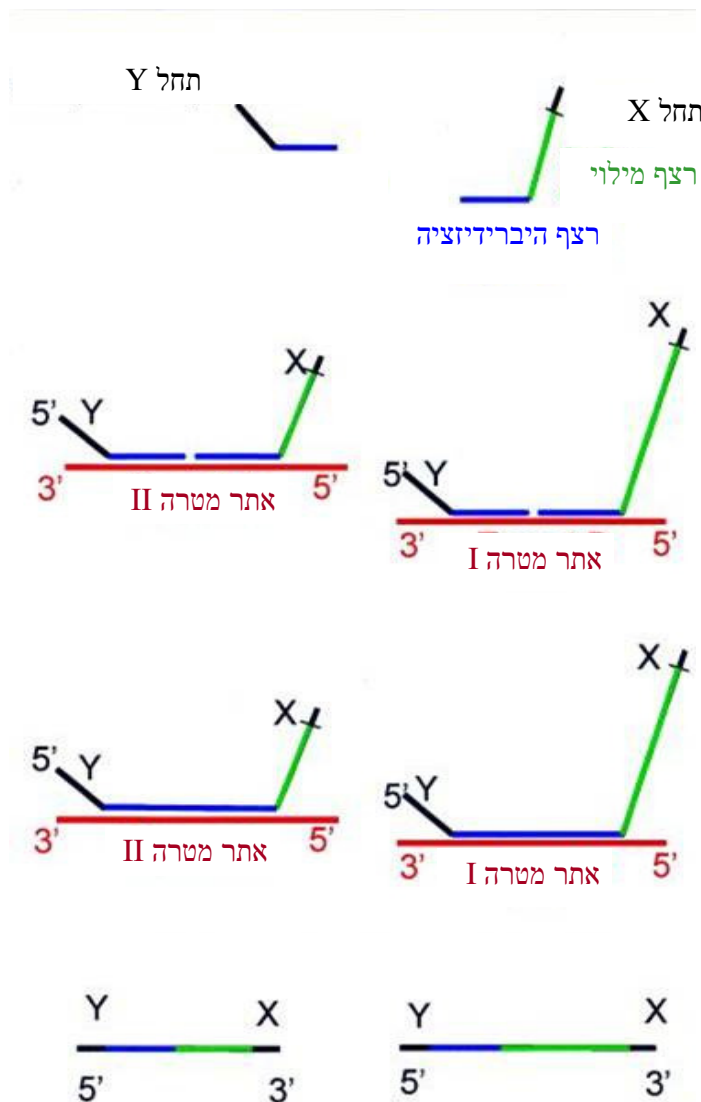
חמש חולות רט קלאסיות וחולה אחת עם צורה מולדת, ללא זיהוי מוטציות באזור המקודד, עברו אנליזת מקטעים לבדיקת אורך תוצר PCR מקצה 5' של האינטרון השני, הכולל רצף בעל מורכבות נמוכה עתיר בשרשראות פולי T ופולי A במיקום c.135+13 עד c.135+82 (או g.83648-83580 לפי AF030876(GeneBank). מקטעי PCR באורך צפוי של 350 זוגות בסיסים יוצרו באמצעות התחל 2F והתחל 2R המסומן ב FAM (רצפי התחלים מובאים בנספח א'). תוצרי הראקציות הופרדו באלקטרופוריזה קפילרית במערכת ABI –Prism 310 (Japan) בהשוואה לסולם גדלים מסומן ב ROX המסופק אף הוא ע"י חברת ABI (USA), ונותחו באמצעות תוכנת GeneScan.

זיהוי חסרים באמצעות Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)

בדיקת MLPA מתבססת על multiplex PCR ונועדה לגילוי חסרים או דופליקציות גדולים באקסונים ובאזור 3' UTR של *MECP2*. הבדיקה בוצעה באמצעות ערכה שפותחה וסופקה על ידי חברת MRC מהולנד. תערובת הגלאים P015C ששימשה לבדיקת *MECP2* כללה 28 גלאים (טבלא ג.1), מתוכם 24 מתאימים לכרומוזום X שמתוכם שמונה ספציפיים לאזורים בתוך *MECP2*. שאר הגלאים מתאימים לאזורים בכרומוזומים אחרים כביקורת לגובה הסיגנלים. בשלב הראשון מבוצעת היברידיזציה של הגלאים לגנום ובהמשך ליגאציה של גלאים סמוכים באמצעות ליגאז עמיד חום. לסיום, מתבצעת ריאקציית הגברה multiplex PCR עם תחלים אחידים שמקורם ברצף הגלאים. אורך תוצרי PCR אלו יוצר מדרג הנחשף בהפרדה באלקטרופורזה קפילרית כך שהמקטעים מזוהים על פי אורכם הספציפי. המחשה של עקרון שיטת MLPA מובא בתרשים ג.1.

פרוטוקול בדיקת MLPA, כלל דנטורציה של 300ng דנ"א גנומי ב 98°C למשך 5 דקות וקירור ל 25°C , הוספת תערובת הגלאים, דנטורציה ב 95°C למשך דקה והיברידיזציה ב 60°C למשך 16 שעות. לאחר מכן שונתה הטמפרטורה ל 54°C והוספה תערובת ליגאז עמיד חום לאינקובציה בת 15 דקות ב 54°C . $10\mu\text{l}$ מריאקציות הליגאציה נלקחו לצורך ריאקציות PCR עם תחלים אחידים בתנאים של: 35 מעגלים של דנטורציה ב 95°C למשך דקה, היקשרות תחלים ב 60°C למשך דקה וסינטיזה ב 72°C למשך דקה וחצי. לסיום בוצעה סינטיזה משלימה ב 72°C למשך 20 דקות.

תוצרי PCR בנפח $1\mu\text{l}$ הופרדו במכשיר 3100 Avant Genetic Analyser (ABI, USA) בנוכחות $10\mu\text{l}$ פורמאמיד ו $0.8\mu\text{l}$ סולם גודל פנימי המסומן ב Rox (ROX-500, ABI), בתנאי הפרדה של: פולימר POP-4, קפילרות בעובי 36°C , טמפרטורת ריצה 60°C במתח קבוע של 1.5kV . מיקומם ועוצמתם של הפיקים הוערכו בתוכנת Genescan שסופקה ע"י אותה החברה. לשם אומדן כמות הדנ"א ויעילות הליגאציה, הושוו שטחי פיקים של ארבעה מקטעים לא תלויי ליגאציה (64,70,76,82bp שאינם מופיעים בטבלא) לשטחו של פיק ביקורת (92bp) תלוי-ליגאציה מכרומוזום 2q14 והיו אמורים להיות נמוכים יותר. כל ניסוי כלל השוואה בין החולות לבין שלוש נקבות ביקורת נורמאליות. נתוני שטחי הפיקים של כל נבדקת הועברו לתוכנת excel, באמצעותה חושב שטח הפיק היחסי של כל מקטע (relative peak area - RPA). ערך ה RPA חושב באמצעות חלוקת שטח פיק ספציפי לסכום שטחי כל הפיקים באותה דגימה. RPA נחשב חריג כאשר נמצאה, בשני ניסויים בלתי תלויים, סטייה של יותר מ 30% מה RPA של הביקורות הנורמליות.



תרשים ג.1: עקרון בדיקת MLPA לגילוי חסרים או דופליקציות

א. דנ"א עובר הקשרות עם 28 גלאים כאשר כל גלאי מורכב משני אוליגומרים עם תחלים אחידים X, Y (צבועים בשחור) ורצפי היברידיזציה ספציפיים לאתר המטרה (כחול). אחד האוליגומרים כולל גם רצף מילוי באורך ייחודי שנגזר מחיתוך M13 (ירוק). ב. שני חלקי הגלאי נקשרים לרצפי היכרות סמוכים בדנ"א. ג. שני חלקי הגלאי הסמוכים עוברים ליגאציה באמצעות ליגאז עמיד חום. ד. תוצרי הליגאציה עוברים PCR עם זוג התחלים X, Y ומתקבלים תוצרי הגברה שונים באורכם, על פי רצף המילוי. התוצרים מופרדים אלקטרופורטית ב Automated DNA Sequencer.

טבלא ג.1. המקטעים המתקבלים באנליזת MLPA של MECP2

אורך המקטע (bp)	מיקום כרומוזומי	תפקיד או מיקום ביחס ל MECP2
92	2q14	ביקורת כמות דנ"א
210	Xp21	ביקורת
220	Xq28	ביקורת
229	Xq28	קצה C
238	Xq12	ביקורת
247	Xp-PAR	ביקורת
256	Xq28	3'UTR
265	Xp21	ביקורת
274	Xq28	אקסון 4, קודון העצירה
283	11q	ביקורת
292	Xq28	אקסון 1
301	Xq22	ביקורת
310	12p12	ביקורת
319	Xq28	L1CAM (0.2Mb centromeric)
328	Xp21.2	ביקורת
337	Xq28	TRD
346	18q21	ביקורת
355	Xq28	אקסון 3
364	Xp21	ביקורת
373	Xq28	אקסון 2
382	Xq28	ביקורת
391	Xq28	אקסון 1
400	Xp21	ביקורת
409	Xq25	ביקורת
418	Xq28	IRAK (0.04Mb centromeric)
427	Xp-PAR	ביקורת
436	17p13	ביקורת
445	Xp22	ביקורת
454	Xq28-PAR	SYBL1-D02 (0.8Mb telomeric)

אנליזת DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography)

אנליזת DHPLC מתבססת על כרומטוגרפיה נוזלית של תוצרי PCR במדרג טמפרטורות וריכוזי ריאגנטים דנטורטיביים. האמפליקונים עוברים דנטורציה, רנטורציה והפרדה בקולונה עם אפיניות לדנ"א דו גדילי, בטמפרטורת היתוך ספציפית לכל מקטע. זמן ההישארות (retention) בקולונה של כל אמפליקון דו-גדילי תלוי באורכו ובמידת ההשלמה של הגדילים המתחברים. ברנטורציה של אמפליקון הומוזיגוט נוצרים הומודופלקסים בלבד. לעומת זאת, כאשר האמפליקון כולל מוטציה או שינוי רצף נוצרים גם הטרודופלקסים שאינם קומפלימנטריים במקום השינוי. השוני בין זמני ההישארות של ההומודופלקסים וההטרודופלקסים יוצר כרומטוגרמים בעלי מופע שונה. שיטת DHPLC מתאימה לסקירת מקטעים מאזור נרחב בפרטים רבים. מקטעים עם כרומטוגרם שונה המצביע על אפשרות של הטרודופלקס, עוברים קריאת רצף ישירה לאיתור שינויי רצף או מוטציות.

אנליזת DHPLC שימשה במחקר זה לחיפוש מוטציות באזור 3'UTR של *MECP2* ב 12 חולות רט קלאסיות ואטיפיות ממוצא אשכנזי שלם או חלקי, שנמצאו שליליות למוטציות בשיטות אנליזת רצף ישירה ו MLPA. 21 זוגות תחלים (ראה נספח א') המכסים תוך כדי חפיפה חלקית את כל אזור 3'UTR תוכננו באמצעות תוכנת Primer Express (Applied Biological Industries, USA). תחלים אלו כיסו את מלוא אורכו של 3'UTR ב *MECP2* שאורכו 8.5kb (GeneBank # NM_004992). ריאקציות PCR בוצעו בנפח 25 μ l ובטמפרטורת היקשרות אחידה של 60°C בתנאים המפורטים בסעיף קריאות רצף ישירות. טמפרטורות ההיתוך האופטימליות לרנטורציה חלקית של האמפליקונים, חושבו על פי נוסחה מתימטית לפי רצף האמפליקון בתוכנת WAVE Maker (Transgenomic, USA).

דגמי ההפרדה של 21 המקטעים המכסים את 3'UTR כוילו על פי 18 נקבות ביקורת ממוצא אשכנזי. האנליזה בוצעה במערכת WAVE (Transgenomic, USA) במעבדתו של ד"ר דני ברקוביץ ממרכז ידע גליל (מיג"ל). תוצרי PCR עברו דנטורציה ב 95°C למשך 5 דקות ואז רנטורציה הדרגתית בטמפרטורות 95-25°C במשך 45 דקות לשם יצירת הדופלקסים. מכל תוצר PCR נלקחו 10 μ l לשם אלוציה בגרדיאנט ליניארי המבוסס על יחסים משתנים של בופר A (0.1 M triethylammonium acetate) ובופר B (0.1 M) (triethylammonium acetate/25% cetonitrile). דגמי הכרומטוגרמים שנתקבלו בחולות הושוו לדגמים שהתקבלו בעשר דגימות ביקורת מנשים נורמאליות, שנכללו בכל ריצה. מקטעים עם דגם הטרודופלקס שלא התקבל בקבוצת הביקורת, עברו קריאת רצף ישירה לאיתור מקור השינוי.

התפלגות אינאקטיבציה של כרומוזומי ה-X, XCI (X chromosome inactivation)

בדיקת XCI מסתמכת על ריאקציית HUMARA המקובלת (Allen et al 1992). עקרון הבדיקה הוא עיכול דנ"א גנומי באנזים רגיש מתילציה HpaII ולאחר מכן ריאקציית PCR של אתר פולימורפי עם 13-31 חזרות CAG באקסון הראשון של הגן AR (androgen receptor) (GenBank # NM_000044.2) הממוקם ב-Xq11.2-12. בכרומוזום X אינאקטיבי, עובר אזור זה מתילציה ועל כן הוא עמיד לחיתוך באנזים HpaII. עיכול דנ"א גנומי באנזים זה מותיר רק את האללים הממותלים ומאפשר הגברה מבדלת שלהם בריאקציית עוקבת של PCR. השוואה כמותית של האללים לפני ואחרי העיכול ב HpaII מאפשרת להעריך את התפלגות ה XCI בין שני הכרומוזומים. הערכה זו כוללת תיקון ליעילות הגברה שונות למקטעים ארוכים וקצרים כדלהלן: $XCI = (d1/u1)/(d1/u1+d2/u2)$, כאשר d1 ו d2 מייצגים את עוצמת הסיגנלים של שני האללים לאחר עיכול ואילו u1, u2 - את עוצמת הסיגנלים ללא עיכול (Hatakeyama et al 2004). על פי המקובל בספרות, התפלגות נטויה (skewed XCI) נחשבת מובהקת החל מיחס של 75:25.

לבדיקת התפלגות XCI בוצע עיכול של $1\mu g$ דנ"א גנומי באמצעות האנזים HpaII (New England Biolabs, USA # R0171) בנפח $20\mu l$ בטמפרטורה $37^{\circ}C$ למשך כ 16 שעות, בנוכחות 20 יחידות אנזים. במקביל הועמדו מבחנות ביקורת שכללו $1\mu g$ מאותו דנ"א, ללא אנזים. השקעת תוצרי החיתוך בוצעה ב $50\mu l$ אתנול אבסולוטי עם $0.3M$ סודיום אצטט ($pH=4.8$) והורחפו ב $20\mu l$ בופר TE 10:0.1. דגימות הדנ"א שימשו בסיס להגברת מקטע הכולל את האתר החוזרני הפולימורפי בגן AR1. ריאקציית PCR בוצעה בנפח סופי של $20\mu l$ עם התחלים AR-R ו AR-F (נספח א') בריכוז $1\mu M$ כשהאחרון מסומן בצבען פלורוצנטי FAM. הריאקציה בוצעה עם 0.5 יחידות אינזים דנ"א פולימראז (Fisher) FB1, בופר תואם $1X$, $2.5 mM MgCl_2$, תערובת dNTPs בריכוז סופי $200\mu M$ ומים מזוקקים סטריליים. שלבי הריאקציה היו: $95^{\circ}C$ למשך 3 דקות, 28 מעגלים של $95^{\circ}C$ למשך 45 שניות, $55^{\circ}C$ למשך 30 שניות ו $72^{\circ}C$ במשך 45 שניות. בסיום המעגלים הושלמה הסינטיזה ב $72^{\circ}C$ למשך 4 דקות נוספות. תוצרי האמפליפיקציה של כל דוגמא, עם ובלי חיתוך HpaII, עברו אלקטרופורזה קפילרית במכשיר 3100 Avant Genetic Analyser (ABI, USA). כמות התוצרים, שאורכם הצפוי נע בטווח של 180-201 זוגות בסיסים, נמדדה באמצעות תוכנת Genescan של אותו היצרן. התפלגות XCI חושבה על פי הנוסחא שתוארה לעיל והתוצאה שוקללה לפי הממוצע שהתקבל בשני ניסויים בלתי תלויים ששונות תוצאותיהם אינה עולה על 0.1. במקרים בהם נמצאה התפלגות לא אקראית בחולות נבדקו הוריהן לשם זיהוי מקור האללים.

2. מתאם גנוטיפ-פנוטיפ בחולות רט

הערכה קלינית

בבדיקת הקשר בין הגנוטיפ לפנוטיפ נכללו 55 חולות עם מוטציות שהמופע הקליני שלהן הוערך מחדש באמצעות סולם בן שבעה מדדים, על פי Hupke ושותפיו (2003) (טבלה ג.2). הציונים ניתנו על פי סיכומים רפואיים כתובים וחוות דעת של הנזירולוגית, ברוריה בן זאב והאורטופד אורי גבעון העוקבים אחר החולות במסגרת מרפאת רט בבית החולים לילדים ע"ש ספרא. מאחר והתסמינים מתייצבים לאחר גיל 5 שנים בערך, ניתנו ציוני פנוטיפ רק לחולות מעל גיל זה והיות ועקמת ואפילפסיה יכולים להופיע עד גיל 10 שנים, ניתנו ציוני עקמת ואפילפסיה שליליים (ערך 1) רק החל מגיל 10 שנים. בהתאם לכך, הציון שנבחר לייצג את חומרת הפנוטיפ הוא ממוצע ציוני המדדים ולא סיכומם.

טבלה ג.2. סולם חומרת הפנוטיפ של תסמונת רט לחולות בגיל 5 שנים ומעלה

מדד	פירוט	ציון
היקף ראש	שווה או גדול מאחוזון 25	1
	גדול מאחוזון 2 וקטן מאחוזון 25	2
	שווה או קטן מאחוזון 2	3
הליכה	עצמאית, גם אם פגועה	1
	בתמיכה או אובדן הליכה	2
	מעולם לא נרכשה	3
דיבור	10 מילים לפחות	1
	הושגו לפחות 10 מילים ואבדו ברובן	2
	לא נרכש דיבור או היו מילים בודדות שנעלמו	3
שימוש ידיים	טוב; יש תפיסת פינצטה או תפקוד חלקי	1
	היה ואבד במהלך הרגרסיה	2
	מעולם לא היה	3
עקמת	שווה או נמוכה מ 25°	1
	בין 25° ל 50°	2
	שווה או גדול מ 50°	3
פרכוסים	ללא	1
	אירועים נדירים הנשלטים על ידי טיפול תרופתי	2
	אירועים תכופים ובלתי נשלטים על ידי טיפול תרופתי	3
הפרעות נשימה	ללא	1
	התנשמויות נדירות שאינן מלוות בשינויי צבע הפנים	2
	התנשמויות תכופות עם עצירות נשימה עד כחלון	3

המבחנים הסטטיסטיים ששימשו לחישוב הקשר גנוטיפ-פנוטיפ

בבחירת המבחנים הסטטיסטיים המתאימים נלקח בחשבון אופי משתני הגנוטיפ והפנוטיפ כפי שהוגדרו במבחן הפנוטיפ. הגנוטיפ הוא משתנה בלתי תלוי קטגוריאלי ומתואר בסולם שמי (נומינלי). הערכת הפנוטיפ לא נעשתה באופן כמותי ולכן ערכי המדדים של מבחן הפנוטיפ (1-3) מהווים סולם סידורי (אורדינלי). לעומתם הציונים הכוללים של מבחני הפנוטיפ הם כמותיים ומתוארים בסולם רווח (אינטרבלי). משתני הגיל ויחס התפלגות XCI הם מסדר יחס (ראציונאלי). המבחנים הסטטיסטיים ששימשו לאנליזות השונות של הקשר בין גנוטיפ לפנוטיפ מפורטים בגוף התוצאות. ככלל, לבדיקת הקשר בין הגנוטיפ כמשתנה בלתי תלוי נומינלי, לבין ציוני הפנוטיפ כמשתנים תלויים אורדינליים, בוצעו מבחנים לא פאראמטריים: Mann-Whitney U לשתי קטגוריות ו Kruskal – wallis להשוואה בין מספר קטגוריות גדול יותר. לבדיקת הקשר בין קבוצות גנוטיפ לבין הציון הכולל הממוצע בוצע מבחן ANOVA עם תיקון Bonferroni להשוואות מרובות. מבחני המתאם הותאמו לאופי המשתנים בל מקרה והם מופיעים בגוף התוצאות. סף המובהקות נקבע כ 0.05 עבור מבחני השערות דו צדדיות. כל המבחנים הסטטיסטיים בוצעו באמצעות תוכנת SPSS 12.0 for Windows.

3. בדיקה כמותית של ביטוי MECP2 בדם

איסוף דגימות

דגימות רנ"א של קבוצת הביקורת הופקו מ 12 מתנדבות שגילאיהן נעו בטווח 17-41 שנים (ממוצע 26 שנים), לעומת גילאי החולות שנעו בטווח 3-41 שנים (ממוצע 17 שנים). 8 מממתנדבות קבוצת הביקורת הן ממוצא אשכנזי, 3 שלוש מהן ממוצא מזרחי ואחת ממוצא אשכנזי ומזרחי. התפלגות המוצאים בקבוצת הביקורת דומה לזו של החולות הישראליות, דהיינו יחס של 2:1 בערך לטובת המוצא האשכנזי. דגימות רנ"א עבור קבוצת המחקר, הופקו מדם של 9 חולות ישראליות ומ 3 חולות מארה"ב וקנדה, שאובחנו עם תסמונת רט קלאסית או אטיפית. כל החולות הללו היו ללא ממצאי מוטציות בקריאות האקסונים 1-4 וב MLPA. בנוסף לכך נאספו דגימות דם להפקת רנ"א מ 15 חולות עם מוטציות שונות ב MECP2. הורי החולות הוחתמו על טופס הסכמה מדעת להשתתפות במחקר, שאושר על ידי ועדת האתיקה העליונה.

חמש דגימות רנ"א מתרביות לימפוציטים, התקבלו מד"ר רות שמר מהמחלקה לביוכימיה של האוניברסיטה העברית. תרביות הלימפוציטים גודלו מדגימות דם של אשה נורמאלית, של חולת רט עם המוטציה c.141insA (p.55fs57X) ושל שתי החולות עם c.62+delGT. מתרבית הלימפוציטים של

p.55fs57X נוצרו שני שבטים (clones) שבכל אחד יש אקטיבציה של אחד מכרומוזומי X, התקין או המוטנטי וההבחנה ביניהם נעשתה על פי בדיקת התוצר החלבוני (Abuhatzira et al 2005). מחולה זו התקבלו שתי דגימות רנ"א נפרדות, עם X אקטיבי תקין ועם X אקטיבי מוטנטי.

הפקת רנ"א מלא והכנת דנ"א קומפלימנטרי

דגימות דם ורידי נלקחו מהנבדקים במבחנות המכילות EDTA למניעת קרישה. רנ"א מלא בודד מלימפוציטים מ 5 מ"ל דם באמצעות ערכת Versagene (Gentra # VGR-0050B2, USA). תהליך ההפקה מבוסס על הפרדת ליזאט התאים הלבנים בקולונות קושרות רנ"א וטיפול ב DNase. איכות דגימות הרנ"א נקבעו בספקטרופוטומטר GeneQuant (Amersham Biosciences). הדגימה הרצויה הנקיה מחלבונים ודנ"א נותן צפיפת אופטית ב A260/A280 ביחס קרוב ל 2. כמויות הרנ"א המלא שהתקבלו נעו בטווח 5-20 µg. הדגימות נשמרו ב 20°C- בנוכחות RNase inhibitor (Roche # 3335 Switzerland) בריכוז 1U ל 1µg רנ"א.

ארבע דגימות דם של חולות רט הגיעו מחו"ל לצורך הפקת רנ"א במבחנות מערכת PAXgene (Qiagen, USA, PreAnalytix. # 762174) המכילות מייצב רנ"א לטווח של עד חמישה ימים בטמפרטורת החדר. הפקת הרנ"א בוצעה על ידי ראגנטים תואמים מאותה חברה. הפרוטוקול מבוסס על ליזיס של תאי הדם האדומים וסילוקם, טיפול ב Proteinase K, טיפול ב DNase והשקעת רנ"א באתנול. הטיפול ב DNase בוצע באמצעות ערכת RNase-Free DNase (Qiagen # 79254). ריכוז רנ"א בדגימות הוערך בספקטרופוטומטר כפי שתואר לעיל. ריאקציות Reverse Transcription ליצירת 1st strand cDNA בוצעו באמצעות ערכת Omniscript (Qiagen # 205111), לפי הוראות החברה, על בסיס 500ng רנ"א מלא בנוכחות תחלים באורך 6 נוקליאוטידים רנדומליים (random hexamers) ובתוספת RNase inhibitor (Roche. # 3335).

תחלים וגלאים לריאקציות TaqMan

תחלים לריאקציות Real-Time PCR של MECP2 תוכננו להגברת צמתי אקסונים על מנת לנטרל זיהומי דנ"א. לזיהוי האיזופורם MECP2_e1 תוכננו תחלים על פי צומת אקסונים 1-3, ליצירת אמפליקון בן 63bp (ראה נספח א') באמצעות תוכנת Primer Express (Applied Biosystems). לגילוי MECP2_e2 שימש תבחין מסחרי הכולל תחלים וגלאי לצומת אקסונים 2-3 (ABI # Hs00172845). מספר תחלים וגלאים נוסו לתפקיד גנים מדווחים (reference) לשם אומדן הכמות הבסיסית של cDNA בכל

דגימה: RNaseP, β Actin, ODC1 (ABI #. Hs00159739, 4333762T, 4316844). גלאי TaqMan מסומנים בקצה 3' בפלורוכרום מדעיך (quencher) מסוג TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-) FAM (rhodamin). בקצה 5' מסומנים הגלאים של ODC1 ו- β Actin באמצעות פלורוכרום ואלו הגלאי של RNAaseP מסומן בפלורוכרום VIC. היותם של גלאי גן המטרה MECP2 וגלאי הגן המדווח RNAaseP מסומנים בפלורוכרום שונים, איפשר לבצע ריאקציית Real Time PCR משותפת (multiplex).

הרכב ריאקציית Real-Time PCR

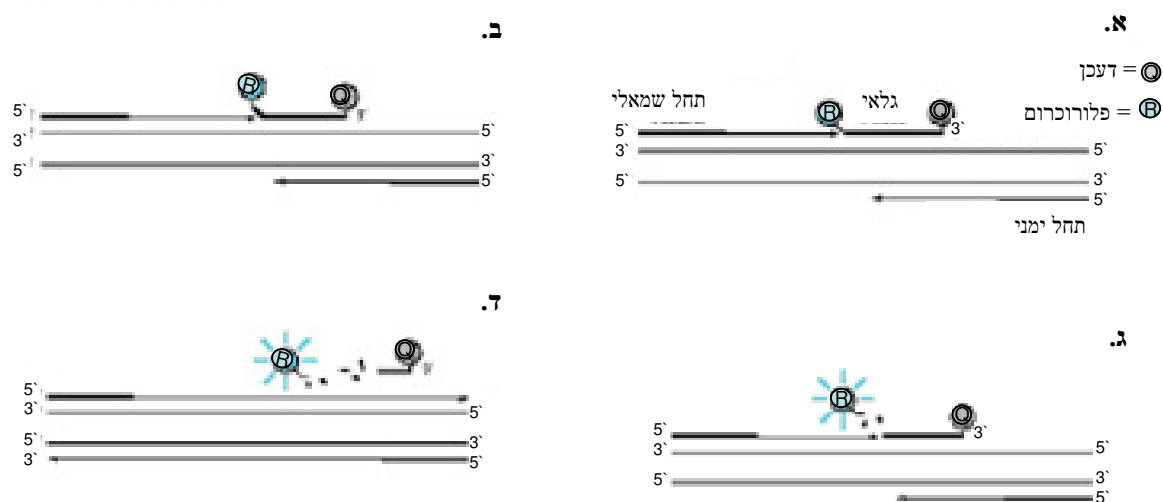
ריכוזים שונים של cDNA ושל גלאי Taqman נוסו עד לקבלת עצמה וספציפיות אופטימליות של הסיגנלים. הרכב הריאקציה כלל 2 μ l cDNA, 1 μ l מכל תבחין לקבלת ריכוז סופי של 300nM תחלים ו 200nM גלאי Taqman, 10 μ l תערובת TaqMan universal mastermix מוכנה (ABI # 4304437) הכוללת את הדינוקלאוטידים dGTP, dCTP, dATP בריכוז 200 μ M, dUTP בריכוז 400 μ M ו 0.025 U/ μ l דנ"א פולימראז Gold AmpliTaq. מים בדרגת טיהור HPLC שימשו להשלמת נפח הריאקציות עד 20 μ l.

ריאקציות Real Time PCR בוצעו בפלטות אופטיות של 96 בארות במכשיר ABI Prism 700. כל דגימת cDNA נבדקה בשלוש ריאקציות שהורצו במקביל (triplicate). בכל פלטה יוחדו בארות ביקורת ללא מצע (NTC-no template control) לאומדן רמת הרקע ובארו עם רנ"א במקום cDNA (-RT) לביקורת זיהום גנומי. דגימת cDNA קבועה שהורכבה מדגימות cDNA של חמש נבדקות מקבוצת הביקורת שימשה כביקורת חיצונית לחישוב רמת הביטוי היחסית של MECP2 בחולות. תנאי הריאקציה היו: 50°C במשך 2 דקות, 95°C למשך 10 דקות ו 40 מעגלים דו-שלביים של 15 שניות ב 95°C ודקה ב 60°C.

הביוכימיה של ריאקציית Real Time PCR

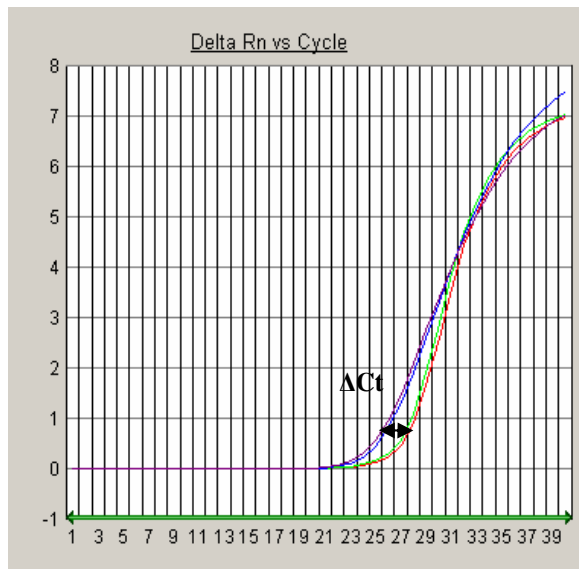
העיקרון שבבסיס ריאקציית Real-Time PCR נעוץ במבנה הביוכימי של גלאי TaqMan, המסומן בקצהו האחד בפלורוכרום שאינו פעיל עקב סמיכות לחומר מדעיך הקשור לקצה השני. התקשרותו של הגלאי לאתרי המטרה שלו מופרעת במהלך הפולימריזציה וגורמת להתפרקותו. כתוצאה מכך משתחרר הגלאי מהשפעת החומר המדעיך ופולט זריחה פלורוצנטית הנמדדת על ידי מערכת (ABI PRISM 7000) (תרשים 2.ג). עוצמת הזריחה הפלורוצנטית מייצגת ביחס ישר את מספר עותקי המצע (template) המקוריים שהיו בדגימה.

כימות תוצר ההגברה בריאקציית Real-Time PCR משקף את מספר העותקים שהיו במקור בדגימת ה- cDNA, והשלב האקספוננציאלי של הריאקציה הוא הרגיש ביותר להבחנה בין כמויות הסובסטר המקוריות. לפיכך, נבחר מעגל סף הגילוי (Ct- Cycle threshold) שנמצא בשלב העליה האקספוננציאלית, לייצג כל עקומת ריאקציה. הסף נקבע באופן אוטומטי על ידי תוכנת ABI PRISM 7000 או באופן ידני אחד לכל עקומות הריאקציה של תבחין מסוים. מיקום הסף הרצוי הוא 10 סטיות תקן מעל הרמה הממוצעת של זריחת הרקע. ערכי מחזור הסף גדולים או שווים ל 35 לא נכללו באנליזה שכן הם קרובים מידי לרעש הרקע ואינם ספציפיים מספיק. בניתוח הנתונים הוכללו לפחות שלוש ריאקציות חוזרות (טריפליקט) של כל דגימה. דגימות עם 3 חזרות לפחות של ריאקציות real time PCR כמותיות. הגן RNAaseP נבחר כגן מדווח היות והוא single copy gene, בעל מעגלי הסף קרובים לאלו המתקבלים בתבחיני *MECP2* ($22 \leq Ct \leq 26$) ובעל סימון בפלורוכרום שונה מגלאי *MECP2* שמאפשר ריאקציות משולבות (multiplex) שהן חסכוניות ומראות שונות קטנה יותר בין הטריפליקטים. הפרש מעגלי הסף של ריאקציית גן המטרה וריאקציית הגן המדווח (ΔCt) מבטא את הרמה היחסית של גן המטרה, כאשר יעילויות הריאקציות של שני הגנים דומות. בתרשים 3.ג מוצגות עקומות מקוריות של ריאקציות משולבות של *MECP2_e2* ו- RNAaseP, בדגימה מחולה ובדגימת ביקורת.

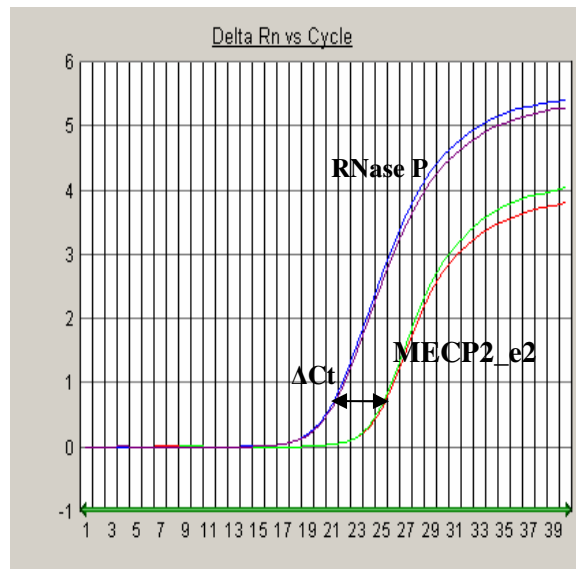


תרשים 3.ג. שלבי מעגל ריאקציית Real-Time PCR

- א. הקשרות גלאי המסומן בפלורוכרום (FAM או VIC) ובדעכן (TAMRA) המדכא את זריחת הפלורוכרום.
- ב. הפולימריזציה גורמת להחלפת הגלאי בגדיל החדש. ג. הגלאי מתחיל להתפרק, הפלורוכרום משתחרר מהשפעת הדעכן ומתחיל לפלוט אור. ד. השלמת הפולימריזציה והתפרקות הגלאי.



ב. עקומות Real-Time PCR של דגימת ביקורת.



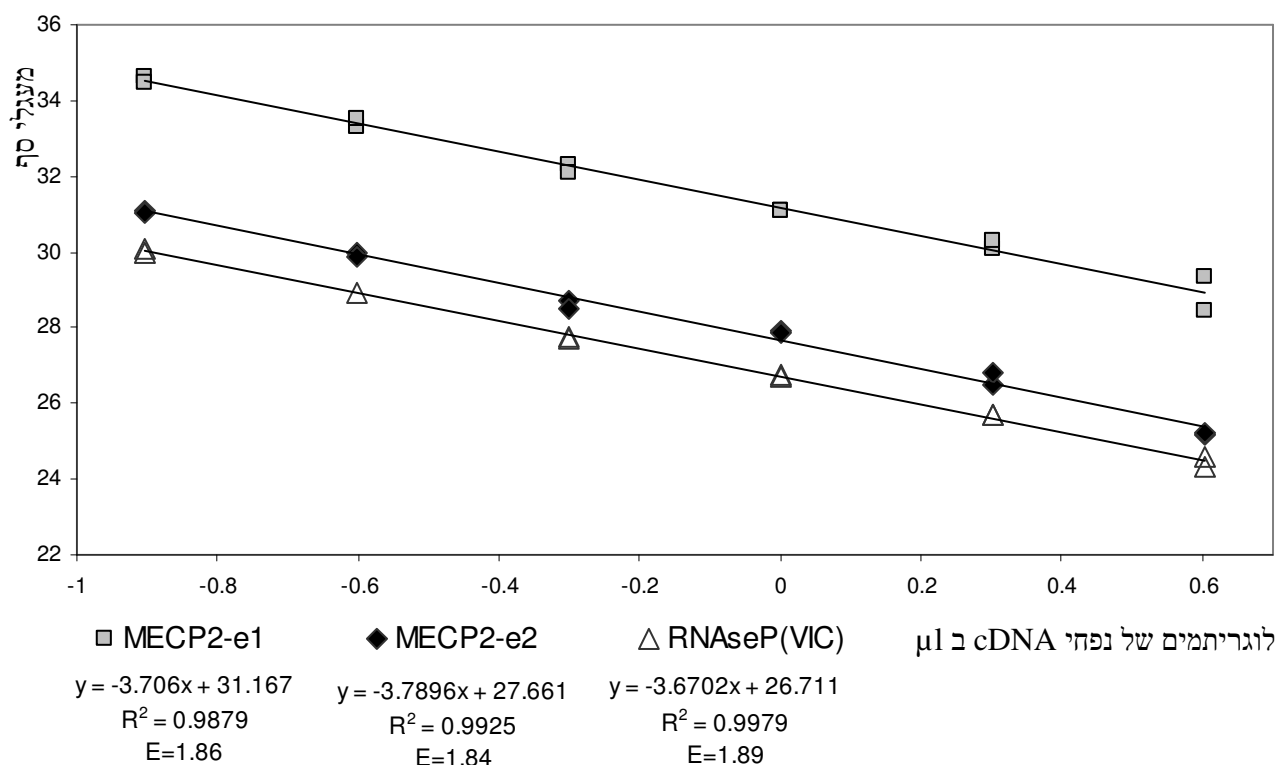
א. עקומות Real-Time PCR של דגימת חולה.

תרשים 3.3: עקומות אמפליפיקציה בניסוי Real Time PCR עם גלאי MECP2 ו RNaseP.

הגלאי של MECP2_e2 מסומן בצבען פלורוצנטי FAM. הגלאי של RNaseP מסומן ב VIC. RNaseP הוא גן מדווח ורמות MECP2 נקבעות ביחס אליו. פער מעגלי הסף (ΔCt) בין מעגלי הסף של עקומת גלאי המטרה ועקומת גלאי הדיווח גדול יותר בדוגמת החולה (א) מאשר בדוגמת מאגר הביקורת (ב).

עקומות סטנדרט

עקומות סטנדרט של ריאקציות Real-Time PCR נעשו על מנת להעריך את יעילותן בנוגע לתבחיני הגנים MECP2_e2, MECP2_e1, RNaseP ולאפשר השוואה כמותית ביניהם. לשם בניית עקומות הסטנדרט בוצעו ריאקציות של ששה מיהולים סדרתיים של מאגר cDNA בהפרשים של פי 2 ($0.125-4\mu l$). הקשר בין מיהולי ה cDNA לבין מעגלי הסף היה מובהק ביותר ($R^2 \geq 0.9879$) עבור שלושת העקומות שהתקבלו (תרשים 4.4). גרף הרגרסיות שהתקבלו הראה כי לשלושת התבחינים, MECP2_e2, RNaseP ו MECP2_e1 יש יעילויות ריאקציה דומות, עם סטיית תקן 0.05. חישובי יעילויות הריאקציות לפי הנוסחה $E(\text{efficiency}) = 10^{-1/\text{slope}}$ העלו את הערכים: 1.84 עבור MECP2_e2, 1.86 עבור MECP2_e1 והם שימשו כבסיס לחישוב רמותיהם היחסיות כפי שיפורט בהמשך.



תרשים ג.4. עקומות סטנדרט של תבחיני TaqMan ל MECP2-e1, MECP2-e2 ו RNAseP. ציר X מייצג לוגריתמים של מיהולים סדרתיים של cDNA ששימשו כבסיס לריאקציות, ציר Y מייצג מעגלי סף. הריאקציות בוצעו באופן המשלב MECP2 (e1 או e2) עם RNAseP באותה ריאקציה (multiplex). יעילות הריאקציה (E) חושבו על פי $10^{-1/\text{STANDARD SLOPE}}$.

חישוב רמות הביטוי היחסיות על בסיס הפרשי מעגלי סף

רמות הביטוי היחסיות של MECP2 בקבוצת הביקורת חושבו על פי הנוסחה $E^{-\Delta C}$ כאשר E היא יעילות הריאקציה הממוצעת של תבחין הניסוי ותבחין הגן המדווח כפי שחושבה על בסיס עקומות הסטנדרט, 1.86 עבור MECP2_e1 ו 1.88 לגבי MECP2_e2 (תרשים ג.4). ΔCt הוא הפער בין מעגל הסף של MECP2 ושל RNAseP ($\Delta Ct = Ct_{\text{MECP2}} - Ct_{\text{RNAseP}}$).

הכמויות היחסיות של MECP2_e1/_e2 בחולות, הושוו לכמויות שנמצאו בדגימה ממאגר הביקורת (pooled cDNA) בכל ניסוי וניסוי. לחישוב ערכים כמותיים מנורמלים לקבוצת הביקורת, שימשה שיטת $\Delta\Delta Ct$ המותנית ביעילות ריאקציה קרובות, כפי שאכן נמצא בעקומות הסטנדרט של התבחינים השונים (ר' לעיל). נוסחת החישוב של הכמות היחסית היא: $RQ = E^{-\Delta\Delta Ct}$ (RQ=Relative Quantity), כאשר E מתייחס ליעילות הממוצעת של כל תבחין מטרה עם תבחין הגן המדווח $\Delta\Delta Ct$ הוא ההפרש בין ΔCt של כל חולה לבין ΔCt של דגימת מאגר הביקורת $Ct = \Delta Ct_{\text{patient}} - \Delta Ct_{\text{control pool}}$ (Livak & Schmittgen, 2001). הכמות היחסית של נבדקת חולה נחשבה חריגה כאשר היתה נמוכה או גבוהה מטווח ערכי RQ שהתקבלו עבור נבדקות קבוצת הביקורת ביחס ל ΔCt של דגימת המאגר.

מבחנים סטטיסטיים

ניתוח נתוני הכמויות היחסיות של MECP2_e1, MECP2_e2 בחולות עם מוטציות, בוצע ביחס לארבע קבוצות על פי סוג המוטציות ומיקומן: א. שתי דגימות ללא אתר שחבור תורם באינטרון הראשון. ב. שתי דגימות עם חסרים החורגים מגבולות האקסונים. ג. שש דגימות עם מוטציות קוטעניות מסוג עצר או frameshifts. ד. ארבע דגימות עם מוטציות לא קוטעניות מסוג חלף או in-frame microdeletions. לחישוב המתאם בין רמות האיזופורמים בוצע מבחן Spearman. השוואת הכמויות היחסיות של האיזופורמים בין קבוצות חולות עם מוטציות שונות לבין קבוצת הביקורת ובינם לבין עצמן, בוצעה באמצעות מבחן ANOVA עם תיקון Bonferroni להשוואות מרובות. ההסתברויות של תוצאות כל חולה ללא מוטציה, להשתייך לקבוצת הביקורת או לאחת מקבוצות החולות נבדקו במבחן רגרסיה מולטינומילית (הנקרא גם polytomous regression). חישובים אלו בוצעו באמצעות תוכנת SAS 9.1.3 למערכות Unix (SAS institute Inc. Cary, NC).

4. אנליזת חלבונים היסטוניים במערכת ביטוי זמנית in vitro

יצירת פלסמידים רקומביננטים

פלסמידים רקומביננטים יוצרו על בסיס פלסמיד pcDNA3.1 הכולל cDNA *MECP2_e1* באורך מלא שהתקבלו באדיבות פרופ' Minassian מ Sick Children' Hospital בטורונטו. המוטציה c.824T>A (p.V275A) הוחדרה לפלסמיד באמצעות ערכת QuickChang (Stratagene # 200518, USA). עקרון הפעולה של ערכה זו מבוסס על הגברת הווקטור וה insert בנוכחות תחלים הכוללים את המוטציה המבוקשת (רצפיהם מובאים בנספח א'), ועיכול הפלסמידים המקוריים באמצעות Dpn I שספציפי לדנ"א ממותל (פלסמידים מקוריים שמגודלים ברוב זני E.coli ממותלים באדנין-dam). בנוסף, כוללת ריאקציית ההגברה בפולימראז Pfu Taq אמין בעל פעילות proofreading 3'. הפלסמידים הרקומביננטים החדשים הוחדרו לחיידקים קומפנטטיים XL1-Blue שהם חלק מהערכה ונזרעו על מצע גידול LB מוצק הכולל אמפיצילין וגאלאקטוז, באינקובטור ב 37°C למשך הלילה. מספר מושבות לבנות שכוללות את ה insert הועברו בנפרד לתוך 5 מ"ל מצע גידול LB נוזלי הכולל אמפיצילין וגדלו ב 37°C בטלטול במשך לילה. דנ"א פלסמידי הופק בנפרד מכל אחת מהדגימות באמצעות ערכת Marligen bioscience high purity plasmid miniprep (USA, #11449) ורצף הנוקליאוטידים של כל פלסמיד נבדק באנליזת רצף ישירה באמצעות מספר תחלים. ממושבה אותנטית שהכילה ווקטור תקין ו insert הכולל את המוטציה הוכנה תרבית בנפח של 100ml במצע LB ממנו הופק דנ"א פלסמידי באמצעות ערכת Marligen bioscience high purity plasmid midiprep (USA, #11451) שהוחדר למערכות ביטוי של תאים הומניים כפי שיוסבר להלן.

מערכת ביטוי זמנית בתרביות תאי osteosarcoma (U2OS)

תאי אוסטאוסרקומה הומניים גודלו במדיום DMEM (Gibco. # 11320033, USA) בתוספת 10% FCS (Gibco # 16170078) ו 500 U/ml פניצילין וסטרפטומיצין. התרביות גודלו בטמפרטורה קבועה של 37°C בנוכחות 5% פחמן דו חמצני. לצורך החדרת *MECP2* רקומביננטי, נזרעו כ 4×10^5 תאים בצלחות של 10 ס"מ עם 15 מ"ל DMEM, 10% FBS ואנטיביוטיקה ב 37°C למשך 16-40 שעות עד לתפוסה של 90% משטח הצלחת. החדרת הפלסמיד הרקומביננטי בוצעה באמצעות ליפוזומים של Lipofectamine 2000 (Invitrogen. # 11668). 4μg פלסמיד רקומביננטי ו 8μg פלסמיד ריק הורחפו ב 1 מ"ל מדיום Opti-MEM (Invitrogen # 31985) והתערובת הודגרה עם Lipofectamine מהול ביחס של 40μl ב 1 מ"ל Opti-MEM בטמפרטורת החדר למשך 20 דקות. התאים שנשטפו ב PBS, הודגרו בנוכחות תערובת הדנ"א וה

lipofectamine בתוספת 5 מ"ל Opti-MEM בטמפרטורה של 37°C למשך 5 שעות. תערובת ה lipofectamine הורחקה באמצעות שטיפות ב PBS והתאים גודלו ב 10 מ"ל מדיום מקורי של DMEM עם FCS ואנטיביוטיקה ב 37°C למשך הלילה.

אנליזה מיקרוסקופית של תאי U2OS

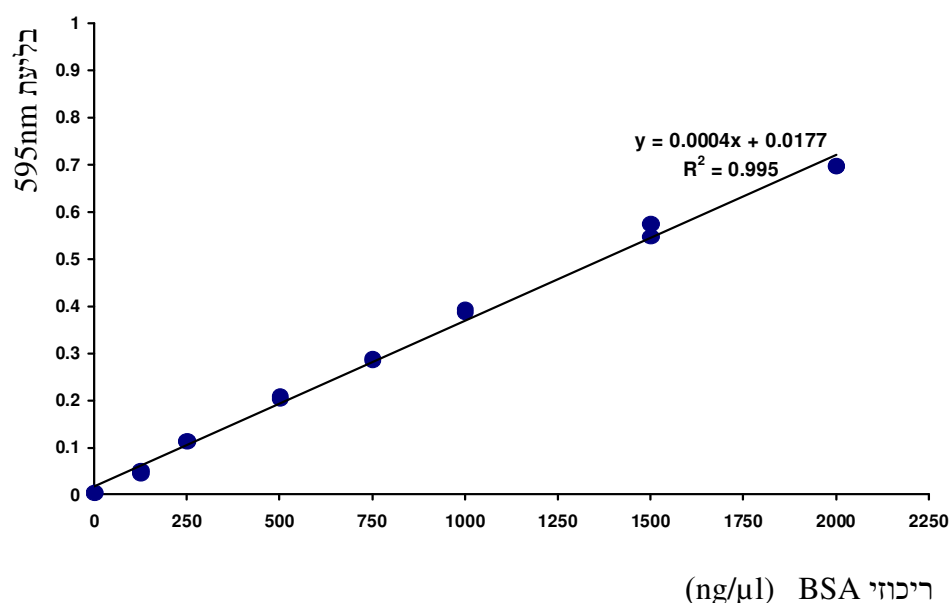
לצורך אנליזה מיקרוסקופית גודלו תרביות תאים על גבי סליידים בתוך צלחות הגידול. לאחר החדרת הפלסמיד הרקומביננטי, עברו התאים קיבוע עם 3.7% פורמאלדהיד למשך 10 דקות, טופלו ב 0.5% TritonX-100 למשך 20 דקות, נשטפו ב PBS והודגרו עם Upstate # polyclonal rabbit anti-MECP2 (Upstate # polyclonal rabbit anti-MECP2, USA) במיהול 1:100 בבופר TBS הכולל 0.1% Tween 20 ו 5% skim milk בטמפרטורת החדר, בטלטול עדין למשך שעה. בהמשך, נשטפו התאים מספר פעמים ב TBS ועברו הדגרה עם נוגדן שניוני פלורוצנטי Cy2-anti-rabbit (AP132J) Upstate # במיהול 1:100 באותו הבופר למשך חצי שעה בחושך. לאחר שטיפה נוספת ב TBS נצבעו גרעיני התאים ב 4',6-diamineo-2-phenylindole (DAPI) מהול בתמיסת antifade ביחס 1:1000 (Sigma #9546). התאים נבדקו וצולמו במיקרוסקופ פלורוצנטי Zeiss Axioskop (Germany) המצויד במצלמת CCD (Photometrics Inc., USA) בהגדלות X40 ו X100 בנוכחות פילטר SpectrumGreen בעל עירור ב 497nm ופליטה ב 524nm עבור הסימון ב Cy2 ופילטר בעל עירור ב 367nm ופליטה ב 452nm עבור DAPI.

הפקת חלבונים היסטוניים

הפקת היסטונים נעשתה על פי פרוטוקול המשתמש בבופר TEB (Triton Extraction Buffer) המשמר את המודיפיקציות ההיסטוניות, על בסיס PBS הכולל 0.05% Triton, 2mM PMSF, 0.02% NaN_3 . תאי U2OS שהוחדר לתוכם הפלסמיד הרקומביננטי נקצרו בנוכחות Gibco. # trypsin-EDTA (Gibco. # trypsin-EDTA, USA) ונשטפו פעמיים ב 5mM sodium butyrate ו PBS קר. התאים עברו ליזיס בבופר TEB בריכוז סופי של 10^7 תאים בנפח 1 מ"ל על קרח במשך 10 דקות. גרעיני התאים הושקעו בצנטריפוגה שולחנית Sorvall T6000B (DuPont, USA) ב 2000 rpm למשך 10 דקות בטמפרטורה 4°C, נשטפו ב TEB והושקעו שוב בצנטריפוגה נוספת כמקודם. הפלט הורחף ב 0.2N HCL לתוכם מוצו ההיסטונים ב 4°C למשך הלילה. התערובת הושקעה ב 2000rpm בצנטריפוגה שולחנית למשך 10 דקות ב 4°C ומתוכה הופרד הנוזל העליון המכיל את ההיסטונים ונשמר ב טמפרטורת 20°C-.

מדידת ריכוז החלבונים בשיטת Bradford

כימות החלבונים מתביות התאים בוצע באמצעות ריאקצית צבע בערכה BCA™ Protein Assay (Pierce #23227, USA). קודם לכן, הוכנה על פי הוראות היצרן סדרת מיהולים של bovine serum albumin (BSA) שמסופק בערכה שימשה ליצירת עקומת סטנדרט. המיהולים הוכנו בדופליקטים בפלטה של 96 בארות של Corning (USA) לתוכה הוסף המרכיב הפעיל (working reagent) על פי המלצות היצרן, הפלטה הודגרה ב 37°C למשך 30 דקות. עוצמת הצבע נמדדה באמצעות המכשיר Microplate Luminometer (Anthos htII, USA) באורך גל 595nm. תרשים ג.4 מציג עקומת סטנדרט ליניארית נבנתה על סמך סדרת מיהולים כנ"ל. דגימות של הפקות חלבונים היסטוניים הוכנו בתוך working reagent ביחס 8:1, בהתאמה, בטריפליקטים ושולבו בתוך הפלטה הכוללת גם את עקומת סטנדרט. ריכוזי חלבונים היסטוניים נקבעו על פי עקומת הסטנדרט שנבנתה באותם תנאים.



תרשים ג.4. עקומת סטנדרט לחישוב ריכוזי חלבון בשיטת Bradford

העקומה נבנתה על פי מיהולים ידועים של BSA ועצמת הצבע נמדדה באורך גל 595nm. ריכוזי החלבונים בדגימות שהופקו מתאים חושבו על פי המגמה הליניארית.

אנליזת חלבונים באמצעות Western blots (PAGE) polyacrylamide gel electrophoresis

דגימות חלבונים היסטוניים בכמות של $7\mu\text{g}$ הודגרו בטמפרטורה 70°C במשך 10 דקות ועורבבו ביהס 1:1 עם בופר הטענה Laemmli (Sigma # S3401) בתוספת β mercaptoethanol 10%. הדגימות הוטענו בג'ל פוליאקרילאמיד בריכוז 15% או בג'לים מוכנים מסוג NuPAGE Novex Bis-Tris (Invitrogen, USA) במדרג ריכוזים של 4-12% יחד עם סולם גדלים Precision Plus Protein (Bio-Rad, # 161-0374, USA). האלקטרופורזה בוצעה במערכת XCell Super-Lock (Invitrogen) במתח קבוע של 200V (USA). החלבונים הועברו מהג'ל לממברנת נטרוצלוז של Schleicher & Schuell (USA) smi-dry באמצעות Blotter (CLP # 77.1010-SD) בזרם של 150mA (צפיפות זרם 3mA ל 1 סמ"ר ג'ל). הפרוטוקולים להכנת הג'לים והבופרים להרצה אלקטרופורטית ולטרנספר מפורטים בנספח ב'.

להערכת יעילות ההעברה לממברנה נצבעו כל החלבונים באמצעות שטיפה בתמיסת 1% Ponceau (Sigma # P7170) למשך 5 דקות ושטיפה במים מזוקקים. לאחר מכן, הממברנות קובעו בבופר TBS המכיל 5% skim milk ב 4°C למשך הלילה. הממברנות נחשפו לנוגדנים ראשוניים פוליקלונליים שיוצרו בארנבת או עז של anti-MECP2 (Upstate # 07-013) ו anti-acetyl-histone H4 (Upstate #06-598) במיהול 1:2000 ו anti-acetyl-histone H3 (Upstate # 06-599) הופעל במיהול 1:10000. כביקורת פנימית שימשו החלבונים emerin (#sc-15378) (Santa Cruz Biotech.) במיהול 1:1000 ו actin (# sc-1616) במיהול 1:2000. תהליך הסימון הראשוני ארך שעה וחצי בטלטול עדין בטמפרטורת החדר. לאחר שטיפות ב TBS, הממברנות הובאו בתגובה עם נוגדנים שניוניים Goat anti Rabbit או Rabbit anti goat מתוצרת Jackson Immuno Research ((111-035-045 או 305-005-045, בהתאמה) במיהול 1:10000, בטלטול עדין למשך שעה. הממברנות (western blots) פותחו באמצעות ערכת ECL Plus מתוצרת Amersham (Biosciences # RPN2132, USA) ונחשפו על סרטי צילום BioMax (Kodak #868 9358). החלבונים זוהו על פי משקלם המולקולרי, כאשר $\text{MeCP2} = 75\text{Kd}$, $\text{H4} = (13+17)\text{Kd}$, $\text{H3} = 17\text{Kd}$, $\text{H4} = 36\text{Kd}$, $\text{emerin} = 43\text{Kd}$ ו actin. בהיברידיזציות חוזרות של אותה ממברנה עם נוגדנים ראשוניים שונים, הממברנה עברה stripping, כלומר סילוק הנוגדן הקודם, באמצעות הדגרה בבופר 1.5% SDS, Tris-HCl 0.125M, pH=6.8) בטלטול עדין ב 37°C למשך 30 דקות. לאחר מכן, קובעה הממברנה שוב בבופר TBS עם 5% skim milk בטלטול עדין למשך 30 דקות ונחשפה לנוגדנים אחרים כמתואר לעיל. עוצמות הסיגנלים שהתקבלו הוערכו חזותית וגם באמצעות תוכנת ImageJ 1.36b (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), שמדדה את צפיפות הפיקסלים הממוצעת עבור כל סיגנל בתמונות שנסרקו מהפילמים.

ד. תוצאות

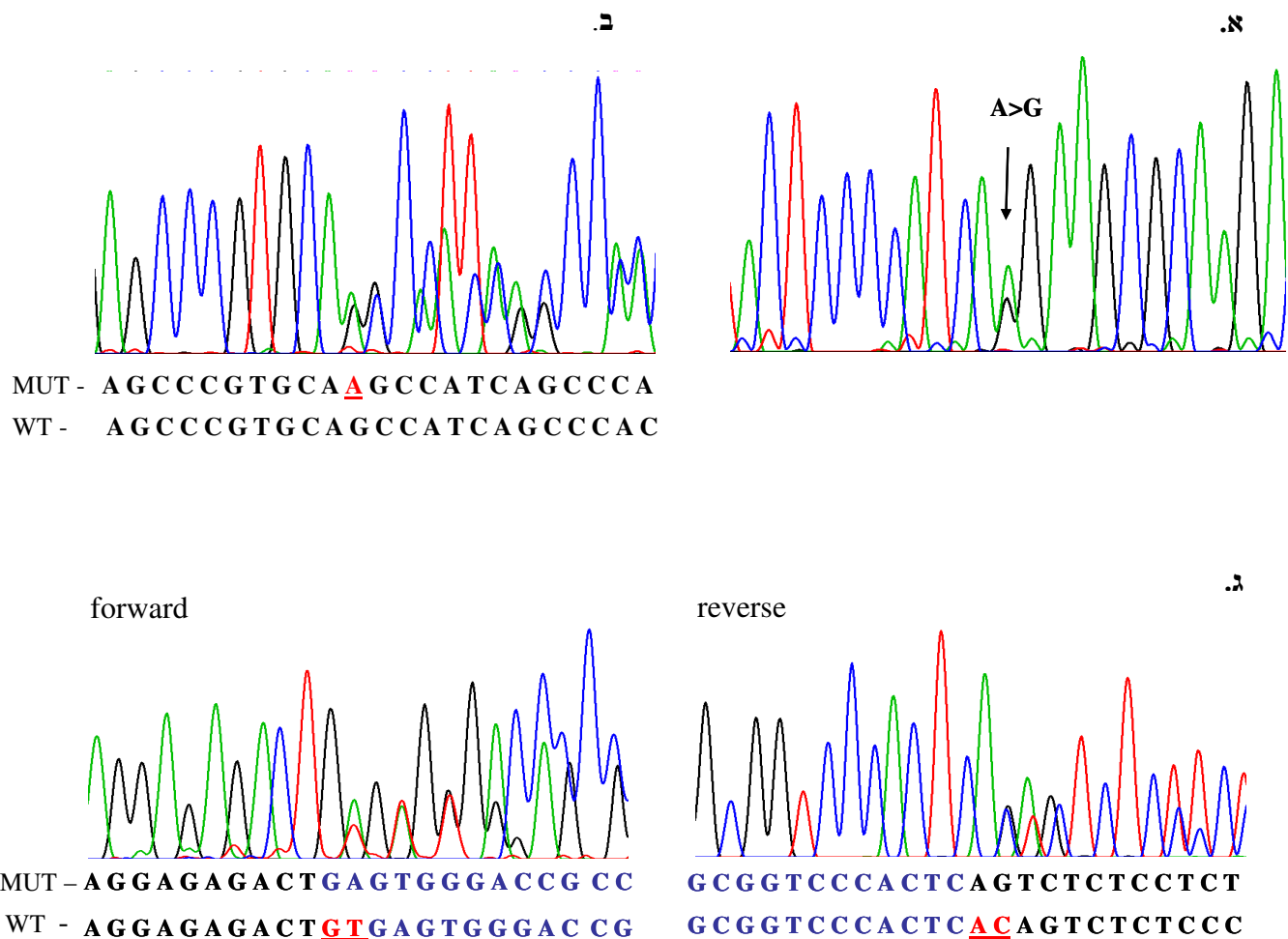
1. אנליזת מוטציות

ממצאי מוטציות

אנליזת המוטציות התבססה על קריאות ישירות של רצף ארבעת האקסונים המקודדים של *MECP2* והצמתים האקסוניים-אינטרוניים הסמוכים אליהם. הממצאים האפייניים לאנליזה זו מתוארים בתרשים ד.1. בו מתוארות מספר מוטציות חלף וחסר. במהלך האנליזה של המוטציות הושם דגש ראשוני על אקסון 4 שבו מרוכזות מרבית המוטציות בחולות רט. כמו כן, המקטע המכסה את TRD ואת קצה C תוכנן להיות הרחב ביותר בהיקפו, כ 823bp, על מנת לאפשר זיהוי חסרים באזור זה ולהימנע ממיקום תחלים באתרי חסר. באמצעות השימוש במקטע זה, זוהו ארבעה חסרים שנראו כבר ברמת ההפרדה של תוצרי PCR בג'ל אגארוז כפי שנראים בתרשים ד.2. הגבולות המדויקים של החסרים נקבעו באמצעות קריאת רצפים המקטעים הקצרים שהופקו מהג'ל כפי שמודגם בתרשים ד.3.

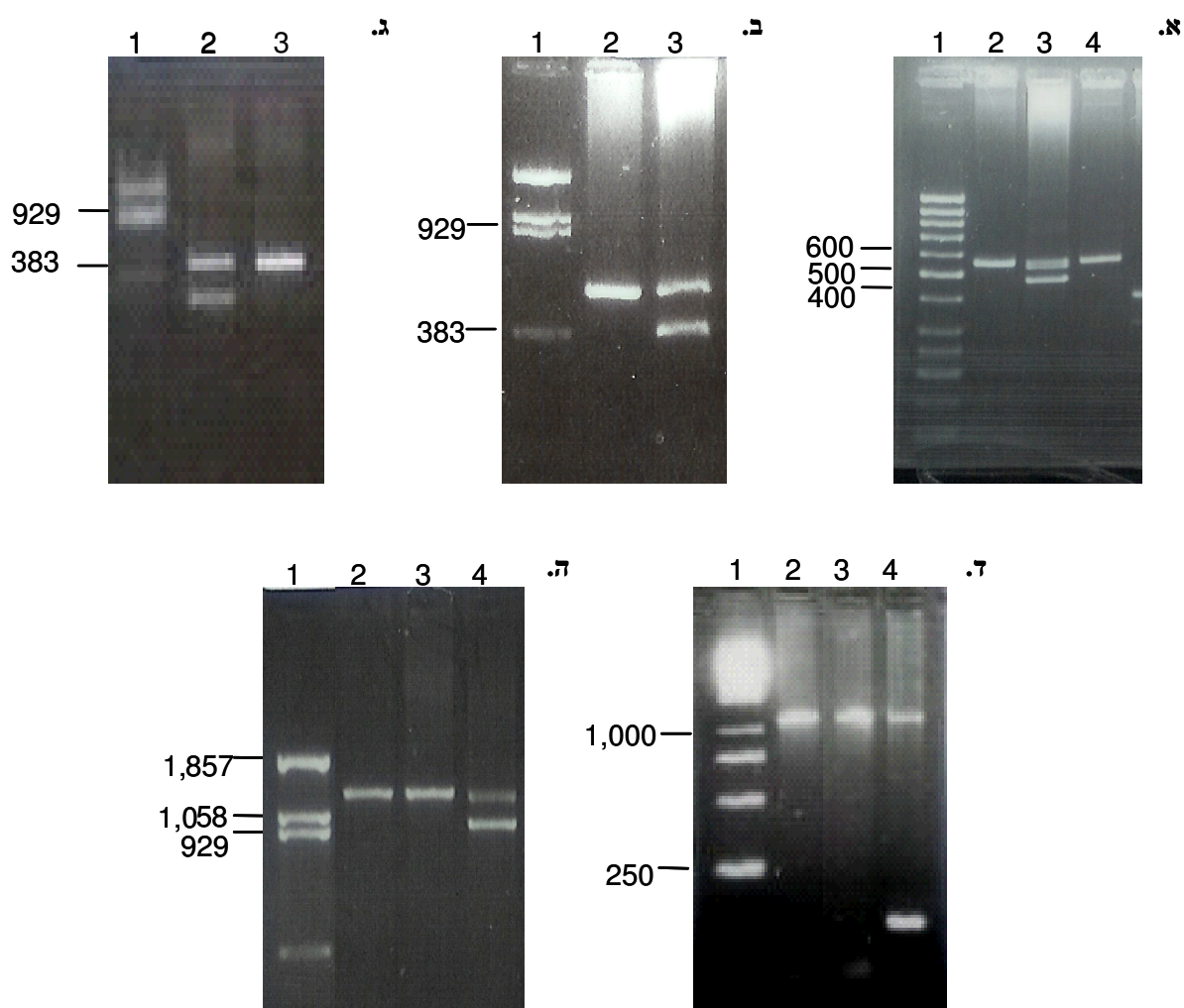
במהלך אנליזת המוטציות בחולות רט התגלו 26 מוטציות ספוראדיות שונות שזוהו במצב הטרוזיגוטי יחד עם האלל התקין. כל המוטציות הלא מורשות נמצאו על רקע אבחנות ברורות של תסמונת רט קלאסיות או אטיפיות, למעט c.910A>G, p.K304E שנמצאה בילדה בת 3 עם הפרעת שפה כתסמין יחיד. בנוסף זוהתה לאחרונה מוטציית חלף חדשה p.D151E, c.453C>T ב MBD בחולה אטיפית עם וריאנט דיבור שמור. מוטציה חדשה נוספת, c.141insA, הגורמת לקיטוע מוקדם מאוד של החלבון, לפני MBD, נמצאה בחולת רט קלאסית. מוטציות קוטעניות בקצה N דווחו במספר מועט ביותר של חולות רט עם פנוטיפ קשה במיוחד.

בשתי חולות מהעוקבה הישראלית התגלתה אותה מוטציית חסר c.62+1delGT באתר השחבור התורם הראשון. מוטציה זו נדירה ביותר ודווחה עד כה במקרה נוסף אחד בלבד (Fukuda et al 2005). המיפוי המדויק של גבולות החסר של אתר השחבור (כמו גם של חסרים אחרים) נקבע על פי קריאות רצף של שני האללים משני הכיוונים. מניסיונו, קריאות חד כיווניות עלולות לשבש את זיהוי צומת החסר עקב נוכחות רצפים הומולוגים משני צידי החסר (תרשים ד.1.ג). ההשלכות הישירות של מוטציית חסר זו הן החדרת האינטרון הראשון לתוך מסגרת הקריאה אך ההשלכות התפקודיות של שיבוש זה אינן ברורות עדיין. בעבודה הנוכחית חקרנו את השפעתה של מוטציה זו על ביטוי שני תוצרי השעתוק של *MECP2* בדם היקפי.



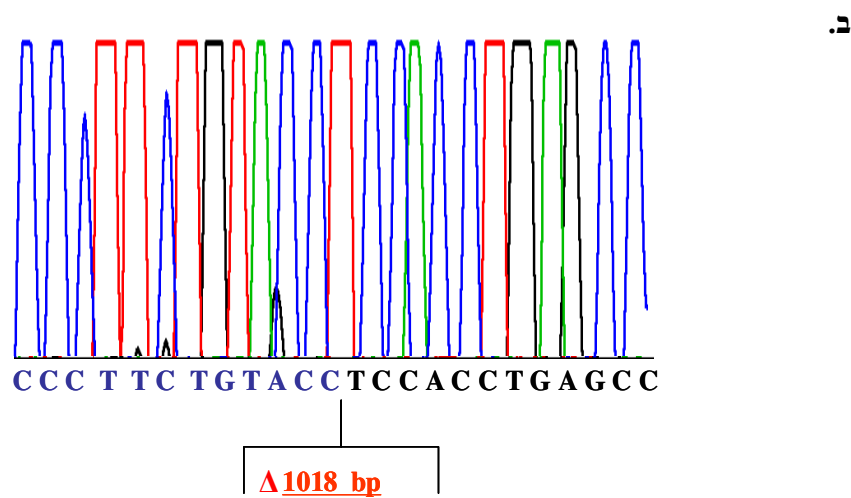
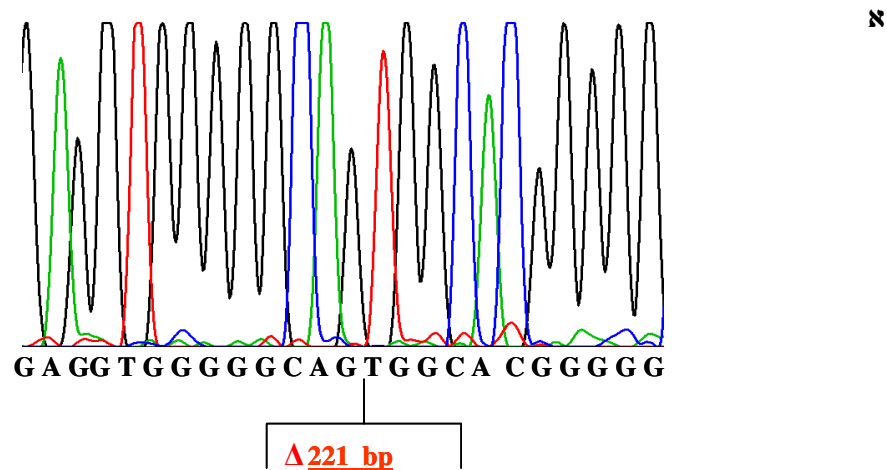
תרשים 1.7. ממצאי מוטציות מקריאות רצף ישירות

א. מוטצית חלף נדירה c.910A>G בעמדה 304 ב TRD הגורמת להחלפת חומצה אמינית מגלוטמית לליזין.
ב. החדרת נוקליאוטיד c.141insA, באקסון השלישי גורמת לשיבוש מסגרת התרגום והופעת קודון סיום בעמדת החומצה האמינית 57. **ג.** חסר אתר שחבור תורם c.62+1delGT באינטרון הראשון, הגורם להחדרת האינטרון הראשון למסגרת התרגום (רצף האקסון הראשון רשום בשחור, האינטרון הראשון בכחול והבסיסים החסרים מודגשים באדום עם קו תחתון).



תרשים 2.ד. הפרדה של תוצרי PCR הכוללים חסרים קטנים באזור TRD וקצה C

א. הפרדת תוצרי PCR בג'ל אגרוז 1.5% מחולה עם חסר c.1080-1161del82bp (באר 3) ובחולות ללא חסר באזור זה (בארות 2,4). ב. חולה עם חסר c.1157-1327del171bp (באר 3) וחולה ללא חסר (באר 2). ג. חולה עם חסר c.775-995del 221bp (באר 2) וחולה ללא חסר (באר 3). ד. חולה עם חסר גדול של אינטרון 3 וחלק גדול מאקסון 4 c.(378-219) 1164del1018bp (באר 4) וחולות ללא חסר (בארות 2-3). ה. חולה עם חסר c.908-1201 del 294bp (באר 4) וחולות ללא חסר (בארות 2-3).



תרשים ד.3. קריאת רצף ישירות של התוצר האללי המכיל חסר שהופק מג'ל אגארוז, לזיהוי צמתי חסרים ניכרים

א. רצף האלל הכולל את החסר c.775-995del221bp. ב. רצף חסר גדול c.1164_1164del1018bp. שזוהה במקטע חדש שיוצר באמצעות התחלים In3bF מאינטרון 3 ו 4BR מאקסון 4, צומת אינטרון-אקסון מסומן בכחול-שחור.

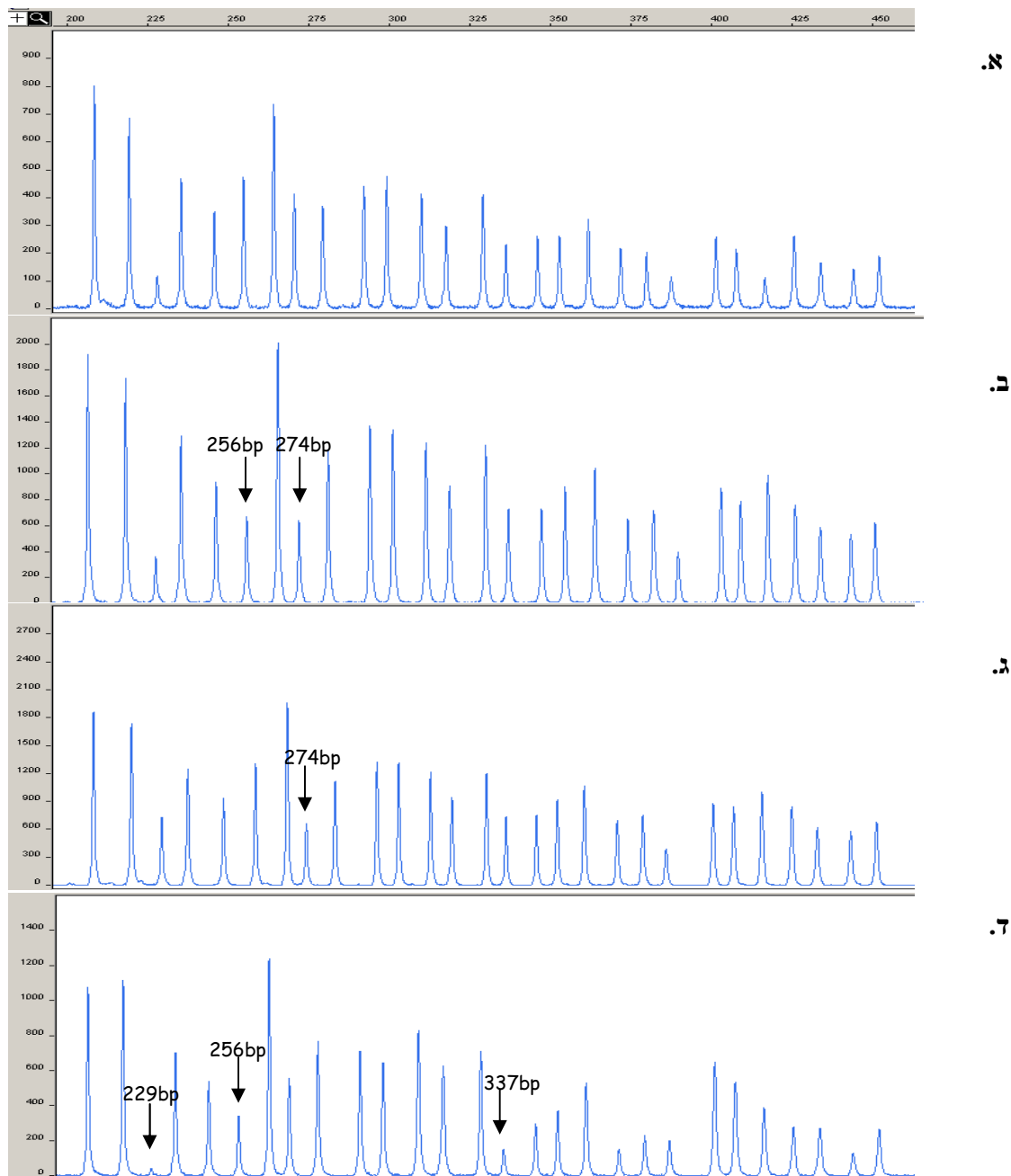
זיהוי מוטציות חסר בשיטת MLPA

בדיקת MLPA בוצעה ב 7 חולות רט קלאסיות, 12 חולות רט אטיפיות ובזכר אחד שנשללו למוטציות באזור המקודד של *MECP2*. מבין החולים האלו זוהו באמצעות MLPA שלוש חולות עם חסרים, כאשר החסר הרחב ביותר זוהה בחולה קשה ביותר עם צורת רט מולדת. תרשים 4.7 מתאר את אנליזת MLPA בשלוש החולות הנ"ל, בו נראים סיגנלים נמוכים במקטעים ספציפיים המעידים על חסרונם של אלל אחד. טבלא ד. 1 מציגה את האזורים בגן *MECP2* שמזוהים עם אותם מקטעים ספציפיים ומביאה את הפענוח של מיקומי החסר באותן חולות. לפיכך הוערך שחולה א' עם תסמונת מולדת נושאת חסר גדול שמתחיל קרוב לקודון הסיום באקסון 4 וממשיך ל 3'UTR, כאשר הגודל המינימלי של החסר מוערך ל 4.2Kb על פי מיקום הגלאים (באדום). בחולה ב' קלאסית התגלה חסר קטן יותר בקצה C של אקסון 4 שלא הצלחנו עדיין לזהות את גבולותיו המדויקים באמצעות קריאות רצף. בחולה ג' קלאסית זוהה חסר באזור המרכזי יותר של הגן שבאמצעות MLPA מופה ל TRD ולמטה ממנו ובאמצעות קריאות רצף מוקם במדויק לחסר c.(378-219) 1164del1018bp, שמתחיל באינטרון 3 ונמשך עד קצה C (תרשים 3.7).

טבלא ד.1. איתור אזורי חסר באמצעות שיטת MLPA בשלוש חולות רט

המקטעים המודגשים הם אלו עם שטחי פיקים חריגים (RPA – relative peak area).

מס' ואורך מקטע (bp)	תפקיד	חולה א'	חולה ב'	חולה ג'
1. 210	ביקורת	0.94±0.10	0.93±0.05	0.82±0.01
2. 220	ביקורת	0.99±0.09	1.12±0.02	0.97±0.08
3. 229	קצה C	0.73±0.05	0.82±0.17	0.52±0.07
4. 238	ביקורת	1.03±0.06	1.03±0.09	0.72±0.02
5. 247	ביקורת	0.99±0.03	0.97±0.04	0.91±0.09
6. 256	3'UTR	0.55±0.04	1.03±0.06	0.63±0.12
7. 265	ביקורת	1.01±0.07	1.06±0.02	1.16±0.03
8. 274	קודון סיום	0.55±0.01	0.54±0.01	1.01±0.13
9. 283	ביקורת	1.08±0.01	0.97±0.04	1.27±0.01
10. 292	אקסון 1	1.06±0.01	1.13±0.13	1.01±0.09
11. 301	ביקורת	1.00±0.01	1.04±0.09	0.87±0.06
12. 310	ביקורת	1.05±0.01	1.00±0.02	1.26±0.02
13. 319	ביקורת	1.03±0.01	1.01±0.04	1.32±0.10
14. 328	ביקורת	1.04±0.04	1.05±0.02	1.29±0.08
15. 337	TRD	1.09±0.05	1.04±0.01	0.41±0.01
16. 346	ביקורת	0.97±0.11	1.15±0.09	1.16±0.06
17. 355	אקסון 3	1.12±0.05	0.99±0.09	0.88±0.03
18. 364	ביקורת	1.07±0.06	1.04±0.01	1.23±0.02
19. 373	אקסון 2	1.05±0.01	1.15±0.07	0.77±0.04
20. 382	ביקורת	1.16±0.16	1.12±0.02	0.79±0.06
21. 391	אקסון 1	1.01±0.01	1.02±0.04	1.25±0.01
22. 400	ביקורת	1.14±0.03	1.06±0.01	0.98±0.12
23. 409	ביקורת	1.15±0.13	1.03±0.06	1.16±0.08
24. 418	ביקורת	1.33±0.14	1.26±0.15	1.20±0.04
25. 427	ביקורת	1.03±0.01	0.98±0.08	1.21±0.01
26. 436	ביקורת	1.14±0.03	1.08±0.02	1.13±0.09
27. 445	ביקורת	1.19±0.13	1.20±0.02	0.75±0.07
28. 454	ביקורת	1.16±0.08	1.20±0.02	1.25±0.05

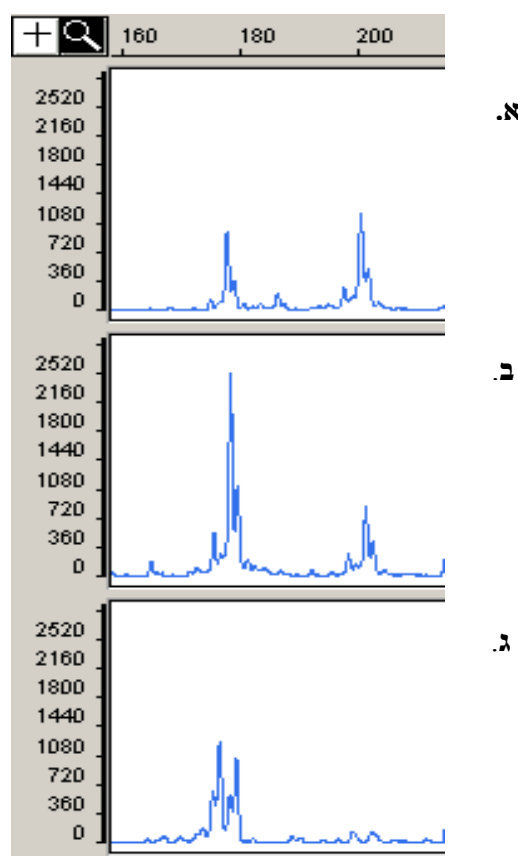


תרשים 4.ד. אנליזת MLPA של שלוש חולות רט עם חסרים גדולים לעומת נבדקת ביקורת.

א. דגם MLPA בנבדקת נורמאלית על פיה חושבו השטחים היחסיים RPA של הסיגנלים התואמים את המקטעים השונים. **ב.** דגם MLPA של חולה א' עם תסמונת מולדת בו נראים סיגנלים נמוכים במקטעים 256bp, 274bp המייצגים את אזורי 3'UTR ואקסון 4, בהתאמה. **ג.** דגם MLPA של חולה ב' עם תסמונת רט קלאסית בו נראים סיגנלים נמוכים של מקטע 274bp המבטא את סוף אקסון 4. **ד.** דגם MLPA של חולה ג' עם תסמונת רט קלאסית עם ירידה בסיגנלים של 229bp, 337bp המייצגים את קצה C ו TRD באקסון 4, בהתאמה.

התפלגות האינאקטיבציה של כרמוזום X (XCI)

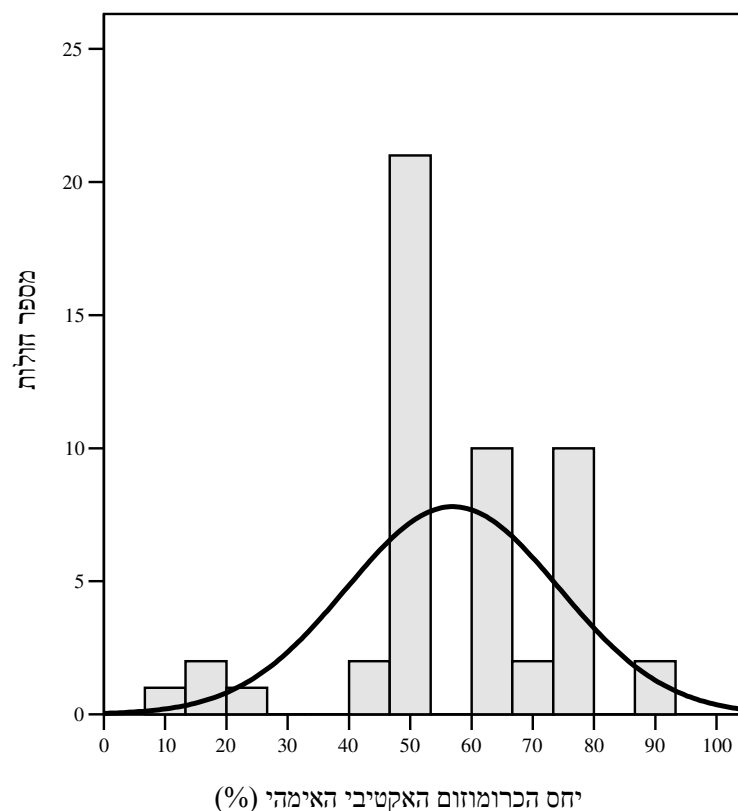
הסף המקובל להגדרת התפלגות XCI נטויה מובהקת הוא 75%. במחקר זה הושם דגש על זיהוי המקור ההורי של כרמוזומי X, גם במקרים עם הטויה פחותה מ 75% XCI על מנת ללמוד על האפקט האפיגנטי הזה המתווסף למוטציות. ההנחה בבסיס מבחן זה, מסתמכת על ממצאים מובהקים מאוד בספרות (Trappe et al 2001, Girard et al 2001) והיא שברובם הגדול של המקרים המוטציות הספונטניות ב *MECP2* מתרחשות בגמטות האבהיות. לפיכך התייחסנו לכרמוזום X האבהי ככרמוזום הנושא את המוטציה (במקרה אחד הוכחה תאחיזה זו- ראה תרשים 8.ד). אמנם אנליזת XCI בוצעה בדנא לימפוציטי ואינה מייצגת בהכרח את התפלגות זו במוח, אך יש סימוכין להתאמה בין התפלגויות אלו ברקמות השונות, בייחוד בגיל צעיר (Sharp et al 2000). בתרשים 5.ד מומחשת אנליזת XCI עם העדפה מובהקת של אינאקטיבציית הכרמוזום האימהי.



תרשים 5.ד. התפלגות נטויה של XCI בחולת רט עם תסמונת מולדת ומוטציית חסר

תבחין HUMARA של חולה עם מוטציית חסר הכוללת אקסון 4 ו 3'UTR. המקטעים בגדלים 200bp, 178bp ו 175bp הם תוצרי האללים הפולימורפיים של AR. א. דגם אללי של החולה לפני חיתוך באנזים HpaII הרגיש למתילציה. ב. דגם אללי של החולה אחרי החיתוך ב HpaII שמעיד על ייצוג יתר של האלל בגודל 178bp באוכלוסיית האללים האינאקטיביים (שעברו מתילציה ולא נחתכו על ידי האנזים). ג. דגם אללי של האם שמעיד על מקורו האימהי של האלל 178bp שאינאקטיבי בחולה. המסקנה מאנליזה זו היא שלחולה יש אינאקטיבציה מועדפת של הכרמוזום האימהי בסדר גודל של 80%.

מתוך 51 חולות רט שנמצאו אינפורמטיביות בתבחין HUMARA, מהן 48 חולות עם מוטציות וארבע חולות קלאסיות ללא ממצאי מוטציות, נמצאה התפלגות נטויה מובהקת ב 14 חולות שהן כ 27%. בתשע מחולות אלו היתה אקטיבציה מועדפת מובהקת ($\geq 75\%$) של הכרומוזום האמהי שהוא, על פי רוב הסיכויים, הכרומוזום התקין בחולות רט. גם ברמות נטיית XCI לא מובהקות (60-74%) היו מקרים רבים יותר של אקטיבציה מועדפת של הכרומוזום האמהי. תרשים ד. 6 מראה את התפלגות XCI של החולות ביחס להתפלגות נורמאלית. למרות שהממצאים יכולים להעיד על ייצוג יתר של הטיית XCI, במבחן טיב ההתפלגות לא נמצאה חריגה מובהקת מהתפלגות נורמאלית (Mean = 56.96, Std. Dev=17.38, Skewness=-0.409).



תרשים 6.ד: התפלגות XCI ב 51 חולות רט

ה XCI חושב בהתייחס לאקטיבציית של כרומוזום X האימהי. התפלגות XCI נראית כנורמאלית עם נטייה ימנית בכיוון העדפת אקטיבציה של כרומוזום X האימהי התקין.

שכיחויות מוטציות ב *MECP2* בתסמונת רט

עוקבת חולות רט שנתגבשה במסגרת מחקר זה מונה 54 חולות קלאסיות ו 16 חולות רט אטיפיות שהגיעו ברובן דרך מרפאת רט בבית החולים שיבא. בנוסף לכך ידוע לנו על עוד כ 11 חולות רט קלאסיות שאינן כלולות בעוקבה הנוכחית. היות ובשנים האחרונות מרפאת רט והמכון הגנטי בבי"ח שיבא מהווים את הגורם העיקרי לאבחון ומעקב אחר חולות רט בארץ ניתן להעריך כי עד כה ידוע על כ 80 חולות שגילאיהן נעים בין 1.5 עד 40 שנים (רווח בר סמך 95% בין גיל שנה וחצי עד 26 שנים). בהסתמך על כך שאוכלוסיית הנשים ילידות 1980-2004 בישראל מונה כ 1.5 מיליון לפי נתוני הלשכה הסטטיסטית המרכזית (<http://www1.cbs.gov.il>), ניתן להסיק כי שכיחות חולות רט מאובחנות בישראל נכון להיום היא כ 0.53:10,000 בנות עד גיל 26 שנים. כמובן שהערכה זו אינה לוקחת בחשבון את החולות שאינן מאובחנות, בפרט אלו בגיל המבוגר.

רשימת חולות רט שבהן נמצאו מוטציות ב *MECP2* מובאת בטבלא 2.ד עם הגדרותיהן הקליניות והתפלגות האינאקטיבציה של כרומוזום X. מוטציות ספוראדיות בגן *MECP2* זוהו ב 55 חולות רט מהעוקבה הישראלית. קבוצה זו מורכבת מ 45 מתוך 54 חולות עם תסמונת רט קלאסית שנבדקו (83%), ארבע חולות עם וריאנט דיבור שמור (מתוך ארבע שנבדקו), שתי חולות עם צורה מולדת (מתוך ארבע שנבדקו), שתי חולות עם צורה קלה (מתוך שש שנבדקו) וחולה אחת עם ביטוי קל ביותר שהאבחון שלה נכון לעתה הוא וריאנט גרסיה מאוחרת עם הפרעת דיבור בלבד. מתוך שש החולות עם וריאנט פרכוסים מוקדמים לא נמצאה אף מוטציה ספוראדית. מרבית החולות עם המוטציות המזוהות (65%) נקשרו במוטציות hotspots בשמונה אתרי CpG לאורך הגן *MECP2*. המוטציות השכיחות ביותר היו p.T158M שנמצאה בתשע חולות ו p.R255X שנמצאה בשמונה חולות, כולן עם תסמונת רט קלאסית. מבחינת פיזור המוטציות, אקסון 4 הגדול באקסונים כלל 90% מהמוטציות. מוטציות באקסון 3 נמצאו בשלושה מקרים. באקסונים 1-2 לא נמצאו מוטציות מלבד חסר אתר השחבור של תורם 1 שנמצא בשתי חולות. בקצה C של *MECP2* מופו גבולותיהם של ארבעה חסרים קטנים שזוהו בקריאות רצף ישירות ועוד שלושה חסרים גדולים שזוהו בשיטת MLPA. שבעת חסרים אלו, בטווח הגדלים 1Kb-4.2Kb, 294-41bp מהווים כ 12% מהמוטציות. נמצאה התפלגות מובהקת של מוטציות נקודתיות לאורך הגן כאשר מרבית המוטציות מסוג חלף נמצאו ב MBD ואילו מוטציות עצר נמצאו בעיקר בתוך TRD-NLS ($\chi^2 = 0.58$, df=9, $p < 0.0001$). התייחסות לתסמינים הקליניים של המוטציות באזורים אלו מובאת בהמשך בפרק האנליזות פנוטיפ-גנוטיפ. יתכן שמוטציות אחרות קשורות בפנוטיפים שאינם מתאימים להגדרת תסמונת רט.

טבלא ד.2. חולות עם מוטציות ב *MECP2*, הגדרותיהן הקליניות והתפלגות XCI

מספור המוטציות נעשה על המיקום באיזופורם *MECP2_e2*, למעט c.62+1 del GT לפי *MECP2_e1*. בסוגריים מרובעים מופיעים שינויים נוספים למוטציות על אותו אלל. במקרים עם התפלגות XCI נטויה ($\leq 75\%$) מצוין יחס הכרומוזום האקטיבי ומוצאו ההורי. ל"א – לא אינפורמטיביות בתבחין HUMARA, ד"ש – וריאנט דיבור שמור.

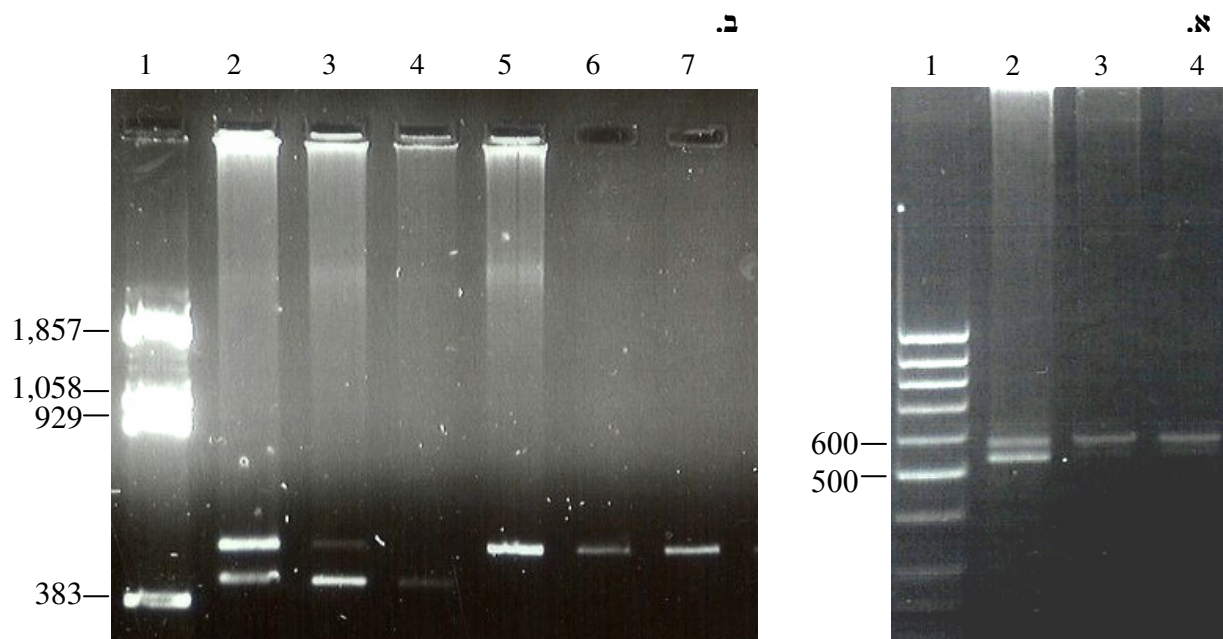
חולות ואבחנות	שינוי נוקליאוטידים	שינוי חומצות אמינו	אזור בגן	התפלגות XCI והכרומוזום הפעיל יותר
1 קלאסית	c.62+1Δ GT		אינטרון 1	אקראית
1 קלאסית	c.62+1ΔGT + 378-19ΔT		אינטרון 1 + אינטרון 3	90% אבהי
1 קלאסית	c.141 ins A	p.E55fs57X	קצה N	80% אמהי
2 קלאסיות	c.316C>T	p.R106W	MBD	90% אמהי ו 80% אמהי
1 קלאסית	c.(378-219)_1164Δ1018		אינטרון 3 עד קצה C	75% אמהי
2 קלאסיות, 2 ד"ש	c.397C>T	p.R133C	MBD	4 אקראיות
1 קלאסית	c.401C>G	p.S134C	MBD	אקראית
1 ד"ש	c.453C>G	p.D151E	MBD	ל"א
1 קלאסית	c.[473C>T+378-19ΔT]	p.T158M	MBD ואינטרון 3	אקראית
8 קלאסיות	c.473C>T	p.T158M	MBD	6 אקראיות, 1 עם 75% אמהי, 1 ל"א
6 קלאסיות	c.502C>T	p.R168X	בין האזורים התפקודיים	5 אקראיות, 1 עם 75% אמהי
1 קלאסית	c.674C>G	p.P225R	TRD	אקראית
1 קלאסית	c.731ins C	p.Q244fs258X	TRD	אקראית
8 קלאסיות	c.763C>T	p.R255X	TRD-NLS	6 אקראיות, 2 עם 75% ו 80% אמהי
1 קלאסית	c.775_995Δ221	p.A259fs266X	TRD-NLS עד קצה C	אקראית
1 קלאסית	c.806ΔG	p.G269fs288X	TRD-NLS	80% אימהי
2 קלאסיות	c.808C>T	p.R270X	TRD-NLS	75% אבהי, 75% אימהי
1 מולדת	c.808ΔC	p.R270fs288X	TRD-NLS	אקראית
1 קלאסית	c.880C>T	p.R294X	TRD	אקראית
1 קלאסית	c.908_1201Δ294	p.I303_T400Δ98	TRD עד קצה C	אקראית
1 רגרסיה מאוחרת	c.910A>G	p.K304E	TRD	ל"א
2 קלאסיות, 1 קלה	c.916C>T	p.R306C	TRD	2 קלאסיות אקראיות, 1 צורה קלה 80% אמהי
1 קלאסית	c.1080_1161Δ82	p.P360fs365X	קצה C	אקראית
1 קלאסית	c.1157_1197Δ41	p.L386fs486X	קצה C	אקראית
1 קלאסית	c.1157_1327Δ171	p.L386fs431X	קצה C	אקראית
1 ד"ש	c.1157_1198Δ42	p.L386_S401ΔI5insP	קצה C	אקראית
1 קלאסית	Large Δ <-4.2Kb		קצה C עד 3'UTR	אקראית
1 מולדת	Large Δ ≥4.2Kb		קצה C עד 3'UTR	80% אבהי

שינויי רצף תורשתיים ב MECP2

בנוסף למוטציות הספוראדיות זוהו בעוקבת החולים עשרה שינויי רצף תורשתיים, מתוכם חמישה באזור המקודד. שניים מהשנויים, $(p.V275A) c.824T>C$ ו $(p.P251P) c.753C>T$, הם חדשים ללא תקדים בספרות או במאגרי המידע של NCBI ו RetBase. מעניינת במיוחד מוטציית החלף $p.V275A c.824T>C$ היות והיא גורמת לשינוי ממשי ברצף החלבון, ממוקמת באתר פונקציונלי TRD ונמצאה על רקע תסמונת רט קלאסית. השוואות באמצעות תוכנות ביואינפורמטיות USCS-Blat ו NCBI-Blast הראו שהחומצה האמינית V275 (ואלין) שמורה במספר מינים ממחלקת היונקים, אך לא בעופות, דו-חיים ודגים. המוטציה הזו נמצאה בחולת רט קלאסית ממוצא אתיופי ובאימה האסימפטומטית. בחולה נמצאה התפלגות XCI נטויה (75%) בכיוון אקטיבציה מועדפת של הכרומוזום האימהי המוטנטי. לעומת זאת, באם הנשאית נמצאה התפלגות של אקטיבציה מועדפת (75%) של כרומוזום X הלא מוטנטי. על מנת לבדוק את האפשרות שהשינוי הוא פולימורפיזם אתני שכיח נערכה סקירה של 100 כרומוזומים מפרטים ממוצא אתיופי. לא נמצא פרט אסימפטומטי נוסף, גבר או אשה, עם שינוי זה (תרשים 7.ד); על כן, הסתמנה מוטציה זו כבעלת ההסתברות גבוהה לפתוגניות והשפעתה על תפקוד TRD נבדקה במערכת ביטוי חלבון (פרק 4.ד להלן).

השינוי $c.753C>T$ נמצא בעמדה השלישית המנוונת של קודון החומצה האמינית פרולין כך שאינו גורם לשינוי חומצה אמינית $(p.P251P)$. שינוי זה נמצא בחולה בת 42 עם אוטיזם, אטקסיה, פרכוסים נשלטים ללא מיקרוצפלי. שינוי זה נמצא גם באם התקינה (לפי דווח בתה שפנתה ליעוץ). בעוד שבבת החולה נמצאה המוטציה על רקע XCI נטוי (85%) בכיוון אקטיבציה של כרומוזום X האימהי המוטנטי, באם נמצא דגם XCI הפוך במובהק (90%). במשפחה זו ישנה גם אחות הסובלת מסכיזופרניה שאינה נושאת את השינוי ואח עם פיגור שכלי קל שלא נבדק. בבדיקת אזור השינוי בתוכנת ESEfinder לא נראה שמדובר ברצף אופייני לאתר התקשרות של אלמנטים רגולטוריים. לפיכך יש סבירות נמוכה בלבד לכך ש $c.753C>T$ הוא שינוי פתוגני.

שינוי תורשתי מעניין נוסף שהושם עליו דגש בזמנו היה $c.378-19delT (\Delta T)$ שנמצא באזור עתיר פירימידינים קרוב לגבול אינטרון 3 – אקסון 4. שינוי זה נמצא בארבעה חולים מקבוצות אתניות שונות אך היווה ממצא יחיד בילד וילדה עם תמונה קלינית דמויית תסמונת רט מולדת. בשתי חולות קלאסיות נוספות הוא נמצא יחד עם מוטציות אחרות. בכל המקרים הללו נעשתה סקירה משפחתית למעקב אחר הורשת ΔT ונמצא כי בחלק מהמקרים הוא הועבר מהצד האמהי ובמקרים אחרים נמצא בצד האבהי. בכל המקרים אותה במשפחה זכר אסימפטומטי שנושא את השינוי מה שמעמיד בספק את הקשר של שינוי זה למחלה. למרות זאת, השינוי ΔT לא נמצא בסדרה של 152 כרומוזומים של נשים ישראליות תקינות ממוצא אשכנזי (תרשים 7.ד).

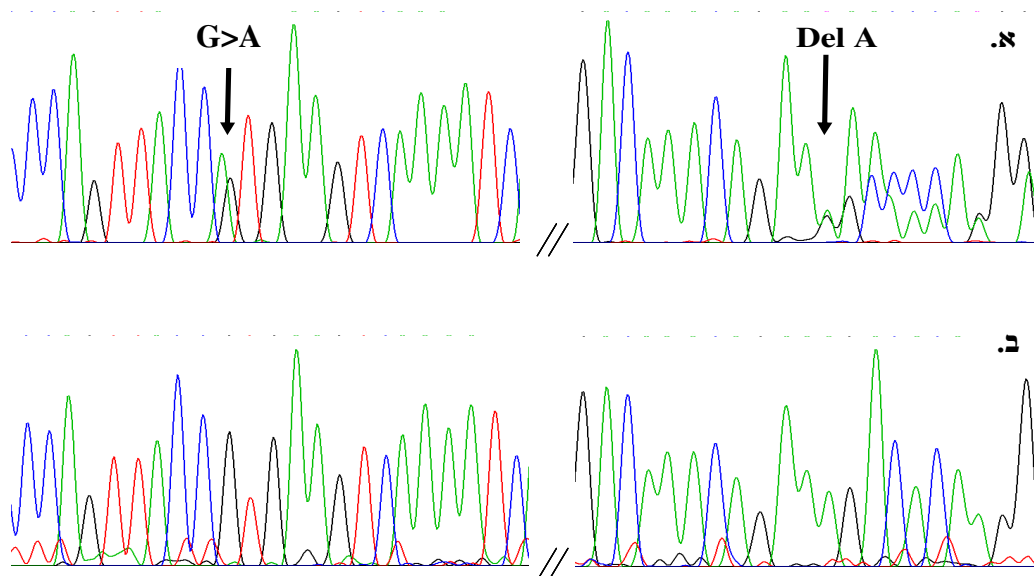


תרשים ד.7. סקר אוכלוסיות לזיהוי פולימורפיזמים אפשריים ב *MECP2*

א. אנליזת RFLP ששימשה לסקר גברים ונשים ממוצא אתיופי לנוכחות שינוי c.824T>C בוצעה באמצעות האנזים BsiEI (ראה פרק שיטות). בתרשים מובאות מספר דגימות של פרטים נורמאליים על פי התוצר הלא מעוכל בגודל 584bp (בארות 3-4), חולת רט הטרוזיגוטית למוטציה על פי תוצר של 584bp ותוצר מעוכל של 538bp (באר 2) וסולם גדלים במרווחים של 50bp (באר 1).

ב. אנליזת RFLP ששימשה לסקר נשים ממוצא אשכנזי לבדיקת השינוי 378-19delT (ΔT) בוצעה באמצעות האנזים BbSI (ראה פרק שיטות). בתרשים מובאות מספר דגימות של פרטים נורמאליים על פי התוצר הלא מעוכל בגודל 498bp (בארות 5-7). זכר נורמאלי המיזיגוט ל ΔT על פי התוצר המעוכל של 416bp (באר 4), זכר עם סימנים קליניים דמויי רט המיזיגוט ל ΔT על פי תוצר של 416bp (באר 3 עיכול חלקי), חולה קלאסית הטרוזיגוטית ל ΔT על פי התוצרים 498bp ו 416bp (באר 2), וסולם גדלים (באר 1).

תרשים 8.ד מתאר את אחד המקרים בהם נמצא השינוי ΔT יחד עם מוטציית hotspot p.T158M בחולה עם תסמונת רט קלאסית. באנליזת רצף נוקליאוטידים של החולה הזו נקראו שני השינויים באותה הריאקציה (תרשים 8.א). בחקירה המשפחתית נקבע שמקור השינוי ΔT הוא אבהי ו p.T158M הוא שינוי חדש. השאלה שהועלתה היתה האם שני שינויים מופיעים ב cis או ב trans והיא נענתה באמצעות אנליזת רצף נוקלאטידים נוספת לאחר חיתוך באנזים האנדונוקליאז BbsI שחותך את האלל ΔT . אנליזה זו העידה כי לאחר העיכול נשאר אלל נורמאלי ללא ΔT וללא p.T158M (תרשים 8.ב). מכאן הוסק ששני השינויים שהמוטציה T158M ו ΔT ממוקמים ב cis ומקורם בכרומוזום X האבהי.



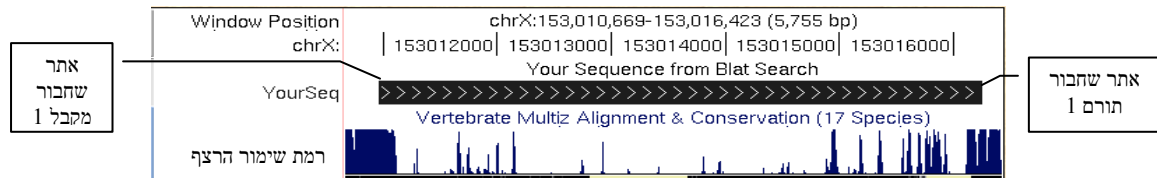
תרשים 8.ד. זיהוי השינויים ΔT ו p.T158M בחולת רט קלאסית
 מקטע מאקסון 4 של *MECP2* שיוצר באמצעות התחלים 4AR ו 4AF עבר אנליזת רצף נוקליאוטידים עם התחל 4AR בכיוון ההפוך. א. מראה רצף הטרוזיגוטי מבחינת השינוי c.473C>T (473A>G) בגדיל המשלים, ברצף השמאלי) והשינוי ΔT (משלים, ברצף הימני). ב. מראה רצף נוקליאוטידים תקין של אותו המקטע באותו כיוון לאחר עיכול מלא באמצעות BbsI.

מעבר לשינויים הנ"ל, נמצאו שינויים תורשתיים נוספים שדווחו כפולימורפיזמים במחקרים אחרים ובמאגר המידע RettBase. השינוי c.375C>A (p.I125I) הוא שינוי שקט (silent) מבחינת הביטוי בחלבון. שינוי זה מדווח כפולימורפיזם על ידי Cheadle ועמיתיו (2000), Buyse ועמיתיו (2000) ומופיע גם ב RetBase. השינוי הזה נמצא במחקר הנוכחי בשלושה בנים הסובלים מפיגור שכלי בינוני המלווה בפרוסים וגם באחיהם הנורמאלי ובאמם. העובדה שהתפלגות השינוי במשפחה אינה תואמת את התפלגות המחלה תומכת בכך ששינוי זה הוא פולימורפיזם. השינוי c.602C>T (p.A201V) גורם להחלפת חומצה אמינית באזור שבין MBD ל TRD. השוואה ביואינפורמטית בתוכנות USCS-Blat ו NCBI-Blast הראתה שהחומצה האמינית A201 נשמרה במהלך האבולוציה גם במינים אחרים במחלקת היונקים. לעומת זאת שינוי זה דווח בתור פולימורפיזם במחקרים אחרונים מכיוון שנמצא גם בזכרים אסימפטומטיים (Amano et al 2000, Fukuda et al 2005). במחקר זה נמצא השינוי הזה בחולה עם תסמונת דמוית אנגלמן שנבדקה גם לחסרים בגן UBE3A ואותו השינוי נמצא גם באמה האסימפטומטית של החולה. התפלגות XCI של החולה היתה נטויה קלות (70%) לטובת אקטיבציה של הכרומוזום האימהי הוריאנטי, אך באם נמצאה התפלגות XCI אקראית. הממצאים האלו מטילים ספק בכך שמדובר במוטציה ומצדדים בכך שמדובר בפולימורפיזם. בדומה לכך, השינוי p.R484T c.1451C>T נמצא אצלנו בשתי חולות אטיפיות קשות, האחת עם פרוסות מוקדמים והשניה עם תסמונת רט מולדת ואותו שינוי נמצא גם באמהות התקינות של החולות על רקע התפלגות XCI אקראית. למרות שהשינוי מופיע על רקע פנוטיפ קשה ושהארגינין במיקום 484 נחשב שמור מבחינה אבולוציונית, ממצאי XCI אינם מצדדים בכך שהשינוי קשור במחלה.

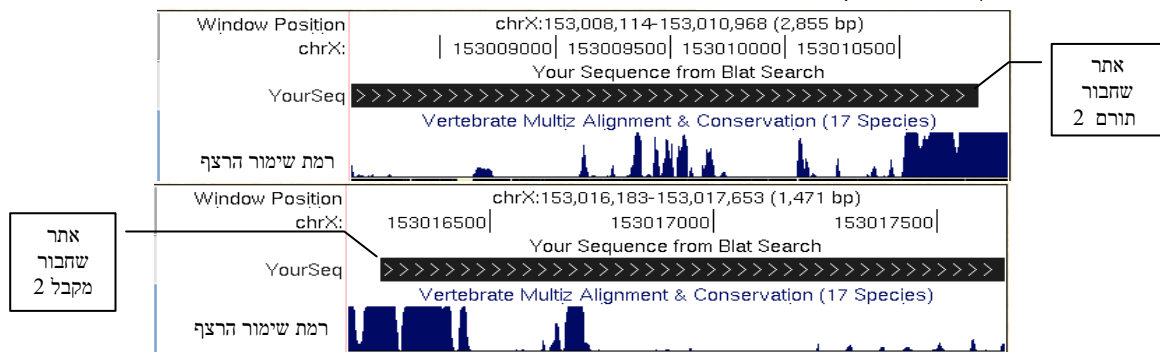
חיפוש מוטציות באזורים האחראים על בקרת השעתוק

במסגרת העבודה הנוכחית נעשה מאמץ לחקור את האזורים המועדים לכלול אתרי בקרת השעתוק של *MECP2*. ניסינו לאתר חולות רט עם מוטציות שיכולות להיות רגולטוריות באזורים לא מקודדים כמו שתי החולות עם חסר אתר השחבור תורם באינטרון הראשון c.62+1delGT. ביתר חולות רט ללא מוטציות מקודדות, חיפשנו מוטציות בפרומוטר, באינטרונים וב 3'UTR. למרות שהרצף המקודד של *MECP2* הוא קצר ונוח ברובו לאנליזת מוטציות, הרצפים הלא מקודדים גדולים ביותר: האזור המועמד לפרומוטר הוא גדול מ 1Kb, האינטרון השני למשל הוא כ 60Kb ואזור 3'UTR יכול להגיע עד 8.5Kb בהתחשב במיקום אתר פולי A האחרון. אשר על כן, נעשתה אנליזה ביואינפורמטית מקדימה על מנת לזהות אזורים שמורים באבולוציה מתוך רצפי האינטרונים ו 3'UTR שיכולים להיות אתרי בקרת שיעתוק מועדמים. אנליזה זו הראתה ששיאי השימור האבולוציוני ממוקמים בקרבת הגבולות אקסון-אינטרון. באותם אזורים ביצענו קריאות רצף בחולות ללא מוטציות. בנוסף, זיהינו אזורים שמורים בקצוות ולאורך ה 3'UTR שעברו אנליזת DHPLC.

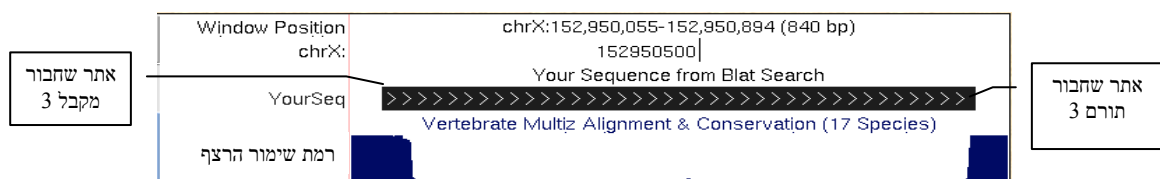
אינטרון 1



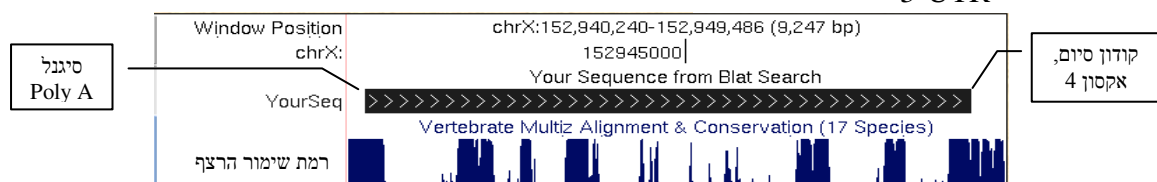
קצוות אינטרון 2



אינטרון 3



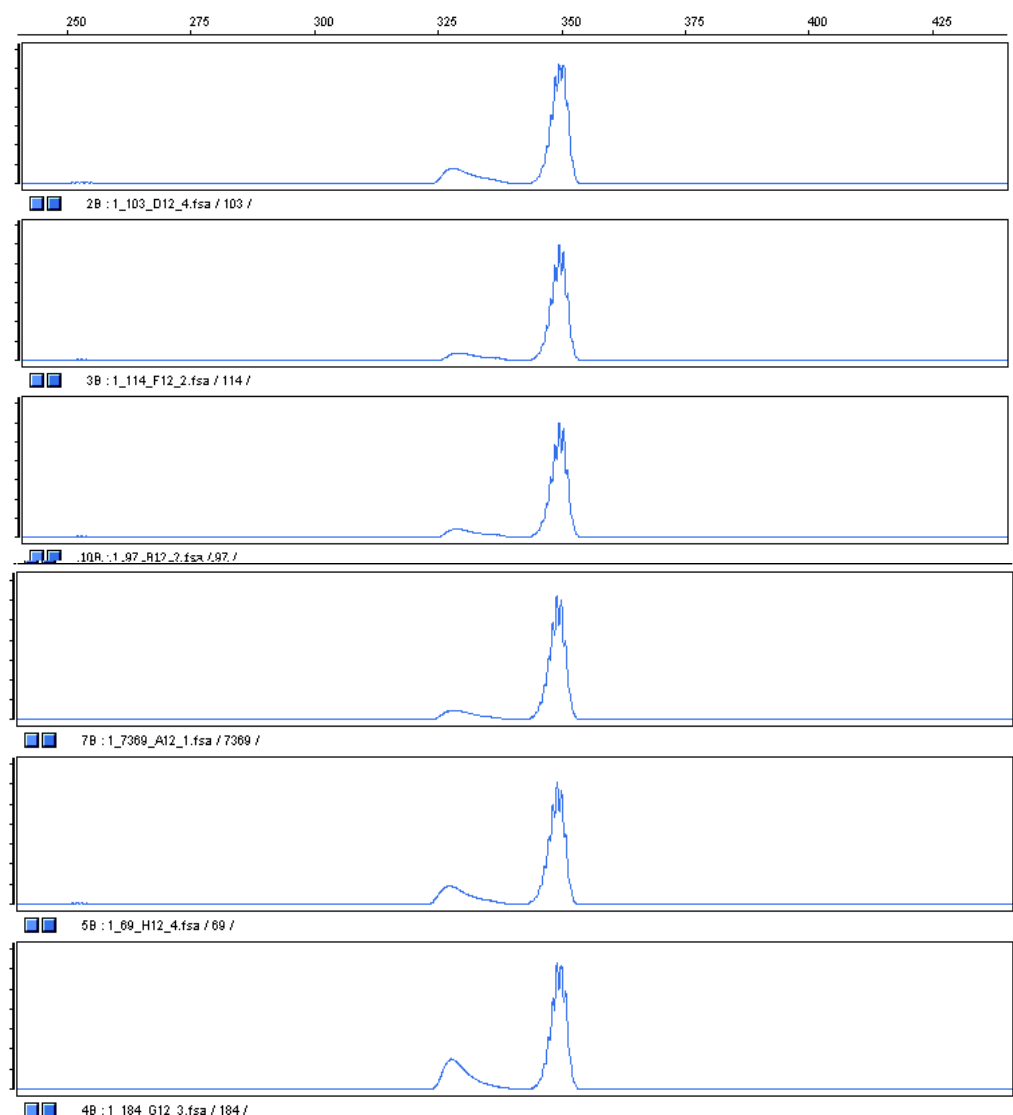
3'UTR



תרשים 10.ד: שימור אבולוציוני של רצפי האינטרונים ו 3'UTR של *MECP2*

רצפי האינטרונים ו 3'UTR של *MECP2* הומני הושו לרצפים מקבילים ב 17 מינים ממחלקת היונקים, עופות, דו חיים ודגים באמצעות תוכנת Blat באתר UCS. בשלושת האינטרונים של *MECP2* היתה רמת שימור גבוהה יותר בקרבת הגבולות אקסון-אינטרון והיא ירדה עם המרחק מהאקסונים. באזור 3'UTR היו אזורים שמורים לכל אורכו (8.5Kb). מהאינטרון השני (שאורכו כ 60Kb) מוצגים תוצאות ההשוואה של מקטעים בגודל 2.8Kb ו 1.5Kb מקצה 5' ו 3', בהתאמה. ההשוואות של אינטרון 1 ו 3 מוצגים ביחס למלוא אורכם: 5.2Kb ו 760bp, בהתאמה.

בקצה 5' של האינטרון השני, בסמוך לאקסון 2 יש אזור עתיר שרשראות פוליפירימידין (-83472 g.83648 לפי GeneBank AF030876) שאינו ניתן לקריאת רצף ישירה עקב מבנה שניוני. אזור זה הינו שמור ביותר ובהיותו סמוך לאקסון השני הנתון לשחבור חליפי עשוי לכלול רצפים חיוניים לבקרת השחבור. לאור סיכון יתר לשינוי במספר החזרות בתוך רצפים חוזרניים, הושם דגש על בדיקת אזור זה באמצעות אנליזת אורכי מקטעי PCR. על מנת לאתר שינויים אפשריים באזור זה נערכה אנליזה של מקטעי PCR בשש חולות רט ללא ממצאי מוטצות מקודדות, חמש קלאסיות ואחת עם צורה מולדת. תרשים 11.ד מראה שבכל החולות הנ"ל נמצא מקטע אחד בגודל מצופה של 349bp.

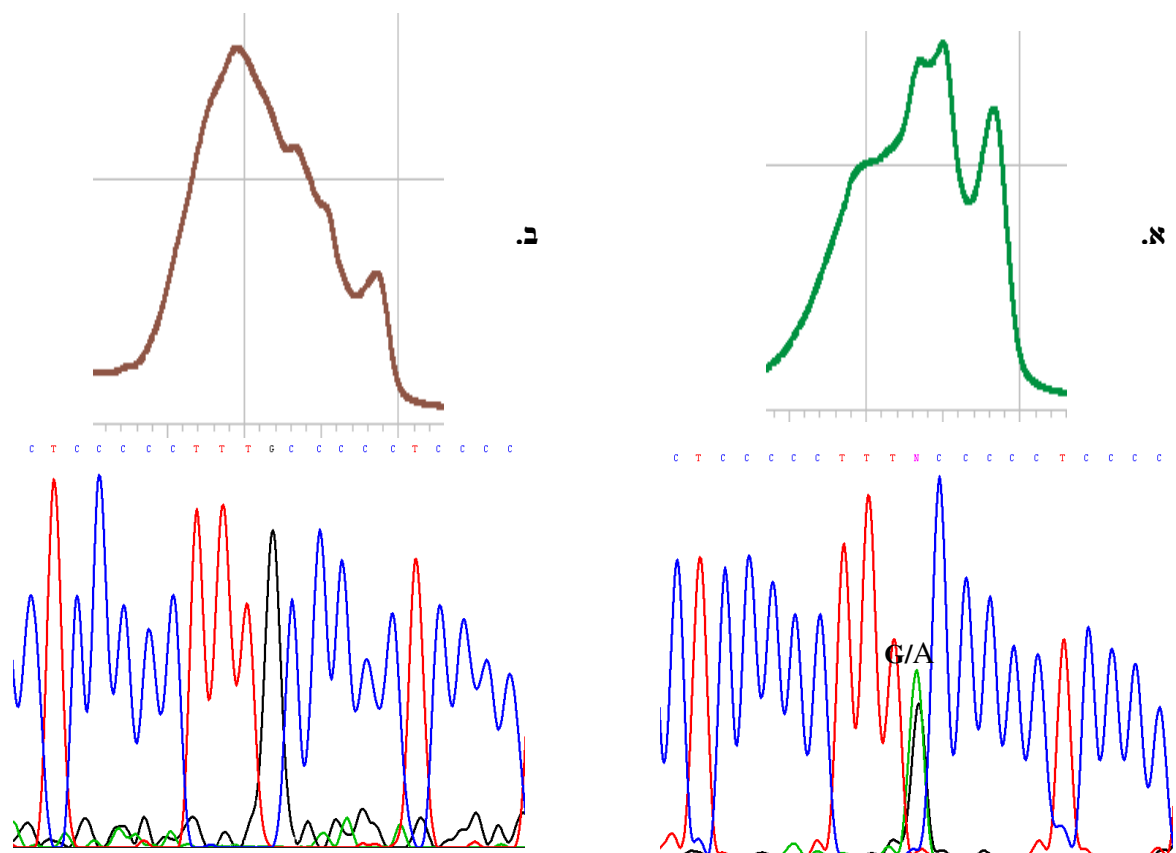


תרשים 11.ד. אנליזת מקטע בן 349bp מקצה 5' של האינטרון השני

בקריאת רצפי הפרומטר של 1.2Kb לא נמצאה כל חריגה מהרצף הנורמאלי באף אחת מהנבדקות. באינטרונים התגלו שלושה שינויים לעומת הרצף התקין אולם כולם התבררו כתורשתיים: השינוי g.88884A>G שממוקם בקצה 5' של האינטרון הראשון (c.62+197A>G לפי MECP2_e1) נמצא בחולה קלאסית ובאביה, בחולה אטיפית נמצא שינוי g.84136C>T בקצה 3' של אותו אינטרון (c.1-314C>T לפי MECP2_e2) שנמצא גם באמה על רקע XCI אקראי, באינטרון 3 נמצא במרבית הנבדקות (8 מתוך 13) פולימורפיזם ידוע g.23413G/A (rs2075596) במצב הטרוזיגוטי. מכאן הוסק שכל השינויים הנ"ל הם פולימורפיזמים.

אזור 3'UTR כוסה באמצעות 21 מקטעי PCR בגודל 400-600bp ששימשו לאנליזת DHPLC (התחלים ששימשו ליצירת כל המקטעים מופיעים בנספח א'). האנליזה כללה השוואה לקבוצת ביקורת של דגימות מ 10 נשים נורמאליות ממוצא אשכנזי שעברו DHPLC בו זמני ובאותם תנאים עם 10 חולות רט (6 קלאסיות ו 4 אטיפיות) מאותו מוצא. התאמת המוצא נועדה להימנע משונות בין קבוצת הביקורת לקבוצת הניסוי על רקע פולימורפיזמים תלויי מוצא. כל מקטע עם דגם כרומוגרפיה שונה שנמצא בחולה לעומת קבוצת הביקורת, עבר אנליזה ישירה של קריאת רצף. דגם כרומוגרפיה חריג כזה התקבל למשל במקטע U3 אצל אחת מהחולות הקלאסיות (תרשים ד.12). בקריאת רצף המקטע התגלה השינוי c.1461+905G>A במיקום 2533 מהתחלת mRNA (GeneBank NM_004992.2). באנליזה משפחתית נתגלה אותו שינוי באמה של החולה. בנוסף, בחולה היתה התפלגות XCI נטויה מובהקת לכיוון אקטיבציה של הכרומוזום האבי, מה ששולל את הפתוגניות של השינוי זה. בבדיקת רצף של קבוצת ביקורת בת עשרה זכרים תקינים ממוצא אשכנזי, נמצא שינוי זה פעם נוספת. כלומר, בסה"כ נמצא שינוי זה פעמיים מתוך 50 כרומוזומים (10 חולות, 10 בריאות ו 10 זכרים). מכאן שהשינוי c.1461+905G>A (או c.2533G>A) שאינו מדווח במאגרי המידע, הוא פולימורפיזם שכיח באוכלוסיה.

בנוסף נתגלה שינוי c.1461+14G>A. הממוקם בקצה של 3'UTR הקרוב לאקסון 4, שנמצא בחולות רט אטיפית שדגימתה הגיעה אלינו מארה"ב. שינוי זה נמצא גם באביה של החולה מכאן שמדובר בשינוי פולימורפי בלבד. דגימת רנ"א של חולה זו נכללה בבדיקת רמות הביטוי של MECP2 בדם פריפרי (ראה להלן). גם החולה הקלאסית עם השינוי c.1461+905G>A שתוארה לעיל נכללה באותה בדיקה.



תרשים 12.ד: אנליזת DHPLC וקריאות רצף נבדלות של מקטע 3U מתוך 3'UTR
א. כרומטוגרם של חולה קלאסית ללא מוטציות מקודדות **ב.** כרומטוגרם של אותו מקטע בנבדקת ביקורת.
 הפאנל התחתון מראה את קריאות הרצף של אותו מקטע וזיהוי השינוי c.1461+905G>A בחולה.

רשימת החולות והשינויים התורשתיים שנמצאו בהן מפורטת בטבלא ד.3. בסך הכל נמצאו 10 שינויים תורשתיים שהופיעו ב 11 חולים. חמישה מהשינויים שנמצאו בתוך האזור המקודד או בסמוך אליו, ידועים כפולימורפיזמים מלבד השינוי p.V275A. לגבי שינוי זה יש בסיס לשער כי הוא יכול להיות קשור למחלה מכיון שהוא נמצא באתר פונקציונלי TRD, נמצא בחולת תסמונת קלאסית ודגם XCI נטוי בכיוון הפוך בחולה ובאם האסימפטומטית. ארבעה שינויים אחרים, שגם הם ככל הנראה פולימורפיזמים מדווחים בזאת לראשונה, שניים מהם ממוקמים באינטרון הראשון (c.1-314C>T, c.62+197A>G) ושניים באזור 3'UTR (c.1461+14G>A, c.1461+905G>A). בשלושה מהמקרים הללו הורשו השינויים מהאבות ובמקרה נוסף מאם בעלת התפלגות XCI אקראית, מה ששולל את האפשרות שמדובר בשינויים פתוגניים.

טבלא ד.3. שינויים תורשתיים שהתגלו כממצא יחיד בחולות תסמונת רט

במקרים עם התפלגות XCI נטויה מצוין יחס הכרומוזום האקטיבי ומוצאו ההורי. מספור הנוקליאוטידים נעשה ביחס לאיזופורם MECP2_e2 למעט השינוי המסומן ב * שממוספר לפי MECP2_e1 (GeneBank #AY541280).

אבחנה קלינית	שינוי נוקלאוטיד	שינוי מקודד	אזור בגן	מקור השינוי	התפלגות XCI והכרומוזום הפעיל
מקרה משפחתי, זכר עם MR ופרכוסים	c.375C>A	p.I125I	MBD	אם	-
נקבה עם צורה מולדת	c.378-19delT	-	אינטרון 3	אם	אקראית
נקבה עם צורה מולדת	c.378-19delT	-	אינטרון 3	אם	-
נקבה עם תסמונת דמויית אנגלמן	c.602C>T	p.A201V	בין האזורים	אם	70% אימהי
נקבה עם תסמונת קלאסית	c.824T>C	p.V275A	TRD	אם	75% אימהי
נקבה עם פיגור שכלי ופרכוסים	c.753C>T	p.P251P	TRD	אם	85% אימהי
נקבה עם צורה מולדת	c.1451G>C	p.R484T	קצה C	אם	אקראית
נקבה עם פרכוסים מוקדמים	c.1451G>C	p.R484T	קצה C	אם	אקראית
נקבה עם תסמונת קלאסית	c.62+197A>G*+ c.1461+905G>A	-	אינטרון 1 ו 3'UTR	באינטרון 1 מהאב, ב 3'UTR מהאם	90% אבאי
נקבה אטיפית (פנוטיפ לא מוגדר)	c.1-314C>T	-	אינטרון 1	אב	אקראית
נקבה עם צורה מולדת	c.1461+14G>A	-	3'UTR	אב	אקראית

2. השפעת סוג המוטציות על הפנוטיפ בחולות תסמונת רט

פיתוח סולם להערכת הפנוטיפ בחולות רט

במסגרת מחקר זה, פותח סולם של תסמינים קליניים ששימש להערכה של 54 חולות רט מהעוקבה הישראלית. כבסיס לסולם החדש שימשו הקריטריונים הקליניים של Huppke ועמיתיו (2002), כמו כן הוספנו את הקריטריון של הפרעות נשימה ששכיחות בחולות רט והרחבנו את קריטריון הפרוסים לשלושה מימדים אפשריים. החשוב מכל שינינו את שיטת חישוב ציוני הקריטריונים והציון הכולל על מנת לנטרל את גורם הגיל. הסולם החדש הוערך בשיטת העקיבות הפנימית (internal consistency) על פי קשרי הגומלין בין הקריטריונים והקשר שלהם לציון הכולל, לצורך זה שימש מבחן Kendall's tau-b עבור סולמות רווח (פרק שיטות, סעיף 2). באנליזה של ציוני הקריטריונים הקליניים נתקבלו מתאמים חיוביים מובהקים עבור ציוני יכולת ההליכה, הדיבור והשימוש בידיים כקבוצה אחת; עבור העקמת והפרעות נשימה כקבוצה שניה ועבור השימוש בידיים ואפילפסיה כקבוצה שלישית (טבלא 4.ד). מתאם שלילי יחיד נמצא בין היקף ראש ואפילפסיה, מה שצפוי מהמהלך האופייני של התסמונת היות והחריגה בהיקף הראש מתגברת במהלך השנים ואילו האפילפסיה מתמתנת אחרי גילאי העשרה (Hagberg et al 2002). כל המדדים, כולל היקף ראש ואפילפסיה, הראו מתאם חיובי ומובהק עם הציון הכולל. בסך הכל ניתוח העקיבות הפנימית העיד שהסולם הוא הומוגני ומודד תכונה מגובשת שמהווה בסיס משותף למדדים השונים.

טבלא 4.ד. קשרי גומלין בין המדדים הקליניים שנכללו בסולם הפנוטיפי החדש

54 חולות רט מעל גיל 5 שנים נכללו במבחן מתאם בין המדדים הקליניים שנכללו בסולם הפנוטיפי. בטבלא מודגשים המתאמים המובהקים בין המדדים ובינם לבין הציון הכולל ($p < 0.005$, על פי מבחן Kendall's tau-b).

מדדים קליניים	היקף ראש	הליכה	דיבור	שימוש ידיים	עקמת	אפילפסיה	הפרעות נשימה
הליכה	$r=0.192$ $p=0.137$	-					
דיבור	$r=0.068$ $p=0.589$	$r=0.578$ $p=0.0001$	-				
שימוש ידיים	$r=-0.053$ $p=0.671$	$r=0.437$ $p=0.0001$	$r=0.373$ $p=0.002$	-			
עקמת	$r=0.065$ $p=0.633$	$r=-0.003$ $p=0.982$	$r=-0.147$ $p=0.280$	$r=0.155$ $p=0.243$	-		
אפילפסיה	$r=-0.290$ $p=0.028$	$r=0.001$ $p=0.992$	$r=0.141$ $p=0.270$	$r=0.268$ $p=0.032$	$r=-0.109$ $p=0.414$	-	
הפרעות נשימה	$r=-0.237$ $p=0.065$	$r=0.001$ $p=0.992$	$r=-0.004$ $p=0.972$	$r=0.027$ $p=0.825$	$r=0.405$ $p=0.002$	$r=0.055$ $p=0.658$	
ציון כולל (ממוצע)	$r=0.234$ $p=0.040$	$r=0.607$ $p=0.0001$	$r=0.525$ $p=0.0001$	$r=0.537$ $p=0.0001$	$r=0.303$ $p=0.012$	$r=0.209$ $p=0.007$	$r=0.275$ $p=0.001$

בבניית סולם ההערכה הקלינית החדש הושם דגש מיוחד על השפעה אפשרית של גורם הגיל על ציוני המדדים השונים. לכן, הוגבלו מתאמי גנוטיפ-פנוטיפ לחולות מעל גיל 5 וציוני עקמת ואפילפסיה הוערכו מגיל 9 שנים ומעלה (ר' פרק שיטות, סעיף הערכה קלינית). על מנת לבדוק את השפעת גורם הגיל בוצע מבחן מתאם בין גיל החולות לבין הציון הכולל על פי הסולם, שהראה כי אין קשר ביניהם ($\text{Spearman; } r=-0.17, p=0.901$). אנליזה זו סיפקה תמיכה נוספת לתקפות הסולם החדש. לעומת זאת, נמצא קשר בין מדדי היקף ראש ואפילפסיה לבין הגיל, כאשר שיעור החריגה בהיקפי ראש עלה עם הגיל ($\text{Spearman; } r=0.39, p=0.004$) וחומרת האפילפסיה ירדה עם הגיל ($\text{Spearman; } r=-0.341, p=0.018$).

אפיון גנוטיפי של מדגם החולות

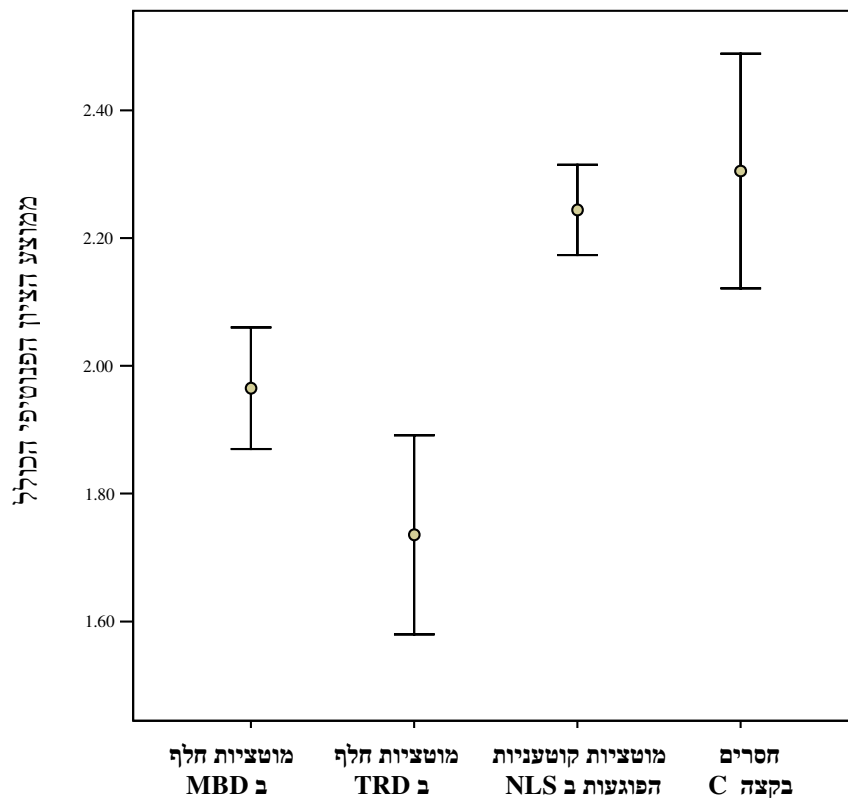
51 מהחולות שעברו אפיון פנוטיפי נכללו באנליזות הקשר גנוטיפ-פנוטיפ. האפיון הגנוטיפי של חולות אלו נעשה בהתחשב בשני גורמים, השפעת המוטציה על התוצר החלבוני דהיינו מוטציות חלף לעומת מוטציות קוטעניות ומיקומן באזורים התפקודיים של החלבון, TRD, MBD או NLS. כמו כן נבדק הקשר גנוטיפ-פנוטיפ בחמש קבוצות הכוללות מוטציות ספציפיות שכיחות (hotspots mutations). טבלא 5.7 מתארת את מדגם החולות בהתייחס לציון הפנוטיפי הממוצע בארבע קבוצות גנוטיפיות הכוללות, מוטציות חלף ב MBD מוטציות חלף ב TRD מוטציות ב NLS וחסרים בקצה C. בקבוצת המוטציות הקוטעניות הכוללות את NLS סווגו חולות עם מוטציות עצר לפני או בתוך NLS ומוטציות הסטה ממסגרת הקריאה (frameshifts) הפוגעות בהרכבו של NLS. לחמש החולות שנכללו בקבוצת המוטציות הפוגעות בקצה C היו מוטציות חסר קוטעניות במיקומים שונים. ארבע חולות לא נכללו בחלוקה זו היות ולא התאימו לאף אחת מהקבוצות הגנוטיפיות שהוגדרו, שתי חולות עם המוטציה c.62+1delGT ושתיים עם מוטציות ב TRD אחרי NLS, p.R294X ו p.I304_T400del98insP.

טבלא 5.7. חלוקת המדגם לארבע קבוצות גנוטיפ לפי סוג ומיקום המוטציות ביחס לאזורים ב MECP2

קבוצות גנוטיפיות (מס' חולות)	ציון פנוטיפי ממוצע $\pm$ טעויות תקן	סוגי מוטציות (מס' חולות)
מוטציות חלף ב MBD (17)	1.97 ± 0.10	(4) R133C, (9) T158M, (2) R106W, S134C, D151E
מוטציות חלף ב TRD (4)	1.74 ± 0.16	(4) R306C, P225R
מוטציות קוטעניות עם השמטה או שיבוש NLS (25)	2.22 ± 0.07	(2) R270X, (10) R255X, (6) R168X (7) חסרים שונים
חסרים בקצה C (5)	2.30 ± 0.18	(5) חסרים שונים

השפעת אופי ומיקום המוטציות על הביטוי הפנוטיפי

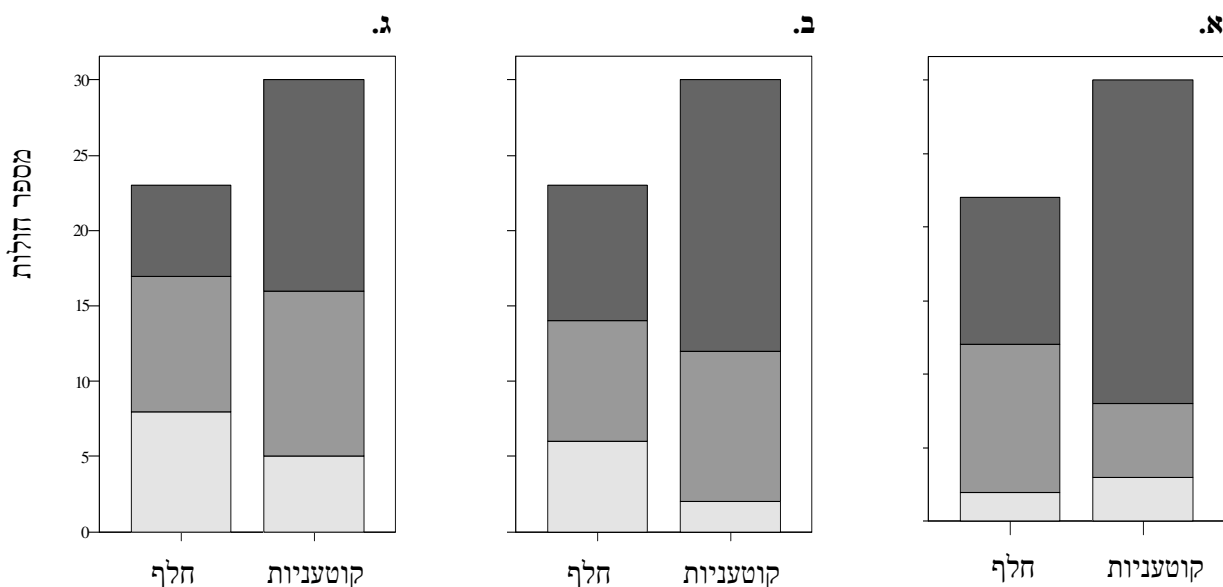
לשם בדיקת השפעת הגנוטיפ מבחינת אופי המוטציות ומיקומן על חומרת הפנוטיפ הקליני, בוצעה אנליזת שונות מרובה להשוואת ממוצעי הציונים בארבע הקבוצות הגנוטיפיות שתוארו לעיל (טבלא ד.5). במבחן זה נמצאו הבדלים מובהקים בין ציוני הקבוצות השונות ($ANOVA; p=0.016$), אולם תיקון בונפרוני לריבוי השוואות טשטש את ההבדלים הללו (למשל, בהשוואה בין מוטציות חלף ב MBD וב TRD התקבל $NOVA-Bonferroni; p=1.00$). הדבר נובע ככל הנראה, מקבוצות קטנות עם שונות פנימיות בלתי מבוטלות. למרות זאת, מתרשים 13.ד ניתן להתרשם כי קיימות לפחות שתי קבוצות עיקריות מבחינת השפעתן על הביטוי הפנוטיפי: האחת, מוטציות חלף והשניה מוטציות קוטעניות וחסרים.



תרשים ד.13: ציונים פנוטיפיים בקבוצות על פי סוג ומיקום המוטציות

הערכים בציר Y מייצגים את הציון הממוצע במבחן הפנוטיפ שנמצאים ביחס ישר לחומרת הפנוטיפ. נתונים ממוצעי הציון הפנוטיפי וטעויות תקן של כל קבוצה.

בחלוקה של החולות לפי סוג המוטציה במושגי מוטציות קוטעניות וחסרים לעומת מוטציות חלף יכולנו להוסיף את החולות עם מוטציות R294X, I303-T400del98insP שלא נכללו באנליזה הקודמת. אכן, בהתאם להתרשמותנו בחלוקה המורכבת הקודמת, בהשוואת שתי קבוצות אלו התקבל ציון פנוטיפי ממוצע חמור יותר בקבוצה עם המוטציות הקוטעניות והחסרים לעומת החולות עם מוטציות החלף ($T\text{-test } df=51; p<0.002$). מעבר לכך, העלינו הבדלים מובהקים בין שתי הקבוצות הללו לגבי המדדים הספציפיים: אחוזון היקף הראש ($Mann\text{-}Whitney\ U; p=0.044$), יכולת הדיבור ($Mann\text{-}Whitney\ U; p=0.041$) ויכולת שימוש ידיים ($Mann\text{-}Whitney\ U; p=0.048$). בשלושת מדדים אלו היתה ההערכה הקלינית של חולות עם מוטציות חלף טובה יותר לעומת חולות עם מוטציות קוטעניות וחסרים (היות והיקף הראש קשור בגיל, וידאנו כי שתי הקבוצות אינן נבדלות בגילאיהן ($T\text{-test}; p=0.884$). תרשים ד. 14 ממחיש את ההבדלים בהתפלגות ציוני מדדים אלו בשתי הקבוצות.

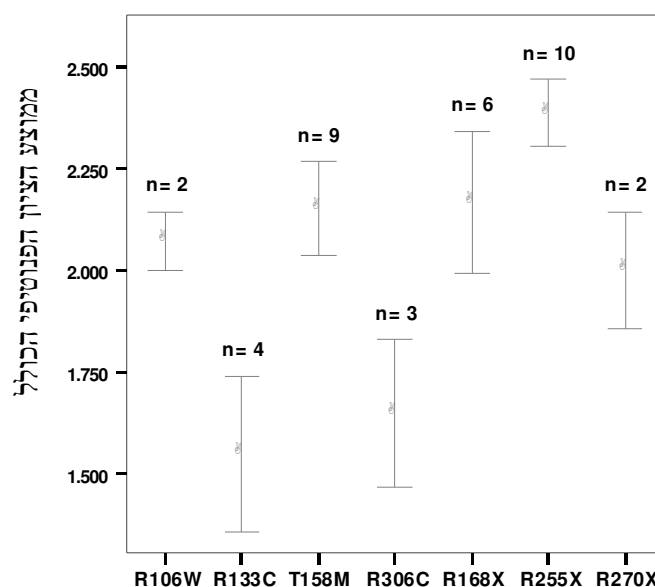


תרשים ד. 14. ציוני מדדים קליניים בחולות עם מוטציות חלף ומוטציות קוטעניות

- א.** התפלגות ציוני היקף ראש: בקבוצת מוטציות חלף וקוטעניות, הכהה מייצג היקף ראש מתחת לאחוזון 2 באוכלוסיה, ביניים באחוזון 2-25 והבהיר מעל אחוזון 25.
- ב.** התפלגות ציוני דיבור: הכהה מייצג מצב של אי השגת דיבור, הביניים היו לפחות 10 מילים שנעלמו, והבהיר מייצג יכולת דיבור של 10 מילים לפחות.
- ג.** התפלגות ציוני שימוש בידים: הצבע הכהה מייצג אי השגת שימוש, ביניים מייצג שימוש שהיה ואבד, והצבע הכהה מייצג יכולת שימוש חלקית שמורה.

השפעת מוטציות ספציפיות על הביטוי הפנוטיפי

בהמשך נבדקה השפעת מוטציות hotspot ספציפיות על הפנוטיפ, כפי שבא לידי ביטוי בציון הכללי ובמדדים נפרדים. באנליזה זו נכללו חולות מעל גיל 5 שנים עם מוטציות hotspot שהופיעו לפחות בשתי נבדקות. בהשוואת ממוצעי הציון הפנוטיפי הכולל של החולות עם המוטציות הללו, נמצאה שונות חיצונית מובהקת בין קבוצות החולות בעלות מוטציות שונות (ANOVA; $p=0.003$). מהשוואת הממוצעים של קבוצות אלו ניכר שהמוטציה p.T158M, למרות היותה מוטציית חלף, דומה מבחינת חומרת הביטוי הפנוטיפי למוטצית העצר p.R168X. לעומת זאת מוטציות החלף p.R133C ו p.R306C קשורות בביטוי פנוטיפי קל יותר. הביטוי הפנוטיפי של מוטצית העצר p.R255X היה הקשה ביותר, לעומת שאר המוטציות השכיחות. תרשים ד.15 ממחיש הבדלים אלו בין חמשת המוטציות הספציפיות הללו.

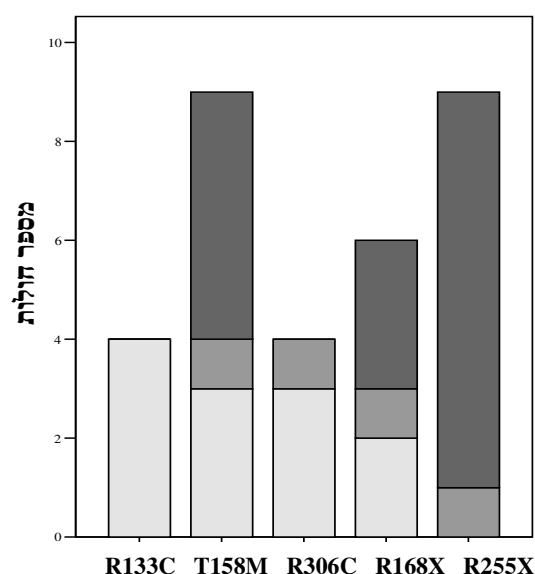


תרשים ד.15. ממוצע ציוני הפנוטיפ בחולות עם מוטציות ספציפיות

ממוצעי הציון הפנוטיפי $\pm$ טעות תקן מייצגים ביחס ישר את חומרת הפנוטיפ הכולל.

על מנת לבדוק האם מוטציות ספציפיות קשורות בפרופילים פנוטיפיים ייחודיים, בוצעה השוואה בין התפלגויות ציוני מדדי סולם הפנוטיפ בחולות עם המוטציות השונות ונמצא הבדל מובהק מבחינת התפלגות ציוני ההליכה (Kruskal-wallis; $p=0.005$), כאשר החולות עם R133C הראו כולן הליכה עצמאית ואילו בקבוצת R255X לא הייתה אף חולה עם יכולת הליכה. החולות עם מוטציית חלף T158M ומוטציית עצר R168X קיבלו ציוני ביניים. מבחינת ציוני ההליכה המוטציה R306C יכולה להחשב קלה למרות שאחת מארבע החולות איבדה את יכולת ההליכה במהלך התפתחות המחלה (אנו זיהינו שלוש חולות עם מוטציית R306C ונתוני חולה נוספת התקבלו מהמכון הגנטי איכילוב). תרשים 16.7 ממחיש את התפלגות ציוני ההליכה בחולות עם המוטציות השונות.

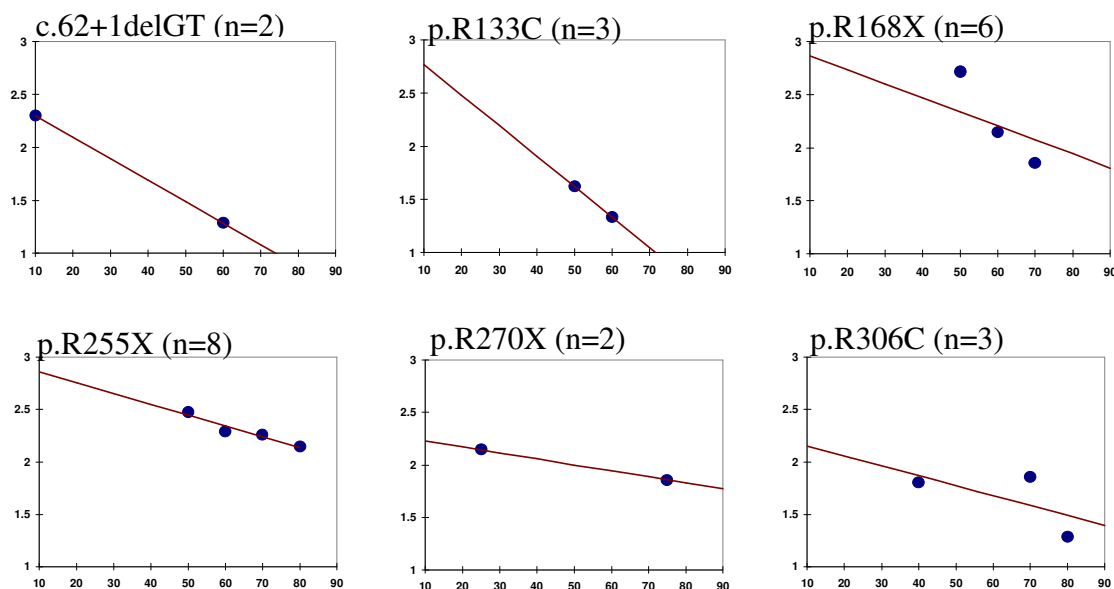
לסיכום, ממצאינו עולה קשר מובהק בין גנוטיפ לבין הפנוטיפ. למוטציות חלף היה באופן כללי פנוטיפ קל יותר מלמוטציות קוטעניות אחרות. בנוסף, למוטציות ספציפיות היה ביטוי פנוטיפי אופייני גם מבחינת הציון הפנוטיפי הכללי וגם במדדים קליניים מסוימים. הפתיע הממצא שמוטצית החלף T158M נקשרה בפנוטיפ חמור יותר בהשוואה למוטציות חלף אחרות. בנוסף להבדלים בין חולות עם מוטציות שונות נמצאה גם שונות אינדיוידואלית בלתי מבוטלת בין חולות עם אותה מוטציה. שונות פנימית זו מרמזת על גורמים אחרים המשפיעים על הביטוי הפנוטיפי. אחד הגורמים החשובים שהוצעו בהקשר זה הוא XCI



תרשים 16.7. התפלגות ציוני ההליכה בחולות עם מוטציות ספציפיות
 התפלגות ציוני ההליכה: הצבע הכהה מייצג אי השגת ההליכה, צבע ביניים מייצג הליכה בתמיכה או הליכה שאבדה והצבע הבהיר מייצג הליכה עצמאית

השפעת התפלגות האינאקטיבציה של כרומוזום X (XCI)

התפלגות XCI נבדקה ב 50 מהחולות שעברו אפיון פנוטיפי ו 47 מהן נמצאו אינפורמטיביות לתבחין HUMARA. כאשר בדקנו את המתאם בין ציון הפנוטיפ הכולל לבין האקטיבציה המועדפת של כרומוזום X האימהי (הנורמאלי במקרים של מוטציות ספוראדיות) לא נמצא קשר מובהק (Pearson; $r=-0.032$, $p=0.829$). כמו כן, לא נמצאו מתאמים מובהקים בין התפלגות XCI לבין חומרת הפנוטיפ בקבוצות הנבדקות עם מוטציות חלף לעומת מוטציות עצר או בחלוקה המפורטת בעמ' 63 המשלבת את סוג המוטציות ומיקומן. לפיכך, בדקנו את השפעת XCI על הציון הפנוטיפי בחולות עם אותה מוטציה. ההבדלים הגנוטיפיים בדקנו את הקשר בין התפלגות XCI לבין הציון הפנוטיפי הכולל בקבוצות חולות עם אותה מוטציה. גישה זו היא ניסיונית ולא ברת הסקה סטטיסטית בשלב זה, עקב מספרן הקטן של החולות עם דפוס XCI שונה בכל קבוצה. עם זאת, תוצאות ראשוניות מעידות על מגמה של קשר אפשרי בין אקטיבציה מועדפת של הכרומוזום האימהי לבין פנוטיפ קל יותר. תרשים 17.ד ממחיש את מגמת הירידה של הציון הפנוטיפי עם עליה ביחס של כרומוזום X האימהי האקטיבי בחולה. מכאן שהטיה בהתפלגות XCI יכולה להשפיע על הביטוי הפנוטיפי של המוטציות השונות ב *MECP2* וכתוצאה מכך, להשפיע גם על השונות הבין-אישית בחומרת הביטוי הקליני של חולות עם אותה מוטציה.



תרשים 17.ד. מתאם בין ציון הפנוטיפ לבין התפלגות XCI בחולות עם אותה מוטציה

ערכי ציר X מבטאים את יחס האקטיבציה של כרומוזום X האימהי בטווח של 10-90. ציר Y מבטא את ממוצע ציון הפנוטיפ הכולל בטווח שבין 1-3. לגבי המוטציה p.R255X התקבל מתאם מובהק $R^2 = 0.92$.

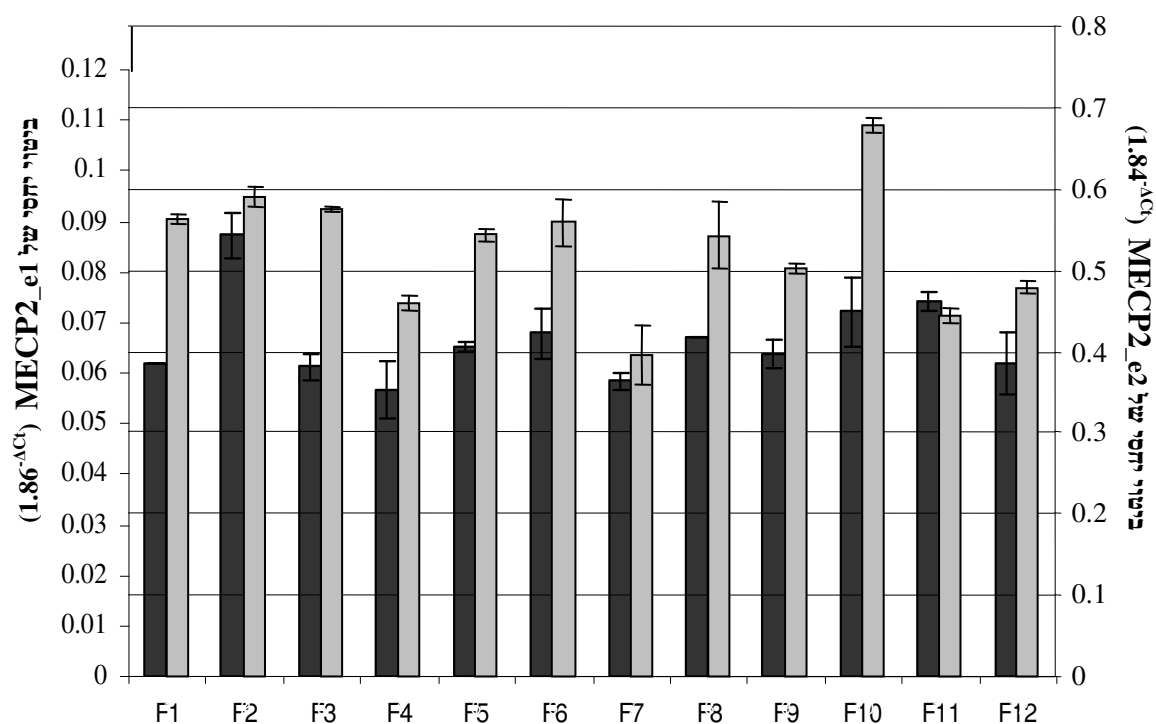
3. רמות ביטוי MECP2 בדם פריפרי של חולות רט

מדידת רמות הביטוי של MECP2 בדם פריפרי נועדה לענות על השאלה האם בחולות רט מובהקות ללא מוטציות מקודדות יכולות להיות מוטציות באזורי בקרה של הגן MECP2 שיכולות להתבטא ברמות RNA חריגות. רמות הביטוי של שני האיזופורמים נבדקו במדגם בן 12 מתנדבות נורמאליות לשם קביעת טווח הביטוי הנורמאלי. מדידת רמות הביטוי בחולות עם מוטציות מקודדות ומוטציות רגולטוריות נועדה לבדוק האם ביכולתו של מבחן זה להבחין בין רמות ביטוי RNA בסוגי מוטציות שונות, בייחוד לגבי המוטציות הרגולטוריות.

טווח רמות הביטוי הנורמאליות של MECP2-e1 ו MECP2-e2 בדם

במטרה לבדוק את רמות הביטוי היחסיות הנורמאליות של שני האיזופורמים של MECP2, נבדקו דגימות של 12 מתנדבות נורמאליות ששימשו בהמשך קבוצת ביקורת לחולות רט. רמות הביטוי של MECP2s חושבו ביחס לגן המדווח RNAaseP בשיטת כימות המבוססת על ΔCt (ר' פרק שיטות חלק שלישי). בתרשים 18.ד מוצגות רמות הביטוי של שני האיזופורמים שנבדקו בקבוצת הביקורת. היחס בין רמת MECP2_e2 לבין רמת MECP2_e1 בדם הפריפרי של הביקורות היה 7.8 בממוצע ($SD=1.08$). אותה תוצאה נראתה כבר בעקומות הסטנדרט של MECP2_e2 ושל MECP2_e1 בהם נמצא יחס פי 4.3 בין ערכי ΔCt ($\Delta Ct_{MECP2_e1}/\Delta Ct_{MECP2_e2}$) (תרשים 4.ג בפרק השיטות). בהתחשב ביעילויות הריאקציה של e1 ו e2 ניתן לחשב היחס בין רמות שני האיזופורמים בדם הפריפרי כ $1.84^{-Ct}/1.86^{-4.3Ct}=7.8$. תוצאה דומה כבר דווחה במחקר שתיאר לראשונה את האיזופורם החדש MECP2_e1 (Mnatzakanian et al 2004).

בתרשים 18.ד ניתן לראות כי רמות הביטוי של MECP2_e1 ו MECP2_e2 שנבדקו בקבוצת הביקורת, נמצאות בטווח שבין 0.06-0.09 ו 0.35-0.68, בהתאמה. מכאן שהשונות הבינאישית המירבית ברמות הביטוי של MECP2_e1 ו MECP2_e2 היא 1.5 ו 1.9 בהתאמה. נתוני הטווח הנורמלי שולבו בחישובי רמות הביטוי היחסיות של שני האיזופורמים בחולות בשיטת $\Delta\Delta Ct$, כאשר ערכי הטווח הנורמאלי נורמלו למוצע של רמת הביטוי של כל אחד מהאיזופורמים בהתאמה. בתרשימים 19-20 מובאים רמות הביטוי היחסיות של e1, e2 בחולות עם מוטציות ספציפיות ובחולות ללא ממצאי מוטציות ביחס לגבולות הטווח הנורמלי שחושבו כנ"ל.



תרשים 18.7. רמות ביטוי יחסיות של האיזופורמים של *MECP2* בקבוצת ביקורת

רמות הביטוי היחסיות של *MECP2_e1* ושל *MECP2_e2* נמדדו ביחס ל *RNAaseP*. רמות הביטוי של כל אחד מהאיזופורמים חושבו על פי $RQ = E^{-\Delta C_t} (MECP2-RNAaseP)$ (RQ=relative quantity, E=efficiency). ציר Y השמאלי מציג את הערכים היחסיים של *MECP2_e1* שמסומן באפור וציר Y הימני מציג את הערכים של *MECP2_e2* שמסומנים בשחור.

רמות הביטוי של MECP2 בדם פריפרי של חולות רט עם מוטציות ידועות

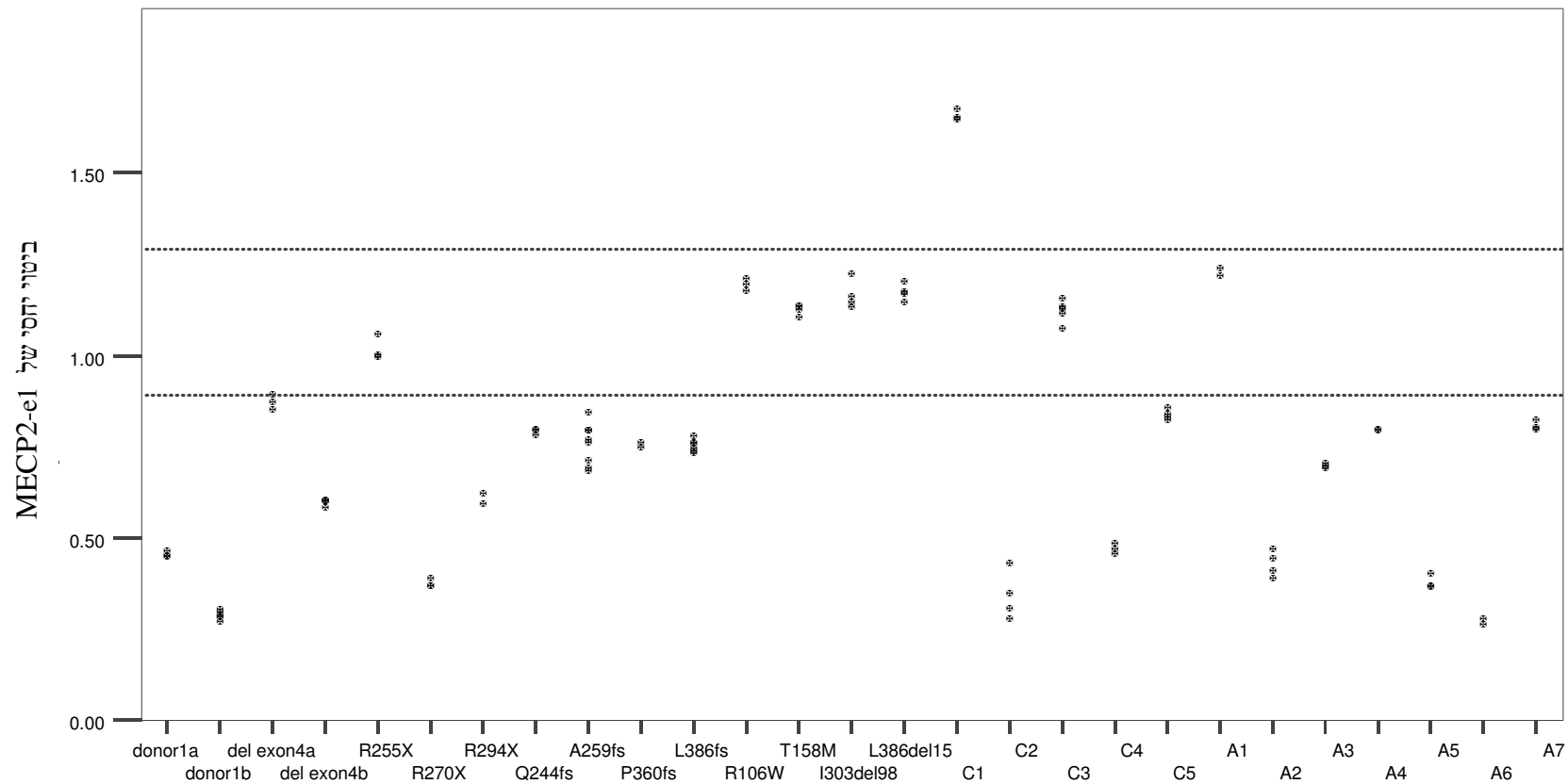
על מנת לבדוק אם יש קשר בין סוגי מוטציות לבין רמות ביטוי MECP2, נבדקו רמות הביטוי של שני האיזופורמים ב 15 חולות רט עם מוטציות ידועות בהשוואה לדגימת pool הכוללת 4-5 דגימות מקבוצת הביקורת. חישובי רמות הביטוי של שני האיזופורמים בשיטת $\Delta\Delta Ct$ מוצגים בתרשימים 19-20, ביחס לטווח הביטוי הנורמלי. באופן כללי, היתה התאמה בין רמות הביטוי של MECP2_e1 ושל MECP2_e2 בחולות עם מוטציות ידועות, ובקבוצת הביקורת (Pearson; $r=0.76$, $p<0.0001$).

רמות הביטוי של מוטציות ספציפיות נבדקו בהתאמה לארבע קבוצות מוטציות: I. מוטציות באתר שחבור, חסר של תורם באינטרון 1 (donor1a and donor1b); II. חסרים גדולים הכוללים חלקים מאקסון 4 ו 3'UTR שהתגלו בשיטת MLPA (del exon 4a<del exon4b). III. מוטציות קוטעניות מסוג עצר (R270X, R255X, R294X) וחסרים המסיטים את מסגרת הקריאה (Q244fs, A259fs, P360fs, L386fs). IV. מוטציות חלף ב MBD (R106W, T158M) וחסרים שאינם פוגעים במסגרת הקריאה (I303del98, L386del15). נמצא שלחולות עם מוטציות שונות היו רמות ביטוי שונות של שני האיזופורמים בדם הפריפרי, (ANOVA; $p<0.0001$), למעט המוטציות מקבוצה I ו II שהיו להם רמות דומות יחסית, אולי מפאת גודל הקבוצות והשונות הפנימית בתוכן (ANOVA-Bonferroni; $p=0.1353$) לגבי MECP2_e1 (ANOVA-Bonferroni; $p=1.000$) לגבי MECP2_e2.

בסך כל נתקבל שמוטציות שחבור ומוטציות חסר גדולות (קבוצות I ו II) היו קשורות ברמות נמוכות של MECP2_e1 (ANOVA-Bonferroni; $p<0.0001$) ושל MECP2_e2 (ANOVA-Bonferroni; $p=0.001$). גם במוטציות הקוטעניות (קבוצה III) נמצאה ירידה מובהקת ברמות ביטוי MECP2_e1 (ANOVA-Bonferroni; $p<0.0001$) ופחות מובהקת ב MECP2_e2 (ANOVA-Bonferroni; $p=0.003$). לעומת זאת, מוטציות חלף ב MBD ומוטציות חסר ללא פגיעה במסגרת הקריאה נמצאו עם רמות ביטוי דומות לקבוצת הביקורת בשני האיזופורמים, לגבי MECP2_e1 (ANOVA-Bonferroni; $p=1.000$) ולגבי MECP2_e2 (ANOVA-Bonferroi; $p=0.1605$).

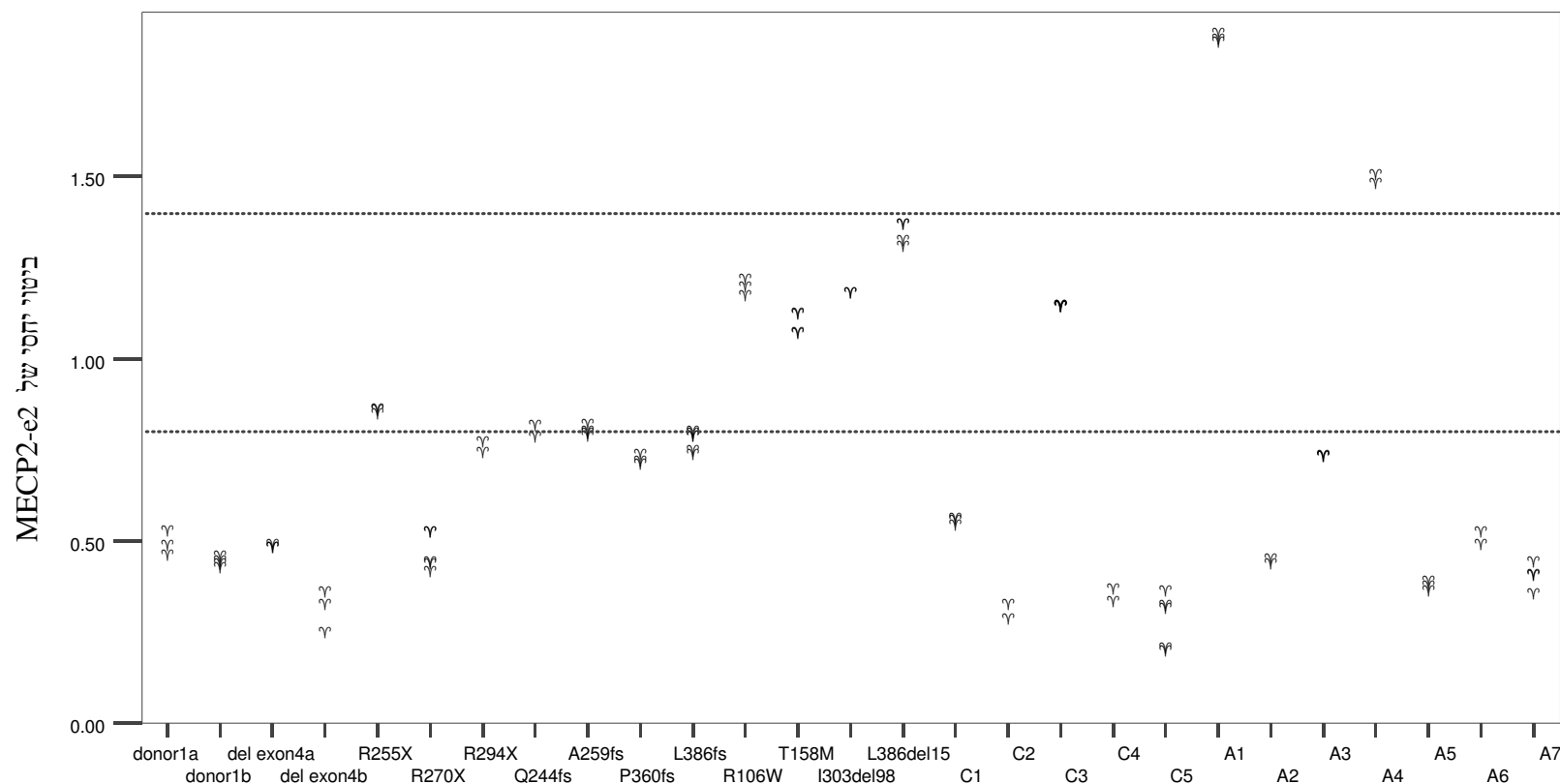
רמות הביטוי של MECP2 בחולות רט ללא ממצאי מוטציות

על מנת לבדוק האם בחולות ללא מוטציות מקודדות ("שליליות") יכולות להיות מוטציות אחרות או חסרים שלא נתגלו עדיין, נערכה אנליזה השואתית של רמות ביטוי של שני האיזופורמים של MECP2 בחמש חולות קלאסיות שליליות (C1-C5) ובשבע חולות אטיפיות שליליות (A1-A7), ביחס לרמות הביטוי של חולות עם מוטציות ידועות וביקורות נורמאליות. בחולות A1 ו A2 אובחנו עם צורה מולדת, A3 ו A4 אובחנו עם פרכוסים מוקדמים ו A5-A7 הם וריאנטים לא מוגדרים. בחולה A1 זוהה פולימורפיזם אינטרוני c.378-19delT. תרשימים ד.19-20 מציגים את ממצאי החולות השליליות במקביל לממצאים בחולות רט עם מוטציות ספציפיות. הנתונים של החולות השליליות נותחו באמצעות אנליזה רגרסייה (Multinomial/polytomous regression) על מנת להסיק על דמיון אפשרי לאחת מקבוצות המוטציות או הביקורת. התמונה הכללית שהתקבלה הראתה שרמות הביטוי של שני האיזופורמים בחולות C2, C4, C5, A2, A5, A7 היו דומות לחולות עם המוטציות מקבוצה II ($p_{(C2)}=0.999$, $p_{(C4)}=0.999$, $p_{(C5)}=1.000$, $p_{(A2)}=0.919$, $p_{(A5)}=0.993$, $p_{(A7)}=1.000$). נכללו כאמור מוטציות שחבור וחסרים בקצה 3' הכוללים גם את 3'UTR, כאשר האחרונים יכולים להכיל אתרים רגולטוריים האחראים על יציבות תוצר השעתוק ואתרים אחרים המווסתים את יעילות התרגום. מכאן ניתן להסיק שחולות אלו יכולות לשאת מוטציות באתרים רגולטוריים האחראים על בקרת השיעתוק והתרגום של MECP2, שאינן ידועות עדיין. לעומת זאת, בחולות A3 ו A6 נמצאו רמות ביטוי שני האיזופורמים דומות לאלו שבקבוצה III הכוללת מוטציות עצר וחסרים קוטעניים ($p_{(A3)}=0.979$, $p_{(A6)}=0.919$). מכאן, שהממצאים המסתמכים על רמת הביטוי של MECP2 בדם של חולות אלו, יכולים להעיד על קיומן של מוטציות חסר שלא התגלו עדיין באמצעות קריאות רצף ו MLPA. בחולה הקלאסית C3 נמצאו רמות ביטוי האיזופורמים של שני האיזופורמים בטוח הנורמאלי ($p=1.000$), מה שתואם גם את המוטציות בקבוצה IV הכוללת מוטציות חלף וחסרים ללא פגיעה במסגרת הקריאה. יתכן שקיימות בחולה זו מוטציות מסוג זה שחמקו מהאנליזות הרבות שנעשו בחולה זו. מאידך, זה מעלה את השאלה האם החולה היא עדות למעורבות של גן אחר בפנוטיפ הקלאסי של תסמונת רט. בחולות A1, C1, ו A4 נמצא שרמת הביטוי של אחד האיזופורמים היא מעל הטווח הנורמאלי: בחולה הקלאסית C1 היתה חריגה ברמת MECP2_e1 ובחולות האטיפיות A1, A4 נמצאו חריגות ברמת MECP2_e2. תבנית ביטוי זו לא תאמה אף אחת מקבוצות המוטציות שנחקרו קודם, על כן, אין באפשרותנו להסיק מסקנות ישירות מממצאים אלו.



תרשים 19.7. רמות ביטוי של MECP2 e1 בחולות עם מוטציות ידועות ובחולות ללא ממצאי מוטציות

רמת הביטוי של MECP2 מחושבת יחסית ל RNaseP ויחסית לרמת הביטוי בדגימת pool של ביקורות נורמאליות, גבולות הטווח הנורמאלי מסומנים בקו שבור. C1-C5 הן חולות קלאסיות ו A1-A7 הן חולות אטיפיות.



תרשים ד.20. רמות ביטוי של *MECP2* e2 בחולות עם מוטציות ידועות ובחולות ללא ממצאי מוטציות

רמת הביטוי של *MECP2* מחושבת יחסית ל *RNAseP* ויחסית לרמת הביטוי בדגימת pool של ביקורות נורמאליות, גבולות הטווח הנורמאלי מסומנים בקו שבור. C1-C5 הן חולות קלאסיות ו A1-A7 הן חולות אטיפיות.

במקביל לעבודה על רמות MECP2 בדם הפריפרי נבדקה אפשרות מדידת ביטוי MECP2 בתרבית לימפוציטים מחולות. במסגרת זו נבדקה רמת ביטוי MECP2_e2 בתרביות לימפוציטים של חולה עם מוטציית קוטענית c.141insA ושל אחת החולות עם מוטציית השחבור c.62+delGT. ובשני מקרים אלו נמצאו רמות הביטוי של MECP2 (ביחס ל RNAaseP) גבוהות בהשוואה לתרבית לימפוציטים מאשה נורמאלית. יתרה מכך, בתרבית לימפוציטים עם המוטצייה הקוטענית c.141insA שעברה שיבוט שמבחין בין כרומוזום X אקטיבי מוטנטי לבין ה X הנורמאלי, נתגלו רמות MECP2_e2 גבוהות דווקא בתרבית המבטאת את ה X המוטנטי. החולה עם המוטצייה c.62+delGT נכללה גם בבדיקת רמות הביטוי של MECP2 mRNA בדם פריפרי (donor1b) בתרשימים ד.20-19) ובה נמצאה כבעלת רמות ביטוי נמוכות מהטווח הנורמאלי בשני האיזופורמים. הבדלים אלו יכולים לנבוע מתהליך השיבוט אשר נוטה לערער את הוויסות המקורי של ביטוי הגנים. לאור הפערים הללו, נראה שכימות MECP2 mRNA בלימפוציטים טריים מספק כלי זמין ואוטנטי יותר לאבחון והבחנה בין מוטציות שונות ב MECP2 לעומת מבחן זה בלימפובלסטים.

השפעת התפלגות XCI על ביטוי MECP2 בדם

גורם נוסף העשוי להשפיע על ביטוי MECP2 הוא התפלגות XCI. התפלגות נטויה של XCI בדם הפריפרי נמצאה בחמש חולות עם מוטציות ידועות ובתוכן חולה עם מוטציית שחבור (donor1b), חולה עם חסר גדול (del exon4a), שתי חולות עם מוטציות עצר (p.R255X, p.R270X) וחולה עם מוטציית חלף (p.R106W). התפלגות XCI של חולות אלו מובאת בטבלה ד.2. אנליזה של רמות הביטוי של MECP2 בחולות אלו (תרשימים ד.20-19) מעידה כי בחולות עם XCI נטוי לטובת אקטיבציית הכרומוזום האבהי המוטנטי היה ביטוי נמוך יותר של שני האיזופורמים, בהשוואה לחולות עם אותן מוטציות או מוטציות דומות ו XCI אקראי. בהקשר זה ניתן להשוות בין הרמות של donor1b, del exon4a, p.R270X, עם XCI אבהי של 75%, 80%, 90% בהתאמה, לבין הרמות של donor1a, del exon4b, p.R294X עם XCI אקראי. לעומת זאת, בחולה עם p.R255X ועם XCI של 80% לטובת אקטיבציית ה X האימהי, נמצאו רמות הביטוי של MECP2 נורמאליות, בהשוואה לחולה עם p.R294X ו XCI אקראי. מכך ניתן להקיש כי התפלגות נטויה של XCI יכולה להסביר את השונות הפנימית של רמות ביטוי MECP2 בין חולות עם אותה מוטציה או מוטציות דומות.

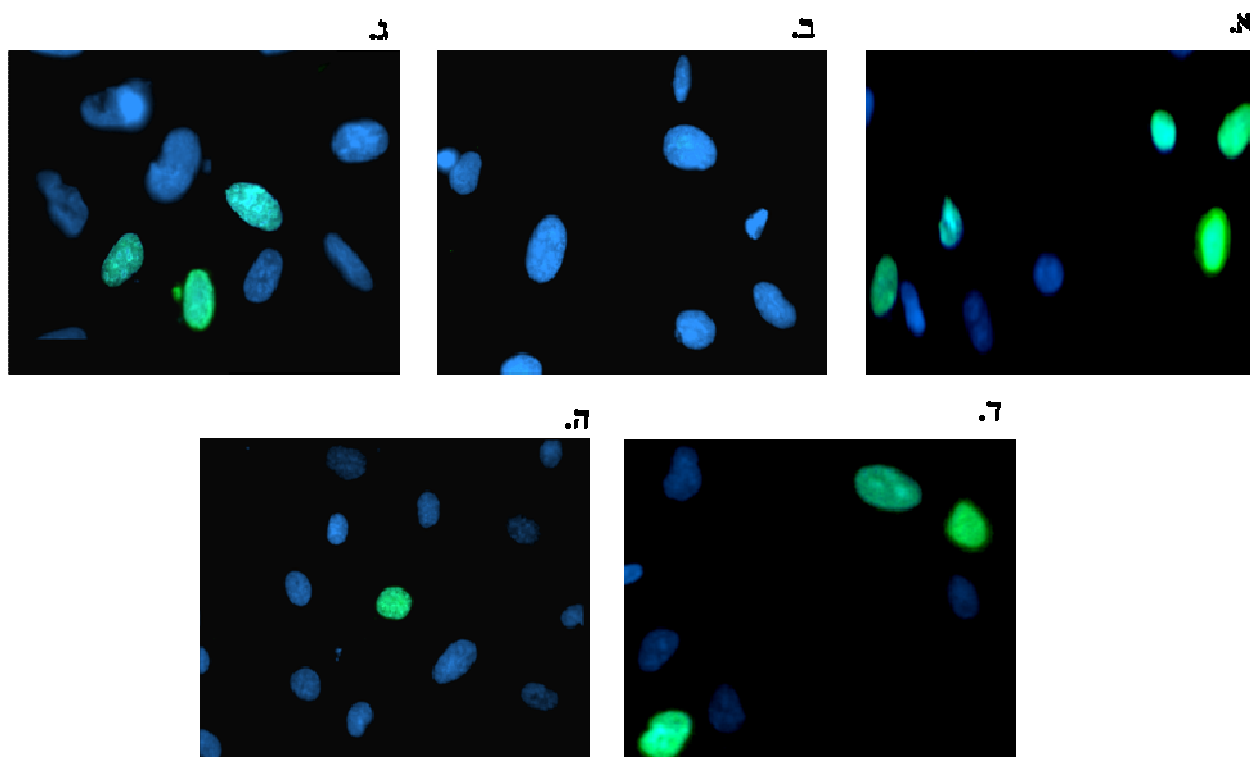
מתוך 12 החולות השליליות שנבדקו לרמות MECP2 בדם, נמצאה התפלגות XCI נטויה בשתי חולות קלאסיות, ב C2 נמצא XCI של 85% לטובת ה X האבהי וב C4 היה XCI של 80% לטובת ה X האימהי ואילו C1 לא נמצאה אינפורמטיבית.

4. הערכה תפקודית של מוטציית חלף חדשה ב TRD

הערכה תפקודית של המוטציה החדשה p.V275A הממוקמת ב TRD, נבדקה בחמש מערכות ביטוי בתאי אוסטאוסרקומה הומניים U2OS (ראה שיטות חלק רביעי). תאים המבטאים pcDNA3.1 רקומביננטי הכולל את המוטציה p.V275A באיזופורם MECP2_e1; מערכת תאים הכוללת pcDNA3.1 עם MECP2_e1 נורמאלי; מערכת מקבילה מבטאת את המוטציה הקוטענית p.R255X ב TRD; מערכת המבטאת מוטצית חלף p.R306C ב TRD; שתי האחרונות יוצרו במסגרת התזה לתואר שלישי של התלמידה מנואלה וקסלר. כביקורת שלילית שימשה תרבית תאים עם פלסמידים ריקים, ללא MECP2. במערכות אלו נבדק מיקום התוצר החלבוני בתוך התאים באמצעות נוגדנים כנגד קצה C. כמו כן נערכה אנליזה כמותית של התוצר באמצעות western blot, כאשר החלבונים actin שברובו ציטופלסמטי ו emerin שהוא בעיקר גרעיני, שימשו כביקורת. מכיוון ש MeCP2 אחראי לדאצטילציה של היסטונים באמצעות אתר TRD הקושר HDACs (histone deacetylases) ומתווכים נוספים, נבדקו במערכות הללו גם רמות הביטוי של היסטונים, בפרט H3 ו H4. היסטונים אלו במצב acetylated נבדקו באמצעות western blots ונוגדנים ספציפיים לשיירים ליזיניים עם אצטיל anti Ach-H4 ו anti Ach- H3 (ראה פרק שיטות, חלק רביעי).

אנליזה מיקרוסקופית של התוצר MeCP2

המיקום התוך תאי של התוצר החלבוני MeCP2_e1 נבדק באנליזה מיקרוסקופית באמצעות סימון בנוגדן כנגד קצה C, המזהה רק חלבונים שלמים ללא קטיעה מוקדמת. תרשים ד. 21 מראה שבכל מערכות התאים זוהה התוצר MECP2 בתוך גרעין התא כפי שמצופה מחלבונים שאינם פגומים באתר NLS. המערכות שביטאו MECP2 תקין (תמונה א.) או מוטציות חלף p.R306C (ג.) או p.V275A חדשה (ד.), הראו סימון MECP2 ב 60-70% מהגרעינים. המערכת שביטאה את הווקטור pcDNA3.1 (ב.) לא הראתה סימון מה שמראה שבתנאים האלו ה MECP2 האנדוגני נמצא בכמות נמוכה ביותר. במערכת שביטאה את המוטציה הקוטענית p.R255X נתגלה סימון באחד מתוך 20 תאים (ה.) בלבד. הספציפיות של הנוגדן והעדר תגובה שלו עם תוצר מוטציה זו נבדקו בהמשך באנליזת western של מיצויי חלבוני הגרעין ממערכות הביטוי השונות.



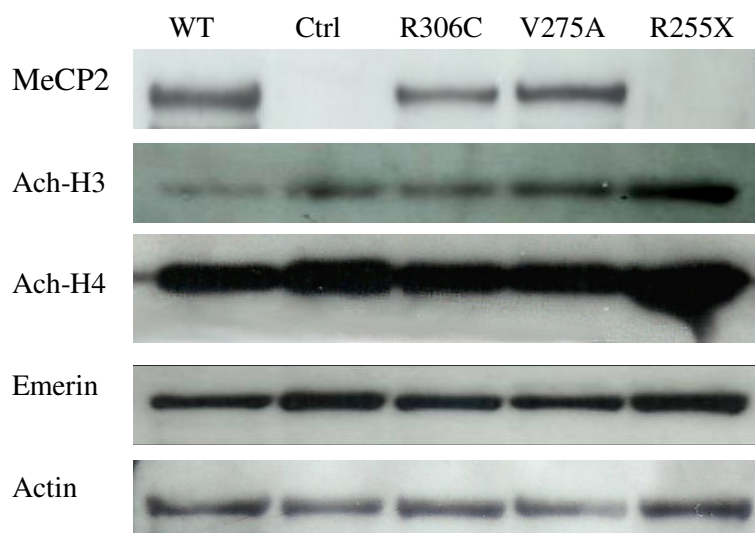
תרשים ד. 21. אנליזה מיקרוסקופית של תוצרי MeCP2 רקומביננטיים בתאי U2OS

גרעיני התאים צבועים ב DAPI (כחול) ותוצרי MeCP2 מסומנים באמצעות נוגדן שניוני Cy-2 anti Rabbit (ירוק). התמונות צולמו במיקרוסקופ פלורוצנטי בהגדלה 40X. מוצגות מערכות תאים המבטאות: **א.** WT-MeCP2_e1. **ב.** pcDNA3.1. **ג.** MeCP2 הכולל p.R306C. **ד.** p.V275A. **ה.** p.R255X.

אנליזה כמותית של MeCP2 והיסטונים אצטיליים

על מנת להעריך כמותית את רמת תוצרי MeCP2 ורמות האצטילציה בהיסטונים H3 ו H4, נערכה אנליזה western של מיצויי חלבונים גרעיניים שהופקו ממערכות התאים שביטאו MeCP2 רקומביננטי תקין או מוטנטי. תוצרי *MECP2* זהו באמצעות נוגדן ספציפי כנגד קצה C, ההיסטונים באמצעות נוגדנים ספציפיים לשירים אצטיליים anti Ach-H3, anti Ach-H4, וחלבוני הביקורת, actin ו emerin, באמצעות נוגדנים ספציפיים שלהם. בתרשים 22.ד נראה כי מערכות עם MeCP2 תקין או עם מוטציות חלף ב TRD, R306C ו V275A החדשה, ביטאו MeCP2 ברמה דומה. לעומת זאת, במערכת עם הווקטור ובמערכת המבטאת מוטציה קוטענית p.R255X. לא נמצא סימון של MeCP2. ממצא זה כי מעיד שהנוגדן כנגד קצה C אינו מזהה את התוצר של המוטציה הקוטענית. העדר תוצרי MeCP2 במערכת ביקורת שלילית (שביטאה ווקטור ללא *MECP2*) מצביע על כך שגם אנליזה western הרגישה יותר איננה מזהה MeCP2 אנדוגני, מה שתואם את הממצאים המיקרוסקופיים. יתכן שחשיפות ארוכות יותר של המברנות היו מאפשרות לראות את התוצר האנדוגני. ממצאי western חזרו על עצמם בשני ניסויים בלתי תלויים.

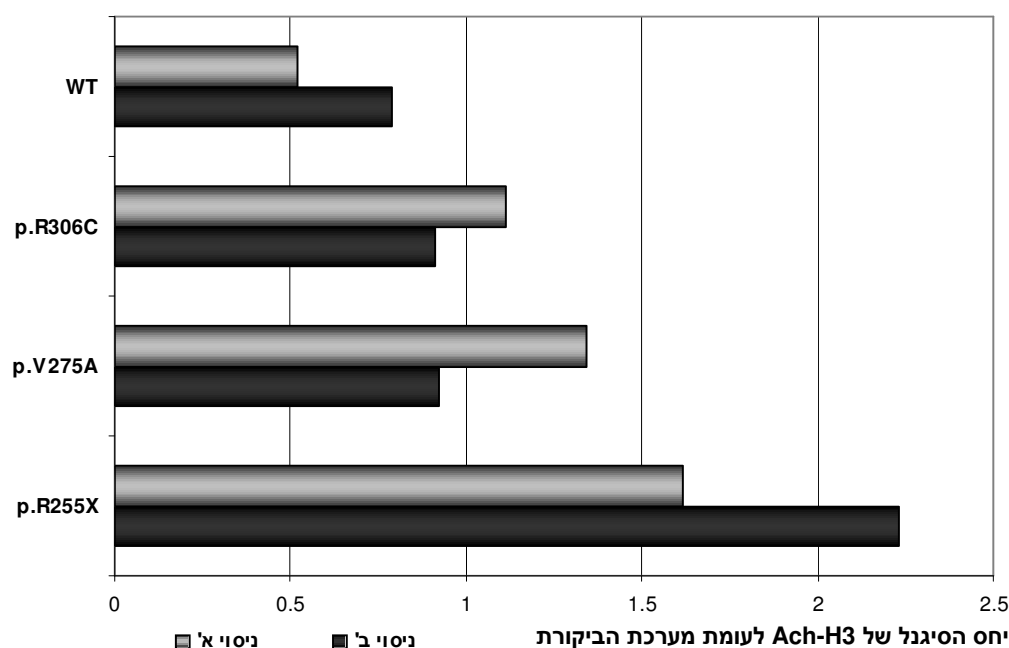
בתרשים 22.ד מובאת גם אנליזה western של ההיסטונים האצטיליים (Ach-H3, Ach-H4) בהשוואה ל actin ו emerin באותן מערכת תאים. בהתרשמות חזותית בולטת אצטילציה מוגברת של שני ההיסטונים במערכת שמבטאת את המוטציה הקוטענית p.R255X ואצטילציה מופחתת של H3 במערכת המבטאת את החלבון התקין. בין מערכות הביטוי של מוטציות החלף והביקורת לא נראים הבדלים כמותיים ברמות האצטילציה של היסטונים H3 ו H4 יחסית ל actin ו emerin. לבדיקת תקפות חזרתית של ממצאים אלו נערכה אנליזה כמותית של עוצמות הסיגנלים ב western blots שיוצרו בשני ניסויים בלתי תלויים באמצעות תוכנת ImageJ 1.36b (ראה בהמשך). מפתיע הממצא של אצטילציה בהיסטונים H3, H4 במערכת ביקורת שלילית (Ctrl) שמבטאת ווקטור, ברמות דומות למערכת המבטאת MeCP2. הממצא הזה מהווה עדות לפעילות MeCP2 אנדוגני בתאים אלו, למרות שלא הצלחנו לזהות אותו ישירות באמצעות נוגדני *MECP2* ספציפיים. בעיקרון, ממצא של אצטילציה מוגברת בהיסטונים H3 ו H4 יכול להעיד על העדר דאצטילציה באמצעות HDAC ובאופן עקיף ללמד על ירידה בפעילות *MECP2*. מכאן, שאצטילציה מוגברת בהיסטונים כפי שנראה במקרה של p.R255X. יכולה להעיד על פעילות לקוייה של TRD כצפוי על פי אופייה הקוטעני של מוטציה זו. מאידך, תת אצטילציה שנראית במערכת ביטוי החלבון התקין, עשויה ללמד על פעילות יתר של MeCP2 אולם ממצא זה לא חזר באנליזה שניה.



תרשים 22.ד. רמות MeCP2 והיסטונים אצטיליים במערכות ביטוי שונות

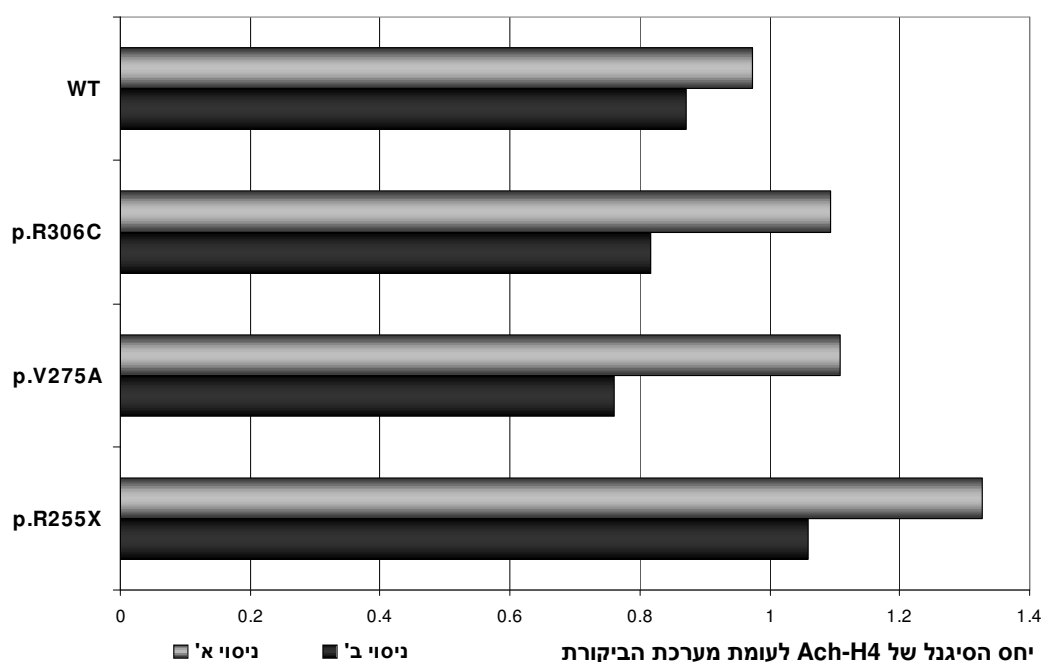
אנליזת western של רמות MeCP2 והיסטונים אצטיליים כנגד actin ו emerin במערכות המבטאות: MeCP2 תקין (WT), ביקורת שלילית עם ווקטור (Ctrl), מערכות עם מוטציות חלף (p.R306C, p.A275A) ומערכת ביטוי המוטציה הקוטענית p.R255X. תנאי הסימון וזמן החשיפה של Ach-H3 היו שונים מאלו של Ach-H4.

ההשוואה הכמותית של ההיסטונים האצטיליים כנגד *emerin* נערכה בשתי אנליזות western מניסויי טרנספקציה בלתי תלויים. לצורך זה, השתמשנו בתוכנת ImageJ 1.36b (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) המאפשרת אומדן של עוצמת הסיגנלים אחרי סריקת הפילמים. בהערכה מקדימה התברר ש *emerin* מהווה חלבון ביקורת אמין מכיון שכמותו היתה אחידה יותר בשני הניסויים ומעצם היותו חלבון גרעיני ספציפי בדומה להיסטונים. לכן חושבה הכמות היחסית של ההיסטונים האצטיליים כמנה (quotient) של עוצמת הסיגנלים ההיסטונים האצטיליים ועוצמת הסיגנלים של *emerin* בכל מערכת ביטוי. בנוסף, על מנת לבטל את האפקט של MeCP2 אנדוגני, חולקו הערכים של H3 ו H4 האצטיליים שנתקבלו ממערכות תאים שונות, בערכים של מערכת הביקורת השלילית (ללא MeCP2 אקסוגני) על מנת להדגיש את השפעת החלבונים הרקומביננטים השונים ביחס לרמת הפעילות הבסיסית של MeCP2 אנדוגני. מתרשים ד.23 המסכם את ממצאי הניסויים לגבי Ach-H3 ניתן להתרשם כי במערכת שביטאה את המוטציה הקוטענית p.R255X היתה אצטילציה מוגברת של היסטון H3, בערך פי 3 בהשוואה למערכת עם MeCP2 תקין (WT) בשני הניסויים. בניסוי א' נמצא כי במערכות שביטאו מוטציות חלף p.R306C הידועה ו p.V275A החדשה, היו רמות אצטילציה של היסטון H3 גבוהות לעומת מערכת ה WT ודומות למערכת הביקורת. בניסוי ב' חזר הדמיון בין שתי מוטציות החלף למערכת הביקורת אולם לא היה הבדל משמעותי לעומת מערכת ה WT. הסבר אפשרי לפער זה הוא שבניסוי ב' היתה שונות רבה יותר בכמויות החלבון שהורצו באנליזת western מכל דגימה, כפי שניכר בעוצמת הסיגנלים של חלבון הביקורת Emerin (ראה נספח ג). ניסוי א' הניב אחידות רבה יותר בסיגנל הביקורת ולפיכך הוא נראה אמין יותר.



תרשים ד.23. רמות אצטילציה יחסיות של H3 בשני ניסויים

תרשים ד. 24 מראה את הממצאים המקבילים לגבי רמות האצטילציה היחסיות של היסטון H4 במערכות הביטוי השונות. במפתיע, נרמול התוצאות ל *emerin* ול *MeCP2* האנדוגני (ביקורת שלילית) הביא לטשטוש ההבדלים שנראו בפילם המקורי (תרשים ד. 22) בין מערכות הביטוי השונות. בניסוי א' נמצאה עליה של כ 40% באצטילציה של H4 במערכת עם *p.R255X* לעומת מערכת *WT* אך בניסוי ב' הצטמצם פער זה לכ 20%, כנראה שגם כאן נעוצה הסיבה לפערים אלו בכימות לא מדויק של דגימות החלבון שהופרדו בשיטת *PAGE*. הפער בין ההתרשמות החזותית לבין התוצאה הכמותית, בניסוי א' מדגיש חשיבות ההערכה הכמותית האובייקטיבית של הסיגנלים המתקבלים באנליזת *Western*. במערכות ביטוי מוטציות החלף *p.R306C* ו *p.V275A*, נמצאו רמות האצטילציה של היסטון H4 דומות לרמה הנורמאלית, מה שיכול להצביע שפעילות *TRD* לגבי היסטון H4 לא נפגעה באופן משמעותי. מוטציות חלף ב-*TRD*, הידועה והחדשה כאחת, לא העלו ולא הורידו באופן עקבי את רמות אצטילציה של שני ההיסטונים, לעומת מערכת ה *WT* והביקורת השלילית (ללא ביטוי *MeCP2* רקומביננטי). ניתן להסיק כי רמות האצטילציה של H3 במערכות ביטוי *MeCP2* רקומביננטי של תאי *U2OS*, מהוות סמן רגיש יותר מאלו של H4 להבחנה בין *TRD* שלם או קטוע. לעומת זאת, בדיקת רמות האצטילציה של היסטונים במערכות ביטוי אלו לא הוכחה כמתאימה לאבחן את ההשפעות הפונקציונליות של מוטציות חלף.



תרשים ד.24. רמות אצטילציה יחסיות של H4 בשני ניסויים

ה. סיכום ודיון

מטרתנו בעבודת המחקר היתה הבנת הבסיס הגנטי של תסמונת רט כמודל לפיגור שכלי האחוז בכרומוזום X (XLMR-X Linked Mental Retardation). על פי העדויות שהגן *MECP2* ממלא תפקיד מפתח בהבשלה ותפקוד תאי העצב במוח, שיערנו כי מוטציות בגן זה יכולות להסביר את מרבית המקרים של תסמונת רט והפרעות נוירו-התפתחותיות אחרות וכי שונות בסוג ומיקום המוטציות ב *MECP2* בשילוב השפעה אפיגנטית של אינאקטיבציה של כרומוזום ה X, יכולה להסביר טווח פנוטיפי רחב.

1. אפיון גנטי של עוקבת החולים

ממצאי מוטציות מקודדות

במסגרת המחקר הוקמה עוקבה בת 136 חולים הכוללת 54 חולות תסמונת רט קלאסיות, 28 חולים עם תסמונת רט אטיפית (הכוללת זכר עם תסמונת רט קלאסית וקרייטיפ 47,XXY) ו 54 חולות וחולים עם חפיפה פנוטיפית חלקית לתסמונת רט. במרכז הארצי של רט בבית החולים שיבא, שהפנה את רוב החולים בעוקבה זו, רשומות בסך הכל 82 חולות רט עם סימנים קלאסיים ואטיפיים מובהקים. מכאן ניתן להעריך את השכיחות הארצית של תסמונת רט לכ 0.55/10,000 בנות בגילאי 2-26. שכיחות זו דומה לזו 0.56/10,000 שהוערכה בצרפת (Philippe et al 2006), בטקסס ארה"ב דווחה השכיחות הנמוכה ביותר של 0.44/10,000 בנות בגיל שנתיים עד 18 שנים (Kozinetz et al 1993) ואילו באוסטרליה דווח על של 0.88/10,000 בנות עד גיל 18 (Laurvick et al 2006). הפערים בין שכיחויות אלו נובעים אולי מהבדלים בהגדרה הקלינית של תסמונת רט על צורותיה השונות ו/או מהבדלים במידת המודעות והפניית החולים של המערכת הרפואית. לדוגמא, הגיל המירבי בעוקבה הישראלית הוא 42 שנים לעומת דווחים על חולות רט בנות >60 שנים (Smeets et al 2003). העדר היסטוריה התפתחותית מפורטת או מוטיבציה נמוכה של האפוטרופסים להביא את החולות לאבחון יכולים להוות קושי ביישום הקריטריונים הקליניים המקובלים לאבחון תסמונת רט, בפרט בחולות מבוגרות.

בעוקבה הישראלית נמצא כי רמת גילוי מוטציות ב *MECP2* בחולות הקלאסיות עומדת על 83%, בהתאם לטווח של 73-90% על פי דיווחים עדכניים (Neul and Zoghbi 2004, Charman et al 2005, Laurvick et al 2006). מבין החולות האטיפיות נרשמה אצלנו רמת הגילוי הגבוהה ביותר באלו עם דיבור שמור (4 מתוך 4 מקרים) בדומה לממצאי קבוצות אחרות (Shahbazian and Zoghbi 2002, Smeets et al 2003). כמו כן,

נמצאו מוטציות בשתיים מתוך שבע חולות עם צורה קלה ובשתיים מתוך ארבע חולות עם צורה מולדת. בדומה לדיווחים אחרים לא נמצאה מוטציה בחולות עם פרכוסים מוקדמים.

בסך הכל, התגלו בעוקבה הישראלית 26 מוטציות ספוראדיות בגן *MECP2* ו 11 שינויים תורשתיים. ב 65% מהמקרים עם מוטציות נמצאה אחת משמונה מוטציות hotspots שנובעת מדאמינציה של ציטוזין, בהתאם לטווח 65-76% שדווח במחקרים אחרים (Lee et al 2001, Schanen et al 2004). המוטציה השכיחה ביותר שנמצאה בעוקבה הישראלית, היא p.T158M (9 חולות) ואחריה המוטציה p.R255X (8 חולות), מוטציות אלו הן המובילות בשכיחותן גם בעוקבות רחבות היקף מארצות אחרות (Fukuda et al 2005, Phillippe et al 2005). חסרים קטנים (41-294bp) בקצה 3' של הגן נמצאו בחמש חולות ישראליות (8% מחולות עם מוטציות), ארבע ממוטציות החסר (למעט c.1157_1198Δ42) הן חדשות ואינן מדווחות ב RettBase. שכיחות החסרים בקצה 3' של *MECP2* נעה לפי דיווחים הספרות בין 4% מכלל המוטציות בעוקבה הבריטית (Charman et al 2005) לבין 12% בעוקבות הצרפתית והגרמנית (Laccone et al 2004, Philippe et al 2005). ריכוז מוטציות חסר בקצה 3' של הגן נובע מאזור בן 110bp (c.1056-1165) שכולל אלמנטים חוזרניים הנוטים לרקומבינציות, כפי שדווח גם בגנים הקשורים במחלות אחרות (De Bona et al 2000). כמו כן, בקצה C נמצאו גם שלושה חסרים גדולים (מעל 1Kb) שאיתרנו בשלוש חולות רט, שתי קלאסיות ואחת אטיפית, באמצעות בדיקת MLPA. גם במחקרים רחבי היקף אחרים שהשתמשו בשיטות לזיהוי חסרים גדולים, נמצא כי הם כוללים נקודות שבירה בקצה C ומהווים כ 2-7% מכלל המוטציות, בשתי העוקבות הבריטיות (Charman et al 2005, Archer et al 2006) ובעוקבה הצרפתית (Phillippe et al 2005). הרמה הכללית והשכיחות היחודיות של מוטציות שונות בעוקבה הישראלית מתאימים למדווח במחקרים עדכניים דומים, כך שניתן להסיק שהאבחונים הקליניים והגנטיים עמדו בסטנדרטים המקובלים בעולם.

המוטציה c.141insA (p.E55fs57X) היא מוטציה ספוראדית חדשה הגורמת לקטיעת התרגום בקצה N, לפני ה MBD. מוטציות קוטעניות באזור זה נדירות ביותר בחולות רט. הסיבה לכך יכולה להיות שהן גורמות למצב דמוי null-allele לפחות בחלק מהתאים, ולמופע קליני חמור ביותר שאיננו מוגדר כתסמונת רט. לחולה הישראלית עם מוטציה זו, היתה תסמונת קלאסית עם התפלגות XCI נטויה (80%) לטובת אקטיבציה מועדפת של הכרומוזום האימהי. התפלגות כזו שכיחה בחולות רט עם מוטציות קוטעניות מוקדמות (Amir et al 2000) ויכולה להסביר את האבחנה הקלאסית בהן.

שתיים ממוטציות החלף הספוראדיות שראויות לדיון מיוחד הן c.755C>T (p.D151E) שאינה מדווחת ב RettBase ו c.910A>G (p.K304E) שדווחה שם פעם אחת בלבד. המוטציה הראשונה נמצאה בחולה בת 12

הסובלת מתסמונת רט אטיפית עם דיבור שמור. מוטצית חלף זו גורמת להחלפת חומצה אמינית אספרטית בחומצה גלוטאמית, אשר שתיהן חומציות, ב MBD בעמדה שמורה בין מינים שונים ובתוך משפחת חלבוני MBD (NCBI-blastp). המוטציה השניה, p.K304E גורמת להחלפת החומצה אמינית בסיסית ליזין לחומצה גלוטאמית בעמדה שמורה ב TRD. הנקודה המעניינת לגבי מוטציה זו היא המופע הקליני היוצא דופן של החולה בה התגלתה, מדובר בילדה בת שלוש תקינה מבחינה מוטורית עם תסמין יחיד של העדר שפה (למעט ז'רגון פרטי) ופעילות אפילפטיפורמית אופיינית לתסמנת רט (ללא פרכוסים). תמונה קלינית זו נחשבת בשלב זה, לקלה מכדי להכלל בהגדרת תסמונת רט. גילוי מוטציה בגן *MECP2* בחולה זו יוצר פתח לחיפוש מוטציות בגן בילדות נוספות עם איחור התפתחותי ופעילות אפילפטיפורמית אופיינית אף שאינן מתאימות להגדרת תסמונת רט. יש בכך תמיכה בגישה לפיה תסמונת רט היא אחת ממגוון הפרעות התפתחותיות הנובעות ממוטציות שונות בגן *MECP2* (Ham et al 2005).

רוב המוטציות מסוג חלף נמצאו ב MBD, מוטציות קוטעניות ממוקמות בעיקר במורד הזרם מ MBD ובקצה C רוכזו החסרים. התפלגות דומה של המוטציות דווחה גם בעוקבות אחרות של חולות רט (RettBase,) (Lee et al 2001) ומכך ניתן להסיק שהגישה המועדפת לחיפוש מוטציות בגן *MECP2* צריכה להיות מכוונת לאזור המקודד, בפרט האקסונים 3 ו 4 הכוללים את מרבית מוטציות hotspots הידועות (כ 2/3 מכלל המוטציות). לצורך זה יכולה לשמש אנליזת רצף או אנליזת RFLP המכוונת לשמונה מוטציות hotspots השכיחות. הבדיקה הבאה בסדר חשיבותה מבחינת תרומתה לגילוי מוטציות, היא שיטת MLPA המשמשת לגילוי חסרים ודופליקציות גדולים שמהווים כ 5% מהמוטציות. שיטה אחרת שנוסתה בהצלחה למטרה זו היא Real Time PCR המבוססת על כימות דנ"א באמצעות גלאים כנגד האקסונים, הפרומוטר ו 3'UTR (Laccone et al 2005) בהקשר זה חשוב להזכיר, כי עד היום לא זוהו כלל מוטציות באקסון 2 והן נדירות ביותר באקסון 1 (Amir et al 2005)

בסקירת הגן *MECP2* מצאנו גם 11 שינויים תורשתיים שונים. שניים מהשינויים באזור המקודד הם חדשים; מוטציית חלף p.V275A עברה בתורשה מאם תקינה לבתה, כחולת רט קלאסית, כאשר באם התקינה, נמצאה התפלגות XCI נטויה לטובת כרומוזום X התקין ואילו בבת החולה היתה אקטיבציה מועדפת של הכרומוזום האימהי המוטנטי. שינוי זה ממוקם ב TRD וגורם להחלפת ואלין באלנין בעלות מטען חשמלי זהה. למרות זאת ואלין באתר זה היא חומצה אמינית נחשבת שמורה בכל חלקת היונקים. יתר על כן, האפשרות ששינוי זה הוא פולימורפיזם שכיח נשללה בסקירת במדגם בן 100 כרומוזומים מקבוצה אתנית תואמת, באמצעות RFLP. לפיכך נבדקה האפשרות ששינוי זה הוא בעל משמעות פונקציונאלית והשלכותיו הביוכימיות נבדקו במערכת ביטוי תאית in-vitro.

שינוי מקודד חדש נוסף c.753C>T (p.P251P). נמצא בחולה בת 42 שנים עם תסמונת רט אטיפית ובאמה האסימפטומטית. גם במקרה זה נמצאה בחולה התפלגות XCI נטויה מובהקת בכיוון אקטיבציה מועדפת של הכרומוזום האימהי הכולל את השינוי ולעומת זאת באם נמצא השינוי על רקע התפלגות XCI נטויה בכיוון ההפוך. פתוגניות של שינויים כגון אלו שאינם משפיעים על הרכב החלבון יכולה לבוא לידי ביטוי ברמת השיעתוק והשחבור עקב שיבוש רצפי היכרות של גורמי בקרה שונים (Black & Grabowski 2003). אכן, באנליזה ביואינפורמטית באזור זה בתוכנת ESEfinder (Cartegni et al 2003) לזיהוי רצפי היכרות של גורמי שחבור ידועים, גילינו באותו מקום אתר היכרות של חלבון SF2/ASF. במיקום סמוך נמצא גם שינוי תורשתי c.752C>T, שגורם לשינוי חומצה אמינית p.P251L. בחולה קלאסית עם מוטציה נוספת ובאביה האסימפטומטי (Amano et al 2000). לאור זאת סביר להניח שאף השינוי p.P251P c.753C>T איננו קשור במחלה וככל הנראה הוא פולימורפיזם. בדיקת קרובי משפחה נוספים, ובעיקר האח עם פיגור שכלי, תוכל לשפוך אור חדש על שינוי תורשתי זה. שינויים תורשתיים נוספים שהתגלו באזור המקודד וידועים כפולימורפיזמים הם: c.375C>A (p.I125I) שמצאנו בארבעה אחים אשר שלושה מהם סובלים מפיגור שכלי; p.A201V שנמצאה בחולה אטיפית דמוית אנגלמן ובאמה האסימפטומטית והשינוי p.R484T שממוקם בסמוך לקודון הסיום. שינוי זה נמצא בשתי חולות ישראליות אטיפיות ממוצא שונה.

הגן *MECP2* כולל אזורים לא מקודדים נרחבים, כמו למשל הפרומוטר (~1Kb), האינטרון השני (60Kb) ואזור 3'UTR (עד 8.5Kb), בעוד שהאזור המקודד הוא ממוצע באורכו (כ 1.5Kb). בהתחשב במספר המחקרים העוסקים ב *MECP2* בשנים האחרונות, כבעל תפקיד מפתח במע' העצבים המרכזית, מפתיעה העובדה שכמעט ואין דיווחים על מוטציות בקרה בגן זה. אי לכך אין הרבה מידע על רצפים ספציפיים באינטרונים ו 3'UTR ותפקידיהם בתהליכי שעתוק, שיחבור ותרגום של *MECP2*. ממש לאחרונה פורסם מחקר המדווח על אתרי בקרה באזורים לא מקודדים של *MECP2*, הקושרים גורמים המעורבים בשיעתוק ושיחבור הגן (cis regulatory elements). באמצעות מבחני luciferase הוכיחו החוקרים את תפקודם של כמה מרצפים אלו שנמצאים באזור הפרומוטר, האינטרונים ו 3'UTR ואף במרחק של 114Kb במורד הזרם מ *MECP2* (Liu and Francke 2006). בסקירה יסודית של רצפים של >1Kb במעלה הזרם לאקסון הראשון (אזור הפרומוטר) ו >1Kb מקצה 5' ומקצה 3' של האינטרון הראשון בכל החולות ללא מוטציות מקודדות, לא נמצאו שינויים הקשורים במחלה מלבד מוטציית שחבור c.62+1delGT. בשני קצוות האינטרון הראשון מצאנו רק שינויים תורשתיים שזוהו גם באבות האסימפטומטיים של החולות, כגון c.62+197A>G (לפי האיזופורם MECP2_e1) שנמצא בקצה 5' של אינטרון 1 והשינוי c.1-314C>T (לפי האיזופורם MECP2_e2) בקצה 3' של אותו אינטרון.

הממצא המשמעותי ביותר מבחינת אתרי בקרה היא מוטציית חסר נדירה c.62+1delGT שנמצאה באתר שחבור תורם באינטרון 1 וזוהתה בשתי חולות רט קלאסיות לא קשורות. מוטציה זו היא הראשונה שתוארה באתרי הבקרה ב *MECP2*. עד כה פורסמו שלושה מאמרים על מוטציה זו, שניים מהם על החולות ישראליות (Amir et al 2005, Abuhatzira et al 2005, al 2005) ואחד על אותה מוטציה בחולת רט יפנית (Fukuada et al 2005). השלכותיה של מוטציה זו אינן וודאיות אך יש ראיות לכך שהשחבור הלא תקין גורם לתוצר לא יציב שמוריד את רמת התוצרים המתורגמים באופן משמעותי (Amir et al 2000). גם אנחנו מצאנו רמה נמוכה של תוצרי שיעתוק של שני האיזופורמים של *MECP2* בדם היקפי של שתי החולות עם מוטציה זו. בעבודה שבוצעה על ידי קבוצתה של ד"ר רות שמר מהאוניברסיטה העברית בשיתוף פעולה אתנו, הצליחו לראות כי התוצר הספציפי של מוטציה זו חסר לפחות את אקסון 1 ואולי גם את אקסון 4 (Abuhatzira et al 2005).

באופן כללי, נמצא כי גנים נוירונליים ביונקים נתונים לשחבור אלטרנטיבי ומכילים אתרי קישור לגורמי בקרה באינטרונים הארוכים, בעיקר באזורים השמורים הסמוכים לאקסון החליפי (Black & Grabowski 2003, Sorek & Ast 2003, Baek and Green 2005). במטרה לזהות אתרי קישור פוטנציאליים לגורמי שחבור אלטרנטיבי, בפרט ברצפים משני צידי אקסון 2 שהוא האקסון החליפי ב *MECP2*, ביצענו אנליזה ביואינפורמטית לחיפוש רצפים שמורים באבולוציה באמצעות תוכנת USCS. הרצפים האינטרונליים הסמוכים לאקסון 2 אכן נמצאו שמורים ביותר ביונקים וגם במחלקות אחרות, מה שתומך בכך שיכולים להיות שם אתרי בקרה פוטנציאליים, אולם אנו לא זיהינו שינויים באזורים אלו.

השינוי התורשתי c.378-19delT שנמצא סמוך לצומת אינטרון 3-אקסון 4, זוהה בעוקבה הישראלית בשתי חולות רט קלאסיות, בחולָה עם צורה מולדת ובחולָה זכר עם תסמיני רט חלקיים. אותו שינוי נמצא גם בעוקבות נוספות של חולי רט (Couvert et al 2001, Gomot et al 2003). ודווח גם בחולי רט במאגר המידע RettBase. בגלל סמיכות השינוי לרצף המקודד ושכיחותו בחולי רט, היו ספקולציות רבות אודות משמעותו. גם אנחנו ניסינו להראות שפולימורפיזם זה קשור בתסמונת רט ואינו קיים באוכלוסיה הכללית בסקירה של לפחות 100 כרומוזומי ממדגם ביקורת. במהלך בעבודה הנוכחית גילינו את אותו השינוי גם בקרובי משפחה זכרים אסימפטומטיים ובנוסף גילינו שבחלק מהחולים הופיעו השינוי עם מוטציות מקודדות שגורמות מחלה. כמו כן בעבודה שבוצעה בשיתוף פעולה עם ד"ר רות שמר, נראה כי שבט לימפובלסטים המבטא את *MECP2* עם שינוי זה מייצר תוצרים תקינים ברמת השיעתוק וגם ברמת התרגום (Abuhatzira et al 2005). מכאן ששינוי זה אינו משמעותי לגבי תסמונת רט.

בעבודה זו הושקע מאמץ רב בחיפוש מוטציות באזור הרחב של 3'UTR של *MECP2*, הכולל אתרים שמורים הקושרים גורמי שיעתוק ותרגום ידועים, שזוהו באנליזה ביואינפורמטית ובמחקרים מעשיים (Zaho et al 2003, Liu and Francke 2006). 21 מקטעים חופפים מהאזור 3'UTR עברו אנליזת DHPLC בכל החולות ללא מוטציות מקודדות וחלק גדול מהם עבר גם קריאות רצף ישירות בהשוואה למאגר מידע. מאמץ זה הניב שני שינויים c.1461+905G>A ו c.1461+14G>A אשר נמצאו גם בהורים האסימפטומטיים. השינוי c.1461+905G>A נמצא גם באנשים נורמאליים ללא קשר לעוקבה. על כן ניתן להתייחס לשני השינויים הללו כפולימורפיזמים שאינם קשורים לרט. ראוי לציין בהקשר זה, כי לא מצאנו שאנליזת DHPLC יעילה ומועדפת על פני קריאות רצף ישירות מבחינת זמן עבודה ועלות.

חשיבותו של אזור 3'UTR לגבי תפקוד הגן הומחשה בממצאים שלנו בשני חסרים גדולים הכוללים את אזור זה ונמצאו בחולה קלאסית ובחולה עם צורה מולדת. במחקר על רמת הביטוי של *MECP2* בדם ההיקפי (תוצאות, חלק 3) הראנו שרמת הביטוי של שני האיזופורמים של הגן היתה נמוכה באופן משמעותי בשתי החולות עם חסרים אלו לעומת חולות עם חסרים שלא כללו את 3'UTR. הממצאים המועטים שלנו וגם של אחרים לגבי מוטציות ואתרי בקרה אפשריים באזורים הלא מקודדים של *MECP2*, מעלים מספר שאלות עקרוניות; האם הם נובעים מאוזלת יד של השיטות המולקולריות שהיו בשימוש? או האם הם יכולים להעיד שמוטציות באתרי בקרה של *MECP2* אינם מהווה גורם משמעותי בתסמונת רט בהגדרתה הקלינית המקובלת? על השאלה הראשונה אפשר לענות באמצעים מולקולריים אחרים מאלו ששימשו בעבודה הנוכחית, אך מענה על השאלה השניה כרוך בסקירה מייגעת של רצפים נרחבים בחולים שאינם קשורים בתסמונת רט, אלא אם כן ימצא קריטריון סלקטיבי ייחודי פשוט יותר ליישום כגון דגם אנצפלוגרם אופייני לתסמונת רט (Glaze 2004), שנמצא גם בחולה עם הפרעה התפתחותית שפתית והמוטציה p.K304E, על אף שאינה מתאימה להגדרת תסמונת רט.

התפלגות האינאקטיבציה של כרומוזום X (XCI)

מרבית המחקרים מעידים על אינטראקציה בין התפלגות האינאקטיבציה של כרומוזום X לבין הביטוי הפנוטיפי של הפרעות אחוזות ב X בכלל ותסמונת רט בפרט (Shabazian & Zoghbi 2002). על כן, יש חשיבות לבדיקת התפלגות XCI בחולות רט, בפרט בעלות מופעים קליניים קיצוניים בהשוואה לתסמונת הקלאסית ומקרים תורשתיים אימהיים. מבין 52 חולות אינפורמטיביות בתבחין HUMARA נמצאו 14 חולות (27%) עם אינאקטיבציה נטויה מובהקת ביחס של 75% ומעלה. בספרות ישנה אחידות בעדויות לגבי המתאם החיובי בין שכיחות הטיה נטויה של XCI לבין הגיל באוכלוסיה הכללית (Busque et al 1996, Hatakeyama et al 2004, Knudsen et al 2006). אולם יש פערים בין הערכת שכיחות אלו באוכלוסיה הכללית. על פי Hatakeyama ועמיתיו (2004) ביפן שכיחות התפלגות XCI נטויה ביחס של 3:1 ויותר היא 25% בגילאים 0-19 שנים וכ 37% בגילאי 20-39 שנים. מחקרים אחרים מעידים על שיעורים נמוכים יותר; בקנדה נמצאה הטיית XCI בכ 9% מהיילודים ממין נקבה ובכ 16% מהנשים בגילאי 28-32 שנים (Busque et al 1996), במחקר יפני אחר נמצאה שכיחות של כ 11% מתוך 82 נשים הטרוזיגוטיות (Sato 2003) וגם במחקר עדכני שבוצע בשבדיה עמד יחס האינאקטיבציה הנטויה על 11% מתוך 238 נשים בגילאי 19-63 שנים (Knudsen et al 2006). לפיכך, בהתייחס לממצאי מרבית הסקרים הללו, עוקבת חולות רט הישראלית מתאפיינת בשכיחות יתר של אינאקטיבציה נטויה. ברוב קטן מהחולות עם התפלגות XCI נטויה (9 מתוך 14) מצאנו אקטיבציה מועדפת של הכרומוזום האימהי. מגמה זו דווחה גם בעבודות קודמות על עוקבות רט אחרות (Zoghbi et al 2000, Nielsen et al 2003, Smeeth et al 2003, Weaving et al 2001). בדומה למחלות גנטיות ספוראדיות אחרות, מרבית מקרי רט (99%) נגרמים על ידי מוטציות חדשות בכרומוזום האבאי (Trappe et al 2000, Girard et al 2001). אי לכך אקטיבציה מועדפת של הכרומוזום האימהי עשויה להצביע על יתרון הישרדותי של תאים שמבטאים MeCP2 תקין. עם זאת יש לסייג ולומר שהתפלגות XCI שנבדקה במחקר זה נכונה לגבי הדם ההיקפי ולא מערכת העצבים המרכזית. למרות שקיים מתאם בין דפוסי XCI ברקמות שונות, הוא אינו מושלם ויורד עם הגיל (Sharp et al 2000). מכאן שחשיבותו של XCI כגורם פרוגנוסטי שניתן להקיש ממנו על חומרת הפנוטיפ הקליני אינה וודאית.

2. השפעת סוג המוטציות ומיקומן על פנוטיפ החולות

אחת מתרומות העבודה הנוכחית הוא פיתוח של סולם חדש ששימש לדירוג הפנוטיפ הקליני של החולות ויושם במבחני גנוטיפ-פנוטיפ שלהן. ייחודו של הסולם החדש הוא בפשטותו היחסית בקביעת ציון הפנוטיפ הכולל והמדדים השונים ובהצלחתו להתגבר על אפקט הגיל. חסרונו של הסולם בכך שאינו נותן ביטוי לגיל ההתחלה ומשך הנסיגה ההתפתחותית וניתן לשפר אותו על ידי הכללת מדדים נוספים שיענו על דרישות אלו. אנליזת שונות בין

ממוצעי הציון הפנוטיפי של חולות עם מוטציות קוטעניות ושל כאלו עם מוטציות לא קוטעניות (מסוג חלף או חסרים קטנים) הצביעה על קשר אפשרי בין גורמים אלו היות ולחולות עם מוטציות קוטעניות היו ציוני פנוטיפ חמורים במובהק מלחולות עם מוטציות לא קוטעניות. גם מחקרים אחרים בעולם הראו בעקביות כי מוטציות קוטעניות ב *MECP2* קשורות בפנוטיפ קליני חמור יותר (Huppke et al 2002, Smeets et al 2003, Naidu et al 2006, Kerr et al 2004, Schanen et al 2003). יוצאים מכלל זה המקרים עם מוטציות חלף מסוג p.T158M ו p.R106W שבהם היתה חומרת הפנוטיפ דומה לזו של מוטציות hotspots קוטעניות, p.R168X (Ham et al 2005). מכאן ניתן להסיק שלמוטציות ספציפיות יש דרגות חומרה פנוטיפית האופייניות להן, כפי שמוטציות חלף בעמדות p.158 ו p.106 פוגעות באופן משמעותי בתפקוד החלבון ומתבטאות בבפנוטיפ חמור לעומת מוטציות חלף בעמדות p.133 ו p.306. הקשר בין המוטציות p.R306C ו p.R133C לבין פנוטיפים מתונים יותר נצפה במדגמים רחבים של חולות רט (Smeets et al 2003, Schanen et al 2004, Ham et al 2005), ואילו הקשר של מוטציות p.R106W, p.T158M לפנוטיפים חמורים יחסית נראה בנוסף גם במחקרים על תפקוד מוטציות אלו in vitro (Kudo et al 2003, Buschdorf and Startling 2004). בעבודה הנוכחית לא מצאנו הבדל מובהק בין מוטציות קוטעניות הפוגעות ב MBD, ב NLS או בקצה C. אולם במספר מחקרים אחרים נמצא שמוטציות קוטעניות באזורים הפונקציונליים MBD, NLS קשורות בפנוטיפים חמורים יותר לעומת אלו שבקצה C (Huppke et al 2000, Smeets et al 2003, Schanen et al 2004, Ham et al 2005). הבדל זה בין העבודה הנוכחית לבין המחקרים האחרים יכול לנבוע ממסולמות מדידה שונים או ממספר מקרים גדול יותר מזה שעמד לרשותנו.

מעבר להבדל בציון הפנוטיפי הכולל מצאנו הבדלים בין המוטציות במדדים פנוטיפיים ספציפיים. מוטציות חלף, באופן כללי היו קשורות בהיקפי ראש קרובים יותר לנורמה, בדיבור שמור וביכולת שימוש ידיים לעומת מוטציות קוטעניות. בנוסף, במוטציות ספציפיות נמצאו הבדלים ביכולת ההליכה. גם במחקרים אחרים דווח על הבדלים בין המוטציות לגבי מדדים פנוטיפיים ספציפיים, כגון היקפי ראש (Amir et al 2000, Weaving et al 2003) ויכולת הדיבור (Schanen et al 2004) הפרעות נשימה, עקמת (Amir et al 2000) והליכה (Monros et al 2001). אך השפעתן של מוטציות ספציפיות על יכולת שימוש הידיים מדווחת כאן לראשונה.

אחד הקשיים העיקריים במתאמי גנוטיפ-פנוטיפ, מלבד מספרן הקטן של החולות היה השונות האינדיוידואלית בציונים הפנוטיפיים בין החולות עם אותה מוטציה. תופעה זו בלטה במיוחד בשתי החולות עם אותה מוטציית שחבור c.62+1delGT וב 8 חולות עם מוטציה p.R168X ובחולות עם חסרים קטנים בקצה C.

שונות זו יכולה לרמז על קיומם של גורמים נוספים המשפיעים על הביטוי הפנוטיפי, כגון גורמים הפועלים באינטראקציה עם *MECP2*, גורמים אפיגנטיים או סביבתיים. במחקר הנוכחי בחרנו לבדוק את תרומת התפלגות XCI נטויה על הביטוי הפנוטיפי של תסמונת רט. עקב המספר הקטן של החולים עם אותה מוטציה ו XCI נטויה שנכללו במתאמים אלו לא ניתן היה להוכיח מובהקות סטטיסטית של הקשר בין משתנים אלו אך ניתן היה לזהות מגמה כללית על פיה XCI נטויה לטובת ה X האבהי המוטנטי (Girard et al 2001, Trappe et al 2001) קשור בפנוטיפים חמורים יותר וההיפך. תופעה זו נצפתה גם בעבודה זו לפחות לגבי ארבע מוטציות שכיחות. בספרות קיימים דיווחים על הקשר בין הפנוטיפ לבין XCI במקרים נדירים של מוטציות ב *MECP2* עם פנוטיפ חריג (Wan et al 1999, Amir et al 2000, Hoffbuhr et al 2001), וכן עדויות על שכיחות יתר של אינטקטיבציה נטויה בקרב חולות רט, בדומה למה שנמצא אצלנו (Knudsen et al 2006). אך מחקר שיטתי שהראה קשר בין XCI לבין חומרת הפנוטיפ פורסם עד כה רק לגבי עכברי מודל, בעלי מוטציה אחידה ב *MECP2* (Young & Zoghbi 2004), מה שתמך בגישתנו לבדיקת המתאם בין XCI לבין הפנוטיפ, גם בחולות רט עם מוטציה משותפת. שיתוף בינלאומי של נתונים קליניים גנטיים ואפיגנטיים של חולות רט אכן נעשה במסגרת פרויקט <http://www.ichr.uwa.edu.au/rett/irsa> (InteRett) שבו אנו שותפים.

השונות הפנוטיפית הגבוהה בקרב חולות רט וזיהוי מוטציות ב *MECP2* בחולים עם הפרעות שאינן מתאימות להגדרת תסמונת רט, כגון אוטיזם או פיגור שכלי בזכרים, מביאים לידי הכרה שהגבלת חיפוש מוטציות ב *MECP2* בחולות רט בלבד גורם לנטאי (bias) ותת אבחנה של חולים עם מופעים קליניים החורגים מהגדרת תסמונת זו (Moretti & Zoghbi 2006). תפקודו המרכזי של *MECP2* בהבשלה ותפקוד מערכת העצבים המרכזית, וריבוי אתרי CpG מוטביליים בגן *MECP2* בעוד שמונה מהם בלבד מהווים hotspots של תסמונת רט (Wan et al 1999), מגבירים את סיכויי להיות אחראי ליותר מאשר תסמונת נוירו-התפתחותית אחת. בשישה אתרי CpG אחרים ב *MECP2* נמצאו מוטציות חלף רק במקרים שאינם רט, כגון המוטציה p.A140V שקשורה בפיגור שכלי בזכרים. מעבר לזה נותרו עוד חמישה אתרי CpG עם פוטנציאל למוטציות עצר בקצה N וששה אתרים עם פוטנציאל למוטציות חלף ב TRD שטרם אותרו בחולות רט (Wan et al 1999+RettBase). במחקר זה חיפשנו מוטציות באזור המקודד של *MECP2* ב 54 חולים עם הפרעות החורגות מהגדרת תסמונת רט ומצאנו במקרה אחד מוטצית חלף נדירה p.K304E ב TRD בחולה עם הפרעת שפה. איתורה של מוטציה זו, מהווה אולי קצה קרחון של הפרעת "העדר שפה" בבנות הנגרמת על ידי מוטציה זו ודומות לה מבחינה פונקציונלית. על כן זיהוי מוטציה זו ראוי לכוון מחקרים עתידיים לסריקת ילדות עם הפרעת שפה על רקע לא ברור. מאידך, קיים נטאי הפוך כנגד בדיקת חולים בעלי פנוטיפ קשה מתסמונת רט כגון חולות עם הפרעות סבנטאליות נוירו-התפתחותיות קשות ואף קטלניות, אשר יכולות לשאת מוטציות קוטעניות בקצה N המדמות מצב של אלל חסר. מוטציות כאלו הן

נדירות ביותר בעוקבת רט והמוטציה p.E55fs57X שנמצאה אצלנו בחולת רט קלאסית עם התפלגות XCI נטויה ביותר, היא אולי יוצאת מהכלל שמעידה על הכלל, דהיינו קיומן של חולות קשות עם מוטציות קוטעניות מוקדמות בלא מיסוך של התפלגות XCI נטויה. לאיתור מוטציות מסוג זה יש לסרוק אוכלוסיית ילדות עם תסמונות עצביות התפתחותיות מולדות חמורות מתסמונת רט.

3. ביטוי *MECP2* בדם היקפי של חולות רט

למרות המאמץ שהשקענו בחיפוש מוטציות ב *MECP2* גם מחוץ לאזור המקודד נותרו בעוקבה שלנו 17% מהחולות קלאסיות ללא ממצאי מוטציות, תופעה המוכרת גם בעוקבות אחרות. בהתבסס על ההשערה שמרבית המקרים בתסמונת רט נובעים מהפרעות ב *MECP2* העלנו את ההיפותזה כי חלק מהפגמים ב *MECP2* צריכים לבוא לידי ביטוי ברמות נמוכות של תוצר השיעתוק בדם הפריפרי. לצורך זה פיתחנו מבחן ביטוי של שני האיזופורמים של *MECP2* בשיטת quantitative Real-Time PCR. טווח השונות (היחס בין הרמה המכסימלית והמינימלית) בביטוי *MECP2* בדם היקפי של נשים נורמאליות נמצא כ 1.51 עבור *MECP2_e1* ו 1.75 עבור *MECP2_e2*. השונות המירבית של ביטוי גנים הומניים אחרים נעה בין 1.4 ל 8.4 (Morley et al 2004). כך ששונות הביטוי של *MECP2* בפרטים נורמאליים הינה נמוכה יחסית וביטוי שני האיזופורמים של *MECP2* נתון תחת בקרה הדוקה. ממצא מעניין נוסף היה שרמות *MECP2_e2* בדם היקפי של נשים נורמאליות גבוהות פי 8 מרמות *MECP2_e1*. ממצא זה עולה בקנה אחד עם Mnatzakanian ועמיתיו (2004), שגילו ואפינו לראשונה את האיזופורם *MECP2_e1* ודווחו על הפרשי רמות דומים לטובת *MECP2_e2* בתרביות לימפוציטים לעומת פערם הפוכים במוח בוגר. באופן מעשי, היה חשוב להראות שרמות האיזופורמים בנשים נורמאליות קבועות כך שיכולנו להשתמש בדגימת מאגר של מספר דגימות נורמאליות, כדגימת ביקורת אחידה לאורך כל הניסויים.

השפעת מוטציות ידועות על ביטוי הגן *MECP2* בדם היקפי, נבדקה בסדרת ניסויי Real-Time PCR בחולות עם מוטציות שחבור, חסרים גדולים, מוטציות חלק, מוטציות עצר וחסרים בקצה C. רמות הביטוי הנמוכות ביותר, בטווח 30-50% מהמוצע הנורמאלי, נמצאו בשתי חולות קלאסיות עם מוטציית שחבור c.62+1delGT, כאשר החריגה ברמות *MECP2_e1* היתה גדולה יותר מאשר ברמות *MECP2_e2*. מעניין לציין כי באותה תקופה, לא אובחנה המוטציה בחולות אלו וממצא זה היווה עדות ראשונה שמחלתן קשורה בהפרעה בביטוי *MECP2*. בהסתמך על המקרים שעבדו באופן ספציפי על מוטציה זו (Amir et al 2005, Abuhatzira et al 2005) מוטצית השחבור גורמת ככל הנראה להשמטת אקסון 1 מתוצרי השחבור של שני האיזופורמים, מקצה N של *MECP2_e1* ומאזור 5'UTR ב *MECP2_e2* (תרשים א.1). בהתאם לכך מוטציה זו היתה קשורה ברמות ביטוי נמוכות של שני האיזופורמים. גם במוטציות חסר גדולות הכוללות חלקים מקצה C- ו 3'UTR נמצאה ירידה

בביטוי שני האיזופורמים. ממצאים אלו מתאימים להכרה ש 3' UTR כולל אתרים המבקרים את יעילות השיעתוק ויציבות תוצר השיעתוק (Zhao et al 1999). החסרים הגדולים היו קשורים לירידה בולטת יותר בביטוי MECP2_e2. תצפית זו מבוססת על מספר קטן של מקרים וכדי להעריך את עקביותה יש לחזור על הבדיקה בחולות נוספות עם חסרים דומים. ככלל, לאור מספרן הקטן של חולות עם מוטציות ידועות אין אנו מתיימרים לענות על השאלה איך משפיעה מוטציה מסוימת על ביטוי איזופורם ספציפי. לגבי מוטציות קוטעניות נמצאה ירידה פחותה ברמות הביטוי של שני האיזופורמים. ממצא זה יכול לנבוע מפעילות מנגנון nonsense mediated RNA decay האחראי לסילוק תוצרי שיעתוק שגויים (Zaho et al 1999, Amrani et al 2006). במוטציות חלף ובחסרים קטנים ללא פגיעה במסגרת הקריאה התקבלו רמות ביטוי נורמאליות של שני האיזופורמים.

ממצאי מבחני הביטוי לגבי מוטציות יכולים ללמד על השפעת התפלגות XCI על רמת MECP2 בדם ההיקפי. הדוגמא הבולטת לכך התקבלה בשתי החולות עם אותה מוטציית שחבור על רקע XCI נטוי בכיוונים שונים. בחולה עם XCI נטוי להעדפת של הכרומוזום האבהי המוטנטי נמצאו רמות ביטוי נמוכות יותר. תופעה דומה נמצאה גם בחולות עם חסרים גדולים ובחולות עם מוטציות קוטעניות: p.R255X לעומת p.R270X. על מנת לבסס את המסקנה כי התפלגות XCI יכולה להסביר הבדלים בין-אישיים בביטוי MECP2 יש צורך להגדיל את מספר החולות הנבדקות בעלות שונות גנוטיפית מינימלית ושונות XCI מכסימלית, מה שקשה ליישום במגבלות הגודל של העוקבה הנוכחית.

המטרה העיקרית של מבחני ביטוי בדם ההיקפי הייתה ליישם בחולות רט ללא ממצאי מוטציות. במרבית החולות הקלאסיות והאטיפיות הללו שנבדקו זוהו רמות MECP2 חריגות לעומת הטווח הנורמאלי. הממצא המשמעותי ביותר אולי הוא שבשלוש חולות קלאסיות ובחולות אטיפיות יש ירידות מובהקות של ביטוי MECP2 בדם ההיקפי מה שיכול להצביע על נוכחות של מוטציות באתרי בקרה או חסרים גדולים שטרם זוהו. מעבר לחשיבות הממצאים הללו כתמיכה באבחנה הקלינית של רט, יש בהם חשיבות לחיזוק הגישה הקושרת את תסמונת רט ל MECP2 כגן יחיד (Zoghbi et al 2005). יישום המבחן איפשר לקשור מקרים נוספים, כולל אטיפיים, לגן זה שהוא לכל הפחות הבסיס הגנטי העיקרי לתסמונת רט ובזאת הוא מעודד להמשיך לחפש בו מוטציות הפוגעות בבקרת ביטוי.

בחולה קלאסית אחת עם רמות ביטוי נורמאליות של MECP2, קיימת אפשרות של מוטצית חלף או חסר קטן שחמקו מאנליזת הרצף הישירה של ב MECP2 אך ניתן גם לציין בהקשר זה מקרים נדירים של פסיפס (mosaica) של מוטציה סומטית ב MECP2 שנמצאה בשני מקרים של בנות חולות רט קלאסי (Bourdon et al 2001b) ובמקרים נוספים של בנים חולים (Ben Zeev et al 2002). על מנת להתייחס לאפשרות זו צריך יהיה

לבצע אנליזה של *MECP2* בדגימות דנ"א ורנ"א שיופקו מרקמות שונות של החולה. לא ניתן לשלול גם את האפשרות שהפנוטיפ הקליני של חולה הזו נגרם על ידי פגמים בגן אחר אם כי עד כה לא דווח על מוטציות בגן אחר הגורמות לתסמונת רט קלאסית.

מבחן הביטוי העלה ממצאים פחות ברורים לגבי שתי חולות אטיפיות עם רמות ביטוי *MECP2* נמוכות מעט מהנורמה ושלוש חולות (קלאסית אחת ושתי אטיפיות) עם רמות ביטוי גבוהות באופן ניכר לגבי אחד האיזופורמים בלבד. על כל פנים, מן הראוי לציין כאן כי ידוע שביטוי יתר של *MeCP2/Mecp2* בעכברים ובאדם גורם להפרעה נוירולוגית דומה לרט (Collins et al 2004, van Esch et al 2005). בנוסף ידוע, כי מוטציות אינטרוניות יכולות לגרום להעדפת ביטוי של תוצר שיחבור מסויים על פני אחרים (Baek and Green 2005) ולגרום בכך להפרעות נוירולוגיות כפי שתואר לגבי הגן *Tau* במחלת אלצהיימר (Hyman et al 2005).

מבחן ביטוי *MECP2* בדם היקפי בחולות רט הוא ייחודי בגישתו על רקע המחקרים הרבים שעוסקים בחיפוש מוטציות ב *MECP2*, בראש ובראשונה בגלל שהוא מספק תמיכה נוספת לאבחנה הקלינית של חולות רט ללא ממצאי מוטציות. העובדה שהממצאים הראשוניים מצביעים על כך שמוטציות מסויימות מאופיינות בפרופיל ביטוי ייחודי, תומכת בתקפותו של מבחן הביטוי בדם כמשקף את השפעות המוטציות. עם הרחבת סקר זה ניתן יהיה לאשש את הממצאים הללו ואולי לנבא על פי דגם הביטוי נוכחות מוטציות מסויימות בבנות ללא ממצאים קודמים. לשם תיקוף התוצאות שהתקבלו במבחן הנוכחי, יש לבדוק את מידת השתקפותם ברמות החלבון *MeCP2* בתרביות לימפוציטים מאותן חולות.

4. הערכה תפקודית של *MECP2* עם מוטציית חלף חדשה ב TRD

אחד מפירות העבודה בחולים היה גילוי מוטציה חדשה p.V275A הממוקמת באתר TRD, בחולה עם פנוטיפ רט קלאסי וגם באם עם התפלגות XCI נטויה הממסכת אותה. השפעת מוטציה זו על רמות ההיסטוניים האצטיליים H3 ו H4 נבדקה במערכת ביטוי תאית בהשוואה למוטציית חלף ידועה ב TRD (p.R306C) ומוטציית עצר ב TRD (p.R255X). על פי המודל המקובל, *MeCP2* נקשר לפרומוטרים ממותלים באמצעות אתר MBD ומגייס קומפלקסים מעכבי שיעתוק הנקשרים לאתר TRD. לאנזימים histone deacetylases יש תפקיד מכריע בדיכוי השעתוק במסלול זה, דרך פעולתם על שיירי ליזין בהיסטונים H3, H4. עקב כך משתנה המבנה הארכיטקטוני של הכרומטין ונחסם שיעתוק הגנים במקום.

בחלק הראשון של מחקר זה ניסינו ללמוד על מיקום ורמת הביטוי של החלבון *MeCP2* במערכות הביטוי השונות. מגבלת אנליזות אלו קשורה בשימוש בנוגדן כנגד קצה C של החלבון, שהוא הנוגדן העיקרי והנפוץ

בשימוש ברוב העבודות מסוג זה (נוגדן כנגד קצה N יוצר ע"י Adrian Bird, אך איננו עומד בקריטריונים מסחריים). מערכת התאים שביטאה את המוטציה החדשה ייצרה MeCP2 ברמה נורמאלית בהשוואה למערכת ביטוי החלבון התקין והביקורת. במערכת שביטאה את המוטציה p.R255X שקוטעת את קצה C ובמערכת הביקורת עם ווקטור בלבד, לא התקבל סימון MeCP2 בתנאי ההחשיפה בהם נקטנו. מכך ניתן להסיק שרמת MeCP2 האנדוגני נמוכה מאוד ביחס ל MeCP2 הרקומביננטי. בנוסף לכך, האנליזה המיקרוסקופית הראתה שהתוצר עם המוטציה החדשה הועבר לגרעין התא כצפוי.

בהשוואת רמות האצטילציה ההיסטונית במערכות הביטוי של מוטציות החלף כולל p.A275A החדשה, לא התקבלו הבדלים לעומת מערכת הביקורת ולעומת מערכת ביטוי בחלבון הנורמאלי. לעומת זאת, במערכת של MeCP2 המבטא מוטציה קוטענית ב TRD (p.R255X) הייתה רמת ההיסטון האצטילי H3 גבוהה יותר באופן משמעותי כפי שצפוי במצב של ירידה בקשירת היסטון דאצטילאזות ל TRD. ממצא זה מעיד על כך שהאנליזה הנוכחית המשתמשת בנוגדנים היסטוניים איננה מבדלת לגבי מוטציות חלף אלא רק לגבי מוטציות קוטעניות הפוגעות ב TRD. אחת הסיבות לכך יכולה להיות שהשפעת מוטציות החלף מתונה מכדי לביות ניכרת על רקע דאצטילציה הנובעת מ MeCP2 אנדוגני. למרות שנוגדן MeCP2 לא הצליח לזהות את נוכחות החלבון האנדוגני במערכת של וקטור בלבד, נוגדנים כנגד היסטונים אצטיליים הצליחו להראות באופן עקיף את האפקט של התוצר האנדוגני באותה מערכת, שכן רמת ההיסטונים האצטיליים במערכת עם הווקטור בלבד היתה דומה לרמתם במערכת עם MeCP2 נורמאלי. בהתאם לממצאנו, מספר מחקרים אחרים הראו אף הם כי רמות האצטילציה בהיסטון H3 רגישות יותר להשפעת מוטציות ב MeCP2 מאשר H4, בלימפוציטים מחולות רט עם מוטציות קוטעניות, ובעכברי מודל לתסמונת רט (Shabazian et al 2002, Young and Zoghbi 2004, Kaufman et al 2005). בניגוד לכך, עבודה מוקדמת על תפקוד MeCP2 הראתה דווקא את השפעתן של מוטציות קוטעניות על האצטילציה של H4 (Wan et al 2001). גם מודיפיקציות אחרות בהיסטון H3 נמצאו כרגישות יותר לנוכחות מוטציות ב MeCP2, כגון מתילציה של ליזין בעמדה 9 (Fuks et al 2003, Young and Zoghbi 2004).

סוגיית השפעתן של מוטציות חלף ב TRD על תפקוד החלבון איננה סגורה עדיין. כאמור, אנחנו לא מצאנו השפעה של מוטציות אלו מבחינת האצטילציה ההיסטונית במערכות הביטוי שלנו. אחת העבודות המוקדמות ביותר על תפקוד מוטנטי לא ראתה השפעה של מוטציות החלף p.R306C על רמות השיעתוק. בבדיקת רמות שיעתוק של גנים אחרים (Yusufzai and Wolffe 2000) גם בעבודה שהוזכרה קודם על לימפוציטים מחולות רט לא נמצאה השפעה של המוטציה p.R306C על אצטילציה של היסטונים (Kaufman et al 2005). העבודה היחידה שדיווחה על השפעה מינורית של מוטציה זו, השתמשה בעוברי *xenopus* כמערכת ביטוי של MeCP2 עם מוטציות

שונות ב TRD ובדקה את מידת ההקשרות של קו-רפרסורים SMART, HDAC1, Sin3A לרצף ה TRD התקין או המוטנטי. עבודה זו הראתה כי TRD עם מוטציה קוטענית אינו נקשר ל Sin3A SMART ו HDAC1 הפועלים בשיתוף פעולה אתו לדיכוי שיעתוק וכי גם ל TRD עם p.R306C היתה אפיניות נמוכה יחסית לשלושת הפקטורים אלו (Stancheva et al 2003). כנראה שמבחן GST-pull down שבו השתמשו במחקר זה, רגיש יותר ממבחן רמת האצטילציה של ההיסטונים לזיהוי השפעות של מוטציות חלף ב TRD והוא עשוי להתאים לבדיקת האפקט של מוטציית החלף החדשה p.V275A. אפשרות אחרת היא שהמוטציה החדשה p.V275A משפיעה על תפקיד נוסף של MeCP2, בבקרת שחבור של גנים נויורנליים באינטראקציה עם החלבון YB1 (Y box binding protein 1). תפקיד זה זוהה אך לאחרונה in vitro וכעדות חיה לכך הוצגו דוגמאות לאברציות בשחבורים אלטרנטיביים בעכברי מודל לתסמונת רט (Young et al 2005). לבסוף, אין לשכוח את האפשרות הסבירה שמוטציות חלף תורשתית זו אינה הגורם לתסמונת רט בחולה שבה התגלתה, דווקא משום שמדובר בחולה קלאסית ומוטציות חלף של אלאנין וואלין שהן חומצות שוות מטען, לא נמצאו עד כה כגורמות לתסמונת קלאסית (RettBase).

סיכום ומבט לעתיד

העבודה הנוכחית משתלבת במאמץ הכולל להבין את הבסיס המולקולרי של תסמונת רט. על פי מרבית המחקרים, מוטציות ספוראדיות בגן *MECP2* גורמות לכ 70-85% ממקרי רט הקלאסיים. בין המקרים האטיפיים, מגיעה רמת גילוי המוטציות עד לכ 50% ממקרי רט עם דיבור שמור (De Bona et al 2000, Zappella et al 2001) ופחות מזה בצורות אטיפיות אחרות. כמו כן רק במיעוט מהמקרים הנדירים של תסמונת רט משפחתית נמצאו מוטציות מורשות ב *MECP2* (Wan et al 1999, Villard et al 2001). במחקר זה נמצא כי במספר בחולות רט ללא ממצאי מוטציות מקודדות, יש רמות ביטוי נמוכות יותר של *MECP2* בדם ההיקפי. ממצאים אלו יכולים להעיד כי מקרים נוספים של רט יכולים להקשר במוטציות באלמנטים הרגולטוריים של *MECP2*. למרות זאת, אין להתעלם מהאפשרות למעורבות גן נוסף, האחראי למספר קטן יותר של מקרי תסמונת רט. ניתן לשער כי הגן הזה פועל במסלול מוליקולרי משותף ל MeCP2, במעלה המסלול כמבקר את ביטוי *MECP2*, או במורדו, על ידי כך שהוא מהווה אולי גן מטרה של MeCP2 במוח.

בשנים האחרונות חלה התקדמות רבה בהבנה של מנגנון הפעילות של MeCP2 בעיקר בתאים הנוירנליים. אחד הגילויים המרכזיים בהקשר הזה הוא האינטראקציה בין MeCP2 ו REST או NRSF (RE1 silencing transcription factor / neuron restrictive silencer factor) כבעלת תפקיד מרכזי בביטוי גנים נאורנליים במהלך התפתחות תאי העצב. ה REST וה MeCP2 פועלים בשיתוף פעולה בהפעלת ביטויים של גנים נאורנליים

ספציפיים. כאשר REST פועל דרך אתרי קישור לא ממותלים RE1 ו MeCP2 פועל בעיקר על פרומרים ממותלים או כקו-רפרסור של REST. השפעתו של REST ניכרת בתאי עצב מתפתחים בעוד שבתאי עצב פוסט-מיטוטיים בוגרים מקבל MeCP2 מעמד מרכזי (Ballas and Mandel 2005). החלפת התפקידים בין שני גורמים אלו יכולה אולי להסביר את ההידרדרות הדרמתית בתסמיני מחלת רט החל מגיל 6-18 חודשים, בשלב שבו מרבית תאי העצב מגיעים להבשלה ו MeCP2 הופך לשחקן הראשי בבקרת שיעתוקם של גנים נוירונליים חיוניים. עד היום לא דווח על ממצאי מוטציות בגן REST הממוקם ב 12q12 בחולי רט אך למרות זאת, REST הוא אחד המועמדים האפשריים להיות מעורב בתסמונת רט קלאסית ואטיפית.

אחת מפריצות הדרך בנסיון למצוא תשובה לשאלה מי הם הגנים הנתונים להשפעתו של MeCP2 כמדכא שיעתוק, היתה הגילוי שאחד הפרומוטרים הממותלים של *BDNF* (brain-derived neurotrophic factor) נתון לבקרה על ידי MeCP2 כפונקציה של פעילות העצב-דה-פולאריזציה של הממברנה (Chen et al 2003,) (Martinovich et al 2003). *BDNF* הוא גורם מפתח בהישרדות ויצירת שינויים ארוכי טווח בתפקוד הסינפסות (synaptic plasticity). שתי קבוצות המחקר הנ"ל הראו במקביל שהפעלת תאי עצב והזרמת יוני סידן לתוך התא גורמת לירידה במתילציה של הפרומוטר של *BDNF* ולפוספורילציה של MeCP2, מה שמשחרר את הפרומוטר מהשפעת MeCP2 ומאפשר שיעתוק *BDNF*. בהמשך התגלו גנים נוירונליים נוספים הנתונים לבקרה של MeCP2 כגון *DLX5* ו *DLX6* (Horike et al 2005), *FMRI* (Harikrishnan et al 2005) ו *UBE3A* הקשור בתסמונת אנגלמן (Makedonski et al 2005). מה שמשותף לגנים אלו שהם כולם קשורים בפעילות מערכת העצבים המרכזית וחלקם קשורים גם בפיגור שכלי באדם. בנוסף כולם נתונים לבקרת ביטוי של פרומוטרים ממותלים.

המחקרים העדכניים ביותר במודל של רט בעכבר הראו כי עכברים עם *Mecp2* מוטנטי נכשלים בהעברת גירויים מעוררים בסינפסות (Asaka et al 2006, Dani et al 2005, Moretti et al 2006, Nelson et al 2006). ממצאים אלו יכולים להסביר מדוע יש פעילות נוירונלית מופחתת יחסית באזורי מוח מסויימים של עכברים מוטנטיים אלו (Dani et al 2005). בנוסף, צורות מסויימות של מוליכות סינפטית (synaptic plasticity) בעלי תפקיד מפתח בלמידה וזיכרון, מופחתות או אף חסרות בעכברים מוטנטיים (Moretti et al 2006, Pelka et al 2006). פגמים כאלה במוליכות סינפטית מובילים, קרוב לוודאי, להפרעות קוגניטיביות והתנהגותיות כגון אלו הנראות בתסמונת רט. כדוגמא לכך עכברים מוטנטיים ב *Mecp2* מראים ירידה משמעותית בלמידה וזיכרון במבחנים מסויימים וכן ירידה באינטראקציות חברתיות.

ההכרות החדשות לגבי תפקוד MeCP2 במודל העכברי הביאו לניסיונות לתקן את הפגם ב *MECP2* באמצעות מספר גישות. אחת הראשונות הייתה באמצעות עכברים טרנסגניים עם מוטציה ב *Mecp2* (Chen et al 2001) שלתוכם הוחדר בנוסף, גם *MECP2* תקין הנמצא תחת בקרה פוסטננטלית. למורת הרוח, נמצא שביטוי יתר של *MECP2* אפילו ברמה של עד פי 2, גורם להפרעות עצביות שונות מתסמונת רט אך חמורות לא פחות (Collins et al 2004, Luikenuis et al 2004). לאחרונה הוצע להשתמש בהעלאת רמת BDNF שבהיותו במורד המסלול, עשוי לפצות על חסר של MeCP2. אכן, נמצא כי השראת ביטוי *BDNF* בעכברים מוטנטיים ב *MECP2* גורמת להתחלה מאוחרת והתקדמות מואטת של המחלה (Chang et al 2006). לפיכך הועלה רעיון לטפל בחולות רט מוקדם ככל האפשר בליתיום או תרופות נוגדות דיכאון שמעלות רמות BDNF (Tsai 2006), על מנת להשיג בהן אפקט שיפור דומה. בימים אלו מתוכנן ניסוי קליני ייחודי וחדשני, בשיתוף פעולה עם ד"ר ברוריה בן זאב ממרפאת נוירולוגית ילדים, המשלב מתן תרופות נוגדות דיכאון ומעקב קליני אחר חולות רט מהעוקבה הישראלית.

חולות רט שאופיינו במסגרת מחקר זה זוכות כיום לטיפול ומעקב רפואי רב תחומי במסגרת המרכז הארצי לתסמונת רט שפועל במרכז הרפואי ע"ש שיבא בשיתוף פעולה עם האגודה הישראלית של משפחות תסמונת רט. הודות להישגי העבודה בתחום זיהוי המוטציות, זוכות המשפחות לייעוץ גנטי מושכל ולאבחון טרום לידתי. פעולת המרכז המשולב והצגת ממצאי עבודה זו בפורומים קליניים וציבוריים הביאו לעליית המודעות לנושא תסמונת רט בקרב קלינאים ומשפחות, שהתבטאה בעליה חדה במספר ההפניות במהלך העבודה. בשנה האחרונה גדל מספר הפניות של ילדות צעירות בגילאי שנה-שנתיים, מה שיכול להעיד על עליה במודעות הקלינאים לתסמינים הראשוניים של המחלה ואפשרות הגילוי המוקדם. כמו כן עלתה ההכרה הממסדית בחשיבות האבחון הגנטי של החולות החשודות לתסמונת רט ועלה מספר המקרים שבהם נתמכת הבדיקה הגנטית במימון קופות החולים. אנו תקווה שישום לקחי מחקר זה בתחום האבחון הגנטי, יאפשר לייעל את הבדיקה במושגי זמן ועלות, ויקדם את הכללת הבדיקה בסל הבריאות הממשלתי. מעבר לפאן הטיפולי, עשויה העוקבה המאופיינת היטב שנאספה במהלך עבודה זו, להוות מצע לפיתוח מחקרים נוספים בנושאים בסיסיים וישומיים בתחום תסמונת רט ו *MECP2*, שחלקם כבר מתבצעים בימים אלו.

ו. רשימת מקורות

ספרות מקצועית

- Aber KM, Nori P, MacDonald SM, Bibat G, Jarrar MH, Kaufmann WE. 2003. Methyl-CpG-binding protein 2 is localized in the postsynaptic compartment: an immunochemical study of subcellular fractions. *Neuroscience*, **116**:77-80
- Abuhatzira L, Makedonski K, Petel Galil Y, Gak E, Ben Zeev B, Razin A, Shemer R. 2005. Splicing mutation associated with Rett syndrome and an experimental approach for genetic diagnosis. *Hum Genet*, **118**: 91–98
- Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. 1992. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *American Journal of Human Genetics*, **51**: 1229-1239
- Amano K, Nomura Y, Segawa M, Yamakawa K. 2000. Mutational analysis of the *MECP2* gene in Japanese patients with Rett syndrome. *Journal of Human Genetics*, **45**:231-236.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders DSM-IV. 4th ed. rev. Washington, DC: APA; 2002.
- Amir RE, Fang P, Yu Z, Glaze DG, Percy AK, Zoghbi HY, Roa BB, Van den Veyver IB. 2005. Mutations in exon 1 of *MECP2* are a rare cause of Rett syndrome. *Journal of Medical Genetics*, **42**: e15
- Amir RE, Van den Veyver IB, Schultz R, Malicki DM, Tran CQ, Dahle EJ, Philippi A, Timar L, Percy AK, Motil KJ, Lichtarge O, Smith EO, Glaze DG, Zoghbi HY. 2000. Influence of mutation type and X chromosome inactivation on Rett syndrome phenotypes. *Annual Neurology*, **47**: 670-679
- Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. 1999. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nature Genetics* **23**: 185-188

- Amrani N, Sachs MS, Jacobson A. 2006. Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**:415-425
- Archer HL, Whatley SD, Evans JC, Ravine D, Huppke P, Kerr A, Bunyan D, Kerr B, Sweeney E, Davies SJ, Reardon W, Horn J, MacDermot KD, Smith RA, Magee A, Donaldson A, Crow Y, Hermon G, Miedzybrodzka Z, Cooper DN, Lazarou L, Butler R, Sampson J, Pilz DT, Laccone F, and Clarke AJ. 2006. Gross rearrangements of the *MECP2* gene are found in both classical and atypical Rett syndrome patients. *Journal of Medical Genetics*, **43**: 451 - 456
- Ariani F, Mari F, Pescucci C, Longo I, Bruttini M, Meloni I, Hayek G, Rocchi R, Zappella M, Renieri A. 2004. Real-time quantitative PCR as a routine method for screening large rearrangements in Rett syndrome: Report of one case of *MECP2* deletion and one case of *MECP2* duplication. *Human Mutations*, **24**: 172-177
- Armstrong DD. 2001. Rett syndrome neuropathology review 2000. *Brain and Development, Suppl 1*: S72-S76
- Asaka Y, Jugloff DG, Zhang L, Eubanks JH, Fitzsimonds RM. 2005. Hippocampal synaptic plasticity is impaired in the *MECP2*-null mouse Rett syndrome. *Neurobiology diseases*, **21**: 217-227
- Ausio J, Levin DB, de Amorim GV, Bakker S, Macleod PM. 2003. Syndromes of disordered chromatin remodeling. *Clinical Genetics*, **64**: 83-95
- Baek D and Green P. 2005. Sequence conservation, relative isoform frequencies, and nonsense-mediated decay in evolutionarily conserved alternative splicing. *PNAS*, **102**: 12813–12818
- Ballas N, Grunseich C, Lu DD, Speh JC, and Mandel G. 2005. REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell*, **121**: 647-657
- Ballas N, Mandel G. 2005. The many faces of REST oversee epigenetic programming of neuronal genes. *Curr Opin Neurobiol*, **15**: 500-506

- Balmer D, Arredondo J, Samaco RC, LaSalle JM. 2002. *MECP2* mutations in Rett syndrome adversely affect lymphocyte growth, but do not affect imprinted gene expression in blood or brain. *Human Genetics*, **110**: 545-552
- Bapat S, Galande S. 2005. Association by guilt: identification of *DLX5* as a target for *MECP2* provides a molecular link between genomic imprinting and Rett syndrome. *Bioessays*, **27**: 676-680
- Bauman ML, Kremer TL, Arin DM. 1995. Pervasive neuroanatomic abnormalities of the brain in three cases of Rett's syndrome. *Neurology*, **45**: 1581-1586
- Ben Zeev B, Yaron, Y, Schanen C, Wolf H, Brandt N, Ginot N, Shomrat R, Orr-Urtreger A, 2002. Rett syndrome: clinical manifestations in males with *MECP2* mutations. *Journal of Child Neurology*, **17**: 20-24
- Beyer KS, Blasi, Bacchelli E, Klauck SM, Maestrini E, Poustka A. 2002. Mutation analysis of the coding sequence of the *MECP2* gene in infantile autism. *Human Genetics*. **111**: 305 - 309
- Bienvenu T, Carrie A, de Roux N, Vinet MC, Jonveaux P, Couvert P, Villard L, Arzimanoglou A, Beldjord C, Fontes M, Tardieu M, Chelly J. 2000. *MECP2* mutations account for most cases of typical forms of Rett syndrome. *Human Molecular Genetics*, **9**: 1377-1384
- Black DL and Grabowski PJ. 2003. Alternative pre-mRNA splicing and neuronal function. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, **31**: 187-216
- Bourdon V, Philippe C, Bienvenu T, Koenig B, Tardieu M, Chelly J, Jonveaux P. 2001a. Evidence of somatic mosaicism for a *MECP2* mutation in females with Rett syndrome: diagnostic implications. *Journal of Medical Genetics*, **38**: 867-871
- Bourdon V, Philippe C, Labrune O, Amsallem D, Arnould C, Jonveaux P. 2001b. A detailed analysis of the *MECP2* gene: prevalence of recurrent mutations and gross DNA rearrangements in Rett syndrome patients. *Human Genetics*, **108**: 43-50

- Buschdorf JP, and Startling WH. 2004. A WW domain binding region in methyl-CpG-binding protein *MECP2*: Impact on Rett syndrome and controls. *Journal of Molecular Medicine*, **82**: 135-143
- Busque L, Mio R, Mattioli J, Brais E, Blais N, Lalonde Y, Maragh M, Gilliland DG. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. 1996. *Blood*, **88**: 59-65
- Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer A. R.; 2003. ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers, *Nucleic Acid Research*, **31**: 3568-3571
- Chang Q, Khare G, Dani V, Nelson S, and Jaenisch R. 2006. The disease progression of *MECP2* mutant mice is affected by the level of *BDNF* expression. *Neuron*, **49**: 341–348
- Charman T, Neilson TC, Mash V, Archer H, Gardiner MT, Knudsen GPS, McDonnell A, Perry J, Whatley SD, Bunyan DJ, Ravn K, Mount RH, Hastings RP, Hulten M, Ørstavik KH, Reilly S, Cass H, Clarke A, Kerr AM, and Bailey MES. 2005. Dimensional phenotypic analysis and functional categorisation of mutations reveal novel genotype–phenotype associations in Rett syndrome. *European Journal of Human Genetics*, **302**: 826–830: 1-10
- Cheadle JP, Gill H, Fleming N, Maynard J, Kerr A, Leonard H, Krawczak M, Cooper DN, Lynch S, Thomas N, Hughes H, Hulten M, Ravine D, Sampson JR, and Clarke A. 2000. Long-read sequence analysis of the *MECP2* gene in Rett syndrome patients: correlation of disease severity with mutation type and location *Hum. Molecular Genetics*, **9**: 1119-1129
- Chen RZ, Akbarian S. 2001. methyl-CpG binding protein -2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nature Genetics*, **27**: 327-331
- Chen WG, Chang Q, Lin Y, Meissner A, West AE, Griffith EC, Jaenisch R, Greenberg ME. 2003. Derepression of *BDNF* transcription involves calcium-dependent phosphorylation of *MECP2*. *Science*, **302**: 885-889
- Christodoulou J and Weaving LS. 2003. *MECP2* and beyond: Phenotype-Genotype Correlations in Rett Syndrome. *Journal of Child Neurology*, **18**: 669-675

- Cohen D, Lazar G, Couvert P, Desportes V, Lippe D, Mazet P, Heron D. 2002. *MECP2* mutation in a boy with language disorder and schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, **159**: 148-149
- Collins AL, Levenson JM, Vilaythong AP, Richman R, Armstrong DL, Nobles JL, Sweatt DJ, Zoghbi HY. 2004. Mild overexpression of *MECP2* cause a progressive neurological disorder in mice. *Human Molecular Genetics* **13**: 2679-2689
- Collins AL, Levenson JM, Vilaythong AP, Richman R, Armstrong DL, Noebels JL, Sweatt J, Zoghbi HY. 2004. Mild overexpression of *MECP2* cause a progressive neurological disorder in mice. *Human Molecular Genetics*, **13**: 629-639
- Colvin L, Leonard H, de Klerk N, Davis M, Weaving L, Williamson S, Christodoulou J. 2004. Refining the phenotype of common mutations in Rett syndrome. *J Med Genet*, **41**: 25-30
- Cooper DN and Yussoufian H. 1988. The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Human Genetics*, **78**: 151-155
- Couvert P, Bienvenu T, Aquaviva C, Poirier K, Moraine C, Gendrot C, Verloes A, Andres C, Le Fevre AC, Souville I, Steffann J, des Portes V, Ropers HH, Yntema HG, Fryns JP, Briault S, Chelly J, Cherif B. 2001. *MECP2* is highly mutated in X-linked mental retardation. *Journal of Human Molecular Genetics*, **10**: 941-946
- Coy JF, Sedlacek Z, Bachner D, Delius H, Poustka A. 1999. A complex pattern of evolutionary conservation and alternative polyadenylation within the long 3'-UTR of the *MECP2* gene suggests a regulatory role in gene expression. *Human Molecular Genetics*, **8**: 1253-1262
- Dani VS, Chang Q, Maffei A, Turrigiano GG, Jaenisch R, Nelson SB. 2005. Reduced cortical activity due to a shift in the balance between excitation and inhibition in a mouse model of Rett syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**: 12560-12565
- De Bona C, Zappella M, Hayek G, Meloni I, Vitelli F, Bruttini M, Cusano R, Loffredo P, Longo I, Renieri A. 2000. Preserved speech variant is allelic of clasasic Rett syndrome. *European Journal of Human Genetics*, **8**: 325-330

- Delaunoy J, Abidi F, Zeniou M. 2001. Mutations in the X-linked RSK2 gene (RPS6KA3) in patients with Coffin–Lowry syndrome. *Human Mutations*, **17**: 103-116.
- Erlandson A and Hagberg B. 2005. *MECP2* abnormality phenotypes: clinicopathologic area with broad variability. *Journal of Child Neurology*, 20: 727-732
- Erlandson A, Samuelsson L, Hagberg B, Kyllerman M, Vujic M, Wahlstrom J. 2003. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) detects large deletions in the *MECP2* gene of Swedish Rett syndrome patients. *Genetic Tests*, 7: 329-332
- Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird A, Kouzarides T. 2003. The Methyl-CpG-binding protein *MECP2* links DNA methylation to histone methylation. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**: 4035-4039
- Fukuda T, Yamashita Y, Nagamitsu S, Miyamoto K, Jin JJ, Ohmori I, Ohtsuka Y, Kuwajima K, Endo S, Iwai T. 2005. Methyl-CpG binding protein 2 gene (*MECP2*) variations in Japanese patients with Rett syndrome: pathological mutations and polymorphisms. *Brain and Development*, **27**: 211-217
- Gibbons RJ, Picketts DJ, Villard L, Higgs DR. 1995. Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X linked mental retardation with alpha-thalassemia (ATR-X syndrome). *Cell*, **80**: 837-845
- Girard M, Couvert P, Carrie A. 2001. Parental origin of de novo *MECP2* mutations in Rett syndrome. *European Journal of Human Genetics*, **9**: 231-236
- Glaze DG. 2004. Rett syndrome: of girls and mice--lessons for regression in autism. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, **10**: 154-158
- Guy J, Hendrich B, Holmes M, Martin JE, Bird A. 2001. A mouse *MECP2*-null mutation cause neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nature Genetics*, **27**: 322-326
- Hagberg B and Skjeldal OH. 1994. Rett variants: a suggested model for inclusion criteria. *Pediatric Neurology*, 11: 5-11

- Hagberg B and Hagberg G. 1997. Rett syndrome: epidemiology and geographical variability. *European Child and Adolescent Psychiatry* **6**, Suppl 1: 5-7
- Hagberg B, Berg M, Steffenburg U. 2001. Three decades of sociomedical experiences from West Swedish Rett females 4–60 years of age. *Brain and Development*, **Suppl 1**: S28-31. Smeets E, Schollen E, Moog U, Matthijs G, Herbergs J, Smeets H, Curfs L, Schrandt-Stumpel C, Fryns JP. 2003. Rett syndrome in adolescent and adult females: Clinical and molecular genetic findings. *American Journal of Medical Genetics*, **122A**: 227-233
- Hagberg B, Hanefeld F, Percy A, Skjeldal O. 2002. An update on clinically applicable diagnostic criteria in Rett syndrome. Comments to Rett Syndrome Clinical Criteria Consensus Panel Satellite to European Paediatric Neurology Society Meeting, Baden Baden, Germany, 11 September 2001. *Eur J Paediatr Neurol* **6**: 293-297
- Hagberg B. 1985. Rett's syndrome: prevalence and impact on progressive severe mental retardation in girls. *Acta Paediatr Scand* **74**: 405-8
- Hagberg B. 2002. Clinical manifestations and stages of Rett syndrome. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, **8**: 61-65
- Ham AL, Kumar A, Deeter R, Schanen. 2005. Does phenotype predict phenotype in Rett syndrome? *Journal of Child Neurology*; **20**: 768-778
- Hansen SR, Wijmenga C, Luo P, Stanek AM, Canfield TK, Weemaes CMR, Gartler SM. 1999. The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *PNAS*; **96**: 14412 – 14417
- Hatakeyama C, Anderson CL, Beever CL, Penaherrea MS, Brown CJ, Robinson WP. 2004. The dynamics of X- inactivation skewing as women age. *Clinical Genetics*, **66**: 327-332
- Hendrich B, Bird A. 1998. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Molecular Cell Biology*, **18**: 6538-6547
- Hoffbuhr K, Devaney JM, LaFleur B, Sirianni N, Scacheri C, Giron J, Schuette J, Innis J, Marino M, Philippart M, Narayanan V, Umansky R, Kronn D, Hoffman EP, Naidu S. 2001. *MECP2*

- mutations in children with and without the phenotype of Rett syndrome. *Neurology*, **56**: 1486-1495
- Horike S, Cai S, Miyano M, Cheng JF, Kohwi-Shigematsu T. 2005. Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. *Nature Genetics*, **37**: 31-40
- Huppke P, Laccone F, Krämer N, Engel W, Hanefeld F. 2000. Rett syndrome: analysis of *MECP2* and clinical characterization of 31 patients. *Human Molecular Genetics*, **9**: 1369-1375
- Hyman BT, Augustinack JC, Ingelsson M, 2005. Transcriptional and conformational changes of the tau molecule in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, **1739**: 150-157.
- Johnston MV, Jeon O-H, Pevsner J. 2001. Neurobiology of Rett syndrome: a genetic disorder of synapse development. *Brain Development*, **23**: S206 –S213.
- Kaufmann WE, Jarrar MH, Wang JS, Lee YJM, Reddy S, Bibat G, Naidu S. 2005. Histone modifications in Rett syndrome lymphocytes: a preliminary evaluation. *Brain and Development*, **27**: 331-339
- Kemper TL, Bauman M. 1998. Neuropathology of infantile autism. *J Neuropathol Exp Neurol*, **57**: 645– 652.
- Kerr AM, Archer HL, Evans JC, Prescott RJ, Gibbon F. 2006. People with *MECP2* mutation-positive Rett disorder who converse. *Journal of Intellectual Disability Research*, **50**: 386-94
- Kerr AM, Stephenson JB. 1985. Rett's syndrome in the west of Scotland. *Br Med J (Clin Res Ed)* **291**: 579-82
- Kishi N and Macklis JD. 2004. *MECP2* is progressively expressively expressed in post-migratory neurons and is involved in neuronal maturation rather than cell fate decisions. *Molecular Cell and Neuroscience*, **27**: 306-321
- Klose R and Bird A. 2003. *MECP2* repression goes nonglobal. *Science*, **302**: 793 - 795

- Klose RJ, Sarraf SA, Schmiedeberg L, McDermott SM, Stancheva I, Bird AP. 2005. Binding Selectivity of *MECP2* due to a Requirement for A/T Sequences Adjacent to Methyl-CpG. *Molecular Cell*, **19**: 667-668
- Knudsen S, Neilson TCS, Pedersen J, Kerr A, Schwartz M, Hulten M, Bailey MES, and Ørstavik K. 2006. Increased skewing of X chromosome inactivation in Rett syndrome patients and their mothers. *European Journal of Human Genetic*, **advance online publication**.
- Kozinetz CA, Skender ML, MacNaughton N, Almes MJ, Schultz RJ, Percy AK, Glaze DG. 1993. Epidemiology of Rett syndrome: a population-based registry. *Pediatrics*, **91**: 445-450
- Kriaucionis S, Bird A. 2004. The major form of *MECP2* has a novel N-terminus generated by alternative splicing. *Nucleic Acids Research*, **32**: 1818-1823
- Kudo S, Nomura Y, Segawa M, Fujita N, Nakao M, Schanen C, Tamura M. 2003. Heterogeneity in residual function of *MECP2* carrying missense mutations in the methyl CpG binding domain. *Journal of Medical Genetics*, **40**: 487-493
- Laccone F, Junemann I, Whatley S, Morgan R, Butler R, Huppke P, Ravine D. 2004. Large deletions of the *MECP2* gene detected by gene dosage analysis in patients with Rett syndrome. *Human Mutations*, **23**: 234-244
- LaSalle JM, Goldsteine J, Balmer D, Greco CM. 2001. Quantitative localization of heterogenous methyl-CpG-binding protein 2 (*MECP2*) expression phenotypes in normal and Rett syndrome brain by laser scanning cytometry. *Human Molecular Genetics*, **10**: 1729-1740
- Laurvick CL, de Klerk N, Bower C, Christodoulou J, Ravine D, Ellaway C, Williamson S, Leonard H. 2006. Rett syndrome in Australia: a review of the epidemiology. *Journal of Pediatrics*; **148**: 347-352
- Lee SS, Wan M, Francke U. 2001. Spectrum of *MECP2* mutations in Rett syndrome. *Brain and Development* **23**: Suppl 1: S138-S143

- Lefebvre L, Viville S, Barton SC, Ishino F, Keverne EB, Surani MA. Abnormal maternal behaviour and growth retardation associated with loss of the imprinted gene Mest. *Nature Genetics* 1998; **20**: 163-169
- Leonard H, Bower C, English D. 1997. The prevalence and incidence of Rett syndrome in Australia. *Eur Child Adolesc Psychiatry* **6**, Suppl 1: 8-10
- Lettice, L.A., Heaney, S.J., Purdie, L.A., Li, L., de Beer, P., Oostra, B.A., Goode, D., Elgar, G., Hill, R.E. and de Graaff, E. 2003. A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fingers and is associated with preaxial polydactyly. *Human Molecular Genetics*, **12**: 1725–1735
- Liu J and Francke U. 2006. Identification of cis-regulatory elements for *MECP2* expression. *HumAN Molecular Genetics*, **15**: 1769-1782
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, **25**: 402-408
- Mari F, Azimonti S, Bertani I, Bolognese F, Colombo E, Caselli R, Scala E, Longo I, Grosso S, Pescucci C, Ariani F, Hayek G, Balestri P, Bergo A, Badaracco G, Zappella M, Broccoli V, Renieri A, Kilstrup-Nielsen C, Landsberger N. 2005. CDKL5 belongs to the same molecular pathway of *MECP2* and it is responsible for the early-onset seizure variant of Rett syndrome. *Human Molecular Genetics*, **14**: 1935 - 1946
- Masuyama T, Matsuo M, Jing JJ, Tabara Y, Kitsuki K, Yamagata H, Kan Y, Miki T, Ishii K, Masuyama Kondo I. 2005. Classic Rett syndrome in a boy with R133C mutation of *MECP2*. *Brain and Development*, **27**: 439-442
- Milani D, Pantaleoni C, D'arrigo S, Selicorni A, Riva D. 2005. Another Patient with *MECP2* Mutation Without Classic Rett Syndrome Phenotype. *Pediatric Neurology*, **32**: 355-357
- Miltenberger-Miltenyi G, Laccone F. 2003. Mutations and polymorphisms in the human methyl CpG-binding protein *MECP2*. *Human Mutations* **22**: 107-115

- Mnatzakanian GN, Lohi H, Munteanu I, Alfred SE, Yamada T, MacLeod PJ, Jones JR, Scherer SW, Schanen NC, Friez MJ, Vincent JB, Minassian BA. 2004. A previously unidentified *MECP2* open reading frame defines a new protein isoform relevant to Rett syndrome. *Nature Genetics*, **36**: 339-341
- Monros E, Armstrong J, Aibar E, Poo P, Canos I, Pineda M. 2001. Rett syndrome in Spain: Mutation analysis and clinical correlations. *Brain Development*, **23**(Suppl 1): S251-S253
- De Moor CH, Meijer H, Lissenden S. 2005. Mechanisms of translational control by the 3' UTR in development and differentiation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **16**: 49-58
- Moretti P, Zoghbi HY. 2006. *MECP2* dysfunction in Rett syndrome and related disorders. *Current Opinions in Genetics and Development*, **16**: 276-281
- Moretti P, Levenson JM, Battaglia F, Atkinson R, Teague R, Antalffy B, Armstrong D, Arancio O, Sweatt JD, and Zoghbi HY. 2006. Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome. *J Neurosci*. **26**: 319-327
- Morley M, Molony CM, Weber TM, Devlin JL, Ewens KG, Spielman RS, Cheung VG. 2004. Genetic analysis of genome-wide variation in human gene expression. *Nature*, **430**: 743-747
- Naidu S, Bibat G, Kratz L, Kelley RI, Pevsner J, Hoffman E, Cuffari C, Rohde C, Blue ME, Johnston MV. 2003. Clinical variability in Rett syndrome. *Journal of Child Neurology* **18**: 662-668
- Nan X, Meehan RR, Bird A. 1993. Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein *MECP2*. *Nucleic Acids Research*, **21**: 4886-4892
- Neul JL, Zoghbi HY. 2004. Rett syndrome: a prototypical neurodevelopmental disorder. *Neuroscientist*, **10**: 118-128
- Nicolao P, Carella M, Giometto B, Tavalato B, Cattin R, Giovannucci-Uzielli ML, Vacca M, Regione FD, Piva S, Bortoluzzi S, Gasparini P. 2001. DHPLC analysis of the *MECP2* gene in Italian Rett patients. *Human Mutations*, **18**: 132-140

- Nelson ED, Kavalali ET, and Monteggia LM. 2006. *MECP2*–dependant transcriptional repression regulates excitatory neurotransmission. *Current Biology*, **16**: 710-716
- Oleksiak MF, Churchill GA, Crawford DL. 2002. Variation in gene expression within and among natural populations. *Nature Genetics*; **32**: 261-265
- Pelka GJ, Watson CM, Radziewicz T, Hayward M, Lahooti H, Christodoulou J, and Tam PP. 2006. *Mecp2* deficiency is associated with learning and cognitive deficits and altered gene activity in the hippocampal region of mice. *Brain*, **129**: 887-898
- Percy A, Dragich J, Schanen N. 2003. Rett syndrome: clinical-molecular correlates, in Fisch G (ed): *Genetics and Genomics of Neurobehavioral disorders*. Totowa NJ, Humana press, 391-418
- Pescucci C, Meloni I, Brutini M, Arian F, Longo I, Mary F, Canitano R, Hayek G, Zappella M, Renieri A. 2003. Chromosome 2 deletion encompassing the *MAP2* gene in a patient with autism and Rell-like features. *Clinical Genetics*, **64**: 497-501
- Pescucci C, Meloni I, Renieri A. 2005. Is Rett syndrome a loss-of-imprinting disorder? *Nature Genetics*, **37**:10-11
- Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG. 1995. Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator, CBP. *Nature*, **376**: 348-351.
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, **339**: 62-66
- Ravn K, Nielsen JB, Skjeldal OH, Kerr A, Hulten M, Schwartz M. 2005. Large genomic rearrangements in *MECP2*. *Human Mutations*, **25**: e324
- Ravn K, Nielsen JB, Uldall P, Hansen FJ, Schwartz M. 2003. No correlation between phenotype and genotype in boys with a truncating *MECP2* mutation. *Journal of Medical Genetics*, **40**: e5 (<http://jmedgenet.com/cgi/content/full/40/1/e5>)

- Reichwald K, Thiesen J, Wiehe T, Weitzel J, Pouska WA, Rosenthal A, Platzer M, Startling WH, Kioschis P. 2000. Comparative sequence analysis of the *MECP2*-locus in human and mouse reveals new transcribed regions. *Mammalian Genome*, **11**: 182-190
- Sato K, Hashiyada M, Uehara S, Nata M, Okamura K. 2003. CpG dinucleotide methylation patterns in the human androgen receptor gene and X-chromosome inactivation in peripheral blood leukocytes of phenotypically normal women. *J Hum Genet*; 48: 374-9.
- Scala E, Ariani F, Mari F, Caselli R, Pescucci C, Longo I, Meloni I, Giachino D, Bruttini M, Hayek G, Zappella M, Renieri A. 2005. *CDKL5/STK9* is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms. *Journal of Medical Genetics*, **42**: 103-107
- Schanen C, Houwink EJJ, Dorrani N, Lane J, Everett R, Feng A, Cantor RM, and Percy A. 2004. Phenotypic Manifestations of *MECP2* mutations in classical and atypical Rett syndrome. *American Journal of Medical Genetics* **126A**: 129-140
- Shahbazian M, Young J, Yuva-Paylor L, Spencer C, Antalfy B, Noebels J, Armstrong D, Paylor R, and Zoghbi H. 2002. Mice with truncated *MECP2* recapitulated many Rett syndrome features and display hypermethylation of histone H3. *Neuron*, **35**: 243-254
- Shahbazian MD, Antalfy B, Armstrong DL, Zoghbi HY. 2002a. Insight into Rett syndrome: *MECP2* levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. *Human Molecular Genetics*, **11**: 115-124
- Shahbazian MD, Young J, Yuva-Paylor L, Zoghbi HY. 2002b. Mice with truncated *MECP2* recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. *Neuron*, **35**: 243-254.
- Shahbazian MD, Sun Y, Zoghbi HY. 2002c. Balanced X chromosome inactivation patterns in the Rett syndrome brain. *American Journal of Medical Genetics*, **11**: 164-168
- Shahbazian MD, Zoghbi HY. 2001. Molecular genetics of Rett syndrome and clinical spectrum of *MECP2* mutations. *Current Opinions in Neurology*, **14**: 171-176
- Sharp A, Robinson D, Jacobs P. 2000. Age and tissue specific variation of X chromosome

inactivation ratios in normal women. Human Genetics, **107**: 343-349

Shibayama A, Cook EH Jr, Feng J, Glanzmann C, Yan J, Craddock N, Jones IR, Goldman D, Heston LL, Sommer SS. 2004. *MECP2* structural and 3'-UTR variants in schizophrenia, autism and other psychiatric diseases: a possible association with autism. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, **128**: 50-3

Smeets, E, Terhal P, Casaer P, Peters A, Midro A, Schollen E, van Roozendaal K, Moog U, Matthijs G, Hagberg J, Smeets H, Curfs L, Schrander-Stumpel C, and Fryns JP. 2005. Rett syndrome in females with CTS hot spot deletions: a disorder profile. American Journal of Medical Genetics, **132A**: 117-120

Sorek R, and Ast G. 2003. Intronic sequences flanking alternatively spliced exons are conserved between human and mouse. Genome Research, **13**: 1631-1637

Stancheva I, Collins AL, Van den Veyver IB, Zoghbi H, Meehan RR. 2003. A Mutant Form of *MECP2* Protein Associated with Human Rett Syndrome Cannot Be Displaced from Methylated DNA by Notch in *Xenopus* Embryos. Molecular Cell, **12**: 425-435

Tao J, Van Esch H, Hagedorn-Greiwe M, Hoffmann K, Moser B, Raynaud M, Sperner J, Fryns JP, Schwinger E, Gecz J, Ropers HH, Kalscheuer VM. 2004. Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. American Journal of Human Genetics, **75**: 1149-1154

Trappe R, Laccone F, Cobilanschi C, Meins M, Huppke P, Hanefeld F, Engel W. 2001. *MECP2* Mutations in Sporadic Cases of Rett Syndrome Are Almost Exclusively of Paternal Origin. American Journal of Human Genetics, **68**: 1093-1101

Tudor M, Akbarian S, Chen RZ, and Jaenisch R. 2002. Transcriptional profiling of a model for Rett syndrome reveals subtle transcriptional changes in the brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99**: 15536-15541

- Van Esch H, Bauters M, Ignatius J, Jansen M, Raynaud M, Hollanders K, Lugtenberg D, Bienvenu T, Jensen LR, Gecz J, Moraine C, Marynen P, Fryns JP, Froyen G. 2005. Duplication of the *MECP2* region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males. *The American Journal of Human Genetics*, **77**: 442-453
- Villard L, Kpebe A, Cardoso C. 2000. Two affected boys in a Rett syndrome family: clinical and molecular findings. *Neurology*, **55**: 1188–1193
- Villard L, Levy N, Xiang F, Kpebe A, Labelle V, Chevillard C, Zhang Z, Schwartz CE, Tardieu M, Chelly J, Anvret M, Fontes M. 2001. Segregation of a totally skewed pattern of X chromosome inactivation in four familial cases of Rett syndrome without *MECP2* mutation: implications for the disease. *Journal of Medical Genetics*, 38:435-442.
- Wan M, Lee SS, Zhang X, Houwink-Manville I, Song HR, Amir RE, Budden S, Naidu S, Pereira JL, Lo IF, Zoghbi HY, Schanen NC, Francke U. 1999. Rett syndrome and beyond: recurrent spontaneous and familial *MECP2* mutations at CpG hotspots. *American Journal of Human Genetics* **65**: 1520-1529
- Wan M, Zhao K, Lee SS, Francke U. 2001. *MECP2* truncating mutations cause histone H4 hyperacetylation in Rett syndrome. *Hum Mol Genet*, **10**: 1085-1092.
- Watson P, Black G, Ramsden S, Barrow M, Super M, Kerr B, Clayton-Smith J. 2001. Angelman syndrome phenotype associated with mutations in *MECP2*, a gene encoding a methyl CpG binding protein. *Journal of Medical Genetics*, **38**: 224-228
- Weaving LS, Christodoulou J, Williamson SL, Friend KL, McKenzie OL, Archer H, Evans J, Clarke A, Pelka GJ, Tam PP, Watson C, Lahooti H, Ellaway CJ, Bennetts B, Leonard H, Gecz J. 2004. Mutations of *CDKL5* cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation. *American Journal of Human Genetics*, **75**: 1079-1093
- Weaving LS, Ellaway CJ, Gecz J, Christodoulou J. 2005. Rett syndrome: clinical review and genetic update. *Journal of Medical Genetics* **42**: 1-7

- Xiang F, Zhang Z, Clarke A, Joseluiz P, Sakkubai N, Sarojini B, Delozier-Blanchet CD, Hansmann I, Edstrom L, Anvret M. 1998. Chromosome mapping of Rett syndrome: a likely candidate region on the telomere of Xq. *J Med Genet*, **35**: 297-300
- Yang M, Li Y, Padgett RW. 2005. MicroRNAs: Small regulators with a big impact. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **16**: 387-393
- Yaron Y, Ben Zeev B, Shomrat R, Bercovich D, Naiman T, Orr-Urtreger A. 2002. *MECP2* mutations in Israel: implications for molecular analysis, genetic counseling, and prenatal diagnosis in Rett syndrome. *Human Mutations*, **20**: 323-324
- Young JI and Zoghbi HY. 2004. X-chromosome inactivation patterns are unbalanced and affect the phenotypic outcome in a mouse model of Rett syndrome. *American Journal of Human Genetics* **74**: 511-520
- Young JI, Hong EP, Castle JC, Crespo-Barreto J, Bowman AB, Rose MF, Kang D, Richman R, Johnson JM, Berget S, Zoghbi HY. 2005. Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**: 17551 - 17558
- Yu F, Thiesen J, Startling WH. 2000. Histone deacetylase independent transcriptional repression by methyl-CpG-binding protein 2. *Nucleic Acids Research*; **28**: 2201-2206
- Yusufzai TM, Wolffe AP. 2000. Functional consequences of Rett syndrome mutations on human *MECP2*. *Nucleic Acids Research*, **28**: 4172-4179
- Zappella M, Meloni I, Longo I, Hayek G, Renieri A. 2001. Preserved speech variants of the Rett syndrome: molecular and clinical analysis. *Am. J. Med. Genet.*, **104**: 14-22
- Zaho J, Hyman L, Moor C. 1999. Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation and interrelationship with other steps in mRNA synthesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **63**: 405-445

Zoghbi HY, Percy AK, Schultz RJ, Fill C. 1990. Patterns of X chromosome inactivation in the Rett syndrome. Brain and Development, **12**: 131-135

Zoghbi HY. 2003. Postnatal neurodevelopmental disorders: Meeting at the synapse? Science, **302**: 826-830

אתרים ברשת

Ensembl: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/mapview

National Center for Biotechnology information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

RettBase: <http://MECP2.chw.edu.au/MECP2/>

נספח א'

רשימת התחלים ששימשו לאמפליפיקציות של מקטעי PCR במחקר זה

Gene, domain	primer	Sequence (5' -3')	Tm (°C)	Product (bp)	Nt position
AR - Exon 1	AR-F	GCG AGC GCA GCA CCT CCC GGC G	55	173-201	664-685
	AR-R	CAG GTA GCC TGT GGG GCC TCT ACG AT	55		837-812
MECP2- Promoter and 5'UTR	Pro1F	CGT CAA TTG GCG AGA TTT CC	57	415	89380-89399
	Pro1R	GGC AGG CTC GGA TGA AAT AA	57		89795-89776
	Pro2F	TTC GGC AGA AGC AGC AGC AAA GT	57	750	
	Pro2R	TGA GGG TGA AAA CCA GCA GAT	57		90438-90418
MECP2-Exon 1	1F	GGG TCC ATT AAT CCT TAA CAT TCA A	53	385	89544-89520
	1R	GGC GAG CAC GGG TGA C	54		
MECP2-Intron1	In1aF	TTC CTG CTA GAT GGG GAA AG	57	643	88451-88470
	In1aR	AGG AGG AGA GAC TGT GAG TG	59		89094-89075
	In1bF	CAG AAA CAT TGC CAC TGC CAT A	58	638	87979-88000
	In1bR	GCA CTT CGC CTC CCG TC	60		88617-88601

* מיקום זוג התחלים הראשון הוא באקסון הראשון של הגן Androgen Receptor (GeneBank Accession number M23263.1) ומיקום שאר התחלים הוא ביחס לגן
MECP2 (GeneBank Accession number AF 030876.2)

Gene domain	primer	Sequence (5' -3')	Tm (°C)	Product (bp)	Nt position
<i>MECP2</i> - Intron 1	In1cF	AGC CAT GGA ACC CAA AAT TCT	56	661	87449-87469
	In1cR	GGG CAA GTT CAT CGC GAC	58		88110-88073
	In1dF	CAG GCA AGA AAA TAA AAG CAA GTG	58	550	87218-87241
	In1dR	GAC TCA TGG TCA GGC AGA TGT G	62		87768-87747
	In1iF	CCA GGG CTA TTT GGG ACA TTT	58	450	83843-83863
	In1iR	TGG TTT CCC TTG GTG CTG AT	58		84293-84274
<i>MECP2</i> -Exon 2	2F	GTT ATG TCT TTA GTC TTT GC	52	364	83513-83531
	2R	TGT GTT TAT CTT CAA AAT GT	48		83877-83858
<i>MECP2</i> -Intron 2	In2aF	CCA GTT CCG GCT CTA ATC TGA	61	349	83386-83406
	In2aR	GTC CCC AGA ATA CAC CTT	54		83735-83719
	In2bF	AGT CCA CAC AAT GGT GCC AAG T	62	565	82949-82971
	In2bR	ACT GTG CCA AAC TGT GCC AT	58		83514-83495
	In2hF	TTG CCG CTT TCC AAA CAT G	55	535	24563-24581
	In2hR	CTT TCC AAG CTG CCC CTG T	60		25134-25116

Gene domain	primer	Sequence (5' -3')	Tm (°C)	Product (bp)	Nt position
<i>MECP2</i> -Intron 2	In2iF	AAG TAT CAC AGA GAA CAT GCC AGT CTG C	68	763	24052-24081
	In2iR	AGG CCA TTC CTC ATC AGG GAA CAT	65		24815-24792
<i>MECP2</i> -Exon 3	3F	CAT TTT CCT GCT CCA TGA GG	58	458	24102-24082
	3R	CCT GCC TCT GCT CAC TTG TT	60		23605-23624
<i>MECP2</i> -Intron 3	In3aF	GGC CTG GTA CAG AAG GGT TGT CAG GCT G	63	604	23147-23174
	In3aR	AAG GCT GGA CAC GGA AGC T	60		23751-23733
	In3bF	TGG AGC TTT GGG AGA TTT GG	58	500	22754-22773
	In3bR	TGA GCA CCG TAC CTG AGT TCA	61		23254-23234
<i>MECP2</i> -Exon 4	4AF	TTT GTC AGA GCG TTG TCA CC	58		23022-23003
	4AR	CCT TCA CGG CTT TCT TTT TG	56		22432-22451
	4BF	ACC ACA TCC ACC CAG GTC AT	60		22582-22563
	4BR	ACC ACA TCC ACC CAG GTC AT	60		22582-22563
	4CF	GAG AAG AGC GGG AAA GGA CT	55		22312-22293
	4CR	CAG AGC CCT ACC CAT AAG GA	60		21759-21778

Gene domain	primer	Sequence (5' -3')	Tm (°C)	Product (bp)	Nt position
<i>MECP2</i> -3'UTR	U1F	AAA CAG AGA GGA GCC TGT GGA C	62	400	21893-21872
	U1R	AGT GTC CTC TCA ACT GCT CTG TC	62		21450-21472
	U2F	CTA CTG ACC AGA CAA GCT CTG	63	593	21552-21535
	U2R	CAG ACT GCT CTG AGT GAT TAG GAA T	61		20959-20983
	U3F	CTA GAG GCC ATG GAG GCA GTA G	64	532	21066-21045
	U3R	AAG AGA AGG GAT GAA CTA GGA AGG	61		20532-20555
	U4F	TTC ATT TCA TCC TTT CAC TTC TTT C	59	471	20597-20573
	U4R	TAG ACT CTG GAC TTC TGA GTG AGG T	63		20126-20150
	U5F	TAC TCT AGA GAA GTG GAC TGG AGG A	63	496	20269-20248
	U5R	CAT CTC TGT AAA CAC AGA AAA GGA T	58		19773-19797
	U6F	AAC CAT AGT TGA CAG TTC CAA TC	57	498	19526-19503
	U6R	AAG CAG CTC TGG ACA ATG ATT C	58		19028-19049
	U7F	TTA GTC AAA TGT AAT GTG GCT TCT G	58	494	19074-19048
	U7R	GAC ACA GCT GGT GAG AAT CCT G	62		18580-18601
	U8F	TTT TCT CTC TAT TTC CCC CTT TCT	58	490	18786-18763
	U8R	CAA TCC CAC TGG CTA TGA CAA G	60		18296-18317

Gene domain	primer	Sequence (5' -3')	Tm (°C)	Product (bp)	Nt position
<i>MECP2</i> , 3'UTR	U9F	CAC CCT TGT TCC AGT TGT TAG TTA C	61	536	18419-18395
	U9R	GAT TCT GTC AGC TAA AGA AAC TCC T	60		17883 -17907
	U10F	TAA TAA CCA GAC ACA AAC TGC CAA G	60	498	17944-17920
	U10R	GAG CAG AGA GAA GAG TAG GAA GAC C	65		17446-17470
	U11F	CAG CTCG TTT CTA GAG TTC CTA CCA T	61	474	17069-17091
	U11R	ATA CCA CTC CCA AAA GAC AGG TT	59		17543-17524
	U12F	TAA AAA TAC TTA GCA CTT GGC CTG A	58	498	17181-17157
	U12R	CAA ATT CCC CAA ATG TTC TTG A	55		16683-16704
	U13F	CTG GGA GGA AAT CCT ACC TTT GAA T	59	496	16230-16254
	U13R	CCT TGT CCT ATG CTA TGG TTA TCA G	61		16726-16705
	U14F	GAC CTG TTA AAA TTA TAC CTG TTG CTT	59	471	16294-16268
	U14R	GAC AGA GTG GGA AGG ATG AAA C	60		15823-15844
	U15F	CTG CTG AAG TCC GGA ACG TAG T	62	495	16011-15989
	U15R	CTC TCT GCT TTG GAA GAA GTT T	60		15516-15533
	U16F	AAT TGC ATT TGC TTT TGT AAT TCT T	53	464	15652-15627
	U16R	ATT TCA TGT CAG TCA GAA AAC ACG	58		15188-15211

Gene domain	primer	Sequence (5' -3')	Tm (°C)	Product (bp)	Nt position
	U17F	GTT CAG TGT TAG CAG TGG GTC AT	61	455	15338-15316
	U17R	CAA GTA AAG GGC AAA GAA GGA AG	59		14839-14861
	U18F	ACA CTG TAA CGT GTG CTG TGT TT	59	477	14896-14873
	U18R	GTT TTG CAG TGA CTT GGA AAG TG	59		14419-14441
	U19F	AAG CCG AAT AGC TGA TGT GTT G	58	471	13992-14014
	U19R	GTG ACA GCC AAG AGA GTG CAA G	62		14463-14442
	U20F	CTT CCC AGG GCA ATA AAA TGA C	58	497	13550-13575
	U20R	CAA AAC ACA AAA ACT GAA GGT GAA T	56		14047-14024

תחלים עם אי התאמות נקודתיות (mismatch)

תחל ליצירת אתר חיתוך ספציפי לאינזים הרסטריקציה BbSI בנוכחות השינוי c.824T>C (הממוקם בבסיס הבא במיקום 3' לתחל), באמצעות החלפת הבסיס המודגש:

5' - TTT TTT TTG GCT TTC TTT TTG GCC TCG GCG GCA GCG GCT GC**G** ACC -3'

תחלים ליצירת המוטציה c.863T>C (= p.V275A, c.824T>C) בפלסמיד עם MECP2_e1 באמצעות החלפת הבסיס המודגש:

forward primer: 5'-GAA AGC CGG GGA GTG TGG **C**GG CAG CCG CTG C -3'

Tm= 83°C

reverse primer: 5'-GCA GCG GCT GCC **G**CC ACA CTC CCC GGC TTT C -3'

Tm=86.9°C

Real Time PCR בריאקציות MECP2_e1 לתבחין

forward primer from exon 1: 5'-CGG AGG AGG AGG AGG A-3' Tm= 56°C

reverse primer from exon 3: 5'-GGA GGT CCT GGT CTT CTG ACT T-3' Tm= 64°C

נספח ב'

PAGE – Polyacrylamide Gel Electrophoresis של חלבונים אלקטרופורטית

מרכיבים להכנת שני ג'לים תחתונים בריכוז 15% בגודל 8X10 ס"מ, בעובי 1 מ"מ:

ddH ₂ O	3.4 ml
30% Acrylamide/BIS mix (29:1)	7.5 ml
1.5M Tris-HCl (pH 8.8)	3.8 ml
10% SDS	150 µl
10% ammonium persulfate	150 µl
TEMED	6 µl

התמיסה נוצקה לתבניות ג'לים מוכנות (Invitrogen) המותקנות אנכית במתקן ההרצה. מעל תמיסת הג'ל התחתון, נוספה תמיסת איזובוטנול ליישור פני הג'ל וספיחת הבועות. לאחר הקרשה בת כחצי שעה בטמפרטורת החדר, נוקזה תמיסת האיזובוטנול ונוצקה תמיסת הג'ל העליון.

מרכיבים להכנת שני ג'לים עליונים לתבניות 8X10 ס"מ בעובי 1 מ"מ:

ddH ₂ O	3.6 ml
30% Acrylamide/BIS mix (29:1)	1.3 ml
0.5M Tris-HCl (pH 6.8)	5 ml
10% SDS	100 µl
10% ammonium persulfate	50 µl
TEMED	10 µl

הג'ל העליון נוצק מעל הג'ל התחתון עד לקצה התבנית ובתוכו קובעו המסרקים. לאחר הקרשה בת כחצי שעה בטמפרטורת החדר, הוצאו המסרקים והבארות נשטפו בבופר הרצה.

הכנת בופר הרצה (SDS electrophoresis buffer) מרוכז פי 5

המרכיבים הבאים עורבבו באמצעות סטירר בטמפרטורת החדר. לאחר מכן נשמר בופר ההרצה ב 4°C עד חודש ימים.

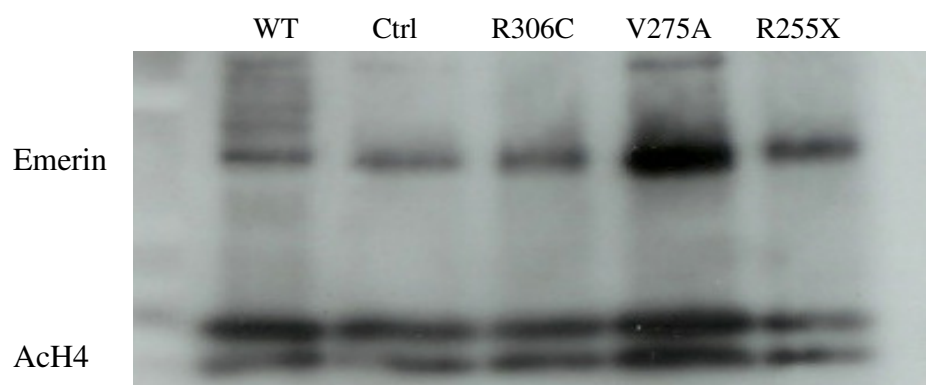
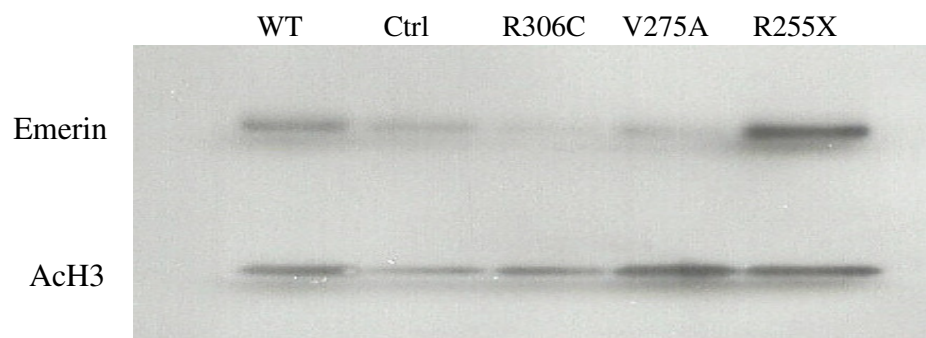
Tris base	15.1 g (0.125 M final)
Glycine	72 g (0.96 M final)
20% SDS	25 ml (0.5% final)
ddH ₂ O	975 ml

בופר טרנספר הורכב מ SDS electrophoresis buffer X 1/methanol ביחס של 4:1 בהתאמה.

נספח ג'

ניסוי ב': רמות היסטונים אצטיליים לעומת Emerin במערכות ביטוי שונות

אנליזת western של היסטונים אצטיליים כנגד emerin כחלבון ביקורת מדגימות חלבונים נוקלאריים שהופקו ממערכות ביטוי של: MeCP2 תקין (WT), ביקורת שלילית עם ווקטור (Ctrl), מערכות עם מוטציות חלף (p.R306C, p.A275A) ומערכת ביטוי של המוטציה הקוטענית p.R255X. תוצאות ניסוי זה הינן בלתי תלויות באלו של ניסוי א'.



ABSTRACT

Introduction and Objectives

Rett syndrome is a neurodevelopmental disorder characterized by cognitive impairment, communication dysfunction, microcephaly, growth failure and stereotypic hand movements, which in most cases become apparent during the first years of life. Rett primarily affects females and is sporadic in most cases with worldwide incidence of 1:10,000-15,000 female births. Atypical forms include forme fruste (FF), preserved speech variant (PSV), late regression variant, congenital form and early seizure onset (ES) variants. Additional clinical phenotypes have been assigned to *MECP2* mutations, among them Angelman-like phenotype, familial X-linked mental retardation, and autism in males.

From the genetic standpoint, Rett is an X-linked dominant disorder associated with defects of *MECP2* gene on chromosome Xq28. *MECP2* mutations were detected in about 80% of classical cases, most of which (about 65%) involve C>T transitions at specific CpG hot-spots and additional 10% involve small deletions at the 3'-end of the gene. The present thesis summarizes an ongoing effort of mutational analysis of an Israeli cohort of Rett patients exploiting the most updated molecular technologies, such as a complete sequencing of the *MECP2* gene including exon 1 that was previously considered untranslated, multiple ligation-dependent probe amplification (MLPA) for the detection of large rearrangements within the *MECP2* region and denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) of 3'UTR.

As *MECP2* is located on the X chromosome, another modulator of Rett phenotype is X chromosome inactivation (XCI) pattern. Preferential activation of the normal allele is one of the possible explanations of asymptomatic female carriers of Rett-causing mutations or those suffering from minor learning disabilities. The present thesis also includes characterizations of the Israeli patients regarding XCI status. Despite the implementation of these advanced approaches, about 15% of classical and more than 50% of atypical Rett cases still remained with no molecular indication of *MECP2* defect. The present thesis

suggests an additional approach to the molecular diagnosis of Rett based on the analysis of *MECP2* expression levels in patients' peripheral blood. In order to expose possible regulatory mutations, we developed a rapid and direct assay providing quantitative estimates of expression levels of both *MECP2*_e1 and _e2 transcription isoforms in peripheral blood, using Real-Time PCR and fluorescently labeled isoform-specific TaqMan probes. This approach could be potentially diagnostic in patients in whom no *MECP2* coding mutations have been previously detected. We preferentially implemented *MECP2* expression assays in a group of Israeli patients and some patients referred from abroad, in whom no *MECP2* mutations have been detected. In addition, *MECP2* expression assays were performed in some representative cases with *MECP2* missense and nonsense mutations, C-terminal deletions and large deletions.

In attempt to learn about the consequences of specific *MECP2* mutations, the present thesis includes a detailed study of phenotypes of patients with various *MECP2* mutations in the course of which we suggested an improved scoring scale for Rett phenotype. We also studied biochemical consequences of a specific novel missense mutation, p.A275V, located in the *MECP2* transcription repression domain (TRD). Being a transcriptional repressor, the *MECP2* gene product is located at the nucleus and has been demonstrated to affect the histones H3 and H4 acetylation levels resulting in more condense chromatin structure. We thus introduced the p.A275V mutation into transient expression systems in human cell lines and analyzed the localization and the amount of the mutated *MECP2*, and the levels of acetylated histones.

Methods

The Israeli Rett cohort includes 136 patients of whom 54 patients were diagnosed as classical and 28 patients as atypical Rett and 54 patients had partial presentation of Rett symptoms. *MECP2* mutation analysis was performed by means of direct sequence analysis of PCR fragments spanning *MECP2* promoter region (1.2kb upstream exon 1) and the entire coding region (exons 1-4). MLPA was employed for the detection of large deletions

spanning *MECP2* exons 1-4. The entire 3'UTR region was screened for the presence of possible mutations by means of DHPLC and direct sequencing of selected fragments. Inherited variations were ascertained as possible polymorphisms by screening of ethnically matched control subsets. Analysis of XCI pattern in peripheral blood was performed using the human androgen receptor (HUMARA) assay. Skewed XCI was considered significant as equal or higher than 75% in favor of the paternal or maternal X chromosome. Genotype-phenotype correlation included a phenotypic scale based on seven criteria considering the established Rett symptoms in girls above the age of 5 years. Statistical analyses of phenotypic scores associated with specific *MECP2* mutations were performed using SPSS software.

MECP2 expression assays were performed on the basis of total RNA extracts from peripheral blood samples of 15 patients with known *MECP2* mutations, 12 patients with no mutation findings and 12 normal female controls. Relative expression levels of *MECP2*_e1 and *MECP2*_e2 transcription isoforms were determined using TaqMan probes specific for both *MECP2* isoforms and RNaseP reference gene. Relative transcript number in the patient samples was determined according to ddCt method comparing between the patient's sample and the pooled sample of normal female controls. Functional studies of the novel p.A275V mutation were carried out in human osteosarcoma cell lines expressing the normal or the mutated *MECP2* product. Western analysis was employed in order to determine the levels of *MECP2* expression and levels of histones H3 and H4 acetylation using specific antibodies.

Results

Mutation analysis of the Israeli cohort yielded a novel missense mutation p.D151E at the methyl binding domain (MBD) and a novel inherited missense mutation p.V275A in the TRD that was discovered on the background of a reversely skewed XCI in the mother and the affected daughter. A novel p.E55fs57X early truncating mutation was discovered in a classical patient with maternally skewed XCI. In addition, we discovered a rare missense

p.K304E in a M.R female patient. Another rare GT deletion of intron 1 donor splice-site (c.62+1delGT) was detected in two unrelated patients. Our mutation detection rate has been estimated as 83% regarding classical cases (54) and 20% regarding atypical cases (28) predominantly with milder presentations. Most of the mutations (65%) occurred at the known CpG hot-spots, additional 8% consisted of microdeletions at the 3'-end of the gene and 5% were large deletions.

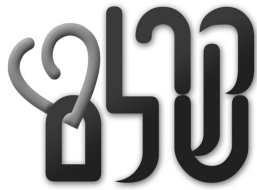
The question of genotype-phenotype correlation has been addressed in further analysis of patients with missense and truncating mutations over the age of 5 years, whose clinical diagnoses were scored according to the new severity scale. Missense mutations were associated with milder Rett phenotypes as compared to *MECP2* truncating mutations. Notwithstanding, differential analysis of specific *MECP2* missense mutations revealed that p.R106W and p.T158M were associated with more severe phenotypes than p.R133C and p.R306C mutations. Additional contribution of skewed XCI could be suggested, as patients with the same mutation and preferential activation of the maternal X, had less severe clinical presentations.

Analyses of quantitative expression of both *MECP2* isoforms in the peripheral blood indicated that *MECP2_e2* is 8 times more abundant than *MECP2_e1*, which is also consistent with other reports. While in the normal female controls *MECP2_e1* and *_e2* expression levels were relatively analogous, in patients with specific mutations *MECP2_e1* and *_e2* levels were lower. The regulatory mutations were related to significantly lower levels of both *MECP2* isoforms, large deletions had lower *MECP2_e2*, the nonsense mutations had slightly lower levels of both isoforms and missense mutations were comparable to the normal controls. Moreover using quantitative expression assays, we obtained evidence of possible *MECP2* mutations in patients with no previous mutation findings. We detected lower levels of both *MECP2* isoforms in three classical and three atypical patients, suggesting the presence of regulatory mutations or large deletions. One classical patient still had normal *MECP2* expression levels suggesting possible involvement

of other genes in Rett. Functional analyses of the p.V275A mutation in transient expression system indicated that this mutation had no effect on the nuclear localization or the amount of MeCP2 protein. We also did not detect any difference in the levels of H3 and H4 histone acetylation related to this mutation.

Discussion

This thesis presents our experience with molecular diagnosis of the Israeli cohort of Rett patients, including various analyses of *MECP2* gene on the genomic and expression levels. We could provide molecular diagnosis in 83% of the classical Rett cases and all PSV patients. Missense mutations in general were related to milder Rett phenotypes than truncating mutations. In the same way, skewed XCI in favor of the maternal, presumably normal, X chromosome contributed to milder manifestations of Rett. One of the important outcomes of this study is the establishment of the Israeli Rett Center where patients attend for clinical follow up and families can receive genetic counseling and prenatal diagnosis of future pregnancies. The major advance proposed in this thesis is the examination of *MECP2* expression levels in the peripheral blood of Rett patients. Using the quantitative expression assays, we could demonstrate that Rett patients with certain *MECP2* mutations had *MECP2* expression levels below the normal range, most significantly in the patients with the splicing mutation and deletions including 3'UTR. As quantitative expression assays were intended to resolve the diagnosis of patients with no previous mutation findings, we could demonstrate that in several classical and atypical patients the peripheral *MECP2* expression levels were consistent with the presence of possible mutations or deletion in the regulatory elements of *MECP2*. We propose that direct estimates of the peripheral *MECP2* expression levels could provide alternative indicators of the presence of yet unknown mutations in *MECP2* or other genes that produce *MECP2* deficiency.



מؤسسة "شاليم" | The Shalem Fund
لتطوير خدمات للأشخاص ذو
التخلف العقلي في السلطات المحلية | for Development of Services for People with
Intellectual Disabilities in the Local Councils
פיתוח שירותים לאדם עם מוגבלות שכלית
התפתחותית ברשויות המקומיות

TEL AVIV UNIVERSITY  אוניברסיטת תל-אביב

STUDY OF THE GENETIC BASIS OF RETT SYNDROME AS A MODEL FOR X LINKED MENTAL RETARDATION

Yael PETEL-GALIL

Supervised by: DR. EVA GAK, PROF. BOLSLAV GOLDMAN

Thesis submitted in partial fulfillment of the
Requirements for the "Doctor of Philosophy"

Tel Aviv University

Sackler School of medicine, graduate school

Department of human genetics and molecular medicine



This work was supported by a grant from Shalem Fund for
Development of Services for People with Intellectual Disabilities
In the Local Councils in Israel

2006

קרן שלם/2006/509