

# NEUROGENETIKAI VIZSGÁLATA AZ ÖRÖKLETES NEURPATHIÁKNAK A GENOMIKAI MEDICINA KORÁBAN

Doktori tézisek

**Dr. Milley György Máté**

Semmelweis Egyetem  
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Gál Anikó Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Nagy Dóra Ph.D.  
Jávorszky Eszter Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szabó Miklós Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Gunda Bence Ph.D., egyetemi adjunktus  
Báthori György Ph.D. tudományos mt.

Budapest  
2019

# BEVEZETÉS

A perifériás neuropathia alatt a környéki idegrendszer azon megbetegedését értjük, amelynél az idegrostok elemeinek – axon, myelinhüvely – károsodása alakul ki. Az idegkárosodás érintheti az izomerőt, az érzőkört illetve a különböző autonóm beidegzéssel bíró szervek működését is. Polyneuropathia esetében több ideg egyidejű érintettsége áll fenn, mely típusosan disztálisan alakul ki és szimmetrikus eloszlást mutat, fokozatos proximális irányú progresszióval jár együtt, és évtizedek alatt jelentősebb mozgáskorlátozottsághoz vezet.

Az örökletes szenzomotoros neuropathiában vagy Charcot-Marie-Tooth neuropathiában (CMT) a motoros és szenzoros idegek együttes érintettsége áll fenn, és gyakran figyelhető meg családi halmozódás. Előfordulási gyakoriságát tekintve a ritka megbetegedések közé sorolható, prevalenciája 1/2.500. A CMT viszonylagosan homogén klinikai megjelenéséhez változatos genetikai háttér társul.

Az örökletes neuropathiát okozó gének komplex élettani szereppel bírnak, és a CMT-s betegek fenotípusa gyakran társulhat bizonyos atípusos, más betegségekre jellemző tünetekkel, megnehezítve a CMT más betegségektől történő elkülönítését. Átfedést mutathat többek között a spinális muscularis atrophiával, örökletes spasticus paraplegiákkal, amyotrophiás lateral sclerosissal, vagy a mitokondriális betegségekkel. Gyakran bizonyos gének nagyobb valószínűséggel fordulnak elő bizonyos atípusos jellegekkel.

A betegek érintettsége, kórlefolyása akár ugyanazon családon belül is nagyban eltérhetnek. Ennek hátterében több faktor együttes szerepe feltételezhető, mint például az epigenetikai módosító hatások, környezeti faktorok, gén-gén interakciók, illetve különböző társbetegségek jelenléte. Mindezen hatásokat együttesen vizsgálva lehet megbízható prognózist nyújtani a betegség várható súlyosságával és lefolyásával kapcsolatban.

A CMT háttérben ismert négy leggyakoribb betegséget okozó gén a *PMP22*, a *GJB1*, *MPZ* és a *MFN2*, amelyek összességében az esetek körülbelül 70-90 százalékáért felelősek. A különböző gének előfordulási gyakorisága nagyban eltér egymástól attól függően, hogy milyen populációban, illetve etnikumban vizsgáljuk a mutációs frekvenciát. Az elmúlt évtizedben számos vizsgálat célozta meg, hogy egy általános stratégiát állítson fel a CMT genetikai vizsgálatának sorrendiségére, mindazonáltal ezek a törekvések részben voltak csak sikeresek. Ennek oka, hogy a vizsgált populációk jelentősen eltérő gyakorisági mintázatot mutattak, mely rávilágított arra, hogy a gyors és költséghatékony vizsgálatokhoz elengedhetetlenül fontos az egyes gének populációs gyakoriságának az ismerete.

A genetikai vizsgálat eredménye segíthet bizonytalan esetekben az örökletes neuropathia tényének megerősítésében, mely a betegek számára megnyugvást, bizonyosságot jelenthet. A multidiszciplináris terápiás lehetőségek javíthatnak a betegek életminőségén, segíthetnek a progresszió késleltetésben, megnyitja a kaput a későbbiekben a célzott terápiák alkalmazásának. A gyermekvállalás előtt álló párok pontos rizikóbecslést kaphatnak a genetikai tanácsadás során, és tájékozott döntést hozhatnak már a preconceptionális gondozás során, ha igényt tartanak rá lehetőség nyílik a prenatális diagnosztika elvégzésére is. A vizsgálatok során nyert adatok körültekintő értékelésével, statisztikai módszerek alkalmazásával pedig személyre szabott prognózis állítható fel a CMT-s betegeknél megkönnyítve a betegséggel történő megküzdést.

# CÉLKITŰZÉSEK

Jelen vizsgálatban magyarországi CMT-s betegek vizsgálatát céloztuk meg abból a célból, hogy azonosítsuk a betegség hátterében álló leggyakoribb genetikai variánsokat és meghatározzuk a fenotípus variabilitást, illetve az egyes gének okozta tünetek spektrumát. Munkánk során az alábbi célkitűzéseket fogalmazzuk meg:

1. A leggyakoribb neuropathia hátterében álló gének gének – *PMP22*, *GJB1*, *MPZ*, *MFN2*, *EGR2*, *CTDP1* and *NDRG1* – vizsgálata magyar betegekben.
2. A betegség tüneteinek és súlyosságának meghatározása a vizsgált kohorszban, és az újonnan azonosított patogén vagy nagy valószínűséggel patogén eltérések részletes leírása.
3. Különböző CMT alcsoportok genotípus-fenotípus korrelációjának a vizsgálata, különösképpen klinikailag jól karakterizált CMTX1 férfi és női betegekben.
4. Feltételezeten ritka variánsokkal érintett betegek azonosítása nagy áteresztőképességű szekvenálási technikákkal.

# MÓDSZEREK

A vizsgálatba 531 magyarországi örökletes neuropathiában szenvedő beteget vontunk be, melyből feltétezetten 55 beteg roma származású volt. Az újonnan azonosított eltéréseket 350 egészséges kontroll személyben is megvizsgáltuk eset-kontroll vizsgálat keretében.

## **Klinikai és elektrofiziológiai vizsgálatok**

A betegek rutinszerűen neurológiai vizsgálaton estek át, valamint általános és családi anamnéziséjük is felvételre került. Az elektrofiziológiai vizsgálatok standard technika alkalmazásával kerültek regisztrálásra felszíni elektródák segítségével, mely során szenzoros, motoros és kevert idegeket is vizsgáltunk. Amennyiben a betegeknél a klinikai és elektrofiziológiai vizsgálatok szenzomotoros neuropathiát igazoltak, valamint érintett családtagok is azonosíthatóak voltak, CMT-s betegekként tekintettünk rájuk. Hasonló tünetekkel érintett első-, és másodfokú rokonoknál feltételeztük, hogy ugyanazt a patogén variánst hordozzák, mint az index beteg. Családi halmozódást nem mutató neuropathiás betegeknél a szerzett neuropathia lehetősége minden esetben körültekintően kivizsgálásra került (metabolikus, toxikus, inflammatorikus, fertőzés okozta, valamint tumorhoz köthető polineuropathiák). További diagnosztikai vizsgálatok, amennyiben a klinikai kép azt szükségessé tette, elvégzésre kerültek. A betegség súlyosságát a CMT examination score segítségével határoztuk meg.

## **Genetikai vizsgálatok során alkalmazott módszerek**

A DNS vérből izoláltuk, és a *PMP22* gén mennyiségi változását MLPA metodikával vizsgáltuk, míg *GJB1* gén mennyiségi változását real-time PCR-ral ellenőriztük. A teljes kódoló régiót Sanger szekvenálással vizsgáltuk a *GJB1*, *MPZ*, *EGR2*, *MFN2*, *PMP22* gének esetében. A *CTDP1* és *NDRG1* gének hotspot variánsait PCR-RFLP segítségével vizsgáltuk. A target szekvenálás során egy saját tervezésű panelt használtunk, a szekvenálás pedig Illumina MiSeq platformon történt. Teljes exom vizsgálat a Miami Egyetem Hussman Intézetében történt HiSeq 2500 platformon a gyártó által megadott protokollok szerint történt.

### **In silico és statisztika analízis**

Az in silico analízishez a PolyPhen2, MutationTaster és SIFT szoftvereket használtuk. A talált eltérések jelentőségét a HGMD ([www.hgmd.cf.ac.uk](http://www.hgmd.cf.ac.uk)), dbSNP ([www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/)), ClinVar ([www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/)) és CMT adatbázisban (<http://www.molgen.ua.ac.be>) ellenőriztük. Az újonnan talált eltérések természetét az ACMG guideline-t követve határoztuk meg. Az újgenerációs szekvenálás során nyert adatokat az Agilent Surecall v2.1, a GEM.app, az Exomiser, az Alamut, valamint a VariantAnalyzer szoftverek segítségével elemeztük.

A csoportok összehasonlítása t-teszttel és Mann Whitney-U tesztekkel határoztuk meg, a százalékos értékeket pedig Chi négyzet próbával hasonlítottuk össze. A korrelációs vizsgálatok során Spearman és lineáris regressziós tesztet alkalmaztunk. A szignifikancia szintet  $p < 0,05$ -ben határoztuk meg. Az odds ratiót, valamint a 95%-os konfidencia intervallumot standard képlet alapján számítottuk ki.

# EREDMÉNYEK

## A CMT betegek genetikai és klinikai karakterisztikája

Az 531 vizsgált CMT betegből az elektrofiziológiai vizsgálatok alapján 409-et demyelinisatiós (CMT1), 122-t pedig axonális (CMT2) alcsoportba soroltuk. A családi anamnézis 148 esetben pozitív volt, míg 142 betegnél sporadikus megjelenés jellemző. Autoszomális domináns öröklődés 123 betegnél, X-hez kötött és recesszív öröklődés mindkét esetben 13 esetben azonosítottunk. CMT examination score és a CMT-hez kötött tünetek vizsgálatára 309 esetben nyílt lehetőség. Az CMTES átlaga a vizsgált betegeket tekintve  $8.9 \pm 4.3$  volt, a súlyosság pedig 0-tól 22-es pontszámig terjedt. A tünetek 69.3%-ban kezdődtek 30 éves kor előtt, de az első tünetek megjelenésének időpontja egészen 70 éves korig terjedt. Az örökletes neuropathiák klasszikus fenotípusától eltérő tüneteket a betegek 22.3%-ban találtunk az alábbi gyakorisági eloszlásban: központi idegrendszeri érintettség 7.8% (24 eset), VII-es, IX-es és XI-es agyidegek bénulása 5.2% (9, 4 és 3 esetben), kétoldali szenzorineurális hallásvesztés 4.9% (15 eset), immunológiai betegség 2.9% (9 eset), vegetatív idegrendszer érintettség 1.6% (5 eset), cataracta 1.3% (4 eset) és nervus opticus atrophia 0.7% (2 eset).

## A gyakori gének genetikai vizsgálatának eredménye

A vizsgált kohorszban összesen 267 CMT1 betegnél és 42 CMT2 betegnél sikerült azonosítani a betegség hátterébe álló genetikai eltérést. Összesen 318 betegnél nyertünk genetikai diagnózist, míg 213 esetén a patogén eltérést nem tudtuk azonosítani.

A teljes CMT kohorszt tekintve a leggyakoribb mutáció a *PMP22* (40.1%) génben fordult elő, melyet a *GJB1* (9,6%), *MPZ* (4,5%), *MFN2* (2,4%) *NDRG1* (1,5%), *EGR2* (0,8%) és *CTDPI* (0,8%) variánsai követték. Az *NDRG1* és *CTDPI* homozigóta founder mutációk a vizsgált Roma betegek 21,8%-ban volt jelen, nyolc, illetve négy esetben.

## **Az örökletes neuropathia klinikai képének és az érintett gének összehasonlítása statisztikai módszerek segítségével**

A betegek kora, a betegség megjelenésének ideje, valamint a fennállásának az időtartama nem különbözött szignifikánsan a vizsgált CMT alcsoportok között.

Spearman és a lineáris regressziós tesztek segítségével hasonlítottuk össze a teljes CMT kohorszt, a *PMP22*, *GJB1*, *MPZ* és *MFN2* mutációt hordozó beteg csoportjaival. Szignifikáns pozitív korreláció volt megfigyelhető a CMTES és az életkor valamint a CMTES és a betegség fennállásának időtartama között. A lineáris regressziós vizsgálat egy közepesen gyenge korrelációt tárt fel a CMTES és a betegség fennállásának időtartama között.

Összehasonlítva a teljes CMT kohorsszal, immunológiai megbetegedés *PMP22* duplikációnál, míg halláskárosodás az *NDRG1* mutációnál (75%) és *PMP22* duplikációnál fordult elő szignifikánsan gyakrabban. A központi idegrendszer érintettsége elsősorban a *GJB1* (37,5%) és *MFN2* (50%) mutációval érintett betegeknél fordult elő. A *GJB1* mutációval érintett férfi és női betegeket összehasonlítva klinikai megjelenésük szempontjából jelentős különbségek mutatkoztak. A betegség jellemzően férfiaknál korábbi életkorban kezdődött, tüneteik súlyosabbak voltak, és változatosabb fenotípust mutattak.

## **Újgenerációs szekvenálási eredményeink**

A vizsgált CMT2-es kohorszból 15 beteget választottunk ki további vizsgálatok céljából; 6 esetben teljes exom vizsgálatot, míg 9 betegnél target szekvenálást végeztünk. Egyik probandnál sem találtunk patogén eltérést a kutatás során vizsgált gyakori génekben. Az újgenerációs szekvenálás segítségével összesen öt betegnél (33%) sikerült patogén (*TRPV4*, *HINT1*) vagy nagy valószínűséggel patogén (*POLG*, *MME*) eltérést azonosítanunk.

### *TRPV4 c.806G>A patogén eltérés*

A *TRPV4* génben azonosított c.806G>A, p.R269H patogén variánst teljes exom vizsgálat során azonosítottuk egy két és fél éves kislánynál, akinek a tünetei 8 hónapos korában kezdődtek ügyetlenséggel valamint a motoros fejlődés elmaradásával. A



vizsgálat során distalisan kifejezett paresis és neurológiai vizsgálat alapján érintetlen érzőkör volt megfigyelhető. Az elektrofiziológiai vizsgálat súlyos motoros és diszkrét szenzoros axonális neuropathiát állapított meg. A szülőknél elvégzett hordozósági szűrés a mutáció de novo eredetét igazolta

#### *A POLG and MME eltérések együttes jelenlétének detektálása*

Exom szekvenálás segítségével azonosítottuk a *POLG* c.3244 G>A (p.A1082T) és az *MME* c.1946 T>C (p.L655P) missense nukleotid szubsztitúciók szimultán jelenlétét egy 35 éves beteg esetében. Az ACMG guideline alapján a *POLG* génben azonosított eltérés valószínűsíthetően patogénnek, az *MME* variáns pedig bizonytalan jelentőségű eltérésként értékelhető. A beteg izombiopsziás mintájából a mitochondrialis DNS deléciója 95%-os heteroplasmia aránnyal is megfigyelhető volt, mely a *POLG* kausatív szerepét támasztja alá. A betegnél közepesen súlyos, elsősorban az alsó végtagokat érintő szenzoros és motoros funkciók deprivációját okozó neuropathia volt megfigyelhető. Az elektrofiziológiai vizsgálat szenzomotoros axonális neuropathiát igazolt. A rendelkezésre adatok alapján a beteg esetében a neuropathia hátterében elsődlegesen a *POLG* gén állhat, míg az *MME* génben észlelt eltérés a betegség súlyosságát, esetleges társbetegség kialakulásának valószínűségét befolyásolja.

#### *HINT1 mutációval szövődött neuropathia és a neuromyotonia*

Három betegnél volt klinikailag megfigyelhető elhúzódó izomrelaxáció. A három beteg esetében kettőnél központi idegrendszeri érintettség (cerebellaris ataxia, illetve piramisjel) is előfordult, egy esetben pedig a scapularis izmokat érintő kifejezett paresis volt jelen. Target szekvenálás során kapott adatok értékelése során mind a három esetben homozigóta formában a *HINT1* gén patogén mutációját azonosítottuk (*HINT1*, c.110 G>C, (p.R37P). A *HINT1* mutációt hordozó betegeknél progresszív alsó- és felsővégtagi paresist, izomrelaxációs zavart, emelkedett CK szintet, mentális funkciózavart, valamint enyhe szenzoros érintettség figyeltünk meg. A betegség manifesztációját, relatív korai életkorban történő, 9 és 14 éves kor között jelentkező első klinikai tünetek jellemzik.

# KONKLÚZIÓ

Jelen kutatásunk az első átfogó genetikai epidemiológiai vizsgálat Magyarországon az örökletes neuropathiák témakörében. Összességében az elvégzett munka alapján az alábbi alábbi következtetésekre jutottunk:

1. Kiemelendő, hogy a gyakori gének vizsgálatával az esetek mintegy 60%-ban sikerült a háttérben álló genetikai eltérést azonosítanunk. Ez a találati arány hasonlóan mutatkozott a nemzetközi epidemiológiai vizsgálatoknál leírt eredményekkel. A betegeknél tett megfigyeléseink rávilágítanak arra, hogy egyes esetekben a klinikai kép alapján, akár a gyakori gének vizsgálatát megelőzően, érdemes alacsonyabb frekvenciájú géneket is megvizsgálni a nagy áteresztőképességű, újgenerációs szekvenálási metodikák alkalmazása előtt.
2. A vizsgált 531 beteg esetében kilenc új patogén és valószínűsíthetően patogén variánst azonosítottunk a *GJB1*, *EGR2* és *MPZ* génekben, mely tovább bővíti a CMT háttérében leírt patogén eltérések csoportját.
3. A betegek részletes klinikai vizsgálata és karakterizálása értékes adatokkal szolgál a célzott diagnosztikában és pontosabb prognózisban. A statisztikai vizsgálataink rámutattak, hogy a genotípus önmagában is erős prediktorként viselkedhet, de számos olyan környezeti és genetikai modifikátort is figyelembe kell venni, melyek mérése illetve azonosítása ma még problémát jelent.
4. Jelen kutatás számolt be elsőként arról, hogy milyen gyakorisággal fordulnak elő CMT-s betegeknél az örökletes neuropathiákra nem jellegzetes tünetek és jelek, illetve azzal kapcsolatban is megfigyeléseket tettünk, hogy az egyes klinikai tünetek bizonyos génekkel szignifikánsan gyakrabban fordulnak elő.
5. Az újgenerációs szekvenálási módszerek hatékonynak bizonyultak a sporadikus betegek és átfedő fenotípust mutató esetek felderítésében, ahol a gyakori gének vizsgálata nem vezetett eredményre.
6. A teljes exom vizsgálat segítségével három betegnél mutattuk ki a *HINT1* founder mutációnak is tekintett patogén eltérését, melyből két eset neuromyotoniával is társult. Ezek alapján a CMT genetikai vizsgálatának megtervezésénél figyelembe kell venni a *HINT1* mutáció lehetőségét célzott esetekben, tovább javítva a genetikai vizsgálat költséghatékonyságát, pontosságát és találati eredményességét.

# PUBLIKÁCIÓK

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

**Milley GM**, Varga ET, Grosz Z et al. Genotypic and phenotypic spectrum of the most common causative genes of Charcot-Marie-Tooth disease in Hungarian patients. *Neuromuscul Disord.* 2017;28(1):38-43 (2.612)

**Milley GM**, Varga ET, Grosz Z et al. Three novel mutations and genetic epidemiology analysis of the Gap Junction Beta 1 (GJB1) gene among Hungarian Charcot-Marie-Tooth disease patients. *Neuromuscul Disord.* 2016;26(10):706-711 (IF: 2.969)

A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk

Pentelenyi K, Remenyi V, Gal A, **Milley GM**, Csosz A, Mende BG, Molnar MJ: Asian-specific mitochondrial genome polymorphism (9bp deletion) in Hungarian patients with mitochondrial disease. *Mitochondrial DNA.* 2014 Sep 22:1-4 (IF: 1,701)

Kecskeméti N, Szönyi M, Gáborján A, Küstel M, **Milley GM**, Süveges A, Illés A, Kékesi A, Tamás L, Molnár MJ, Szirmai Á, Gál A.: Analysis of GJB2 mutations and the clinical manifestation in a large Hungarian cohort. *Eur Otorhinolaryngol.* 2018;275(10):2441-2448 (IF: 1.750)

**Cumulative impact factor: 7.331**