

# Az intergenomiális hatások és gén-környezet interakciók vizsgálata mitochondriális diszfunkció következtében kialakuló kórképekben

Doktori értekezés

**Pentelényi Klára**

Semmelweis Egyetem  
Szentágothai János Idegtudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Molnár Mária Judit, D.Sc. egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Borsy Adrienn, Ph.D. tudományos munkatárs  
Dr. Igaz Péter, D.Sc. egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Alpár Alán, D.Sc. egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Gyurján István, Ph.D. tud. munkatárs  
Dr. Kardon Tamás, Ph.D. egyetemi adjunktus

Budapest  
2016

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>I. Rövidítésjegyzék</b> .....	3
<b>II. Bevezetés</b> .....	8
II/1. A mitochondrium.....	8
II/2. A mitochondriális DNS .....	9
II/3. Intergenomiális kommunikációban szerepet játszó, jelen kutatásban vizsgált gének szerepe .....	11
II/4. MtDNS populációgenetikai jelentősége .....	15
II/5. A mitochondriális diszfunkció következtében kialakuló betegségek .....	16
II/5.1. Mitochondriális DNS betegségek .....	16
II/5.2. Nukleáris mitochondriális betegségek .....	18
II/5.3. Intergenomiális kommunikációs zavarok .....	18
II/5.4. Komplex betegségek mitochondriális diszfunkcióval .....	20
II/5.4.1. A mitochondrium szerepe a neurodegeneratív betegségekben .....	20
II/5.4.2. A mitochondrium szerepe a neurodevelopmentális betegségekben....	21
<b>III. Célkitűzések</b> .....	22
<b>IV. Módszerek</b> .....	23
IV/1. Vizsgált betegek .....	23
IV/1.1. Neurodegeneratív betegek .....	23
IV/1.2. Mitochondriális diszfunkciót mutató betegek .....	23
IV/1.2.1. Mitochondriális deléciós betegek .....	23
IV/1.2.1.1. Intergenomiális kommunikációs zavarok vizsgálatában rész vett betegek .....	24
IV/1.2.1.2. Autista betegek.....	24
IV/1.2.2. 9-bp deléciós betegek .....	25
IV/2. Alkalmazott módszerek.....	25
IV/2.1. PCR alapú metodikák (longPCR, PCR-RFLP) .....	25
IV/2.2. Real time PCR alapú metodikák.....	26
IV/2.3. Sanger szekvenálás .....	26
IV/2.4. Újgenerációs szekvenálás: NGS eredmények kiértékelése, validálás .....	28
IV/2.5. Statisztikai analízis .....	31
IV/2.6. Haplocsoport analízis .....	32

<b>V. Eredmények</b> .....	33
V/1. Alfa-ketoglutarát dehidrogenáz mutációk és a demencia kapcsolata .....	33
V/2. Intergenomiális kommunikációs zavarok (deléciós és depléciós szindrómák) vizsgálatai .....	36
V/2.1. Sanger szekvenálás eredményei.....	36
V/2.2. NGS eredmények .....	39
V/2.3. Autizmus spektrum betegségben a mitochondriális diszfunkció hatásának vizsgálata a betegség patomechanizmusában .....	46
V/3. A kelet-ázsiai antropológiai marker jelentősége .....	51
<b>VI. Megbeszélés</b> .....	53
VI/1. Az aKGDH deficiencia hátterében álló genetikai variációk és az Alzheimer-kór kapcsolatának vizsgálata .....	53
VI/2. A mitochondriális DNS és a nukleáris genom közötti kommunikációért felelős gének rendellenességei.....	54
VI/2.1 Az intergenomiális kommunikációért felelős gének Sanger szekvenálási eredményei .....	54
VI/2.2. Intergenomiális NGS eredmények megbeszélése mitochondriális páciensekben.....	55
VI/2.3. Az mtDNS deléció és az ASD összefüggései.....	58
VI/2.3.1. ASD-asszociált gének és az intergenomiális kommunikációban résztevő gének komplex elemzése a mitochondriális működéssel összefüggésben.....	59
VI/3. NGS-sel talált kérdéses, új mutációk jelentősége, besorolása .....	61
VI/4. A mtDNS 9-bp deléciójának klinikai jelentősége .....	62
<b>VII. Következtetések</b> .....	64
<b>VIII. Összefoglalás</b> .....	66
<b>IX. Summary</b> .....	67
<b>X. Irodalomjegyzék</b> .....	68
<b>XI. Saját publikációk jegyzéke</b> .....	78
<b>XII. Köszönetnyilvánítás</b> .....	80

## I. RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

AARS2	alanil-tRNS szintetáz
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
AD	Alzheimer disease (Alzheimer-kór)
ADI/ADOS	Autism Diagnostic Interview
ADP	adenozin-difoszfát
AHS	Alpers-Huttenlocher szindróma
aKGDH	alfa-ketoglutarát dehidrogenáz
ALS	amyotrophiás lateral sclerosis
<i>APEX1</i>	Apex nukleáz 1
AS	aminosav
ASD	autizmus spektrum betegség (autism spectrum disorder)
ASD-MD	autizmus spektrum betegség mitochondriális diszfunkcióval
ATP	adenozin-trifoszfát
<i>ATP5A1</i>	ATP-szintáz 5A1
BanII	Bacillus aneurinolyticus restrikciós endonukleáz
bp	bázispár
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
<i>c10orf2</i>	Twinkle (chromosome 10 open reading frame 2)
<i>c10orf65</i>	chromosome 10 open reading frame 65
CAG	citozin, adenin, guanin triplet
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát
CCD	charge-coupled device
CDR	clinical dementia rating
cGMP	ciklikus guanozin-monofoszfát
CIPO	krónikus intesztinális pseudo-obstrució
CMTII	Charcot-MarieTooth II
CMV	cytomegalovirus
CNS	központi idegrendszer (central nervous system)
CO <sub>2</sub>	szén-dioxid
CoA	koenzim A

CoA-SH	koenzim A - szulfhidril
COPD	krónikus obstruktív tüdőbetegség
cytB	citokróm B
<i>DARS2</i>	aszpartil-tRNA szintetáz 2
<i>DGUOK</i>	deoxyguanozin-kináz
<i>DLI</i>	dihidrolipoamid-dehidrogenáz
<i>DLST</i>	dihidro-lipoamid S-szukciniltranszferáz
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxi-nukleotid-trifoszfát
DSB	double strand binding
dsDNS	duplaszálú DNS
DSM-IV	Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders
<i>EARS2</i>	glutamil-tRNS szintetáz 2
<i>ERCC6</i>	excision repair cross-complementing 6
ex	exon
<i>FARS2</i>	fenilalanil-tRNS szintetáz 2
fw	forward
HP	heteroplazmia
GERD	gastrooesophagealis reflux
GFM1	mitochondrial elongation factor1
GI	gastro-intestinális
H	hidrogén
<i>HARS2</i>	hisztidil-tRNS szintetáz 2
HSP	herediter spasztikus paraparesis
<i>IARS2</i>	izoleucil-tRNS szintetáz 2
IOSCA	infantile-onset spinocerebellar ataxia
IVS	InterVening Sequence
KSS	Kearn-Sayre szindróma
LHON	Leber-féle herediter optikus neuropathia
<i>LRPPRC</i>	leucin-rich PPR motif-containing protein
MAF	minor allél frekvencia
<i>MARS2</i>	metionil-tRNS szintetáz 2

MD	mitochondriális betegség (mitochondrial disorder)
MELAS	mitochondriális encephalopathia laktátacidózissal és stroke-kal
MERRF	myoclonusos epilepszia ragged red rostokkal
<i>MFN2</i>	mitofusin 2
<i>MGME1</i>	mitochondrial genome maintenance exonuclease 1
MGMT	metilguanin-DNS-metiltranszferáz
<i>MICU1</i>	mitochondriális calcium uptake protein 1
<i>MICU2</i>	mitochondriális calcium uptake protein 2
MIRAS	mitochondriális recesszív ataxia szindróma
<i>MIRO</i>	RAS homolog gén
MNGIE	mitochondriális neurogastrointestinalis encephalopathia
<i>MPV17</i>	mitochondrial inner membrane protein
mRNS	messenger (hírvivő) ribonukleinsav
<i>MRPL3</i>	mitochondriális riboszomális protein L3
<i>MRPS</i>	mitochondriális riboszomális protein S
mtDNS	mitochondriális DNS
<i>MTFMT</i>	mitochondriális metionil-tRNS formiltranszferáz
<i>MTO1</i>	mitochondrial translation optimization
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
<i>MTPAP</i>	mitochondriális polyA polimeráz
MT-RNR1	12S rRNS
MT-TK	tRNS-lizin
MT-TL1	tRNS-leucin1
NAD/NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NARP	neuropathia ataxia retinitis pigmentosa
NCBI	National Center for Biotechnology Informatics
nDNS	nukleáris DNS
<i>NDPK</i>	nukleozid-difoszfát-kináz
NGS	next-generation sequencing (újgenerációs szekvenálás)
nt	nukleotid
OCD	obszesszív-kompulzív megbetegedés
<i>OFCC1</i>	orofacial candidate gene 1

<i>OGDH</i>	oxo-glutarát-dehidrogenáz
<i>OPA1</i>	optikus atrophia 1
orf	open reading frame
OXPPOS	oxidatív foszforilációs rendszer
PCR	polimeráz lánreakció (polymerase chain reaction)
PD	Parkinson disease (Parkinson-kór)
PEO	progresszív ophthalmoplegia externa
<i>POLG</i>	polimeráz gamma
<i>PUS1</i>	pseudouridin szintáz 1
Q30	quality score 30
QC	quality control
qPCR	quantity polymerase chain reaction
<i>RARS2</i>	arginil-tRNS szintetáz 2
recA	recombination protein A
rev	reverz
RFLP	restriction fragment length polymorphism
<i>RHOT</i>	RAS homolog gén
<i>RMND1</i>	required for meiotic nuclear division 1
ROS	reakív oxigén szabadgyök
<i>RRM2B</i>	ribonukleotid-reduktáz M2B
rRNS	riboszomális RNS
SANDO	sensoros ataxia neuropathia dysarthria és ophthalmoplegia
<i>SARS2</i>	szeryl-tRNS szintetáz 2
SCA	spinocerebellaris ataxia
<i>SCO1</i>	cytochrom-c oxidáz assembly protein
SLC	solute carrier family
SLOS	Smith-Lemli-Opitz-szindróma
SNP	single nucleotid polymorphism
SNV	single nucleotid variant
SPCH1	speech language disorder
SSDBP	single-strand DNA-binding protein
<i>SUCLA</i>	succinil-CoA ligáz

<i>TACO1</i>	translational activator of cyt-c oxidase
<i>TFAM</i>	mitochondriális transzkripció faktor A
TIA	transient ischaemic attack
<i>TK1</i>	timidin-kináz 1
<i>TK2</i>	timidin-kináz 2
TOR	target of rapamycin
Tm	anellációs hőmérséklet
<i>TRMU</i>	tRNA-5-methylaminomethyl-2-thiouridylate-methyltransferase
tRNS	transzfer RNS
<i>TSFM</i>	translation elongation factor
<i>TUFM</i>	Tu translation elongation factor
<i>TYMP</i>	timidin-foszforiláz
<i>TYMS</i>	timidilát-szintáz
<i>YARS2</i>	tirozil-tRNS szintetáz
UV	ultraibolya (ultra-violet)
vs	versus
<i>WARS2</i>	triptofanil-tRNS szintetáz 2



## II. BEVEZETÉS

### II/1. A mitochondrium

A mitochondrium a sejt energiatermelő szerve. Saját cirkuláris DNS-sel rendelkezik, mely maternálisan öröklődik, 18 559 bázispárból áll, 1239 aminosavat kódol. Összesen 37 génjéből 13 proteint kódol, 22 tRNS-t és 2 rRNS-t. A magtól független működésre az evolúció során képtelenné vált (Taylor és Turnbull 2005). A működéséhez szükséges proteineket a magi DNS kódolja: kb. 1000 mitochondriális proteint (ebből 74 fehérje az oxidatív foszforilációhoz szükséges, a többi mitochondriális membránfehérje, transzporterek, replikációs/transzkripció/transzlációs faktorok és riboszomális proteinek) (Wong 2010). A nukleáris DNS-ről átíródó fehérjék a citoplazmában szintetizálódnak és a mitochondriumba transzportálódnak. A mitochondrium fő feladata, hogy a tápanyagokból kémiai energiát nyer, az oxidatív foszforilációs (OXPHOS) rendszer segítségével ATP-vé konvertálva. Az oxidatív foszforilációt a légzési lánc enzimkomplexei végzik, melyek a mitochondrium belső membránjában helyezkednek el, elektronokat adnak át egymásnak a végső terminális oxidáció folyamatáig. A keletkező oxigénmolekula a redukált koenzimek hidrogén atomjaival reakcióba lépve vízzé alakul, mely folyamat nagy energia felszabadulással jár (hő és ADP/ATP átalakulás). Az OXPHOS I. komplexe, a Koenzim Q a NADH<sub>2</sub>-t oxidálja, mely során két elektron kerül át a II. komplexre és egy proton a mitochondrium mátrixába. A két elektron tovább vándorol az oxidoreduktív folyamatok során citokróm fehérjéken (III. komplex). A IV. komplexen oxigénből protonok és elektronok felvétele segítségével víz keletkezik. A légzési láncon áthaladó elektron energiája csökken, ez az energia arra fordítódik, hogy a protonok a mátrixból visszakerüljenek a két membrán közötti térbe. A protongrádienszt az V. komplex (ATP-szintáz) csökkenti, visszapumpálja a protonokat a mátrixba, az így keletkező energia ATP-szintézisére fordítódik.

A citrát- (Krebs-) ciklus enzimeit a mátrixban lokalizálódnak, mely során CO<sub>2</sub> keletkezik, míg a terminális oxidáció következtében víz. A két folyamat térben elkülönülten megy végbe (ez teszi lehetővé a jó hatásfokú energiahasznosítást), a hidrogénszállító koenzimek kapcsolják össze a reakciókat. A mitochondriumban

találhatóak az OXPHOS és a Krebs-ciklus enzimein kívül a zsírsav-, amino-/ketosav anyagcsere enzimein is.

## **II/2. Mitochondriális DNS**

A mitochondriális DNS (mtDNS) mutációi lehetnek csírvonal (germline, öröklődő) vagy szomatikus (testi, szerzett) mutációk. A szomatikus mutációkat nem örököljük, hanem mi halmozzuk fel sejtjeinkben az életünk során különböző okok miatt: megjelenhetnek spontán mutációk mutagén anyagok következményeképpen (sugárzás, kémiai vegyszerek, cigarettafüst stb.), illetve bizonyos daganatok és az öregedés eredményeképpen.

A mitochondriális betegségeket okozhatja mtDNS vagy nukleáris (nDNS) mutáció. A nDNS és mtDNS között nagyon szoros kommunikáció van. A mtDNS replikációjában és transzkripciójában szerepet játszó gének a nDNS-ben vannak kódolva, csak két rRNS (12S és 16S rRNS) genetikai kódja található a mtDNS-ben. A transzláció molekuláris résztvevői közül már nagyobb arányban találunk mitochondriumban kódoltakat (a legtöbb tRNS, és 13 légzési lánc fehérjekomponens), de a vezető szerepet itt is a mag vette át az evolúció során (Taylor és Turnbull 2005). Míg a mtDNS mutációk anyai öröklődést mutatnak, a nDNS defektusai AD, AR vagy X-hez kötötten öröklődnek. A mtDNS mutációs rátája 10-20x nagyobb, mint a nDNS-é, az oxidatív károsodásnak jobban ki van téve, mint a nDNS.

Szemben a magi DNS-sel, ahol a DNS hisztonokra tekeredve kromoszomális formát vesz fel, a mtDNS esetében hiányoznak a védő funkciót ellátó hisztonok, ami 10x magasabb mutációs rátához vezet (Shokolenko és mtsai 2009), ez a D-loop esetében 9000 év alatt 1%. A mtDNS károsodásnak többféle formája lehetséges (Alexejev és mtsai 2013): alkilációs, hidrolitikus, mismatch (replikációs hiba), DNS-szál törés és a leggyakrabban előforduló oxidatív károsodás. A mtDNS repair-rendszere fejletlenebb, mint a magi DNS-é, extrém érzékeny a szabadgyökök károsító hatására. Az első felfedezéseket ezzel kapcsolatban még 1974-ben tették, amikor azt tapasztalták, hogy a mitochondrium képtelen az UV-sugárzás okozta pirimidin dimerek kijavítására (Clayton és mtsai 1974). A mutációk sok esetben nem tudnak kijavítódni, hanem kiszelektálódnak. A magi fő direkt repair enzim az O(6)-metilguanin-DNS-

metiltranszferáz (MGMT), mely az O(6)-alkilguanin javítását végzi. A mitochondrium az O(6)-metil-2-deoxiguanozin és az O(6)-etil-2-deoxiguanozin javítására képes (Myers és mtsai 1988), azonban mitochondriális lokalizációjú MGMT-t nem tudtak kimutatni (Cai és mtsai 2005). Nukleotid excíziós repair funkciót és DSB (double-strand break) repairt nem írtak le a mitochondriumban, bázis excíziós és mismatch repair azonban jelen van (Alexejev és mtsai 2013). A magi DNS-szel szemben a mitochondriális genom redundáns, több 100-1000 kópiában van jelen a sejtben, így a „repair or die” elmélet itt nem szükségszerű, a károsodott mtDNS kópiákat kompenzálhatják a nagyobb arányban jelen lévő egészséges mtDNS-ek. Ez óriási különbség a nDNS-hez képest, ahol a DSB apoptózist aktivál. A mitochondriumoknak a különböző szövetekben való egyenlőtlen eloszlása, és a vad/mutáns mitochondriumok együttes jelenléte (heteroplazmia) miatt a manifesztálódó fenotípusok nagyon változatosak. Egy mitochondriumban a mtDNS több kópiában van jelen, és egy sejtben több mitochondrium van, így egy-egy sejtben több ezer kópiában van jelen a mtDNS (poliplazmia). A klinikai tünetek megjelenéséhez a mutált mtDNS-eknek el kell érnie egy küszöbértéket az adott szövetben (threshold effect), amikor elkezdődik a mtDNS degradáció (Levinger és mtsai 2004). A gyermekkori mitochondriális betegségek (MD) prevalenciát nehéz megbecsülni, mert a tünetek kezdete változó és széles spektrumot ölel fel a klinikai manifesztáció (könnyen összekeverhető egyéb adott szervrendszert érintő szimptomákkal). A diagnózisban az izombiopszia szövettani képe és a genetikai háttér lehet az orvosok segítségére.

A kettős genomi interakció tovább bonyolítja a helyzetet: nDNS mutációk további mtDNS mutációkat indukálhatnak. Egy amerikai vizsgálat 1:200-nak becsüli annak az esélyét, hogy valaki potenciálisan MD-t okozó patogén mutációt hordoz (Saneto és mtsai 2013).

A mitochondriális betegségek kb. 80%-a nukleáris defektus következtében alakul ki, ilyen esetekben általában súlyosabb a betegség, és korábban manifesztálódnak a tünetek (Chinnery és Hudson 2013). A mitochondriális betegségek egy külön csoportját alkotják a munkám során vizsgált intergenomiális kommunikációs zavarok, amikor a mtDNS minőségileg (egyes, többes deléciók) vagy mennyiségileg (depléció) károsodik. A háttérben a mtDNS replikációs, transzkripciós mechanizmusainak, ill. a mitochondrium integritásának károsodása áll.

A nukleáris és mitochondriális genom kölcsönös kommunikációja alapvetően szükséges a mitochondrium biogeneziséhez és működéséhez. Az intergenomiális szignalizáció meghibásodása (nDNS mutációk) másodlagosan károsítja a mtDNS-t (kvantitatív vagy kvalitatív módon), melynek következménye a csökkent oxidatív foszforiláció, csökkent energiatermelés.

A mitochondriális replikációban és repair-ben szerepet játszó gének: *POLG* (polimeráz gamma), *TWINKLE*, *MGME1*, *RAD51* a mitochondrium biogenezisében játszanak szerepet. A mitochondriális polimeráz gamma enzim bizonyos proteinek (helikáz, SSDBP: single-stranded DNA binding protein, topoizomeráz, iniciáló faktorok) segítségével replikálja a mtDNS-t. Ezen gének hibái instabilitást okoznak a mitochondriális genomban (Copeland 2014). A nukleotid-pool egyensúlyának fenntartása nélkülözhetetlen a mtDNS kópiaszám fenntartásában. A mitochondriumban található enzimek: *DGUOK* (deoxyguanozin-kináz), *TK2* (timidin-kináz 2), *NDPK* (nukleozid-difoszfát-kináz) és *SUCLA* (succinylCoA ligáz). A citoszolban található enzimek: *TYMP* (timidin-foszforiláz), *TK1* (timidin-kináz 1), *TYMS* (timidilát-szintáz), *RRM2B* (ribonukleotid-reduktáz), *MPV17* (mitochondrial inner membrane protein) (Molnár és Pentelényi 2015).

A kutatásaim során vizsgált gének funkcióját részletezem a következőkben.

### **II/3. Intergenomiális kommunikációban szerepet játszó, jelen kutatásban vizsgált gének szerepe**

Sok gén vesz részt a mitochondriális DNS transzkripciójában, translációjában, melyek közül néhány fontosabb gént volt lehetőségünk vizsgálni. Klinikai szerepét tekintve a legfontosabb a *POLG* (polimeráz gamma), mely a 15. kromoszómán helyezkedik el (23 exonból áll), a mitochondriális DNS polimeráz katalitikus alegységét (140kDa) kódolja, mely polimeráz és exonukleáz doménekből áll (15q22-26) (Kaguni 2004). A heterotrimer enzim katalitikus alegységén kívül 2 homodimer alegység is van, melyet a *POLG2* kódol. Kb. 90 mutációt írtak le ebben a génben (<http://tools.niehs.nih.gov/polg>). Ezen genetikai hibákhoz asszociált fenotípusok a következők: progresszív ophthalmoplegia externa (PEO, Lamanthea és mtsai 2002), mitochondriális recesszív ataxia szindróma (MIRAS), sensoros ataxia neuropathia dysarthria és ophthalmoplegia

(SANDO, Mancuso és mtsai 2004), Alpers-kór (Naviaux és mtsai 1999), mitochondriális neurogastrointestinális encephalopathia (MNGIE, Tzoulis és mtsai 2014), Parkinson-kór (Luoma és mtsai 2004). A tünetek változatossága családon belül is előfordulhat (Milone és mtsai, 2011).

A mtDNS polimeráznak fontos szerepe van az mtDNS stabilitásában. Compound heterozigóta mutációk - amennyiben különböző clustereket érintenek az enzimen - sokkal súlyosabb tüneteket produkálnak, korábbi betegség kezdetet eredményeznek. Farnum „clustering” metodikája alapján prediktálni lehet az új talált mutációk patogenitásának mértékét (Farnum és mtsai 2014), mely elősegíti az MD betegek diagnózisát. A *POLG2* a mtDNS polimeráz gamma 2 homodimer alegységét kódolja, a 17. kromoszómán lokalizálódik, 55kDa, mutációi leggyakrabban PEO-t okozhatnak (Young és mtsai 2011).

Az irodalmi mutációs előfordulási gyakoriságuk, valamint a talált eredmények alapján a következő géneket emelem ki. *TWINKLE* (*C10orf2*: 10-es kromoszóma open reading frame 2): hexamer DNS helikázt kódol, mely a dsDNS-t kis részekben széttekeri 5'-3' irányban. A polimeráz gammával és SSDBP-vel közösen kulcs szerepet tölt be a replikációban. A helikáz a mitochondriális mátrixban található, mutációi IOSCA-t, PEO-t, depléciót okozhatnak (Park és mtsai 2014).

*MGME1* (mitochondrial genom maintenance exonuclease 1) a mtDNS fenntartásáért felel, a 20. kromoszómán lokalizálódik (Kornblum és mtsai 2013). Katalitikus részének mutációja (Lys253Ala) a nukleáz aktivitást gátolja, felhalmozódik a 7S DNS, mely a D-loop egyszálú komponense, a mtDNS replikáció korai terminációját okozza.

Az *RRM2B* (ribonukleotid-reduktáz M2B alegység) a 8. kromoszómán kódolódik, a p53-indukálta ribonukleotid-reduktáz kis alegységét kódolja, mely egy heterotetramer enzim, a ribonukleozid-difoszfát/deoxyribonukleozid-difoszfát átalakulást katalizálja. A DNS szintézishez alapvetően szükséges molekula kialakulását szabályozza, mutációit autoszomális recesszív mitochondriális depléciós szindrómával, autoszomális domináns PEO-val (Tynismaa és mtsai 2009), mitochondriális neurogastrointestinális encephalopáthiával hozták összefüggésbe (Pontarin és mtsai 2012).

*TK2* (timidin-kináz 2) a 16. kromoszómán a deoxyribonukleozid-kinázt kódolja, mely a mitochondriumban lokalizálódik, feladata a timidin, deoxycitidin, deoxyuridin foszforilálása. Alapvetően szükséges a DNS szintézishez, mutációi depléciós szindrómát (myopathiás forma) okozhatnak. Alternatív splicing során keletkező izoformáiból hiányozhat a transitpeptid, mely következtében a kész fehérje nem szállítódik a mitochondriumba (Chanprasert és mtsai 2013). A *TK2* gén érintettségét deléció hátterében is leírták (Alston és mtsai 2013).

A mitochondriális fehérjeszintézis defektusainak hátterében aminoacil-tRNS-szintetáz (pl. *RARS2*, *DARS2*, *YARS2*), illetve elongációs faktorok (*TUFM*, *TSMF*) mutációi állhatnak. Az alábbi táblázatban foglaltam össze a munkám során újgenerációs szekvenálással vizsgált gének funkcióit (1. Táblázat).

1. Táblázat. Intergenomiális kommunikációban szerepet játszó, a kutatásomhoz kiválasztott 51 gén feladata

Gén	Teljes név	Funkció
<i>AARS2</i>	Alanyl-tRNA synthetase2	Ala-tRNS kapcsolódást katalizálja
<i>APEX1</i>	Apex nuclease1	Repair enzim
<i>ATP5A1</i>	ATP synthase	ADP/ATP transzport
<i>C10orf2</i>	Twinkle	Helikáz
<i>C12orf65</i>	C12 open reading frame 65	Fehérjék riboszómáról való leválását katalizálja
<i>DARS2</i>	Aspartyl-tRNA synthetase2	Asp-tRNA kapcsolódást katalizálja
<i>DGUOK</i>	Deoxyguanosine kinase	Purin dezoxiribonukleozidokat foszforilálja
<i>EARS2</i>	Glutamyl-tRNS synthetase2	Glu-tRNA kapcsolódást katalizálja
<i>ERCC6</i>	Excision repair cross-complementing6	Repair enzim
<i>FARS2</i>	Phenyl-alanyl-tRNS synthetase2	Phe-tRNS kapcsolódást katalizálja
<i>GFMI</i>	Mitochondrial elongation factor1	Transzláció során a riboszomális transzlokációt katalizálja
<i>HARS2</i>	Histidyl-tRNA synthetase2	His-tRNS kapcsolódást katalizálja
<i>IARS2</i>	Isoleucyl-tRNA synthetase2	Ile-tRNS kapcsolódást katalizálja
<i>LRPPRC</i>	Leucin-rich PPR motif-containing protein	Poszt-transzkripcionális génexpressziót regulálja
<i>MARS2</i>	Methionyl-tRNS synthetase2	Met-tRNS kapcsolódást katalizálja
<i>MFN2</i>	Mitofusin2	Mitochondriális fúziót szabályozza

<b>Gén</b>	<b>Teljes név</b>	<b>Funkció</b>
<i>MGME1</i>	Mitochondrial genome maintenance exonuclease1	MtDNS integritását tarja fent, repair enzim
<i>MICU1</i>	Mt calcium uptake protein1	Kálcium csatornát szabályozza
<i>MICU2</i>	Mt calcium uptake protein2	Kálcium csatornát szabályozza
<i>MIRO1/RHOT1</i>	RAS homolog gene1	Mitochondriális homeosztázis és apoptózisban játszik szerepet
<i>MIRO2/RHOT2</i>	RAS homolog gene2	Mitochondriális homeosztázis és apoptózisban játszik szerepet
<i>MPV17</i>	Mouse homolog of MPV17	Mitochondriális homeosztázist tartja fent stressz helyzetben
<i>MRPL3</i>	Mitochondrial ribosomal protein L3	Fehérjeszintézis
<i>MRPS16</i>	Mitochondrial ribosomal protein S16	Fehérjeszintézis
<i>MRPS22</i>	Mitochondrial ribosomal protein S22	Fehérjeszintézis
<i>MSTO1</i>	Misato1	Mitochondrium eloszlását és morfológiáját szabályozza
<i>MTO1</i>	Mitochondrial translation optimization	Fehérjeszintézis, tRNS modifikáció
<i>MTFMT</i>	Mitochondrial methionyl-tRNA formyltransferase	Met-tRNS-t formilálja
<i>MTPAP</i>	Mitochondrial polyA polymerase	PolyA farkat szintetizál a mitochondriális transzkriptek 3' végére
<i>POLG1</i>	Polymerase gamma1	MtDNS replikáció
<i>POLG2</i>	Polymerase gamma2	MtDNS biogenezis
<i>PUS1</i>	Pseudouridine synthase1	RNS struktúrák stabilitásáért felelős
<i>RAD51</i>	Recombination protein A (RECA)	Repair enzim
<i>RARS2</i>	Arginyl-tRNA synthetase2	Arg-tRNS kapcsolódást katalizálja
<i>RMND1</i>	Required for meiotic nuclear division1	Mitochondriális transzláció
<i>RRM2B</i>	Ribonucleotide reductase M2B	Ribonukleozid-PPi-ből dezoxiribonukleozid-PPi-t csinál
<i>SARS2</i>	Seryl-tRNA synthetase2	Ser-tRNS kapcsolódást katalizálja
<i>SCO1</i>	Cytochrome-c oxidase assembly protein	Légzési lánc
<i>SLC25A3</i>	Solute carrier family	Foszfát szállítás
<i>SLC25A4 / ANTI</i>	Solute carrier family	ADP-ATP transzlokáció
<i>SUCLA2</i>	Succinate-CoA-ligase	ATP-függő szukcinát-koenzimA - szukcinil-koenzimA átalakulást katalizálja
<i>SUCLG1</i>	Succinate-CoA-ligase	ATP/GTP- függő szukcinát-koenzimA - szukcinil-koenzimA átalakulást katalizálja
<i>TACO1</i>	Translational activator of cyt-c oxidase	Cyt-c oxidáz transzlációs aktivátora
<i>TFAM</i>	Transcription factor A mt	Transzkripciós faktor

Gén	Teljes név	Funkció
<i>TK2</i>	Thymidine-kinase2	Timidint foszforilál
<i>TRMU</i>	tRNA-5-methylaminomethyl-2-thiouridylate-methyltransferase	MtDNS tRNS-ek modifikáció
<i>TSFM</i>	Translation elongation factor	Transzláció
<i>TUFM</i>	Tu translation elongation factor	Transzláció
<i>TYMP</i>	Thymidine-phosphorilase	Timidin-szint fenntartás
<i>WARS2</i>	Tryptophanyl-tRNA synthetase2	Trp-tRNA kapcsolódást katalizálja
<i>YARS2</i>	Tyrosyl-tRNA synthetase2	Tyr-tRNA kapcsolódást katalizálja

#### II/4. MtDNS populációgenetikai jelentősége

A mtDNS bizonyos evolúciósan rögzült polimorfizmusainak, delécióinak populációgenetikai, antropológiai jelentősége van. A maternális öröklődés és a rekombináció hiánya miatt egy matriarchális családfát lehet felállítani a mtDNS D-loop szekvencia analízise alapján, visszavezetve az ősi afrikai “mitochondriális Éváig”. A 27 betűvel jelölt haplocsoport különböző földrajzi területekre jellemző, egymásból levezethetőek. A 9-bp deléció legmagasabb előfordulási gyakorisága DK-Ázsiában, Indonéziában és a csendes-óceáni térségben tapasztalható (Soodyall és mtsai 1996, Hertzberg és mtsai 1989), kiugró prevalencia értékkel a Nicobarese populációban Indiában: 45.8%. Thaiföldön, Taiwanban és Kínában az előfordulása 14 és 40% közötti (Liu és mtsai 2005). A többi földrészen (Ausztrália, Afrika és D-Amerika) kis mértékben, de jelen van a 9-bp deléció (Alves-Silva és mtsai 1999, Soodyall és mtsai 1996). Európában eddig csak három esetben írták le: két skót és egy spanyol egyénben (Thomas és mtsai 1998, Barrientos és mtsai 1995).



## **II/5. A mitochondriális diszfunkció következtében kialakuló betegségek általános ismérvei**

A mitochondriális betegségek prevalenciája (mtDNS és nDNS által meghatározott kórképek együttesen) 1:5000 (Schaefer és mtsai 2004), az érintettek 50%-a gyermek (5 év alatti). A multiszisztémás betegségek heterogén csoportját alkotják, főként a vázizom és az idegrendszer érintett. Mitochondriális károsodás esetén leginkább a nagy energiaigényű szövetek vannak nagy károsodásnak kitéve (agy, retina, izom, vese), ezért a mitochondriális betegségeket főleg neuromuszkuláris és metabolikus szervi manifesztáció jellemzik, megváltozik az apoptózis folyamata, „korai öregedésre” lehet számítani.

### **II/5.1. Mitochondriális DNS betegségek**

A mitochondriális mutációk változatos fenotípusokat eredményeznek. Egyetlen bázis cseréje adott pozícióban különböző tünet együtteseket tud okozni, míg sok esetben ugyanazt a fenotípust különböző pontmutációk is okozhatják (DiMauro és Davidson 2005).

A mitochondriális DNS mutációi érinthetik a protein kódoló géneket, mint az *MT-ND* (NADH dehidrogenáz) gének hibái LHON (Leber-féle hereditær optikus neuropathia) esetében (Howell és mtsai 1991, Wallace és mtsai 1998, Brown és mtsai 1992), vagy a *MT-ATP6* gén m.8993 T>G pontmutációja NARP (neuropathia, ataxia, retinitis pigmentosa) szindrómával társulva (Tatuch és Robinson 1993).

A patogén eltérés lokalizálódhat proteint nem kódoló génekben, mint a tRNS, rRNS gének. A leggyakrabban előforduló ilyen betegségek a MELAS (mitochondriális encephalopathia laktát-acidózissal és stroke-szerű tünetekkel), melynél m.3243 A>G mutáció az *MT-TL1* (tRNS leucin1) génben (Goto és mtsai 1990), a MERRF (myoclonusos epilepszia ragged red rostokkal) m.8344 A>G mutáció pedig az *MT-TK* (tRNS lizin) génben lokalizálódik. A gyakori tRNS mutációk következtében többféle fehérje működése is károsodhat. Egy pontmutáció sokféle tünetet okozhat önmagában is. Riboszomális RNS mutáció következtében manifesztálódik az amino-glikozid

indukálta süketség, az m.1555 A>G pontmutáció miatt az *MT-RNR1* (12S rRNS) génben.

A nagyobb átrendeződéseket (deléciók, inszerciók) korábban sporadikusnak tartották. A PEO, Kearns-Sayre szindróma (KSS), Pearson-szindróma a de novo common deléciók leggyakoribb fenotípusos megnyilvánulási formája. A Kearns-Sayre szindróma krónikus progresszív külső szemizombénulással, ataxiával, retinitis pigmentosával és ritmuszavarokkal jár. A Pearson-szindróma jellegzetességei: pancreas diszfunkció és súlyos vashiányos anaemia (a vas nem tud beépülni a protophorphyrin vázba és felhalmozódik a mitochondriumban, következménye a malabszorpciós szindróma: felszívódási zavarok, fejlődésbeni lemaradás). A PEO a külső szemizom gyengesége, legjellemzőbb tünete a ptosis, de egyéb izmokban is jelentkezhet a myopathia. A PEO megjelenhet egyéb mitochondriális betegségek részjelenségeként is. Hátterében leggyakrabban, de nem kizárólagosan mitochondriális tRNS mutáció vagy különböző intergenomiális kommunikációban szerepet játszó gének mutációi állhatnak, aminek következtében a betegség maternális vagy autoszomális domináns/recesszív öröklésmenetet is mutathat.

A mtDNS mutációinak sok esetben farmakogenetikai jelentősége is van, bizonyos gyógyszerekre érzékenyen reagálhat az adott SNV-t (single nucleotid variant) hordozó szervezet (pl. valproát toxicitás bizonyos *POLG* mutációkkal összefüggésben, vagy az aminoglikozid-indukálta süketség).

A mitochondriális genom minőségbeli hibáin kívül szót kell ejtenem a mennyiségi defektusról, a Mitochondriális Depléciós Szindrómáról (MDS), amely során a tüneteket a mitochondriumok számának csökkenése okozza. A MDS autoszomális recesszív öröklésmenetet mutat, általában csecsemőkori, kisgyermekkorban kezdődik, legtöbb alkalommal letális a kimenet. Típusai: hepatocerebelláris (korai májelégtelenség), myopathiás (hypotonia, progresszív izomgyengeség, légzési elégtelenség) és cardiomyopathiás forma (progresszív szívizom problémák), az alábbi tünetekkel: hypotonia, megkésett fejlődés, mentális retardáció, epilepszia, halláskárosodás, PEO (Shoubridge és Molnár 2002).

## II/5.2. Nukleáris mitochondriális betegségek

A mitochondrium működését befolyásoló nukleáris gének funkcionálisan csoportosítva a következők:

- OXPHOS alegységeket kódoló gének (Komplex I-V. defektusok, sok esetben Leigh-szindrómát okozva)
- mitochondriális dinamikát befolyásoló gének (*OPA1*: optikus atrophia 1, a mitochondrium belső membránjának fúziós fehérjéje; *MFN2*: mitofusin 2, a mitochondrium külső membránjának fúziós fehérjéje), társuló fenotípusaik a CMTII (Charcot-MarieTooth II) és HSP (herediter spasztikus paraparesis)
- lipid anyagcserében szerepet játszó gének (Barth-szindróma, Mohr-Tranebjaerg-szindróma)
- egyéb anyagcserezavarokat befolyásoló gének:  $\beta$ -oxidáció, kreatin/karnitin anyagcsere
- intergenomiális szignalizációban részt vevő gének (Molnár és Pentelényi 2015)

## II/5.3. Intergenomiális kommunikációs zavarok

A többes (multiplex) deléciók többnyire másodlagosan, nDNS mutációk következtében jönnek létre az intergenomiális kommunikációs zavarok megnyilvánulásaképpen. Az egyes szerveket, szervrendszereket érintő, jellemző tüneteket az alábbi táblázatban foglaltam össze (2. Táblázat).

2. Táblázat. Intergenomiális kommunikációs zavarok jellemző (előforduló) tünetei (CIPO: krónikus interstinális pseudo-obstructio, GERD: gastroesophagealis reflux)

<b>idegrendszer</b>	<b>szem/fül</b>	<b>izomzat</b>
myoclonus	retinitis pigmentosa	myopathia
generalizált rohamok	ophthalmoplegia	hypotonia
ataxia	kettőslátás	spasticitás
tremor	ptosis	atrophia
nystagmus	cataracta	
dyslexia	glaucoma	
vegetatív idegr. érintettség	szín-/térlátásbeli zavarok	
pszichiátriai tünetek	sensorineurális hallásvesztés	
mentális retardáció		
demencia		
neuropathia		
<b>GI traktus</b>	<b>szív</b>	<b>egyéb</b>
dysmotilitás	cardiomyopathia	extrém gyógyszerreakciók
GERD	szívbillentyű-zavar	fogyás
CIPO	brady/tachycardia	fáradékonyság
hányinger	hyper/hypotonia	immunhiányos állapot
székrekedés/hasmenés		osteoporosis
pancreas diszfunkció		anaemia
májelégtelenség		hormonzavar
		megkésett fejlődés

Néhány jellegzetesebb szindróma: a leggyakoribb *POLG* gén mutációinak fenotípusos megjelenési formája az Alpers-Huttenlocher szindróma (AHS), mely autoszomális recesszív betegség, általában már kisgyermekkorban megjelennek a tünetek: epilepszia, myoclonus, pszichomotoros regresszió (mentális képességek és a mozgás károsodása), májelégtelenség, ataxia, neuropathia, parkinsonizmus, memóriazavar. Terápiájában antiepileptikumot használnak a rohamok kezelésére. A valproát növelheti a májelégtelenség kockázatát, az erre hajlamosító polimorfizmusokat fontos megvizsgálni a *POLG* génben.

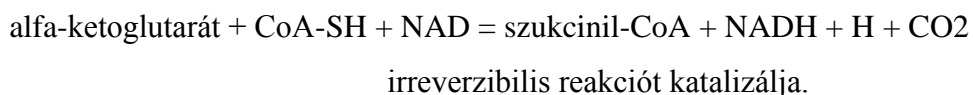
Az ataxia-neuropathia spektrum betegségek közé sorolható MIRAS (mitochondriális recesszív ataxia szindróma) és SANDO (szenzoros ataxiás neuropathia, dysarthria és

ophthalmoparesis), ill. a MNGIE (mitochondriális neurogastrointestinalis encephalopathia), mely egy timidin-foszforiláz (*TYMP*) defektus (károsodása következtében a timidin felhalmozódik a szervezetben) multiplex deléciókkal társuló gyakori tünetegyüttesek.

## **II/5.4. Komplex betegségek mitochondriális diszfunkcióval**

### **II/5.4.1. A mitochondrium szerepe a neurodegeneratív betegségekben**

A mitochondriumok károsodása fontos szerepet játszik a neurodegeneratív betegségekben (Alzheimer-kór, Garcia-Escudero és mtsai 2013; ALS, Keeney és Bennett 2010; Huntington-kór, Quintanilla és mtsai 2013). A mitochondrium károsodása következtében csökken az energiatermelés, nő a ROS (reaktív oxigén szabadgyök) mennyiség, károsodik a membrán és a mtDNS (másodlagos mutációk alakulnak ki). Munkám során az Alzheimer-kór kialakulásában szerepet játszó aKGDH (alfa-ketoglutarátdehidrogenáz) enzimet vizsgáltam, mely a mitochondrium mátrixában a Krebs-ciklus fontos résztvevője, az



A progresszív memóriazavart okozó Alzheimer-kór (AD) diagnosztikus kritériumait a DSM-5 (Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders, American Psychiatric Association, 2013) tartalmazza. Az Alzheimer-kór a primer demenciák leggyakrabban előforduló formája (60-80%; Gaugler és mtsai 2014). A betegség általában komplex, multifaktoriális, bár ismertek monogénes formái is. A multifaktoriális AD hátterében a genetikai rizikótényezők mellett több patofiziológiai eltérést is leírtak, mint pl. a mitochondriális diszfunkciót, oxidatív stressz hatást, sejtciklus problémákat és neurovaszkuláris diszfunkciót (Blennow és mtsai 2006). AD-vel kapcsolatos kutatásaink fókuszában a Krebs-ciklus fontos enzime, az aKGDH állt. Az aKGDH nagyon érzékenyen reagál a reaktív oxigéngyökök károsító hatására, így kiemelkedően fontos szerepet kaphat az Alzheimer és mitochondriális betegségek kutatási területén. Az Alzheimer-kórban régóta ismert tény, hogy az aKGDH aktivitása csökken (Sheu 1994).

Az agyban az enzim viselkedése eltér a többi szövethez képest, itt szerepet játszik a glutamát lebontásban, mely a neurotoxicitás vonatkozásában egy fontos tényező (Sheu és Blass 2006). Az aKGDH eloszlása az agyon belül nem egyenletes, a kéregben van jelen a legnagyobb, a fejlődéstanilag korábbi régiókban, kisebb mennyiségben (Tretter és Ádám-Vízi 2005). Az agyi kolinerg neuronok gazdagok aKGDH komplexekben, így különösen érzékenyek a defektusaira (Sheu és Blass 2006). Egyes kutatások szerint az aKGDH-aktivitás csökkenésének mértéke összefügg a demencia súlyosságával (ezt a CDR érték jelzi: clinical dementia rating) (Shi és mtsai 2008). A kolinerg neuronok lokalizációja megfelelhet az Alzheimer-kórra jellemző sejtpusztulással, és ezen agyterületek sérülése következtében megjelenő tünetekkel (Tretter és Ádám-Vízi 2005). A III. és az V. neuron réteg a leggazdagabb aKGDH-ban, itt találjuk a legfokozottabb sejtvészteséget AD esetében (Sheu és Blass 2006).

#### **II/5.4.2. A mitochondrium szerepe a neurodevelopmentális betegségekben**

Az autizmus spektrum betegségben szenvedők leggyakrabban leírt metabolikus károsodásának alapja a mitochondriális diszfunkció (Lerman-Sagie és mtsai 2004). A mitochondrium nagyon sok metabolikus útvonalba bekapcsolódik a glükóz- vagy a zsírsav-anyagcserébe. ASD-ben az OXPHOS károsodását írta le Valenti (Valenti és mtsai 2014). A MD biomarkerek (laktát, piruvát, karnitin, ammonia, keratin-kináz) szignifikáns emelkedést mutattak ASD-ben és ez korrelációt mutatott a betegség súlyosságával. Sok MD tünet ASD-asszociált fenotípusként található meg, mint a megkésett fejlődés, epilepsia, ataxia myopathia (Pentelényi-Varga 2016, *Közlés alatt*). Felnőtt ASD betegek izomrostjaiban sokszor ragged red rostok találhatóak, melyek egyértelműen jelzik a mitochondriális diszfunkciót. Gyermekes esetében ilyen még nem tudtak azonosítani (Persico és Napolioni 2013).

### III. CÉLKITŰZÉSEK

Az elmúlt években kutatásaim fókuszában a mitochondrium, a mitochondriális DNS, valamint a mitochondriális és a nukleáris genom kapcsolata állt. A mitochondriumnak vitathatatlanul fontos szerepe van az egészséges sejtműködésben, károsodásának sokféle fenotípusos megnyilvánulási formájával találkozhatunk. Kutatásaim során leginkább azokat a nukleáris géneket vizsgáltam, melyek jelentős befolyással bírnak a mitochondrium működésére replikációs, transzkripciós, transzlációs szinten. Célom volt a monogénes intergenomiális kommunikációs zavarok genetikai hátterének alaposabb megismerése mellett a multifaktoriális neurodegeneratív (Alzheimer-kór) és neurodevelopmentális (autizmus) betegségek patofiziológiájában a mitochondriális diszfunkció elemzése, és az ok-okozati viszonyok feltárása.

A mitochondriális DNS deléció jelenléte nem ritka jelenség a mindennapi rutin mtDNS diagnosztikai vizsgálatok során. Mivel a mtDNS hiba nukleáris genom csírasejt mutáció következtében is kialakulhat, de szomatikus mutációként is jelentkezhet, kutatásaimmal arra próbáltam választ kapni, hogy mikor mely nukleáris gének vizsgálata indokolt ahhoz, hogy megfelelő információval rendelkezünk a mtDNS deléció jelentőségét illetően. E kérdés elemzéséhez az elmúlt időszakban elérhetővé vált újgenerációs szekvenálási technológiát (NGS) választottuk, melynek segítségével nagyobb génpanelek vizsgálata is gyorsan kivitelezhető. Egyidejűleg össze tudtuk hasonlítani az NGS és klasszikus Sanger szekvenálás hatékonyságát és megbízhatóságát.

Kutatásaink során fény derült a mtDNS 9-bp deléciójának jelenlétére. Ez a deléció egy kelet-ázsiai antropológiai marker, melynek klinikai és populációgenetikai jelentőségének elemzését tűztük ki célul a magyar populációban.

## **IV. MÓDSZEREK**

### **IV/1. Vizsgált betegek**

#### **IV/1.1. Neurodegeneratív betegek**

Post mortem agyszövetmintákat vizsgáltunk 11 Alzheimer beteg esetében (6 nő,  $77\pm 8$  év és 5 férfi  $69,5\pm 9$  év) valamint 22 Alzheimer-kóros beteg vérmintáit elemeztük (6 férfi,  $63\pm 4,6$  év és 16 nő,  $55,8\pm 10$  év), akiknél a DSM-IV kritériumok alapján állítottuk fel az Alzheimer-kór diagnózisát. Az agyszövetminták a Semmelweis Egyetem Humán Agyszövet Bankjából származtak, Dr. Palkovits Miklós Professor Úr bocsátotta rendelkezésünkre. Az Alzheimeres betegek DNS mintáit a Genomikai Medicina és Ritka betegségek Intézetének NEPSYBANK-jából (<http://molneur.webdokter.hu>) szelektáltuk.

Az agy több különböző régióiból (prefrontális Brodman 9, temporális Brodman 20-21, parietális és parahippocampális lebenyek) állt rendelkezésünkre minta. Részletes neuropathológiai vizsgálat igazolta az Alzheimer-kórt minden esetben. A talált mutációk patogenitásának bizonyítására, ill. kizárására kontroll agyszövet mintákat is vizsgáltunk (5 nő és 4 férfi,  $62\pm 15$  év). A kontroll személyeknél a szövettani feldolgozás nem igazolt neurodegeneratív betegséget.

#### **IV/1.2. Mitochondriális diszfunkciót mutató betegek**

##### **IV/1.2.1. Mitochondriális deléciók betegek**

A Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetében mitochondriális betegség gyanúja miatt az elmúlt 18 évben vizsgált betegeknél (N=1477) minden esetben megtörtént a mtDNS deléciójának vizsgálata (az izomszövetten által igazolt esetekben minden esetben izomszövetből izolált mtDNS-t vizsgáltunk, azokban az esetekben, ahol egyértelmű volt az autoszomális öröklésment, a vizsgálat vérből izolált DNS-en történt).



Az intergenomiális kommunikációban szerepet játszó *POLG* gént 131 betegben vizsgáltuk (47 férfi, 84 nő,  $40 \pm 22$  év). A betegek szelekciója során fontos szempont volt a posztmitotikus szövetben a mtDNS deléció jelenléte, illetve az autoszomális domináns módon történő öröklés. Ezen betegcsoporton belül a klinikai tünetektől függően alcsoportokat képeztünk, melyekben további intergenomiális kommunikációért felelős géneket vizsgáltunk (*TWINKLE*, *TK2*, *RRM2B*, *ANT1*) Sanger szekvenálással.

#### **IV/1.2.1.1. Intergenomiális kommunikációs zavarok vizsgálatában részt vett betegek**

NGS intergenomiális panel vizsgálatot (51 nukleáris gén) 46 beteg esetében végeztünk (a vizsgált gének listáját az 1. Táblázat tartalmazza). A betegek beválogatása során - hasonlóan a *POLG* gén vizsgálatához - a posztmitotikus szövetben a mtDNS deléció/depléció jelenléte, illetve az autoszomális öröklődés volt a beválasztási kritérium; a mitochondriális diszfunkciót jelző klinikai és laboratóriumi adatok mellett.

#### **IV/1.2.1.2. Autista betegek**

A mitochondriális diszfunkció szerepének igazolására ASD gyermekekben (54 fiú, 6 lány,  $10.4 \pm 7.3$  év) vizsgáltuk a mtDNS deléció előfordulási gyakoriságát; ezzel párhuzamosan fiatal egészséges kontroll csoportot is teszteltünk (26 nő, 34 férfi,  $28.5 \pm 7.4$  év). Valamennyi esetben részletes családi anamnézist vettünk fel, rögzítettük a környezeti és szociális háttér információkat a SMARTBANK adatbázisban (<http://asd.sotebiobank.com>). Az autista gyermekek részletes klinikai vizsgálatban részesültek: általános és neurológiai vizsgálat, valamint diagnosztikai tesztek is készültek (ADI-R/ADOS tesztek). A gyermekek szülei beleegyező nyilatkozatot tölthettek ki (Helsinki Declaration 1975). Az ASD diagnózis a standardizált ADI-R (Autism Diagnostic Interview) teszt alapján született (Autizmus Alapítvány, Kapocs Kiadó). Az ADI-R határértékek a következők:  $A \geq 10$  (szociális interakciók),  $B \geq 7$  (kommunikáció),  $C \geq 3$  (repetitív sztereotípiák),  $D \geq 1$  (abnormális fejlődés 36 hónapos kor előtt). A kontroll csoportot a NEPSYBANK-ból választottuk ki

(<http://molneur.webdoktor.hu>), 45 év alatti, szenvedélyektől mentes (csökkentve a potenciálisan negatív környezeti hatásokat, mint az alkohol, dohányzás, drogok) egészséges embereket.

#### **IV/1.2.2. A 9-bp deléció betegek**

Mitochondriális betegség gyanújával diagnosztizált 1073 páciens (647 nő, 44,3±18,5 év, 426 férfi, 39,9±19 év) és 468 egészséges kontroll személyt (301 nő, 38,7±14,4 és 167 férfi 42,7±18,1) választottunk be a 9-bp deléció kelet-ázsiai antropológiai marker jelentőségének meghatározására irányuló vizsgálatba. A MD populáció vezető tünetei a következők voltak: ataxia, myopathia, epilepszia, hypacusis, myalgia és laktát acidózis.

#### **IV/2. Alkalmazott módszerek**

##### **IV/2.1. PCR-alapú metodikák (long-PCR, PCR-RFLP)**

A DNS izolálása vérből, illetve izom-/agyszövetből "QIAamp DNA blood/tissue kit"-tel történt a gyártó által megadott metodika szerint (QIAGEN, Hilden, Germany). A mtDNS egyes és többes delécióit long PCR-rel vizsgáltuk 20 µl végtérfogatban, 20-20 pmol primerrel, 0.2 µl Phusion DNA Polymerase-zal (Finnzymes, Vantaa, Finland), 4 µl Phusion GC Reaction Buffer-rel (Finnzymes, Vantaa, Finland), 0.4 µl dNTP és 12.4 µl RNáz-mentes víz (qPCR grade water, AMBION) hozzáadásával. A következő primereket és PCR programokat használtuk 30 cikluson keresztül: Fw 5'-TAAAAATCTTTGAAATAGGGC-3', Rev 5'-CGGATACAGTTCACTTTAGCT-3', kezdeti denaturáció 98°C 30 sec, majd 98°C 10 sec, annealáció 63°C 10 sec, szintézis 72°C 3 illetve 8 min, végső szintézis 72°C 7 min. Az amplifikátumokat 2%-os agaróz gélen futtattuk, etídium-bromiddal vizualizáltuk és QuantityOne Software (Bio-Rad Corp. Hertfordshire, UK) segítségével determináltuk a deléciók méretét.

Az egyik leggyakoribb mitochondriális pontmutáció (m. 8344 A>G) szűrését PCR-RFLP-vel végeztük (GeneAmp PCR System 9700, AppliedBiosystem) 20 µl végtérfogatban: 20-20 pmol primer, 10 µl ImmoMix (Bioline USA Inc, Taunton, MA), 7 µl RNáz-mentes víz. A MERRF (myoclonusos epilepszia ragged red rostokkal) mutáció

régióját 5'-GGTATACTACGGTCAATGCTCT-3' forward és 5'-TTTCACTGTAAAGAGGTGTGGG-3' reverz primerekkel amplifikáltuk a következő PCR program segítségével: kezdő denaturáció 94°C 5 min, majd 35 ciklus denaturáció 94°C 30 sec, anelláció 50°C 30 sec, szintézis 72°C 30 sec, majd a végső szintézis 72°C 7 min. Az emésztés 20 unit BanII endonukleázzal (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) történt 3 órán keresztül 37°C-on. A fragmenteket 4%-os agaróz gélen futtattuk, ethidium-bromiddal vizualizáltuk, QuantityOne Software segítségével értékeltük. A gélelektroforézis során több esetben 9-bp deléciót detektáltunk, melynek jelenlétét Sanger szekvenálással megerősítettük. A tRNS lizin régió szekvenálása a Fw 5'-GCAATTCCCGGACGTCTA-3' és Rev 5'-GCGAACAGATTTTCGTTCAT-3' primerekkel történt (300 nmol/L) a következő PCR programmal: denaturáció 94°C 5 min; majd a következő 35 ciklusban 30 sec, anelláció 60°C 30 sec, szintézis 30 sec 72°C; végső szintézis 72°C 7 min.

#### **IV/2.2. Real time PCR alapú metodikák**

Az mtDNS mennyiségét izomból határoztuk meg Taqman próba segítségével. A citokróm B (cytB) volt a mitochondriális target génünk, az albumin (alb) a nukleáris. Ezek egymáshoz viszonyított mennyisége (ddCt módszer, ref: Livak és Schmittgen, 2001) alapján tudtuk meghatározni a depléciót. TaqManUniversal Master Mix (AppliedBiosystems) és az alábbi primerek segítségével amplifikáltuk párhuzamosan a két genom referencia génjeit: alb-fw TGTTGCATGAGAAAACGCCA, alb-rev GTCGCCTGTTACCAAGGAT, cytB-fw TGATCCTCCAAATCACCACA, cytB-rev GCGGATGATTCAGCCATAAT.

#### **IV/2.3. Sanger szekvenálás**

Az intergenomiális kommunikációban szerepet játszó gének szekvenálásához szükséges primerek adatai a függelékben tekinthetők meg (*POLG*, *TK2*, *RRM2B* *TWINKLE* és *ANTI*). Az aKGDH alegységeinek vizsgálatához szükséges primerek a 3. és 4. Táblázatban láthatóak. 35 ciklusos PCR programmal végeztük az amplifikációt, kezdeti denaturáció 94 fokon 4 percig, majd 94 fok 30 sec, Tm 30 sec, 72 fok 1 min, végső szintézis 72 fokon 4 percig.

3. Táblázat. Az *aKGDH* OGDH és DLST alegységeinek vizsgálatához tervezett primerek

Gén, exon, irány	Szekvencia	T <sub>m</sub> (°C)	Gén, exon, irány	Szekvencia	T <sub>m</sub> (°C)
<i>OGDH1fw</i>	gggagggtactgttgac	59	<i>OGDH19fw</i>	ccacatgccccagaagact	59
<i>OGDH1rev</i>	ctttaccgcatctccaacc	59	<i>OGDH19rev</i>	cccacctagctaacccaag	59
<i>OGDH2fw</i>	ggatctagtagccttgtctcct	59	<i>OGDH20fw</i>	gccttgctttgacctct	59
<i>OGDH2rev</i>	caacacaccaacatgaggca	59	<i>OGDH20rev</i>	atgtcagtcacctgagctgt	59
<i>OGDH3fw</i>	atgtagacttgcttgcct	59	<i>OGDH21fw</i>	cttgaagctgcgtctcctg	59
<i>OGDH3rev</i>	ctaaggaacactgcacct	59	<i>OGDH21rev</i>	caaggctgttctgtaaggc	59
<i>OGDH4fw</i>	gtgtgtcctccctctca	59	<i>OGDH22-23fw</i>	ccttgctggatcttgcctg	59
<i>OGDH4rev</i>	taagagccttccctcctgc	59	<i>OGDH22-23rev</i>	ggacgacagcctaactceta	59
<i>OGDH5fw</i>	atccctctcatctggcttg	59	<i>DLST1fw</i>	ctgccagtggtcgtcc	56
<i>OGDH5rev</i>	ctcaaagccatctgccaat	59	<i>DLST1rev</i>	gtccagtgcccttggtg	56
<i>OGDH6fw</i>	ttcattcagccaggcctgt	59	<i>DLST2fw</i>	attcacctgtcaccacct	56
<i>OGDH6rev</i>	ggaatgtctgccccatgg	59	<i>DLST2rev</i>	tcctcacatactgctctgcc	56
<i>OGDH7fw</i>	tggccagaatccctctttt	59	<i>DLST3fw</i>	tatccgttgccgtgatcct	56
<i>OGDH7rev</i>	tctcagtcctttacctggt	59	<i>DLST3rev</i>	taaccctggccacatatct	56
<i>OGDH8fw</i>	aacaccctcatctgccatct	59	<i>DLST4-5fw</i>	ccctggtaagagtactgt	56
<i>OGDH8rev</i>	taagttgggctatgctgga	59	<i>DLST4-5rev</i>	ccgagatatacactgcac	56
<i>OGDH9fw</i>	agactgagcatctctggc	59	<i>DLST6fw</i>	tgggtttgtgctactgga	56
<i>OGDH9rev</i>	gcctctctctggccttac	59	<i>DLST6rev</i>	acaatggttaagctcctgttct	56
<i>OGDH10fw</i>	tgcatttctctgtttacctgt	59	<i>DLST7fw</i>	tgcttgcttcattggagat	56
<i>OGDH10rev</i>	tcagaaaacagtgaacgtcct	59	<i>DLST7rev</i>	gggaacactggagacctga	56
<i>OGDH11fw</i>	ttgggtacgtactcagagt	59	<i>DLST8fw</i>	attcagacagtgccagtgg	56
<i>OGDH11rev</i>	caagaggggtgggtcagatg	59	<i>DLST8rev</i>	tggcctgtcagaacctca	56
<i>OGDH12fw</i>	tgctgaacagcacttcttc	59	<i>DLST9fw</i>	ggcacaaactcagcagatgt	56
<i>OGDH12rev</i>	tttctagtcacgcccagccc	59	<i>DLST9rev</i>	caccacaccatactccact	56
<i>OGDH13fw</i>	gtggctgcagaaagtgtgg	59	<i>DLST10fw</i>	actacaggggaatgcttga	56
<i>OGDH13rev</i>	tgctcgttacatcagatcct	59	<i>DLST10rev</i>	taaggagtgggcaagtctg	56
<i>OGDH14fw</i>	ccaaaatcacgtgtctcca	59	<i>DLST11fw</i>	aatgcaggcttgggtcag	56
<i>OGDH14rev</i>	cccacaatttcacaggtc	59	<i>DLST11rev</i>	gctcacactactccca	56
<i>OGDH15fw</i>	agtaaagaagctccctct	59	<i>DLST12-13fw</i>	cctcattagcttgccttcc	56
<i>OGDH15rev</i>	agcctgagagcaatgtgact	59	<i>DLST12-13rev</i>	ctctccctcgcctgcttag	56
<i>OGDH16-17fw</i>	gctgtcaagtcagagctcc	59	<i>DLST14fw</i>	aagcgtgggattatggact	56
<i>OGDH16-17rev</i>	caagtcttagtctggcagg	59	<i>DLST14rev</i>	tcctttcatcgagacctagc	56
<i>OGDH18fw</i>	ttggtgaggaggaaacagca	59	<i>DLST15fw</i>	tgggtgtgctaactctct	56
<i>OGDH18rev</i>	agattgctcttcccaggtt	59	<i>DLST15rev</i>	ggaacttaacacatggctccc	56

4. Táblázat. Az *aKGDH DLD alegységének*  
vizsgálatához tervezett primerek

Gén, exon, irány	Szekvencia	T <sub>m</sub> (°C)	Gén, exon, irány	Szekvencia	T <sub>m</sub> (°C)
<i>DLD1fw</i>	gcctcgtgcggtagaacc	58	<i>DLD8fw</i>	tgcaagtagtcctatgctgt	62
<i>DLD1rev</i>	gccagcccaacacgggta	58	<i>DLD8rev</i>	aagtccttccaactccaag	62
<i>DLD2fw</i>	gctctgtgtggcaatggaa	58	<i>DLD9fw</i>	cagggcaattttaacctcgga	58
<i>DLD2rev</i>	gcctggaacacactagctca	58	<i>DLD9rev</i>	tgtttgcctaaagagacagga	58
<i>DLD3-4fw</i>	cgggttatttggctctcc	58	<i>DLD10-11fw</i>	cacttgagaattgctgcct	58
<i>DLD3-4rev</i>	tccatcctctagttggtgct	58	<i>DLD10-11rev</i>	gcacaactcacactggct	58
<i>DLD5fw</i>	tgggcaataagaacgaaactcc	62	<i>DLD12fw</i>	tgcaacaattcctcttgg	58
<i>DLD5rev</i>	agagccaagtcaagcagtct	62	<i>DLD12rev</i>	agcaacctcagactaacca	58
<i>DLD6-7fw</i>	aatgatgttggcctttgtcaa	58	<i>DLD13-14fw</i>	gcttcccctcaacaattgct	58
<i>DLD6-7rev</i>	cccaagctgaatgacctca	58	<i>DLD13-14rev</i>	acttctacaaaagctcccagga	58

Az amplifikátumok tisztítása Sureclean® -nal történt, majd a szekvenáló reakció BigDyeTerminatorSequencing Kittel. A végső tisztítás NucleoSeq® (BIOLINE) kittel. A szekvenálás ABI PRISM 3100 GeneticAnalyzer-rel kapilláris gél-elektroforézissel történt. Az adatokat a 3100 Data Collection Software segítségével analizáltuk. A szekvenogramokat a SequenceScanner (v.1.0) program segítségével elemeztük, az NCBI BLAST adatbázis (National Center for Biotechnology Information, Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) humán genom referencia szekvenciájához illesztettük. Az eltéréseket a [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) adatbázis alapján azonosítottuk.

#### IV/2.4. Újgenerációs szekvenálás

Az új generációs szekvenálás nagy áteresztőképességű (high-throughput), lehetőséget nyújt sok minta egyidejű szekvenálására. A Sanger vs. újgenerációs szekvenálás összehasonlítása látható az alábbi táblázatban (5. Táblázat).

5. Táblázat. A Sanger szekvenálás és NGS paramétereinek összehasonlítása

	Sanger	NGS
<b>egyidejűleg szekvenálható</b>	max 1000 nt	több millió nt
<b>pontosság</b>	nagy	kisebb
<b>kapacitás</b>	kicsi	óriási
<b>fajlagos ár</b>	nagy	kicsi
<b>munka és időigény</b>	nagy	automatizálható
<b>elektroforetikus elvű</b>	igen	nem
<b>multiplexezhető</b>	nem	igen

Az intergenomiális kommunikációban szerepet játszó gének közül 51 fontosabb gént (1. Táblázat) terveztem egy NGS (next-generation sequencing) panelbe a Sure Design szoftver segítségével (<https://earray.chem.agilent.com/suredesign/>). A könyvtárkészítést SureSelect QXT kittel végeztem a gyártó által megadott protokoll szerint (Agilent Technologies). A futtatást Illumina MiSeq készüléken végeztük. A vizsgált gének a következők: *AARS2, APEX1, ATP5A1, C10orf2, C10orf65, DARS2, DGUOK, EARS2, ERCC6, FARS2, GFMI, HARS2, IARS2, LRPPRC, MARS2, MFN2, MGME1, MICU1, MICU2, MIRO1/RHOT1, MIRO2/RHOT2, MPV17, MRPL3, MRPS16, MRPS22, MSTO1, MTO1, MTFMT, MTPAP, POLG, POLG2, PUS1, RAD51, RARS2, RMND1, RRM2B, SARS2, SCO1, SLC25A3, SLC25A4/ANT1, SUCLA2, SUCLG1, TACO1, TFAM, TK2, TRMU, TSFM, TUFM, TYMP, WARS2* és *YARS2*. A magas (>100) lefedettség elérése érdekében 16 mintát futtattunk (MiSeq reagent kit v2, 300 cycles, Illumina).

Az Illumina (Solexa) szekvenálás során a DNS-t 100-150bp-os darabokra fragmentáljuk, melyeket párhuzamosan szekvenálunk. A többszörösen átfedő read-ek folyamatos szekvenciát adnak eredményül. A hibák csökkentése érdekében egy nukleotid sok-sok read-ben kell, hogy szerepeljen (minimális elfogadott lefedettségi érték: 30). A DNS fragmentálása lehet fizikai, kémiai vagy enzimatis, a SureSelect QXT kittel enzimatis hasítást végeztünk transzpozáz segítségével. A fragmentekhez adaptereket ligálunk (melyek a flow cell-re horgonyzott szekvenáló primerek komplementerei), ezt követi a denaturáció, hibridizáció és bridge (híd) amplifikáció. A szekvenálás alapja a Sanger metodikához hasonlóan szintézis. A templáthoz primert ligálnak, hozzáadják a négyféle fluoreszcensen jelölt reverzibilis terminátor

nukleotidokat. A beépült nukleotid fluoreszcens jelét CCD kamerával detektálják, levágnak a fluorofórt és a 3' blokkolót.

**Kiértékelés:** Az intergenomiális panel futtatása során kapott fastq file-okat Sure Call szoftverrel analizáltuk (Agilent Technologies). A 20 read alatt lefedett régiókat a QC report kilistázza (ld. függelék: SureCall QC report minta). A fastq file-ok illesztése a BWA MEM algoritmus alapján történt, a variánsshivás SNPPET SNP caller programmal. A minimális térképezési minőség a read-ekre, nukleotidokra: Q30 (0.1% az esélye, hogy rossz bázist azonosítottunk). Annotáció v2 adatbázissal: clinSNP\_260912, ClinVarAnnotations, cosmic\_v61\_260912, gwasV1\_ucsc\_260912, Hs\_hg19\_Gene\_20110426\_cds.

Az analizált mintákból kiszűrtük az exoni mutációkat, majd ezekből kizártuk a samesense eltéréseket. A megmaradt missense mutációk közül kiszűrtük az adatbázisok alapján (Alamut, ensembl.org, PubMed, HGMD, RGD, ftp.expasy.org, DMDM), illetve több predikciós szoftver alapján (Polyphen2, dbSNP, SIFT, Mutation Tester) benignusnak minősített variánsokat, illetve amelyek a minták min. 50%-ában jelen voltak. Kerestük a ritka variánsokat (MAF<0.5%, minor allél frekvencia), és azokat az eltéréseket, melyek hatásáról vagy jelenlétéről nincs klinikailag minősített adat. Eredményeinket az ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) ajánlásai szerint minősítettük (Richards és mtsai 2015).

A patogénnek feltételezett mutációkat Sanger szekvenálással validáltuk, amennyiben lehetőségünk volt rá, szegregációs vizsgálatokat végeztünk. Az érintett génekre tervezett primereket és PCR beállításokat az 6. Táblázatban foglaltam össze.

Az ASD panel (Betancur 2011) könyvtárkészítése TruSight Autism Rapid Capture Kittal (Illumina), eredményeinek analízisa a VariantAnalyzer program segítségével történt (Gézi András fejlesztése) (Pentelényi-Varga és mtsai 2016, *közlés alatt*).

## IV/2.5. Statisztikai analízis

Az egyes kohortokban talált eredmények szignifikanciaszintjének meghatározására a Yates által korrigált chi-négyzet próbát használtuk (<http://www.quantpsy.org/chisq/chisq.htm>).

6. Táblázat. NGS visszaválaláshoz tervezett primerek

Gén	Mutáció	Irány	Szekvencia	T <sub>m</sub> (°C)
<i>c20orf72</i>	c.86	fw	GCCTTCGACCGTTGCAAATA	57
<i>c20orf72</i>	c.86	rev	AAAGCATCTTCCTCCACCGA	57
<i>WARS2</i>	c.452	fw	tcagatttctcccctcctctc	55
<i>WARS2</i>	c.452	rev	ccttgcccatgaaccaagtc	55
<i>APEX1</i>	c.605	fw	TTGACTCGTTTGTGCTGGT	55
<i>APEX1</i>	c.605	rev	GTAATTCCCCGAAGCCTTGG	55
<i>LRPPRC</i>	c.38	fw	ACATGCTCCTCCTGTCCTTC	57
<i>LRPPRC</i>	c.38	rev	GCAGATAGGAGGCGGCAT	57
<i>c20orf72</i>	c.532	fw	atatgcccaactactcca	55
<i>c20orf72</i>	c.532	rev	GCTGGACACTTTCAATGTAACC	55
<i>SUCLG1</i>	c.236	fw	cttttgettctcttggcttac	54
<i>SUCLG1</i>	c.236	rev	tcaaatagcaagtgactctacca	54
<i>IARS2</i>	c.23	fw	CTCTTACTCGGCTCCCCCTG	57
<i>IARS2</i>	c.23	rev	TCGGCTGGTGGTACTGG	57
<i>MTO1</i>	c.922	fw	agcaaatcagtattgcatctggt	55
<i>MTO1</i>	c.922	rev	ACCTGATGTAGACGGTTTGA	55
<i>RHOT2</i>	c.229	fw	tgctacctgtgagcttctgg	57
<i>RHOT2</i>	c.229	rev	acgggttgggtgaaggtc	57
<i>EARS2</i>	c.367	fw	gagaacgagcgtgtgtg	57
<i>EARS2</i>	c.367	rev	gttcttacCGGGGCGTCT	57
<i>c20orf72</i>	c.794	fw	aatggtgaataagagcaatggtc	54
<i>c20orf72</i>	c.794	rev	ttaagtaaaggctcagtgctcct	54
<i>CHD7</i>	Fs	fw	gaagtccattcgaacacct	60
<i>CHD7</i>	Fs	rev	atggcttcaaagccctgtaa	60
<i>DHCR7</i>	W119*	fw	agccaagctcctcactgc	58
<i>DHCR7</i>	W119*	rev	ttctcagtgctcagggttt	58
<i>GABRB3</i>	E122*	fw	cgcaacctccatgtaataga	60
<i>GABRB3</i>	E122*	rev	gcacattttgtcactccagtc	60



#### **IV/2.6. Haplocsoport analízis**

A haplocsoport meghatározást az Archeogenetikai Laboratórium végezte (MTA, Régészeti Intézet) a hipervariábilis I régió (L16024/H16401) 401 bp-os részének bidirekcionális szekvenálásával a következő primerekkel: Fw 5' CTC CAC CAT TAG CAC CCA AAG C 3', Rev 5' TCT GTT CTT TCA TGG GGA AG 3'. A szekvenciákat a cambridge-i referencia szekvenciához illesztették (mely a leggyakoribb H haplocsoportba tartozik). Amennyiben az illesztett szekvenciák teljes egyezést mutattak (Andrews és mtsai 1999) három mutációs helyet határoztunk meg: a hipervariábilis régió II. 73. nukleotidja (Fw 5' CAG GTC TAT CAC CCT ATT AAC CA 3', Rev 5' GGA TGA GGC AGG AAT CAA AG 3'); a 7028-as nukleotidja (Fw 5' TTT TCA CCG TAG GTG GCC TG 3', Rev 5' TGA AAT GGA TTT TGG CGT AGG 3'); és a 14766-as nukleotidja (Fw 5' ACC CCA CAA ACC CCA TTA CT 3', Rev 5' AGG AGT GAG CCG AAG TTT CA 3').

## V. EREDMÉNYEK

### V/1. Alfa-ketoglutarátdehidrogenáz mutációk és a demencia kapcsolata

A vizsgált 11 AD beteg agyszöveteinek különböző régióiban az aKGDH alegységeiben 3 missense mutációt találtunk, melyeket patogénnek feltételeztünk a Polyphen2 predikciós score-ok alapján. Ezen eltéréseket 9 kontroll agyminta 3 régiójában is kerestük, hogy jelentőségüket értékeljük. A betegekben patogénnek tűnő mutációk közül egyet azonosítottunk egy 74 éves kontroll személyben, így ezt polimorfizmusnak minősítettük.

Az *OGDH* génben (aKGDH 1. alegysége) a 2. exonban Ser55Leu (c.164 C>T, rs2230445) mutációt (Polyphen 0.89, MAF 0,002) találtunk, mely valószínűleg patogén. Az eltérést csak a temporális régióban tudtuk kimutatni, a frontális régióban nem volt jelen. Nem találtuk meg a vizsgált kontroll mintákban sem ezt a mutációt. Ugyan evolúciósan nem konzervált nukleotidról van szó, a MutationTester program jóslata szerint is betegséget okozhat ez az eltérés. A továbbiakban 7 szinonim variánst, 4 esetben pedig a Polyphen score-ok alapján benignusnak prediktált missense mutációkat azonosítottunk (7. Táblázat).

#### 7. Táblázat. Az *OGDH* génben talált SNV-k

(zöld:benignus missense eltérés, piros: patogén(gyanús) missense mutáció)

Exon	Variáns	AS-csere	Jelentőség	Polyph.	MAF	ID
2	c.164 C>T	S55L	missense, patogén	0.89	0.002	rs2230445
3	c.345 A>G	E115E	same sense		0.03	rs11557280
3	c.317 C>T	A106V	missense, benignus	0	n/a	rs373615811
3	c.396 G>A	S132S	same sense		0.02	rs41280648
6	c.682 C>T	L228L	same sense		n/a	rs200177390
10	c.1275 C>T	H425H	same sense		0.0002	rs527318063
11	c.1412 C>A	P471P	same sense		n/a	n/a
14	c.1809 C>A	C604M	missense, benignus	0.04	n/a	n/a
22	c.2988 C>T	T996T	same sense		0.046	rs61756583
23	c.3052 G>A	V1018I	missense, benignus	0.016	0.047	rs2070607
23	c.3063 C>T	N1021N	same sense		n/a	n/a
23	c.3064 T>A	N1022F	missense, benignus	0.015	n/a	n/a

A *DLST* génben (aKGDH 2. alegysége) a 9. exonban Pro204Leu (c. 611 C>T, rs142872233) mutációt találtunk heterozigóta formában, melyet patogénnek feltételeztünk a különböző predikciós szoftverek alapján (Polyphen2: 0.96, Alamut: konzervált aminosav, phyloP: 4.81, Grantham: 98, SIFT és MutationTester alapján betegség okozó mutáció), azonban megtaláltuk egy kontroll mintában is, így polimorfizmusnak minősítjük. A kontroll minta egy 74 évesen akut keringési elégtelenségben elhunyt férfi agymintája, neuropathológiai elváltozások nélkül. A továbbiakban 2 szinomin polimorfizmust találtunk: Gln192Gln (exon 8) és Gly366Gly (exon 14) (8. Táblázat).

8. Táblázat. *DLST* génben talált SNV-k (\*kontroll mintában is megtaláltuk)

Exon	Variáns	AS-csere	Jelentőség	Polyphen	MAF	ID
8	c.576 G>A	Q192Q	same-sense		0.38	rs2230237
9	c.611 C>T	P204L	missense, benignus*	0.96	0.01	rs142872233
14	c.1098 C>T	G366G	same-sense		0.29	rs20578

A *DLD* gén (aKGDH 3. alegysége) 9. exonjában Arg263His (c.788 G>A, rs145670503) mutációt találtunk heterozigóta formában, melyet a kontroll mintákban (N=9) nem találtuk meg. A mutáció az agy frontális, temporális és parahippocampalis lebenyeiből izolált DNS mintákban ugyanúgy jelen volt. Különböző predikciós szoftverek előrejelzése alapján patogénnek gondoljuk (Polyphen2: 1, Alamut: konzervált aminosav, phyloP: 4.73, Grantham: 29, SIFT és MutationTester: betegség okozó mutáció). A Biokémiai Intézetben (Ambrus Attila munkacsoportja) sikerült az Arg263His mutáns fehérje előállítását, az aktivitásmérés - patogenitásának bizonyítására - folyamatban van. A további talált eltéréseket az 9. Táblázat tartalmazza.

9. Táblázat. DLD génben talált SNV-k

Lokalizáció	Variáns	AS-csere	Jelentőség	Polyph.	MAF	ID
IVS3-4	c.199-108 T>C	-	introni variáns	-	0.28	rs10250718
IVS3-4	c.199-127_199-121 del ATTTTAG	-	introni variáns	-	0.30	rs71522853
IVS6-7	c.438+83 G/A	-	introni variáns	-	0.30	rs17412104
IVS6-7	c.439-7 T/C	-	introni variáns	-	0.28	rs10263341
Exon9	c.788 G>A	R263H	missense, patogén?	1	n/a	rs145670503

A vizsgált 22 AD vérmintában nem találtunk egyetlen patogén mutációt sem, kizárólag introni variánsokra derült fény, melyeket az 10. Táblázatban mutatok be.

10. Táblázat. A vérben talált introni variánsok (DLD gén)

Lokalizáció	Variáns	MAF	Esetek száma	Jelenlét kontroll mintában
IVS3-4	c. 199-108 T>C	0.28	11	+
IVS3-4	c. 199-127_199-121 del ATTTTAG	0.30	10	+
IVS6-7	c. 438+83 G/A	0.30	17	+
IVS6-7	c. 439-7 T/C	0.28	18	+
IVS6-7	c. 338-81 T>A	0.01	1	-
IVS8-9	c. 685-14T>A	0.02	1	-
IVS12-13	c. 1375-45 A/T	n/a	1	-
IVS13-14	c. 1465-29 G/T	n/a	1	-
3'UTR	c.*18A>T	0.30	1	-
3'UTR	c.*20A>T	< 0.01	1	-

## V/2. Intergenomiális kommunikációs zavarok (deléció és depléció szindrómák) vizsgálatai

### V/2.1. Sanger szekvenálás eredményei

Mitochondriális betegség diagnózisú 1477 betegből 267 esetben találtunk mtDNS deléciót, amely kohort különböző alcsoportjaiban kerestük az egyes intergenomiális gének patogén eltéréseit. Sanger szekvenálásra azoknak a géneknek az elemzését választottuk, melyekben az irodalmi adatok alapján, a klinikai tünetet is figyelembe véve a legnagyobb volt a valószínűsége az érintettségnek. A szelekciót segítette a pozitív familiáris anamnézis.

A **POLG** (polimeráz gamma) gén vizsgálata során (N=131) 7 patogénnek feltételezett mutációt találtunk 6 betegben. A kontroll csoportban (N=5, 2 férfi, 3 nő, 43+-18 év) nem találtuk meg ezeket az eltéréseket (11. Táblázat).

11. Táblázat. A **POLG** génben talált missense eltérések Sanger szekvenálás során

Mutáció	AS-csere	ID (rs-szám)	Jelentőség	Betegek száma	Előfordulás kontrollban
c.53 C>T	Pro18Leu	n/a	polimorfizmus	1	-
c.718 T>C	Ser240Pro	n/a	kérdéses	1	-
c.1094 G>A	Gly365Glu	n/a	kérdéses	1	-
c.1399 G>A	Ala467Thr	113994095	patogén	1	-
c.2072 C>T	Ala676Val	376306906	polimorfizmus	1	-
c.2243 G>C	Trp748Ser	113994097	patogén	1	-
c.2254 C>T	Leu752Leu	41564016	polimorfizmus	6	+
c.2492 A>G	Tyr831Cys	41549716	polimorfizmus	3	-
c.2864 A>G	Tyr955Cys	113994099	patogén	1	-
c.3198 G>A	Thr1066Thr	61752780	polimorfizmus	1	-
c.3244 G>A	Ala1082Thr	n/a	kérdéses	1	-
c.3428 A>G	Glu1143Gly	2307441	polimorfizmus	13	-
c.3589 T>C	Cys1197Arg	n/a	kérdéses	1	-
c.3597 C>A	Thr1199Thr	2307443	polimorfizmus	1	-
c.3708 G>T	Gln1236His	3087374	polimorfizmus	23	+
c.*49_50 InsG	-	3087377	3'UTR variáns	77	+

A (valószínűleg) patogén mutációk predikciós adatait az 12. Táblázatban mutatom be.

12. Táblázat. A POLG génben talált patogén eltérések score-jai

Beteg	AS-csere	PolyPh	SIFT	Mut.Tester	PhyloP	Grantham-távolság	Nt-konzerv.	AS-konzerv.
POLG_P1	Ser240Pro	0.93	ártalmas	patogén	2	74	gyenge	közepes
POLG_P2	Gly365Glu	1	tolerálható	patogén	6.1	98	magas	magas
POLG_P3	Trp748Ser	1	tolerálható	patogén	5.69	177	magas	közepes
POLG_P4	Tyr955Cys	1	ártalmas	patogén	4.48	194	magas	magas
POLG_P5	Ala1082Thr	0.8	ártalmas	patogén	4	58	közepes	magas
POLG_P6	Ala467Thr	1	tolerálható	patogén	5.86	58	magas	magas
	Cys1197Arg	1	ártalmas	patogén	4.89	180	magas	magas

A POLG\_P1 69 évesen exitált mitochondriális myopathiás nőbetegben Ser240Pro patogén mutációt találtunk heterozigóta formában a Gln1236His polimorfizmussal asszociálva. Az utóbbi SNV valproát toxicitásra hajlamosító genetikai biomarker (Stewart és mtsai 2010). A proband tünetei 46 éves korában kezdődtek: PEO, dysarthria, dysphagia, dysphonia, hypacusis, ataxia, dystonia és súlyos depresszió. Familiáris anamnézise pozitív: édesanyjánál dysphagia és ptosis, lányainál pajzsmirigy diszfunkció, agyvérzés, depresszió, ill. májcirrhosis fordult elő.

A POLG\_P2 (43) nőbetegben heterozigóta Gly365Glu mutációt detektáltunk, vezető tünetei ataxia, hypacusis, depresszió, anxietas és cerebelláris atrophia voltak. A familiáris anamnézis pozitív, az ataxiás édesanyában is megtaláltuk a mutációt. Ezt a beteget az NGS panel vizsgálatba is beválasztottuk, ami ugyancsak igazolta ezt a mutációt más SNV-k mellett (ld. IV/2.2. fejezet).

A POLG\_P3 (46) nőbetegben heterozigóta formában találtuk meg a Trp748Ser patogén mutációt (Hakonen és mtsai 2005) és a Glu1143Gly modifikáló faktort (Chan és mtsai 2006), mely eltérések minden érintett családtagban együtt szegregáltak és különböző tünetegyütteseket eredményeztek. A proband tünetei: myopathia, myalgia, depresszió, látásproblémák. Két érintett testvére depressziós és arthritis-es, lánya a depresszió mellett Schönlein-Henoch purpura-ban szenved.

A POLG\_P4 (42) férfibetegben heterozigóta Tyr955Cys mutációt találtunk, mely ismert patogén mutáció (Van Goethem és mtsai 2001). Harminckét éves korától fokozódó

vállövi dominanciájú izomatrophia és a gyengeség tünetei mutatkoztak. Édesapjának későbbi kezdettel, enyhébb formában hasonló tünetei voltak.

A POLG\_P5 (42) férfibetegben Ala1082Thr mutációt találtunk. Kisgyermekkora óta alsó végtagi gyengeség, lábfej deformitás jellemezte, mely háttérében axonális típusú neuropathiát igazoltunk. A betegség a családban sporadikusan jelentkezett.

A POLG\_P6 (3) kisfiúban heterozigóta formában Ala467Thr ismert patogén mutációt detektáltunk, melyet korábban homozigóta formában írtak le (Naviaux és Nguyen 2004). A patogén mutáció mellé heterozigóta Cys1197Arg ismeretlen jelentőségű mutáció társult. A gyermek fenotípusa Alpers-szindróma. A mutációk közül az Ala467Thr egyértelműen összefüggésben áll a valproát toxicitással. A kisfiú epilepsziás lánytestvérét sajnos valproát okozta hepatotoxicitás miatt elveszítette a család. Ezt követően került sor a POLG\_P6 gyermek genetikai vizsgálatára. Az egészséges szülők és a testvér vizsgálata azt igazolta, hogy a két mutáció transz helyzetben fordul elő, és compound heterozigóta formában hordozza azokat a kisfiú.

A *TWINKLE* (*c10orf2*) gén vizsgálata során (N=48) a Perrault-szindróma háttérében sikerült a világon másodikként igazolni a gén érintettségét. A talált compound heterozigóta mutációk közül az Asn399Ser egy nemrégiben leírt patogén mutáció, melyet szintén Perrault-szindrómával asszociáltak (Demain és mtsai 2015); esetünkben az Arg453Gln ismeretlen jelentőségű mutációval társult. A két mutáció compound heterozigóta formában felelős lehet a gén diszfunkciójáért. Szegregációs vizsgálat során megtaláltuk az Asn399Ser mutációt az édesanyánál és az Arg453Gln mutációt az édesapánál. A szülők tünetmentesek. A beteg tünetei a klasszikus Perrault-szindróma tünetei: sensorineurális halláscsökkenés, ataxia, ovarium dysgenesis, pszichiátriai tünetek. Az eset közzlése folyamatban van.

A *TK2* gén vizsgálata 14 betegből minden esetben negatív eredménnyel zárult. A timidin-kináz vizsgálata többnyire mitochondriális mtDNS depléción pozitívitás esetén ajánlott. A 47 vizsgált mtDNS depléción-gyanús betegből (4 év alatti korcsoport) 14 esetben találtuk csökkentnek a mitochondriumok számát. A háttérben álló lehetséges károsodott gének további vizsgálatát NGS-sel terveztük. Mindeztidáig 9 beteget sikerült

újgenerációs szekvenálással analizálnunk, az eredményeket az IV/2.2. fejezetben mutatom be.

Az **RRM2B** vizsgálata 41 betegből munkacsoportunk egy család esetében talált heterozigóta formában c.979 C>T mutációt, mely adPEO (autoszomális domináns öröklésű PEO) fenotípusként jelent meg. Az adPEO háttérében eddig *SLC25A4*, *POLG*, *POLG2*, *PEO1* és *OPA1* mutációkat írtak le. Az általunk talált SNV következtében korai stop kodon alakul ki, a fehérje termék (p53R2) 25 aminosavval rövidebb lesz (R327X).

Az **ANTI** vizsgálata 37 pozitív családi anamnézissel bíró PEO betegben negatív eredménnyel zárult.

## **V/2.2. NGS eredmények**

A mitochondriális deléciók és a depléció okának feltárására egy hatékonyabb módszerhez folyamodtunk, újgenerációs szekvenálást végeztünk 36 betegnél (27 mtDNS deléciós és 9 depléciós esetben), mivel a Sanger szekvenálás során relatíve alacsony volt a pozitív találatok száma. Az NGS vizsgálat (51 gén párhuzamos vizsgálata) új távlatokat nyitott meg az intergenomiális kommunikációs zavarok genetikai hátterének felderítésében. Az NGS során az átlagos lefedettség 241 volt, az esetek 98% -ban értük el a 60x lefedettséget. A vizsgált 36 betegből 12 esetben nem találtunk patogén eltérést, a betegek 2/3-ában azonosítottunk olyan mutációkat, melyekről feltételezhető volt, hogy szerepet játszhatnak a betegség patofiziológiájában (13. Táblázat). A talált mutációkat Sanger szekvenálással validáltuk. Jelentőségük meghatározására lehetőség szerint szegregációs vizsgálatokat végeztünk.



13. Táblázat. NGS eredmények deléció hátterében - első megközelítéssel, az adatbázisok és szakirodalom alapján

Megjegyzés: SIFT>0.05 benignus (ideális érték: 2.75-3.5);

B= Benignus, P=possibly damaging, D=probably damaging

Beteg	Fenotípus	Gén	Mutáció	AS-csere	ID	SIFT	PolyP.	Zigócia	Jelentőség: szakirodalomban	Referencia
Del_P1	Ataxia	WARS2	c.452A>G	His151Arg	rs150022801	0.02	B	HET	bizonytalan jelentőségű	-
Del_P2	Mitochondriális encephalomyopathia	APEX1	c.605G>C	Arg202Pro	n/a	0.01	B	HET	bizonytalan jelentőségű	-
Del_P3	Perrault-szindróma	TWINKLE	c.1196A>G	Asn399Ser	n/a	0.09	B	HET	patogén (Perrault-sz.)	Demain, 2015
		TWINKLE	c.1358G>A	Arg453Gln	n/a	0.27	B	HET	bizonytalan jelentőségű	-
Del_P4	Myopathia	MGME1	c.532C>T	Arg178Trp	rs143417446	0.01	P	HET	patogén	Taylor, 2014
		TFAM	c.298C>G	Gln100Glu	rs151097728	1.0	B	HET	bizonytalan jelentőségű	-
Del_P5	Infarktuszok, psychosis, hypacusis	TRMU	c.28G>T	Ala10Ser	rs11090865	0.0	D	HET	rizikófaktor (süketség)	Guan, 2006
		MTO1	c.1702C>G	Pro568Ala	rs200759516	0.77	B	HET	bizonytalan jelentőségű	-
Del_P6	Myopathia	SCO1	c.22C>T	Pro8Ser	rs370809239	0.5	B	HET	bizonytalan jelentőségű	-
		MRPS22	c.617C>T	Thr206Ile	rs76148008	0.41	B	HET	bizonytalan jelentőségű	-
Del_P7	Myoclonus, demecia, epilepszia	YARS2	c.572G>T	Gly191Val	rs11539445	0.01	B	HET	patogén	ensembl.org
		MTO1	c.922A>G	Thr308Ala	rs145043138	0.1	P	HET	feltehetően patogén(légz.lánc def)	Baruffini, 2013
Del_P8	PEO, COPD	RHOT2	c.229G>A	Val77Met	n/a	0.0	D	HET	bizonytalan jelentőségű	-
		MGME1	c.532C>T	Arg178Trp	rs143417446	0.01	P	HET	patogén	Taylor, 2014
Del_P9	Myopathia	TRMU	c.28G>T	Ala10Ser	rs11090865	0.0	D	HET	rizikófaktor (süketség)	Guan, 2006
		YARS2	c.572G>T	Gly191Val	rs11539445	0.01	B	HET	patogén	ensembl.org
Del_P10	PEO, rheumatoid arthritis	WARS2	c.799G>C	Ala267Pro	rs3790549	0.1	B	HET	bizonytalan jelentőségű	-
		YARS2	c.572G>T	Gly191Val	rs11539445	0.01	B	HET	patogén	ensembl.org
Del_P11	Spasticus tetraplegia	IARS2	c.23G>T	Arg8Leu	rs149324758	0.02	B	HET	bizonytalan jelentőségű	-
		MRPL3	c.224G>A	Ser75Asn	rs151331067	0.34	B	HET	patogén (Tourette-szindróma)	Guo, 2012
Del_P12	Mitochondriális encephalopathia	ATP5A1	c.517A>G	Ile173Val	rs77958705	0.1	B	HET	bizonytalan jelentőségű	-

Beteg	Fenotípus	Gén	Mutáció	AS-csere	ID	SIFT	PolyP.	Zigócia	Jelentőség	Referencia
Del_P13	Myopathia	<i>SUCLG1</i>	c.236G>A	Gly79Asp	rs143030960	0.0	D	HET	valószínű patogén	dbSNP
Del_P14	Recurráló stroke szindróma	<i>MGME1</i>	c.532C>T	Arg178Trp	rs143417446	0.01	P	HET	patogén	Taylor, 2014
		<i>YARS2</i>	c.572G>T	Gly191Val	rs11539445	0.01	B	HET	patogén	ensembl.org
Del_P15	SCA, cerebellaris atrophia	<i>IARS2</i>	c.23G>T	Arg8Leu	rs149324758	0.02	B	HET	bizonytalan jelentőségű	-
		<i>PGBD3</i>	c.1552C>T	Arg518Cys	n/a	0.2	B	HET	bizonytalan jelentőségű	-
		<i>POLG</i>	c.1094G>A	Gly365Glu	n/a	0.0	D	HET	valószínű patogén	-
Del_P16	PEO	<i>YARS2</i>	c.572G>T	Gly191Val	rs11539445	0.01	B	HET	patogén	ensembl.org
Del_P17	Myopathia	<i>YARS2</i>	c.572G>T	Gly191Val	rs11539445	0.01	B	HET	patogén	ensembl.org
Del_P18	Myopathia	<i>YARS2</i>	c.572G>T	Gly191Val	rs11539445	0.01	B	HET	patogén	ensembl.org
Del_P19	Myopathia	<i>MTO1</i>	c.1549G>A	Val517Met	rs139608228	0.01	B	HET	bizonytalan jelentőségű	-
		<i>YARS2</i>	c.572G>T	Gly191Val	rs11539445	0.01	B	HET	patogén	ensembl.org

Mitochondriális deléció háttérben aminoacil-tRNS-szintetáz mutációkat találtunk 12 esetben heterozigóta formában (*YARS2*, *IARS2*, *WARS2*), melyeknek az érintett aminosavakkal kapcsolatos fehérjeszintézisben van nélkülözhetetlen szerepük. A *YARS2* (tirozin-tRNS szintetáz) génben a Gly191Val aminosavcsere patogénnek leírt eltérés (dbSNP adatbázis, Riley és mtsai 2013) 8 esetben is előfordult (a depléciós és autista kohortokban is nagy gyakorisággal volt jelen, ld. később), több család szegregációs vizsgálata alapján azonban polimorfizmusnak tartjuk.

A mitochondriális genom integritásának fenntartásáért felelős exonukleáz (*MGME1*, mitochondrial genome maintenance exonuclease) ismert Arg178Trp mutációját (Taylor és mtsai 2014) írtuk le 3 esetben heterozigóta formában. Az Arg178Trp mutáció patogenitását mindhárom esetben alá tudtuk támasztani szegregációs vizsgálattal. A szakirodalomban ismert patogén mutációkat találtunk a Krebs-ciklust katalizáló *SUCLG1* (Gly79Asp, ref.: dbSNP) génben és a fehérjeszintézisben szerepet játszó *MTO1* (Thr308Ala, ref.: Baruffini és mtsai 2013), ill. *MRPL3* mitochondriális riboszomális protein (Ser75Asn, ref.: Guo és mtsai 2012) génekben heterozigóta formában.

Az irodalomban mindezidáig ismeretlen jelentőségű, de predikciós szoftverek alapján patogénnek feltételezett mutációk, melyek közül csak az első SNV esetében kaptunk egymásnak megfeleltethető score-okat (szegregációs vizsgálatra nem minden esetben volt lehetőségünk):

- A *RHOT2* (*MIRO2*) GTPázban detektált Val77Met  
(SIFT: 0; PolyPhen2: D; MutationTester: betegség okozó)  
A szegregációs vizsgálat alátámasztotta patogenitását.
- A DNS repair-ben szerepet játszó apex endonukleázban (*APEX1*) detektált Arg202Pro (SIFT: 0.01; Polyphen2: B; MutationTester: polimorfizmus)  
A szegregációs vizsgálat alátámasztotta patogenitását.
- *ATP5A1*-ben Ile173Val aminosavcsere  
(SIFT: 0.1; PolyPhen2: B; MutationTester: betegség okozó)  
Szegregációs vizsgálat folyamatban van.
- A fehérjeszintézisben szerepet játszó *MTO1*-ben Pro568Ala  
(SIFT: 0.77; PolyPhen2: B; MutationTester: betegség okozó)  
Szegregációs vizsgálatra nem volt lehetőség.

- Ugyancsak az *MTO1*-ben Val517Met (SIFT: 0.01; PolyPhen2: B; MutationTester: polimorfizmus)  
Szegregációs vizsgálatra nem volt lehetőség.

További talált missense eltérések, melyeket benignusnak tartunk a predikációs programok alapján:

- *TFAM* transzkripció faktorban a Gln100Glu (SIFT:1; PolyPhen2: B; MutationTester: polimorfizmus)
- *SCO1* citokróm oxidázban a Pro8Ser csere (SIFT: 0.5; PolyPhen2: B; MutationTester: polimorfizmus)
- *MRPS22*-ben a kevésbé konzervált Thr206Ile (SIFT: 0.41; PolyPhen2: B; MutationTester: polimorfizmus)
- A DNS repair nukleotid excíziós enzimében (*PGBD3/ERCC6*) Arg518Cys csere (SIFT: 0.2; PolyPhen2: B; MutationTester: polimorfizmus)

Két esetben süketségre hajlamosító rizikófaktort találtunk a tRNS-modifikáló *TRMU* génben.

A *POLG* és *TWINKLE* génekben detektált patogén eltéréseket Sanger szekvenálás során már megtaláltuk: Gly365Glu (Del\_P15) polimeráz gamma mutáció, és Asn399Ser/Arg453Gln compound heterozigóta (Del\_P3) mutációk a *TWINKLE* génben (ld. IV/2.1. fejezet). A NGS technológia vizsgálataink alapján az általunk alkalmazott min 60x lefedettség mellett (a vizsgált régiók 98%-ban) megfelelő szenzitivitásúnak tűnik a Sanger szekvenáláshoz viszonyítva. Ennek a megállapításnak fontossága a klinikai diagnosztika kapcsán kiemelendő.

Az analizált mintákban nagyságrendileg kb. 150 eltérés volt, melyek 20%-a exoni mutáció, és ezeknek a fele missense eltérés. Az 14. Táblázatban bemutatom az NGS-sel talált aminosav-cserét okozó variánsokat és ezek jelentőségét.

14. Táblázat. Az újgenerációs szekvenálás során talált missense eltérések és besorolásuk az adatbázisok, irodalom és saját vizsgálataink alapján (\*több mint 50%-ban fordult elő a kohortunkban)

Mutáció ID	Gén	Jelentőség	Referencia
rs1037699	<i>RRM2B</i>	Polimorfizmus	DMDM adatbázis
rs1047991	<i>MTPAP</i>	Benignus	Saját kohort vizsgálat*
rs1048945	<i>APEX1</i>	Polimorf., tumor rizikófaktor	ExPASy
rs11090865	<i>TRMU</i>	Süketség rizikófaktor	ClinVar adatbázis
rs11243011	<i>FARS2</i>	Benignus	Ensembl
rs112723255	<i>TYMP</i>	Benignus	Ensembl
rs1130409	<i>APEX1</i>	Benignus	Saját kohort vizsgálat*
rs1139897	<i>RHOT2</i>	Benignus	Saját kohort vizsgálat*
rs11479	<i>TYMP</i>	Valószínű benignus	Ensembl
rs11539445	<i>YARS2</i>	Polimorfizmus	Szegregációs vizsgálat
rs11550103	<i>RMND1</i>	Benignus	Ensembl
rs11551768	<i>MGME1</i>	Polimorfizmus	Ensembl
rs11557858	<i>RHOT2</i>	Polimorfizmus	Ensembl
rs116567033	<i>FARS2</i>	Benignus	Ensembl
rs139608228	<i>MTO1</i>	?	n/a
rs141265144	<i>MSTO1</i>	Benignus	Saját kohort vizsgálat*
rs141298312	<i>DARS2</i>	Benignus	ClinVar adatbázis
rs1427463	<i>POLG2</i>	Benignus	Ensembl
rs143030960	<i>SUCLG1</i>	Valószínű patogén	ClinVar adatbázis
rs143417446	<i>MGME1</i>	Patogén	Taylor és mtsai 2014
rs143811282	<i>MGME1</i>	Polimorfizmus	Szegregációs vizsgálat
rs145043138	<i>MTO1</i>	Patogén, légzési lánc defektus	Baruffini és mtsai 2013
rs1468138	<i>EARS2</i>	Benignus	Saját kohort vizsgálat*
rs147713038	<i>MSTO1</i>	Polimorfizmus	DMDM adatbázis
rs149324758	<i>IARS2</i>	?	n/a
rs150022801	<i>WARS2</i>	Benignus	Szegregációs vizsgálat
rs151097728	<i>TFAM</i>	Benignus	3 predikációs szoftver alapján
rs151331067	<i>MRPL3</i>	Patogén, Tourette szindróma	Guo és mtsai 2012
rs17850455	<i>POLG2</i>	Benignus	Ensembl
rs1937	<i>TFAM</i>	Benignus	Saját kohort vizsgálat*
rs200490327	<i>MARS2</i>	Benignus	canSAR
rs200759516	<i>MTO1</i>	?	n/a
rs2073951	<i>EARS2</i>	Benignus	Saját kohort vizsgálat*
rs2228526	<i>ERCC6</i>	Benignus	Saját kohort vizsgálat*
rs2228527	<i>ERCC6</i>	Benignus	Saját kohort vizsgálat*
rs2228528	<i>ERCC6</i>	Benignus	ClinVar adatbázis
rs2228529	<i>ERCC6</i>	Benignus	Saját kohort vizsgálat*
rs2291381	<i>MRPL3</i>	Polimorfizmus	ExPASy

<b>Mutáció ID</b>	<b>Gén</b>	<b>Jelentőség</b>	<b>Referencia</b>
rs2303909	<i>GFMI</i>	Benignus	Saját kohort vizsgálat*
rs2307441	<i>POLG</i>	Benignus	Ensembl
rs3087374	<i>POLG</i>	Benignus	Ensembl
rs3177338	<i>RHOT2</i>	Benignus	Saját kohort vizsgálat*
rs324136	<i>AARS2</i>	Benignus	Saját kohort vizsgálat*
rs35623954	<i>AARS2</i>	Benignus	Ensembl
rs35862137	<i>RARS2</i>	Benignus	Ensembl
rs370809239	<i>SCO1</i>	Benignus	3 predikciós szoftver alapján
rs3734800	<i>RMND1</i>	Benignus	Ensembl
rs3757370	<i>RARS2</i>	Benignus	Ensembl
rs3790549	<i>WARS2</i>	Benignus	Szegregációs vizsgálat
rs41549716	<i>POLG</i>	Polimorfizmus	Barthelemy és mtsai 2002
rs4253072	<i>PGBD3</i>	Benignus	Saját kohort vizsgálat*
rs4253211	<i>ERCC6</i>	Tumor rizikófaktor	Berndt és mtsai 2006
rs543213250	<i>MSTO1</i>	?	n/a
rs564555725	<i>MARS2</i>	Benignus	canSAR
rs61752783	<i>POLG</i>	Benignus	Ensembl
rs6497671	<i>EARS2</i>	Benignus	Saját kohort vizsgálat*
rs6934360	<i>RMND1</i>	Polimorfizmus	ExPASy
rs7187920	<i>EARS2</i>	Benignus	Saját kohort vizsgálat*
rs7320366	<i>SUCLA2</i>	Benignus	Saját kohort vizsgálat*
rs74874677	<i>DGUOK</i>	Benignus	Ensembl
rs76148008	<i>MRPS22</i>	Benignus	3 predikciós szoftver alapján
rs76599088	<i>MGME1</i>	Patogén	Taylor és mtsai 2014
rs77958705	<i>ATP5A1</i>	?	n/a
rs78770848	<i>IARS2</i>	Polimorfizmus	DMDM adatbázis
<b>rs ID-vel nem rendelkező SNV-k:</b>			
c.1552C>T	<i>PGBD3</i>	Benignus	3 predikciós szoftver alapján
c.1094G>A	<i>POLG</i>	Patogén	Szegregációs vizsgálat
c.1196A>G	<i>C10orf2</i>	Patogén, Perrault-szindróma	Demain és mtsai 2015
c.1358G>A	<i>C10orf2</i>	?	n/a
c.605G>C	<i>APEX1</i>	Patogén	Szegregációs vizsgálat
c.38G>C	<i>LRPPRC</i>	Polimorfizmus	Szegregációs vizsgálat
c.229G>A	<i>RHOT2</i>	Patogén	Szegregációs vizsgálat
c.367C>G	<i>EARS2</i>	Polimorfizmus	Szegregációs vizsgálat
c.38T>C	<i>POLG2</i>	?	n/a
c.2174C>T	<i>POLG</i>	?	n/a

#### A depléción háttérben talált eltérések:

A mtDNS deplécións gyermekek közül 9 gyermeket választottunk be az NGS-sel vizsgálható kohortba. Közülük 4 esetben nem találtunk patogén eltérést. A deplécións kohortban is 8 esetben megtalált *YARS2* Gly191Val mutáció két esetben volt jelen homozigóta formában, melyet a szegregációs vizsgálatok alapján polimorfizmusnak tartunk, ugyanis a tünetmentes szülők is hordozták a mutációt. Négy betegen azonosítottunk homozigóta Arg178Trp *MGME1* mutációt, melynek patogenitását egy esetben szegregációs elemzéssel alá tudtuk támasztani (a többi esetben a szegregációs mintázat elemzésére nem volt lehetőségünk).

#### **V/2.3. Autizmus spektrum betegségben a mitochondriális diszfunkció hatásának vizsgálata a betegség patomechanizmusában**

A vizsgált kohortban a 60 gyermekből (6 lány, 54 fiú,  $10,4 \pm 7,3$  év) 29 sporadikus eset volt. Családi anamnézis két esetben nem volt felvehető, mert ezek a gyermekek nem a biológiai szülőkkel élnek. Az esetek 48%-ában pozitív volt a családi anamnézis (29 eset): 20 esetben pszichiátriai betegségek (bipoláris betegség, depresszió, schizofrénia), 4 esetben mitochondriális betegség gyanú tekintetében (MD asszociált multiszipisztémás tünetek mint migrén, látás/hallás problémák, epilepszia, endokrin betegségek, carcinoma), 5 esetben pedig mindkét betegségcsoportba tartozó érintettség volt a családban. A gyermekeknek elkészült az ADI-R (és legtöbb esetben az ADOS) diagnosztikai tesztje, az ICD-10 (<http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2016/en#/F84.0>) alapján ASD diagnózist kaptak. Az ASD-MD betegek részletes klinikai, familiáris adatait és a társbetegségeket a 15. Táblázatban mutatom be.

**A mtDNS mutációk keresése:** 60 ASD betegből 10 esetben találtunk mtDNS depléciónt. Két gyermekben multiplex depléciónt, 8 esetben 7.9 kb egyes major depléciónt. A heteroplazmia arány minden esetben  $>20\%$  volt (15. Táblázat). Az egészséges kontrollok vizsgálata során 98 esetből 4-ben találtunk depléciónt. A vizsgált betegek 16.6%-ában találtunk mtDNS eltérést, az autista és kontroll csoport közötti különbség szignifikáns (Yates' chi-négyzet 4.5;  $p=0.03$ ; odds ratio 5.8; 95% CI: 1.2132-27.7289).

A hot spot régiók vizsgálata: m. 3243 A>G, m. 8993 T>C,G és m. 8344 A>G mutációk, negatív eredménnyel zárult 60 ASD betegben.



15. Táblázat. Az ASD-MD betegek adatai

(HP: heteroplazmia, CMV: cytomegalovirus, OCD: obszesszív-kompulzív megbetegedés, PD: Parkinson, AD: Alzheimer)

Beteg	Kor	Nem	Familiáris anamnézis	Társbetegségek	Minor anomáliák	CNS érintettség ASD mellett	Laktát szint (norm.: ≤1.6mmol/l)	mtDNS (HP)
ASD_P1	14	f	Anyai és apai ágon: mentális retardáció	Krónikus otitis	+	Hypacusis, orofaciális dyspraxia, mentális retardáció, ataxia, tremor	3.6	Multiplex deléció
ASD_P2	12	f	Anyai ágon: autoimmun hypothyreosis	Glutén szenzitivitás	+	Figyelemzavar, enyhe mentális retardáció	0.6	Egyes deléció (80%)
ASD_P3	10	f	Anyai ágon: epilepszia Apai ágon: szorongás	Fog problémák	+	Kongenitális anomáliák, coloboma, látási és légzési problémák, hypotonia, ataxia	1.9	Egyes deléció (20%)
ASD_P4	5	f	Anyai ágon: pánik betegség	Gastro-oesophagealis reflux	+	Postnatális növekedési defektus, mentális retardáció	1.3	Egyes deléció (65%)
ASD_P5	4	f	Negatív	Dermatitis	-	Nincs	0.9	Egyes deléció (35%)
ASD_P6	4	n	Előző gyermek abortált, Apai ágon: vízfejűség, fejlődési rendellenesség Anyai ágon: depresszió, szorongás, ptosis, OCD, carcinoma	Strabismus	+	Microcephalia, látásproblémák, hypotonia	2.3	Egyes deléció (20%)
ASD_P7	5	f	Negatív	Nincs	+	Enyhe ataxia	1.2	Egyes deléció (85%)
ASD_P8	5	n	Anyai ágon: bipoláris zavar (3 rokon)	Dermatitis, CMV, hepatitis	+	Hypacusis, enyhe myopathia	1.5	Egyes deléció (85%)
ASD_P9	21	f	Mindkét ágon: PD, AD, mentális retardáció Apai ágon: ASD gyanú	Nincs	+	Enyhe ataxia, láb hypertrophia	1.5	Egyes deléció (90%)
ASD_P10	5	f	Negatív	Nincs	+	Nincs	1.2	Multiplex deléció

**A *nDNS* mutációk keresése:** A vizsgált 60 ASD betegből egy esetben tudunk szindrómás formát azonosítani. Az ASD\_P3 esetben heterozigóta patogén mutáció igazolódott a *CHD7* génben az ASD-vel asszociációt mutató 103 gént tartalmazó panel NGS vizsgálata során. A *CHD7* gén mellett egy ismeretlen jelentőségű heterozigóta *TSC2* mutációt is találtunk. A beteg fenotípusa és a családi szegregáció alapján az ASD háttérében a *CHD7* mutáció következtében kialakuló CHARGE-szindróma igazolódott. Korábban ezt a szindrómát Zentner és mtsai írták le (Zentner és mtsai 2010). A talált *TSC2* mutáció jelentősége kérdéses, mivel a kisgyermeknek még nincsenek sclerosis tuberosára jellegzetes tünetei.

Jelen munkában a mtDNS delécióval rendelkező ASD esetekre fókuszáltunk (MD-ASD betegek). A betegek NGS eredményeit a 16. Táblázatban mutatom be (csak a patogén, valószínű patogén és kérdéses mutációkat tüntettem fel).

A 10 MD-ASD esetünkben 4 betegben ismert patogén mutációkat azonosítottunk heterozigóta formában ASD asszociált génekben vagy a mtDNS fenntartásáért felelős génekben (16. Táblázat). Ismeretlen jelentőségű eltéréseket találtunk 6 esetben. A

Három esetben a már korábban említett patogénnek leírt *YARS2* Gly191Val mutációt detektáltuk, melyet a szegregációs vizsgálatok alapján polimorfizmusnak minősítettünk (14. Táblázat). Egy esetben a *MGME1* Ser29Cys aminosavcseréjét találtuk, melyet a szegregációs vizsgálat ugyancsak polimorfizmusnak minősített.

Az intergenomiális panel génekben 3 gyermeknél találtunk patogén (gyanús) eltérést: patogén Thr265Ile *MGME1* mutációt (Taylor és mtsai 2014), ismeretlen jelentőségű *POLG* mutációt és egy valószínű patogén *SUCLG1* mutációt (dbSNP adatbázis) (16. Táblázat). A többi autista gyermek esetében csak ASD-asszociált eltéréseket detektáltunk, melyek mitochondriális vonatkozásai magyarázhatják a deléció jelenlétét.

A 16. Táblázatban bemutatott patogén/valószínű patogén mutációk (*MGME1*, *GABRB3*, *CHD7*, *SUCLG1*) a szegregációs vizsgálatok során a *DHCR7* kivételével (melyet megtaláltunk az anyában) de novo-nak bizonyultak.

16. Táblázat. ASD-MD betegekben talált eltérések NGS-sel

(<sup>1</sup>dbSNP, <sup>2</sup>Charge szindróma, <sup>3</sup>Taylor és mtsai 2014, <sup>4</sup>schizophrenia, autismKB, <sup>5</sup>szegregációs vizsgálataink alapján)

Beteg	Gén	Mutáció	Zigócia	Jelentőség	Polyphen2	SIFT	NGSpanel	Mt-korreláció
ASD_P1	FOXP2	A280T	HET	bizonytalan jelentőségű	0.99	0.23	Autista	+
	AUTS2	L433P	HET	bizonytalan jelentőségű	1	n/d	Autista	+
ASD_P2	CHD8	H2219P	HET	bizonytalan jelentőségű	0.96	0.04	Autista	+
	YARS2	G191V	HET	polimorfizmus <sup>5</sup>	0.6	0.01	Intergenom	+
ASD_P3	TSC2	K22N	HET	bizonytalan jelentőségű	1	0.42	Autista	+
	CHD7	Fs	HET	patogén <sup>2</sup>	n/d	n/d	Autista	+
ASD_P4	RELN	L496P	HET	bizonytalan jelentőségű	0.98	0.02	Autista	+
	KATNAL2	R1382S	HET	bizonytalan jelentőségű	0.99	0.14	Autista	-
	MGME1	S29C	HET	polimorfizmus <sup>5</sup>	P	0.02	Intergenom	+
ASD_P5	MGME1	T265I	HET	patogén <sup>3</sup>	P	0.25	Intergenom	+
ASD_P6	YARS2	G191V	HET	polimorfizmus <sup>5</sup>	0.6	0.01	Intergenom	+
	POLG	Q53RSK	HET	bizonytalan jelentőségű	n/d	n/d	Intergenom	+
ASD_P7	RELN	P1703R	HET	rizikófaktor <sup>4</sup>	1	0.11	Autista	-
	RAI	G1070R	HET	bizonytalan jelentőségű	0.99	0.01	Autista	+
ASD_P8	DHCR7	W119*	HET	patogén <sup>1</sup>	n/d	0.12	Autista	+
	NHS	R409Q	HET	bizonytalan jelentőségű	1	0.31	Autista	-
	GABRB3	E122*	HET	valószínű patogén	n/d	1	Autista	+
ASD_P9	YARS2	G191V	HET	polimorfizmus <sup>5</sup>	0.6	0.01	Intergenom	+
	SUCLG1	G79D	HET	valószínű patogén <sup>1</sup>	0.99	0	Intergenom	+
ASD_P10	PDE10A	P477A	HOM	bizonytalan jelentőségű	0.99	1	Autista	+
	NLGN3	T449P	HET	bizonytalan jelentőségű	0.95	0.15	Autista	+

### V/3. A kelet-ázsiai antropológiai marker jelentősége

A mtDNS 9-bp deléciót 14 esetben találtuk meg 1073 mitochondriális diszfunkció miatt vizsgált betegben (PCR-RFLP). Az elektroforézis során a normálisan 41-bp fragmens kisebbnek bizonyult, melynek oka az mt. 8272-8281 9-bp deléció jelenléte a NC7 intergénikus régióban (*COII-tRNA<sup>Lys</sup>*). A humán referencia mitochondriális genomban két tandem repeat (CCCCCTCTA) van ebben a régióban, a deléció következményeképpen azonban ez csak egy kópiában van jelen. A vizsgált kontroll populációban (N=468) csak egy esetben találtunk 9-bp deléciót. Frekvenciája 1.3%, a kontroll csoportban 0.2%. A különbség nagy a két csoport között, statisztikailag mégsem szignifikás ( $p=0.085$ ; Yates' chi-négyzet 2.97). Az 1073 betegből 203 esetben tudtuk a mitochondriális betegséget genetikailag is alátámasztani (azaz a patogén mtDNS mutációt azonosítani). Ebben a subkohortban tíz 9-bp deléciós páciens volt. Ha a genetikailag bizonyítottan mitochondriális betegeket hasonlítjuk össze a kontroll csoporttal, a deléció előfordulása szignifikánsan magasabb ( $p=0.00004$ ; Yates' chi-négyzet 16.69). A vizsgálni kívánt kohort megfelelő kiválasztása nagyban befolyásolja a nullhipotéziseinkre kapott válaszokat. A genetikailag bizonyított MD kohortban a 9-bp gyakorisága majdnem 5%. A 9-bp deléciót hordozó betegek mtDNS stabilitását vizsgálandó, végigszekvenáltuk a teljes mtDNS-t. Homoplazmikus m. 8270 C>T szubsztitúció társult a deléció mellé 11 esetben. Ezt a polimorfizmust (*COII-tRNA<sup>Lys</sup>* intergénikus régióban) ischaemiás szívbetegségben írták le (Ruppert és mtsai 2004). Egy család 3 tagjában ezek mellett az eltérések mellett egy új patogén mutációt találtunk heteroplazmikus formában (m.8332 A>G) a tRNA<sup>Lys</sup> anticodon karján (Gál és mtsai 2010). Nagyobb mtDNS deléciók is társultak a 9-bp delécióval: 5 esetben 7.9 kb common deléciót, 1 esetben multiplex deléciót találtunk. Egy betegben frame shift mutációt mutattunk ki a D-loopban, 4 esetben azonban semmilyen patogénnek feltételezhető eltérést sem tudtunk azonosítani.

*A 9-bp deléciót hordozók haplocsoport analízisének eredménye:*

Egy családban (két beteg) és egy kontroll személyben határoztuk meg a B haplocsoportot (17. Táblázat).

17. Táblázat. 9-bp deléció hordozó betegek és az egészséges kontroll haplocsoportja

Minta	Nem	Osztályozó polimorfizmusok	Haplocsoop.	Eredet	MtDNSalteráció	Fenotípus
9bp_P1	n	16126C-16140C-16183C-16189C-16209C-16294T-16296T-16311C	T*	Európa	m.8332A>G	Fiatalkori stroke, ataxia, hypacusis, dysarthria, hyperkinesis, alacsony IQ
9bp_P2	f	16126C-16140C-16183C-16189C-16209C-16294T-16296T-16311C	T*	Európa	m.8332A>G	Fiatalkori stroke, hyperkinesis, alacsony IQ
9bp_P3	f	16126C-16140C-16183C-16189C-16209C-16294T-16296T-16311C	T*	Európa	m.8332A>G	Fiatalkori stroke, súlyos dystonia
9bp_P4	n	16126C-16182C-16183C-16189C-16294T-16296T-16298C	T*	Európa	7.9kb deléció	Myalgia, myopathia, DM, hepatopathia
9bp_P5	n	16126C-16140C-16189C-16294T-16295T-16296T-16311C	T*	Európa	D-loop frame shift	Kéz tremor, gyengeség
9bp_P6	n	16126C-16182C-16183C-16189C-16294T-16296T	T*	Európa	Multiplex deléció	Ataxia
9bp_P7	f	16126C-16294T-16296T-16324C	T4	Európa	-	Spaszticitás, tremor, myalgia, myopathia
9bp_P8	f	7028T-14766C	HV	Európa	-	Dysarthria, spaszticus paraparesis, ataxia
9bp_P9	n	16192T-16256T-16270T-12308G	U5a1	Európa	-	Dysarthria, paraesthesia
9bp_P10	f	16256T-16270T-16362C-16399G	U5a1a	Európa	-	Epilepszia, stroke-ok
9bp_P11	f	16129A-16224C-16311C	K	Európa	7.9kb deléció	Spaszticitás, myopathia
9bp_P12	f	16111T-16129A-16140C-16153A-16183C-16189C-16193+1C-16234T-16243C	B	Ázsia	7.9kb deléció	Myopathia, DM
9bp_P13	f	16111T-16129A-16140C-16153A-16183C-16189C-16193+1C-16234T-16243C	B	Ázsia	7.9kb deléció	Myopathia, DM
9bp_P14	f	16126C-16182C-16183C-16189C-16294T-16296T-16298C	T*	Európa	7.9kb deléció	Ataxia
9bp_K1	f	16092C-16182C-16183C-16189C-16217C	B	Ázsia	-	Egészséges kontroll

Az összes többi beteg európai haplocsoportokba sorolható, sok esetben ritka típusokba. A legtöbb vizsgált beteg (N=8) T\* és T4 subhaplocsoportba tartozott a besorolás alapján (a magyar populációban a T haplocsoport frekvenciája 7.8%, ref.: Bogácsi-Szabó és mtsai 2008). Két esetben a hasonlóan ritka U5, egy esetben a K haplocsoportot tudtuk definiálni. Találtunk egy beteget, aki pedig a nagyon ritka HV haplocsoportba tartozik.

## VI. MEGBESZÉLÉS

### VI/1. Az aKGDH deficiencia háttérében álló genetikai variációk és az Alzheimer-kór kapcsolatának vizsgálata

Patogénnek feltételezett aminosavcserét okozó mutációt az aKGDH-t kódoló génnek vizsgálatakor 2 esetben találtunk heterozigóta formában szövettanilag bizonyítottan Alzheimer-kóros betegek agyában. Az *OGDH* Ser54Arg mutáció nagy valószínűséggel patogén mutáció ([ftp.nectar.mutation.org](http://ftp.nectar.mutation.org)), mely közvetlenül az általunk azonosított aminosavcsere (Ser55Leu) előtt lokalizálódik. Emellett figyelembe véve a predikciós score-okat, és azt, hogy a kontroll mintákban nem volt jelen, az általunk talált mutációt is patogénnek feltételezzük. A *DLD* Arg263His aminosavcsere az enzim NAD<sup>+</sup>/NADH-kötő régiójában helyezkedik el, ebben a régióban eddig csak egy mutációt azonosítottak: Gly194Cys aminosavcserét. Az irodalomban a legtöbb mutációt a *DLD* interface régiójában írták le. Mindkét eltérés a predikciós szoftverek alapján patogén. A *DLST*-ben talált mutációt polimorfizmusnak minősítettük a kontroll agymintában való jelenléte miatt, ahol semmi nyoma nem volt neuropathológiai elváltozásnak, az érintett 74 évesen heveny keringési elégtelenségben exitált.

Az Alzheimer-kór háttérében általunk talált aKGDH alegységek génjeinek heterozigóta eltérései feltételezéseink szerint genetikai rizikó tényezőként szolgálnak az AD kórban, míg a homozigóta mutációk súlyos, csecsemőkorban kezdődő letális aKGDH-deficienciát okozhatnak. Az a kérdés, hogy hányszorosára emelik a betegség kialakulásának rizikóját ezek a genetikai biomarkerek, még nem válaszolható meg jelen vizsgálat kis elemszámú volta miatt. Nagyobb kohorton érdemes lenne ezeknek a genetikai tényezőknek a további vizsgálata.

Az *OGDH*-ban talált eltérést a temporális lebenyben azonosítottuk, a frontális lebenyben azonban nem volt jelen. Ez alátámaszthatja a feltételezést, hogy az életünk során keletkező szomatikus mutációk is károsítják az agyban az aKGDH működését, mely ROS felhalmozódáshoz és idegrendszeri károsodáshoz vezethet.

## **VI/2. A mitochondriális DNS és a nukleáris genom közötti kommunikációért felelős gének rendellenességei**

### **VI/2.1. Az intergenomiális kommunikációért felelős gének Sanger szekvenálási eredményei**

Munkánk során azokat a géneket elemeztük Sanger szekvenálással, melyekben az irodalom alapján leggyakrabban írták le az általunk talált fenotípusokkal kapcsolatos eltéréseket. A legtöbb esetben a *POLG* gént szekvenáltuk, hiszen ennek hibái relatíve gyakoriak és nagyon változatos a klinikai megjelenése. A találati arányunk az *ANTI* és *TK2* génben 0 volt, az *RRM2B* gén patogén mutációját egy családban, a *TWINKLE* gén mutációját egy családban, míg a *POLG* gén mutációját 6 családban azonosítottuk az összesen vizsgált 131 esetből. Mindezek alapján konklúzióként levonható az a megállapítás, hogy olyan betegségcsoportok esetében, ahol a klinikai tünetek és a biomarkerek alapján nem specifikálható a betegség és a tünetek hátterében számos gén állhat, eredményesebb az NGS panel vizsgálat.

A *POLG* génben talált 7 eltérés közül 4 eddig nem leírt valószínűleg patogén mutáció, melyeknek jelentőségét predikációs szoftverek segítségével és szegregációs vizsgálatokkal igyekeztünk alátámasztani. Az Ala467Thr (Chan és mtsai 2005), Trp748Ser (Hakonen és mtsai 2005) és Tyr955Cys (Van Goethem és mtsai 2001) más betegekben már leírt patogén mutációk. Négy eltérést azonban mi találtunk meg először: Ser240Pro, Gly365Glu, Ala1082Thr és Cys1197Arg (12. táblázat), szegregációs vizsgálatok alapján patogénnek feltételezzük őket. A *POLG* mutációk következtében manifesztálódó fenotípusok nagy variabilitást mutatnak, autoszomális domináns (PEO, pszichiátriai kórképek) és recesszív (PEO, Alpers, SCA, neuropathia, myopathia) öröklésmenetet is találtunk. Nagyon gyakran társulnak pszichiátriai tünetek a *POLG* mutációkhoz, általában multiszisztémás betegség részként, de néha izolált formában is. A patogén mutációk mellett előforduló modifikáló faktorok (polimorfizmusok) is befolyásolhatják a fenotípust, de láthatunk példát arra is, hogy ugyanaz a genotípus (*POLG\_P3* család) különböző tüneteket produkál. Egyes esetekben a patogén mutációk vagy modifikáló faktorok valproát toxicitásra hajlamosító genetikai markerek is egyben.

## VI/2.2. Intergenomiális NGS eredmények megbeszélése mitochondriális páciensekben

A 36 vizsgált beteg közül 19 deléciós és 5 depléciós esetben találtunk missense eltéréseket. Jelen tanulmányban csak azokat a missense mutációkat részleteztük, melyeket adatbázisokban, szakirodalomban nem találtunk benignusnak besorolva (azaz patogének, vagy jelentőségük mindeközéig ismeretlen). Mitochondriális deléciós betegek esetében a talált mutációk **heterozigóta** formában voltak jelen, míg a depléciós gyermekeknél a patogén *MGME1* mutációk **homozigóta** formában voltak detektálhatóak.

A mtDNS depléció háttérében az eddig olvasható irodalom adataival (Alston és mtsai 2013) ellentétben nem találtunk egy esetben sem *TK2* mutációt; viszont *MGME1* mutációkkal, egy esetben pedig *WARS2* His151Arg heterozigóta mutációval társulva találtunk depléciós szindrómát. A His151Arg eltérést két predikációs szoftver (SIFT és MutationTester) patogénnek minősíti. Az aminoacil-tRNS szintetáz család (*ARS2*) enzimei a meghatározott aminosavak mt tRNS-hez való kötődését biztosítják, mutációik különböző tünetegyütteseket okoznak szövetspecifikus érintettséggel. A *DARS2*, *EARS2* és *MARS2* mutációk leukoencephalopathiát okoznak, a *RARS2* mutációk pontocerebellaris hypoplasziát, *HARS2* és *LARS2* mutációk ovárium diszgenézist és sensorineurális hallásvesztést, *AARS2* mutációk csecsemőkori cardiomyopathiát, *SARS2* mutációk hyperuricémiát, tüdő hypertenziót és veseproblémákat, *FARS2* mutációk pedig mitochondriális encephalopathiát (Riley és mtsai 2013). Saját kohortunkban a gyakori heterozigóta *YARS2* polimorfizmuson kívül *WARS2* és *IARS2* eltéréseket találtunk missense patogén(gyanús) formában, melyek a triptofán és az izoleucin tRNS-hez való kapcsolódásáért felelősek. A *YARS2* Gly191Val eltérés 8/27 deléciós és 2/9 depléciós esetben fordult elő, ezen gén defektusát homozigóta formában légzési lánc elégtelenség, myopathia, laktát-acidózis és sideroblastos anaemia-val írtak le (Riley és mtsai 2010). Ugyanez a munkacsoport 3 évvel később compound heterozigóta formában Gly191Asp-t talált, mely következtében az enzim katalitikus hatékonysága 38-ad részére csökkent (Riley és mtsai 2013). Kohortunkban az előfordulási gyakorisága magasabb, mint az irodalmi értékek, >25% (MAF: 0.1266), szegregációs elemzéssel kizártuk patogenitását, polimorfizmusnak tartjuk. Az



adatbázisokban a kétféle eltérés (Gly191Asp és Gly191Val) egy azonosító szám (rs11539445) alatt szerepel, és jelentőségét, előfordulási gyakoriságát is közösen határozzák meg (dbSNP: „patogén”), holott a kétféle aminosavcsere között nagy a különbség. A glicin és valin közötti különbség lényegesen kisebb és nem okoz akkora változást a fehérjeszerkezetben, mint a glicin-aszpartát csere. Vizsgálataink alapján azt gondoljuk, hogy az adatbázisban szereplő patogenitásra vonatkozó adat a Gly191Asp eltérésre vonatkoztatható, míg az általunk talált gyakori Gly191Val polimorfizmusnak bizonyul. A *WARS2* His151Arg eltérést a szegregációs vizsgálatok elvégzése után benignusnak soroltuk be.

A *MGME1* gén Arg178Trp és Thr265Ile feltételezeten patogén mutációit egy közlemény PEO-val kísért myopathiás betegen írták le, akinél a légzési lánc defektusa igazolódott (Taylor és mtsai 2014). A szerzők Kornblum és mtsai 2013 munkájára hivatkozva hozták meg a következtetést a patogenitásra vonatkozóan, amelyben az *MGME1* kimagasló szerepét írják le a mtDNS fenntartásában. Három izombeteg családban találtak *MGME1* mutációkat. A *MGME1* egy mitochondriális RecB-típusú exonukleáz kódol, az egyszálú DNS-t hasítja, esszenciális a mtDNS szintéziséhez és repair-hez (Kornblum és mtsai 2013). Kohortunkban az Arg178Trp *MGME1* mutációt heterozigóta formában 3 mtDNS deléciós esetben, homozigóta formában 4 depléciós esetben találtuk meg (további *MGME1* mutációkat ASD-MD betegekben írtam le: ld. IV/2.3. fejezet). Heterozigóta formában PEO/COPD, MELAS/TIA fenotípust eredményezett betegeinkben, míg homozigóta formában súlyos gyermekkori depléciós szindrómával társult az eltérés. Perrault-szindrómás betegünkben compound heterozigóta *TWINKLE* mutációkkal (Del\_P3) együtt fordult elő. Szegregációs vizsgálatot négy esetben tudtunk végezni az *MGME1* mutációra, egyik esetben sem találtuk meg az egészséges szülőkben az eltérést, mely a patogenitását támasztja alá.

Egy tipikus mitochondriális tünetekkel rendelkező (epilepszia, myoclonus, kognitív hanyatlás) páciensünkben (Del\_P7) a Thr308Ala *MTO1* mutáció feltételezett patogenitását (Baruffini és mtsai 2013) megerősíthetjük, ugyanis az irodalmi adatok alátámasztják a mutáció következtében kialakuló OXPHOS defektust. Ugyanezen beteg *RHOT2* génjében is találtunk egy Val77Met aminosavcserét, mely 3-féle predikciós

szoftver értékelése alapján egyértelműen patogén besorolást kapott. A *RHOT2* (*MIRO2*) egy mitochondriális GTPáz kódol, melynek a mitochondriális homeosztázisban, apoptózisban van szerepe (Fransson és mtsai 2003). Feltételezzük, hogy a 2 heterozigóta mutáció gén-gén kölcsönhatása eredményezi a beteg klinikai tüneteit. Mind a MTO1 mind a RHOT2 szegregációs vizsgálata ezen SNV-k patogenitását alátámasztja.

A Ser75Asn *MRPL3* mutációt korábban Tourette-szindrómával összefüggésben írták le egy *OFCC1* eltéréssel együtt (Guo és mtsai 2012). A mi kohortunkban az *MRPL3* mutációt egy spasticus tetraparesisben szenvedő betegben (Del\_P11) találtuk meg *IARS2* missense eltéréssel együtt (SIFT score 0.02, MutationTester alapján betegség okozó eltérés). Az *IARS2* defektusát neuropathia, sensoneurális hallásvesztéssel és növekedési hormon deficienciával összefüggésben írták le (Schwartzentruber és mtsai 2014). A szegregációs vizsgálat folyamatban van.

Az *IARS2* Arg8Leu eltérés hallásvesztéses tünettől társulva detektálható volt egy spinocerebellaris ataxiás betegünkben is, akinél egyidejűleg a *POLG* Gly365Glu aminosavcserét is megtaláltuk. A klinikai tünetek valószínűleg itt is a gén-gén interakciók következtében alakulnak ki.

Az *ATP5A1* gén defektusait OXPHOS és ATP-szintáz defektus háttérben írták le, mely a progresszív encephalopathia súlyos letális formáját okozta az Arg329Cys mutáció (Jonckheere és mtsai 2013) és a Tyr321Cys (Lieber és mtsai 2013) homozigóta formában. Az általunk talált heterozigóta Ile173Val SNV betegünk tüneteit (mitochondriális encephalopathia) magyarázhatja abban az esetben, ha a szegregációs vizsgálat is megerősíti azt.

Összességében elmondhatjuk, hogy a mtDNS delécióval és deplécióval járó mitochondriális betegeinkben *MGME1* eltéréseket találtunk (Arg178Trp, Thr265Ile) leggyakrabban, így ez a gén a *POLG* gén mellett központi jelentőségű lehet az intergenomiális kommunikációs defektusok genetikai háttérének igazolása során. Kohortunkban az Arg178Trp csere előfordulási gyakorisága magas, majdnem 20%, de az 1000 genom projekt alapján számolt MAF (minor allél frekvencia) érték alacsony

(*MGME1* Arg178Trp 0.0022; Thr265Ile 0.0044). Szegregációs vizsgálatokkal alátudtuk támasztani ennek az eltérésnek a patogenitását.

Az intergenomiális kommunikáció háttérben álló gének sokfélesége és variábilis fenotípusos megnyilvánulási formái miatt sok újdonságot rejt még ez a terület, melynek csak egy kis szeletébe tudtam több éves munkám során belepillantani. A NGS-sel vizsgált génpanel összetétele erőteljesen befolyásolja az eredményeket, találati arányokat (Vasta és mtsai 2012), az általam összeállított panel egyedi mivolta miatt mindenképpen új információkat nyújt a mitochondriális defektusok háttérének felderítéséhez.

### **VI/2.3. Az mtDNS deléció és az ASD összefüggései**

Első alkalommal végeztünk komprehenzív, több mint 150 gén egyidejű átfogó vizsgálatára kiterjedő vizsgálatot ASD-MD betegek kohortjában. Munkánk során kizárólag azon ASD betegekre fókuszáltunk, akik mitochondriális deléciót hordoznak. Kimutattuk, hogy az ASD kohortban szignifikánsan nagyobb a mitochondriális deléciók előfordulása, mint az egészséges kontroll populációban, annak ellenére, hogy a kontroll csoport jóval idősebb volt (a kor előrehaladtával a mtDNS egyre több mutációt akumulálhat magában, a környezet károsító hatásainak egyre jobban ki van téve). Az ASD-MD kohortban a 106 ASD génen kívül 51 intergenomiális gént vizsgáltunk. A mitochondriális betegségek háttérben sok esetben mtDNS deléciók állnak (nDNS mutációk következményeképpen), a szomatikus mutációk pedig nem örökletes neurodegeneratív betegségeket okozhatnak. Az ASD betegek mitochondriuma sokkal sebezhetőbb a magasabb ROS termelés és alacsonyabb antioxidáns szint miatt (Frye és Rossignol 2011). Munkám során nem csak a deléciók jelenlétét, genetikai háttérét vizsgáltuk, hanem az elváltozást mutató ASD-asszociált gének mitochondriummal való kapcsolatát is.

Több mint 30 éve tudjuk, hogy az ASD mitochondriális diszfunkcióval jár (Coleman és Blass 1985), genetikai háttére aránylag mégis kevésbé kutatott terület. Felmerül a kérdés, hogy a MD elsődleges vagy másodlagos; a tünetek kiváltója, vagy a tünetek súlyosbító tényezője, szerepet játszik-e a patomechanizmusban vagy downstream hatás,

esetleg csak epifenomén?! Rossignol és Frye munkájában az ASD-MD betegek 79%-ában nem tudták tisztázni a genetikai hátteret, ami a szekunder mitochondriális károsodásra irányítja a figyelmünket (Rossignol és Frye 2012). Egy kis mintaszámú vizsgálatban a 12 ASD betegből 8 esetben állapították meg a mtDNS deléciót (Smith és mtsai 2009). Az ASD-MD betegek tünetei nagyon karakterisztikusak, Rossignol és Frye összehasonlította az ASD-MD kohortot a sima ASD, ill. sima MD kohortokkal (Rossignol és Frye 2012). Az ő ASD-MD betegeikben az emelkedett laktát, piruvát, megkésett motoros fejlődés és gastro-interstinális tünetek szignifikánsabban gyakrabban fordultak elő, mint az általános ASD kohortban. ASD-MD betegek között a fiú/lány arány kiegyenlítettebb volt. A mi eredményeink megfelelnek ezeknek a megfigyeléseknek, a legtöbb páciensünknek volt mitochondriális-asszociált tünete: izomgyengeség, megkésett motoros fejlődés, hypoacusis, ataxia. A klasszikus deléciós szindrómák (PEO, Pearson-, Kearns-Sayre-szindróma) fenotípusai nem jelentek meg kohortunkban.

### **VI/2.3.1. ASD-asszociált gének és az intergenomiális kommunikációban résztvevő gének komplex elemzése a mitochondriális működéssel összefüggésben**

A 10 esetből 3 gyermekben találtunk patogén vagy valószínűleg patogén intergenomiális génmutációkat. 7 esetben patogén (gyanús) eltérést nem tudtunk azonosítani a vizsgált 51 intergenomiális kommunikációért felelős génben, azonban hordoztak valószínűleg patogén eltéréseket ASD-asszociált génekben: *RELN*, *DHCR7*, *GABRB3*, *CHD7*, *CHD8* és eddig nem leírt bizonytalan jelentőségű mutációkat a *FOXP2*, *RAI*, *NHS*, *PDE10A* és *NLGN3* génekben. Ezek a gének szerepet játszanak a sejtszabályozásban, szignál transzdukcióban, ill. különböző jelátviteli mechanizmusokban, melyek a mitochondrium működését is szabályozhatják. A *DHCR7* protein a koleszterol termelést szabályozza, defektusa Smith-Lemli-Opitz szindrómát okoz (SLOS). A magas 7DHC (dehydro-koleszterol) szint mitochondriális diszfunkcióhoz vezet (Chang és mtsai 2014). A szinaptikus kapcsolatokban való abnormitások is befolyásolhatják a mitochondriumot, *GABRB3* mutáció következtében

felborulhat a glutamát/GABAerg rendszer, a megnövekedett glutamát szint ROS-t termel, mely gátolja a beta-oxidációt. Az evolúciósan konzervált FOXP2 transzkripciósfaktor sokféle gént szabályoz, mutációi SPCH1-et okozhatnak (speech-language disorder 1). A RAI1 a mitochondriumban lokalizálódik, főként idegszövetben expresszálódik, a kromatin remodeling transzkripcionális regulátora, szerepe van a neuronális differenciációban, az embrionális és postnatális fejlődésben. A *PDE10A* gén mutációi a ciklikus nukleotid koncentrációt befolyásolják, a foszfodiészteráz a 3' ciklikus foszfát-kötést hidrolizálja cAMP vagy cGMP-ről. A foszfodiészterázok ezáltal szabályozzák ezeknek a másodlagos hírvivő molekuláknak a szintjét, lokalizációját, aktivitását. Sokféle sejtszintű transzdukciós útvonalnak résztvevői, szerepük van a tanulási és memória folyamatokban.

Az MD-ASD betegek 30%-ában találtunk az intergenomiális kommunikációban érintett génekben patogén (gyanús) mutációt. Jelen kutatás keretei között csak 51 gént volt lehetőségünk vizsgálni, ennél nagyságrendekkel több gén állhat a mitochondriális defektus hátterében, nem beszélve a másodlagos károsodásról, melynek okait nem genetikai szinten, hanem a környezeti hatásokban kell keresnünk. A leggyakrabban érintett gén vizsgálatom során ebben a kohortban is a *MGME1* volt.

*POLG* és *SUCLG1* mutációkat 1-1 esetben találtunk. A *POLG* mutációkat pszichiátriai kórképekben (pl. schizofrenia) leírták, autizmussal kapcsolatban azonban nincsenek adatok. *SUCLG1* homozigóta vagy compound heterozigóta mutációkat különböző tünetekkel hozták összefüggésbe: laktátacidózis, hypotonia, akaratlan mozgások, hallás problémák, megkésett fejlődés (Rouzier és mtsai 2010). Érdekes módon a patogén (gyanús) missense mutációk minden esetben heterozigóta formában fordultak elő, feltételezzük hogy a gének/géntermékek közötti kölcsönhatások bonyolultabbak. Ezek hatásának elemzését komplex, párhuzamosan még több gén bevonásával érdemes tovább vizsgálni.

Egy szindrómás esetben (ASD\_P3) sikerült azonosítani az egyértelmű genetikai hátteret: egy *CHD7* mutációt, mely CHARGE szindrómát (Coloboma, Hearth defect, Atresia, Retardation, Genital defect, Ear anomalies) okoz, emellett egy *TSC2* mutációt. A *CHD7* (chromodomain helikáz DNS-kötő fehérje) a kromatin remodelinget szabályozza. A *TSC2* mutációk aktiválni tudják az mTORC1-et, ami megnövekedett

mtDNS expresszióhoz és mitochondriális denzitáshoz vezet. A TOR egy Ser/Thr kináz, különböző proteinekkel komplexet alkotva szabályozza a sejtciklust, mitochondriális membránpotenciált és az ATP-szintézist (Koyanagi és mtsai 2011).

Összefoglalva azt gondoljuk, hogy a mtDNS deléciók az ASD-ben másodlagos jelenségnek minősíthetők, melyek vagy a betegséggel elsődlegesen asszociált ASD gének károsodásának következményeként, vagy külső környezeti hatások következtében alakulnak ki.

### **VI/3. NGS-sel talált kérdéses, új mutációk jelentősége, besorolása**

A kérdéses mutációkat az ACMG standard-ek (Richards és mtsai 2015) alapján próbáltuk besorolni.

Az irodalomban mindezidáig nem ismert jelentőségű mutációk, melyek predikációs szoftverek alapján patogénnek tűntek: *WARS2* (His151Arg és Ala267Pro), *IARS2* (Arg8Leu), *RHOT2* (Val77Met), *APEX1* (Arg202Pro), *ATP5A1* (Ile173Val), *MTO1* (Pro568Ala), melyek közül az *APEX1*, *RHOT2* és *IARS2* eddig nem leírt eltérések patogenitását szegregációs elemzéssel alá tudtuk támasztani. A heterozigóta formában való előfordulás jelentősége kérdéses. A *WARS2* eltérések a szegregációs vizsgálatok alapján polimorfizmusnak tűnnek.

Ismeretlen jelentőségű mutációk, melyek a predikációs szoftverek alapján benignusak: *TFAM* (Gln100Glu), *SCO1* (Pro8Ser), *MRPS22* (Thr206Ile), *PGBD3* (Arg518Cys). Ezen eltéréseket 3 program (SIFT, PolyPhen2, MutationTester) egyöntetű predikációja alapján benignusnak gondoljuk.

Szegregációs vizsgálat során polimorfizmusnak minősítettük a következő eltéréseket: az *EARS2* génben c.367 C>G (Leu123Val) és a *LRPPRC* génben c.38 G>C (Arg13Pro) mutációk, melyeket eddig nem írtak le az irodalomban; és a *YARS2* génben gyakran előforduló Gly191Val eltérést, *MGME1* génben a Ser29Cys aminosavcserét.

Az ismeretlen jelentőségű mutációk több esetben más leírt patogén vagy feltételezett patogén mutációkkal társultak, mely összhangban áll feltételezésünkkel, hogy a mitochondrium működését befolyásoló gének direkt/indirekt módon hatással vannak

egymásra és összehangolt működésük szükséges a mitochondrium normális működéséhez.

#### **VI/4. A mtDNS 9-bp deléciójának klinikai jelentősége**

Kutatásaink eredményeképpen elsőként határoztuk meg a 9-bp deléció előfordulási gyakoriságát a magyar populációban, amely magasabbnak bizonyult, mint ahogy feltételezték Európában (Watkins és mtsai 1999). Az európai populációban csak három esetben írták le: két skót (Thomas és mtsai 1998) és egy spanyol esetben (Barrientos és mtsai 1995). A 9-bp deléció főként Ázsiában és a Pacifikus régióban fordul elő, főként a B haplocsoporttal asszociáltnan. A mi kohortunkban a B haplocsoport 3 esetben fordult elő (két beteg és egy kontroll). Eseteink többségében a 9-bp deléció a T haplocsoporttal asszociálva fordult elő, amely nem egy gyakori haplocsoport Európában. Néhány esetben más, Európában ritka haplocsoportokkal fordult elő, mint az U5, K és HV.

Eredményeink alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a 9-bp deléció jelenlétét a magyar populációban magyarázhatja a magyarok vándorlása, de lehet recurrens deléció is, melyet Redd feltételezett (Redd és mtsai 1995). Thomas és munkatársai szerint a 9-bp deléció a mtDNS replilációja során SSM (slipped-strand mispairing) következtében keletkezik (Thomas és mtsai 1998). Ez az evolúció során többször is megtörténhet egymástól függetlenül. A mtDNS deléciójának, a replikáció megcsúszásának a kiváltó oka lehet egy repetitív szekvencia (Schon és mtsai 1989).

Mivel a 9-bp deléció asszociációt mutat a mitochondriális betegségekkel, azt gondoljuk, hogy az adott mtDNS régió instabilitását okozza, növeli, és más patogén mutációk kialakulására hajlamosít (Pentelényi és mtsai 2014). Hasonló jelenséget tapasztalt Liu Ázsiában: a 9-bp deléció prevalenciája taiwani kontrollokban 21% volt, míg m.8344 A>G szubsztitúcióval rendelkező betegekben 67% és m.3243 A>G mutánsoknál 39% (Liu és mtsai 2005). Kohortunkban a 9-bp deléció sok esetben nagyobb deléciókkal társult (14 esetből 6-ban). A major deléciók előfordulása a magyar MD populációban 21% (Reményi és mtsai 2015), ennél magasabb arányt mutat a 9-bp deléciós kohortunkban. Egy orosz 9-bp deléciót hordozó család egy tagjában (Sokolova és mtsai 2002) 5.5 kb mtDNS deléciót detektáltak nagyon közel a 9-bp delécióhoz (mt 8278-

13770), mely a 9-bp deléció instabilitást provokáló hatását támasztja alá. Mivel a mtDNS alterációk nem csak a 9-bp deléció közvetlen közelében alakulnak ki, a pontos patogenezishez további vizsgálatok szükségesek. A 9-bp deléció jelenléte nem csak mtDNS betegségek prediktív biomarkere lehet, asszociációt mutattak ki hepatocellularis carcinomával a kínai populációban, főként az alkoholisták körében (Jin 2012). Számítógépes szimulációval modellezték, hogy a 9-bp deléció egy micro-RNS kötőhelyen lokalizálódik, ami a mitochondriális metabolizmust szabályozza.

A 9-bp deléció előfordulásának különbsége a teljes MD kohort és a genetikailag alátámasztott mtDNS betegek között azzal magyarázható, hogy a mitochondriális betegségek nem csak mtDNS mutációk következtében alakulhatnak ki, hanem nDNS hibák miatt is. A 9-bp deléció csak a mtDNS stabilitását befolyásolja. Kimutattuk, hogy a 9-bp deléció bár az ázsiai és Pacifikus régióra jellemző, jelen van a magyar populációban is, nem csak ázsiai hanem európai típusú haplocsoportokban is (Pentelényi és mtsai 2014). Jelenléte nem csak a magyarok vándorlásával magyarázható, keletkezhetett többször különböző ágakon az evolúció során “slipped-strand mispairing” miatt. A mtDNS betegek közötti gyakori előfordulásából arra következtetünk, hogy instabilitást okoz a régióban és más patogén mutációk kialakulására hajlamosít.



## VII. KÖVETKEZTETÉSEK

Kutatásainkkal a mitochondriális diszfunkció különböző humán betegség vonatkozásait világitottuk meg.

Eredményeimet a következőkben foglalom össze:

1. Vizsgáltuk egy klasszikusan multifaktoriális betegség, az Alzheimer-kór aKGDH genomikai eltéréseit, mely során azt találtuk, hogy az aKGDH egyes alegységeinek genetikai variánsai hajlamosíthatnak AD kialakulására, de ez a genetikai rizikó tényező nem tekintendő vezető tényezőnek, egy a számos genetikai rizikó faktor között.
2. A mitochondriális betegségek etiopatogenezisének kutatása során az intergenomiális kommunikációban részt vevő azon génekre fókuszáltam, melyek humán betegség asszociációjáról meg csak korlátozott mennyiségű információ állt rendelkezésünkre. Megállapítottuk, hogy a mtDNS delécióval rendelkező betegek intergenomiális kommunikációban részt vevő génei közül a leggyakrabban károsodó *POLG* mellett a *MGME1* gén is gyakran hordoz eltéréseket.
3. Egy betegnél a nagyon ritka Perrault-szindróma háttérében compound heterozigóta mutációt írtunk le a világon másodikként. Megfigyelésünkkel alátámasztottuk azt a feltételezést, miszerint a *TWINKLE* gén hibái is eredményezhetnek Perrault-szindrómát. Így bővítettük a Perrault-szindróma háttérében álló gének sorát.
4. Igazoltuk, hogy az intergenomiális kommunikációban résztvevő gének nem csak egyféle öröklődéssel okozhatnak humán betegségeket, hanem egyes gének hibái autoszomális domináns módon öröklődve enyhébb fenotípust, autoszomális recesszív módon öröklődve súlyosabb fenotípust eredményeznek (pl. *RRM2B* heterozigóta mutációja PEO-t eredményezett az általunk megfigyelt családban, a *POLG* mutációknál a felnőtt betegek

heterozigóta formában hordozták a mutációt, a gyermekkori kezdet azonban compound heterozigóta státuszhoz kötődött).

5. Az intergenomiális gének NGS vizsgálata során de novo patogén MGME1 mutációkat találtunk betegeinkben, mely homozigóta formában mtDNS depléciós szindrómát eredményezett, heterozigóta formában pedig mtDNS deléciót és sokkal enyhébb klinikai fenotípust. Több új, eddig ismeretlen eltérést írtunk le, illetve ismert eltérések jelentőségét határoztuk meg, értékeltük át.
6. Első alkalommal végeztünk komprehenzív, több mint 150 gén egyidejű analízisére kiterjedő vizsgálatot MD-ASD betegeknél. Megállapítottuk, hogy a mitochondriális deléciók szignifikánsan gyakrabban fordulnak elő ASD betegeknél, mint az egészséges populációban. Minden általunk vizsgált MD-ASD esetben találtunk direkt vagy indirekt mitochondriummal összefüggő génhibát. Az érintett ASD-asszociált géneknek szerepe van a sejt szabályozásban, szignál transzdukcióban, különböző jelátviteli folyamatokban. Kimutattuk, hogy a mitochondriális deléció a betegek többségében nem primer intergenomiális kommunikációzavar következtében kialakuló csírasejt mutáció miatt alakult ki, hanem vagy a betegséggel elsődlegesen asszociált ASD gének károsodásának következménye, vagy a külső környezeti tényezők hatása.
7. Elsőként határoztuk meg a 9-bp deléció kelet-ázsiai antropológiai marker gyakoriságát a magyar populációban, melynek átfogó tanulmányozására Európában még nem volt példa. Eredményeinkkel alátámasztottuk azt a feltételezést, miszerint a deléció instabillá teszi a mtDNS-t, ez alapján MD rizikófaktornak tartjuk. A kelet-ázsiai antropológiai marker gyakori előfordulásának magyarázata a magyar populációban lehet a magyarság történelme, de nem zárható ki a recurráló mutáció kialakulásának lehetősége sem.

## VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

A mitochondrium irányításáért, működéséért, fennmaradásáért nagyobb részt a nukleáris DNS-ben kódolt információk felelősek. Diszfunkciója szerepet játszik a neurodegeneratív és neurodevelopmentális betegségekben. A mitochondrium károsodása következtében csökken az energiatermelés, nő a ROS képződés. Kutatásaim során azon nukleáris géneket kerestem és vizsgáltam, melyek jelentős befolyással bírnak a mitochondrium működésére; mitochondriális deléció, ill. depléció hátterében állhatnak. Célom volt közelebb kerülni a neurodegeneratív (Alzheimer-kór) és neurodevelopmentális (autizmus) betegségek patomechanizmusában fontos mitochondriális diszfunkció genetikai hátterének megértéséhez, és az ok-okozati viszonyok feltárásához. A rutin diagnosztika során talált mtDNS 9-bp deléció (kelet-ázsiai antropológiai marker) jelenlétének és szerepének azonosítását tűztem ki célul a magyar populációban. Az újgenerációs szekvenálással kutatásom utolsó évében lehetőségem nyílt targetált génpanelek vizsgálatára, aminek segítségével az intergenomiális kommunikációban szerepet játszó gének átfogóbb tanulmányozására volt módom, mint korábban a Sanger szekvenálással.

Alzheimer-kórral diagnosztizált post mortem agyszövetekben aKGDH mutációkat azonosítottunk. Ez az enzim a mitochondriumban zajló Krebs-ciklus kulcsfontosságú résztvevője. Mindhárom alegységben találtunk 1-1 missense mutációt, melyekből kettőt patogénnek feltételezünk. Autista gyermekekben kimutattuk a mitochondriális deléció előfordulásának szignifikánsan magasabb értékét az egészséges populációhoz viszonyítva. A mtDNS deléciók jelenléte ASD-ben több esetben szekundernek tűnik, mely az ASD-vel asszociált gének defektusainak másodlagos hatásaként alakulhat ki, de a külső környezeti tényezők hatása sem zárható ki.

Sanger szekvenálással 7 patogén POLG mutációt azonosítottunk (N=131), melyből 4 új, eddig nem leírt patogén eltérés. NGS vizsgálattal (N=46) több nem közölt missense mutációt azonosítottunk különböző génekben, in silico analízis és szegregációs vizsgálatok alapján ismeretlen jelentőségű eltérések hatását határoztuk meg.

Az európai populációk között elsőként határoztuk meg a 9-bp deléció kelet-ázsiai antropológiai marker gyakoriságát hazánkban. Eredményeinkkel alátámasztottuk azt a feltételezést, miszerint a deléció instabillá teszi a mtDNS-t; MD rizikófaktornak tartjuk.

## IX. SUMMARY

Information encoded by nuclear DNA is mainly responsible for the regulation, function and survival of mitochondrion, and mitochondrial dysfunction is implicated in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases. Damage to the mitochondrion decreases energy production and increases ROS formation.

The aim of my research was to identify and investigate such genes that heavily influence the function of mitochondrion and could be in the background of mitochondrial deletion or depletion. Furthermore, I aimed to get a better understanding of the background of mitochondrial dysfunction of neurodegenerative (Alzheimer's disease) and neurodevelopmental (autism) diseases, and to reveal any possible cause-effect relationship. I was able to determine the presence and function of an mtDNA 9-bp deletion (East Asian anthropology marker) in the Hungarian population, which was discovered during routine diagnostics. In the last year of my research I had the opportunity to examine gene panels using NGS technology to study genes responsible for intergenomical communication more thoroughly than perviously done using Sanger sequencing.

We also investigated aKGDH mutations in post mortem brain tissues diagnosed with Alzheimer's disease. This enzyme plays a major role in the Krebs cycle in mitochondrion. We detected 1-1 missense mutation in each of three subunits, two of them are a hypothesized pathogen. Compared to healthy controls, we found a significantly higher incidence of mitochondrial deletion in autistic children, and the underlying MD/ASD associated genes were examined. The presence of a mtDNA deletion seems to be secunder. We identified 7 pathogenic POLG mutations (N=131) by Sanger sequencing, four of which are novel, undescribed variations. We also identified unpublished missense mutations in different genes using next generation sequencing (N=46), and we described predictions for many unknown variations based on in silico and segregation analysis.

Among European populations we firstly determined the incidence of a 9-bp deletion East-Asian anthropology marker in Hungary. Our findings confirmed the hypothesis that the deletion makes mitochondrial DNA instable, and we interpret it to be a MD risk factor.

## X. IRODALOMJEGYZÉK

Alexejev M, Shokolenko I, Wilson G, LeDoux S. (2013) The maintenance of mitochondrial DNA integrity – critical analysis and update. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(5):a012641.

Alston CL, Schaefer AM, Raman P, Solaroli N, Krishnan KJ, Blakely EL, He L, Craig K, Roberts M, Vyas A, Nixon J, Horvath R, Turnbull DM, Karlsson A, Gorman GS, Taylor RW. (2013) Late-onset respiratory failure due to TK2 mutations causing multiple mtDNA deletions. *Neurology*, 81(23):2051-2053.

Alves-Silva J, Santos MS, Pena SD, Prado VF. (1999) Multiple geographic sources of region V 9-bp deletion haplotypes in Brazilians. *Hum Biol*, 71(2):245-259.

Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. (1999) Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*, 23(2):147.

Barrientos A, Casademont J, Solans A, Moral P, Cardellach F, Urbano-Márquez A, Estivill X, Nunes V. (1995) The 9-bp deletion in region V of mitochondrial DNA: evidence of mutation recurrence. *Human Genetics*, 96(2):225-228.

Barthelemy C, de Baulny HO, Lombes A. (2002) D-loop mutations in mitochondrial DNA: link with mitochondrial DNA depletion? *Hum Genet*, 110(5):479-487.

Baruffini E, Dallabona C, Invernizzi F, Yarham JW, Melhionda L, Blakely EL, Lamantea E, Donnini C, Santra S, Vijayaraghavan S, Roper HP, Burlina A, Kopajtich R, Walther A, Strom TM, Haack TB, Prokisch H, Taylor RW, Ferrero, Zebiani M, Ghezzi D. (2013) MTO1 mutations are associated with hypertrophic cardiomyopathy and lactic acidosis and cause respiratory chain deficiency in humans and yeast. *Hum Mutat*, 34(11):1501-1509.

Berndt SI, Platz EA, Fallin MD, Thuita LW, Hoffman SC, Helzlsouer KJ. (2006) Genetic variation in the nucleotide excision repair pathway and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15(11):2263-2269.

Betancur C. (2011) Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: More than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res*, 1380:42-77.

Blennow K, Leon MJ, Zetterberg H. (2006) Alzheimer's Disease. *Lancet*, 368(9533):387-403.

Bogácsi-Szabó E, Csányi B, Tömöry Gy, Blazsó P, Csősz A, Kiss D, Langó P, Köhler K, Raskó I. (2008) Archeogenetikai vizsgálatok a Kárpát-medence 10. századi népességén. *Magyar Tudomány*, 10:1204.

Brown MD, Voljavec AS, Lott MT, MacDonald I, Wallace DC. (1992) Leber's hereditary optic neuropathy: a model for mitochondrial neurodegenerative diseases. *FASEB J*, 6(10):2791-2799.

Cai S, Xu Y, Cooper RJ, Ferkowicz MJ, Hartwell JR, Pollok KE, Kelley MR. (2005) Mitochondrial targeting of human O6-methylguanine DNA methyltransferase protects against cell killing by chemotherapeutic alkylating agents. *Cancer Res*, 65(8):3319-3327.

Chan SS, Longley MJ, Copeland WC. (2005) The common A467T mutation in the human mitochondrial DNA polymerase (POLG) compromises catalytic efficiency and interaction with the accessory subunit. *J Biol Chem*, 280(36):31341-31346.

Chan SS, Longley MJ, Copeland WC. (2006) Modulation of the W748S mutation in DNA polymerase gamma by the E1143G polymorphism in mitochondrial disorders. *Hum Mol Genet*, 15(23):3473-3483.

Chang S, Ren G, Steiner RD, Merkens LS, Rouillet JB, Korade Z. (2014) Elevated autophagy and mitochondrial dysfunction in the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Mol Genet Metab Rep*, 1:431-442.

Chanprasert S, Wang J, Weng SW, Enns GM, Boué DR, Wong BL, Mendell JR, Perry DA, Sahenk Z, Craigen WJ, Alcalá FJ, Pascual JM, Melancon S, Zhang VW, Scaglia F, Wong LJ. (2013) Molecular and clinical characterization of the myopathic form of mitochondrial DNA depletion syndrome caused by mutations in the thymidine kinase (TK2) gene. *Mol Genet Metab*, 110(1-2):153-161.

Chinnery PF, Hudson G. (2013) Mitochondrial genetics. *Br Med Bull*, 106(1):135-159.

Clayton DA, Doda JN, Friedberg EC. (1974) Absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci*, 71(7):2777-2781.

Coleman M, Blass JP. (1985) Autism and lactic acidosis. *J Autism Dev Disord*, 15(1):1-8.

Copeland WC. (2014) Defects of mitochondrial DNA replication. *J Child Neurol*. 29(9):1216-1224.

Demain IAM, Urquhart JE, O'Sullivan J, Williams SG, Bhaskar SS, Jenkinson E, Lourenco CM, Heiberg A, Pearce SH, Munro KJ, O'Keefe R, Newman WG. (2015) Expanding the genotypic spectrum in Perrault's syndrome. *European Journal of Human Genetics*, 23(1):81-82. (abstract, ESHG Glasgow)

DiMauro S, Davidzon G. (2005) Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med*. 37:222-232.

Farnum GA, Nurminen A, Kaguni LS. (2014) Mapping 136 pathogenic mutations into functional modules in human DNA polymerase gamma establishes predictive genotype-phenotype correlations for the complete spectrum of POLG syndromes. *Biochim Biophys Acta*, 1837(7):1113-1121.

Fransson A, Ruusala A, Aspenstrom P. (2003) Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. *J Biol Chem*, 278(8):6495-6502.

Frye RE, Rossignol DA. (2011) Mitochondrial dysfunction can connect the diverse medical symptoms associated with autism spectrum disorders. *Pediatr Res*, 69(5 Pt 2):41R-47R.

García-Escudero V, Martín-Maestro P, Perry G, Avila J. (2013) Deconstructing mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2013:162152.

Gaugler J, James B, Johnson T, Scholz K, Weuve J. (2014) Alzheimer's Disease Facts and Figures, Vol10, Issue2 (by Alzheimer's Association)  
[http://www.alz.org/downloads/Facts\\_Figures\\_2014.pdf](http://www.alz.org/downloads/Facts_Figures_2014.pdf)

Goto YI, Nonaka I, Horai S. (1990) A mutation in the tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*, 348(6302):651-653.

Guan MX, Yan O, Li X, Bykhovskaya Y, Gallo-Teran J, Hajek P, Umeda N, Zhao H, Garrido G, Mengesha E, Suzuki T, del Castillo I. (2006) Mutation in TRMU related to transfer RNA modification modulates the phenotypic expression of the deafness-associated mitochondrial 12S ribosomal RNA mutations. *Am J Hum Genet*, 79(2):291-302.

Guo Y, Deng X, Zhang J, Su L, Xu H, Luo Z, Deng H. (2012) Analysis of the MRPL3, DNAJC13 and OFCC1 variants in Chinese Han patients with TS-CTD. *Neurosci Lett*, 517(1):18-20.

Hakonen AH, Heiskanen S, Juvonen V, Lappalainen I, Luoma PT, Rantamäki M, Van Goethem G, Löfgren A, Hackman P, Paetau A, Kaakkola S, Majamaa K. (2005) Mitochondrial DNA polymerase W748S mutation: a common cause of autosomal recessive ataxia with ancient European origin. *Am J Hum Genet*, 77(3):430-441.

Hertzberg M, Mickleson KN, Serjeantson SW, Prior FJ, Trent RJ. (1989). An Asian-specific 9-bp deletion of mitochondrial DNA is frequently found in Polynesians. *Am J Hum Genet*, 44(4):504-510.

Howell N, Bindoff LA, McCullough DA, Kubacka I, Poulton J, Mackey D, Taylor L, Turnbull DM. (1991) Leber hereditary optic neuropathy: identification of the same mitochondrial ND1 mutation in six pedigrees. *Am J Hum Genet*, 49(5):939-950.

Jin Y, Yu Q, Zhou D, Chen L, Huang X, Xu G, Huang J, Gao X, Gao Y, Shen L. (2012) The mitochondrial DNA 9-bp deletion polymorphism is a risk factor for hepatocellular carcinoma in the Chinese population. *Genet Test Mol Biomarkers*, 16(5):330-334.

Jonckheere AI, Renkema GH, Bras M, van den Heuvel LP, Hoischen A, Gilissen C, Nabuurs SB, Huynen MA, de Vries MC, Smeitink JAM, Rodenburg RJT. (2013) A complex V ATP5A1 defect causes fatal neonatal mitochondrial encephalopathy. *Brain*, 136(Pt 5):1544-1554.

Kaguni LS. (2004) DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annu Rev Biochem*, 73:293-320.

Keeney PM, Bennett JP (2010) ALS spinal neurons show varied and reduced mtDNA gene copy numbers and increased mtDNA gene deletions. *Mol Neurodegener*, 5:21.

Kornblum C, Nicholls TJ, Haack TB, Schöler S, Peeva V, Danhauser K, Hallmann K, Zsurka G, Rorbach J, Iuso A, Wieland T, Sciacco M, Ronchi D, Comi GP, Moggio M, Strom CM, Meitinger T, Minczuk M, Kunz WS, Prokisch H. (2013) Loss-of-function mutations in MGME1 impair mtDNA replication and cause multi-systemic mitochondrial disease. *Nat Genet*, 45(2):214-219.

Koyanagi M, Asahara S, Matsuda T, Hashimoto N, Shigeyama Y, Shibutani Y. (2011). Ablation of TSC2 enhances insulin secretion by increasing the number of mitochondria through activation of mTORC1. *PLoS One*, 6(8):e23238.



Lamanthea E, Tiranti V, Bordoni A, Toscano A, Bono F, Servidei S, Papadimitriou A, Spelbrink H, Silvestri L, Casari G, Comi GP, Zeviani M. (2002) Mutations of mitochondrial DNA polymerase gamma are a frequent cause of autosomal dominant or recessive progressive external ophthalmoplegia. *Ann Neurol*, 52(2):211-219.

Lerman-Sagie T, Leshinsky-Silver E, Watemberg N, Lev D. (2004) Should autistic children be evaluated for mitochondrial disorders? *J Child Neurol*, 19(5):379-381.

Levinger L, Morl M, Florentz C. (2004) Mitochondrial tRNA 3' end metabolism and human disease. *Nucleic Acids Res*, 32(18):5430-5441.

Lieber DS, Calvo SE, Shanahan K, Slate NG, Liu S, Hershman SG, Gold NB, Chapman BA, Thorburn DR, Berry GT, Schmahmann JD, Borowsky ML, Mueller DM, Sims KB, Mootha VK. (2013) Targeted exome sequencing of suspected mitochondrial disorders. *Neurology*, 80(19):1762-1770.

Liu CS, Cheng WL, Chen YY, Ma YS, Pang CY, Wei YH. (2005). High prevalence of the COII/tRNA(Lys) intergenic 9-bp deletion in mitochondrial DNA of Taiwanese patients with MELAS or MERRF syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1042:82-87.

Livak K, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-ddCt}$  method. *Methods*, 25(4):402-408.

Luoma P, Melberg A, Rinne JO, Kaukonen JA, Nupponen NN, Chalmers RM, Oldfors A, Rautakorpi I, Peltonen L, Majamaa K, Somer H, Suomalainen A. (2004) Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet*, 364(9437):875-882.

Milone M, Benaroch EE, Wong LJ. (2012) A POLG-gal kapcsolatos zavarok. *Ideg tudományi Kutatások Hatása a Klinikumra*, 2(1):52-56. Eredeti megjelenés: *Neurology*, 2011;77:1847-1852.

Myers KA, Saffhill R, O'Connor PJ. (1988) Repair of alkylated purines in the hepatic DNA of mitochondria and nuclei in the rat. *Carcinogenesis* 9(2):285-292.

Naviaux RK, Nyhan WL, Barshop BA, Poulton J, Markusic D, Karpinski NC, Haas RH. (1999) Mitochondrial DNA polymerase gamma deficiency and mtDNA depletion in a child with Alpers' syndrome. *Ann Neurol*, 45(1):54-58.

Naviaux RK, Nguyen KV. (2004) POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol*, 55(5):706-712.

Park MH, Woo HM, Hong YB, Park JH, Yoon BR, Park JM, Yoo JH, Koo H, Chae JH, Chung KW, Choi BO, Koo SK. (2014) Recessive C10orf2 mutations in a family with infantile-onset spinocerebellar ataxia, sensorimotor polyneuropathy, and myopathy. *Neurogenetics*, 15(3):171-182.

Persico AM, Napolioni V. (2013) Autism genetics. *Behav Brain Res*, 251:95-112.

Pontarin G, Ferraro P, Bee L, Reichard P, Bianchi V. (2012) Mammalian ribonucleotide reductase subunit p53R2 is required for mitochondrial DNA replication and DNA repair in quiescent cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(33):13302-13307.

Quintanilla RA, Jin YN, von Bernhardi R, Johnson GV. (2013) Mitochondrial permeability transition pore induces mitochondria injury in Huntington disease. *Mol Neurodegener*, 8:45.

Redd AJ, Takezaki N, Sherry ST, Mcgarvey ST, Sofro A, Stoneking M. (1995). Evolutionary history of the COII-tRNA(Lys) intergenic 9-base-pair deletion in human mitochondrial DNAs from the Pacific. *Molec Biol Evol*, 12(4):604-615.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL. (2015) Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*, 17(5):405-424.

Riley LG, Cooper S, Hickey P, Rudinger-Thirion K, McKenzie M, Compton A, Lim SC, Thorburn D, Ryan MT, Giegé R, Bahlo M, Christodoulou J. (2010) Mutation of the mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase gene, YARS2, causes myopathy, lactic acidosis, and sideroblastic anaemia – MLASA syndrome. *Am J Hum Genet*, 87(1):52-59.

Riley LG, Menezes MJ, Rudinger-Thirion J, Duff R, de Lonlay P, Rotig A, Tchan MC, Davis M, Cooper ST, Christodoulou J. (2013) Phenotypic variability and identification of novel YARS2 mutations in YARS2 mitochondrial myopathy, lactic acidosis and sideroblastic anaemia. *Orphanet J Rare Dis*, 8:193.

Rossignol DA, Frye RE. (2012) Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry*, 17(3):290-314.

Rouzier C, Le Guedard-Merezue S, Fragaki K, Serre V, Miro J, Tuffery-Giraud S et al. (2010) The severity of phenotype linked to SUCLG1 mutations could be correlated with residual amount of SUCLG1 protein. *J Med Genet*, 47(10):670-676.

Ruppert V, Nolte D, Aschenbrenner T, Pankuweit S, Funck R, Maisch B. (2004) Novel point mutations in the mitochondrial DNA detected in patients with dilated cardiomyopathy by screening the whole mitochondrial genome. *Biochem Biophys Res Commun*, 318(2):535-543.

Saneto RP, Sedensky MM. (2013) Mitochondrial disease in childhood: mtDNA encoded. *Neurotherapeutics*, 10(2):199-211.

Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, Chinnery PF. (2004) The epidemiology of mitochondrial disorders – past, present and future. *Biochim Biophys Acta*, 1659(2-3):115-120.

Schon EA, Rizzuto R, Moraes CT, Nakase H, Zeviani M, DiMauro S. (1989) A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science*, 244(4902):346-349.

Schwartzentruber J, Buhas D, Majewski J, Sasarman F, Papillon-Cavanagh S, Thiffault I, Sheldon KM, Massicotte C, Patry L, Simon M, Zare AS, McKernan KH. (2014) Mutation in the nuclear-encoded mitochondrial isoleucyl-tRNA synthetase IARS2 in patients with cataracts, growth hormone deficiency with short stature, partial sensorineural deafness, and peripheral neuropathy or with Leigh syndrome. *Hum Mutat*, 35:1285-1289.

Sheu KFR. (1994) Abnormality of the  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex in fibroblasts from familial Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 35(3):312-318.

Sheu KWR, Blass JP. (2006) The  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex. *Ann N Y Acad Sci*, 893:61-78.

Shi Q, Hu H, Kleinman WA, Gibson GE (2008) Novel functions of the  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex may mediate diverse oxidant-induced changes in mitochondrial enzymes associated with Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1782(4):229-238.

Shokolenko I, Venediktova N, Bochkareva A, Wilson GL, Alexeev MF. (2009) Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. *Nucleic Acid Res*, 37(8):2539-2548.

Shoubridge E, Molnar MJ. Oxidative phosphorylation defects. In: *Structural and molecular basis of skeletal muscle diseases* (ed. Karpati G, Molnar MJ, Goebel HH,

Arahata K, Emery AEH, Hoffman E, Shoubbridge E), ISN Neuropathology Press Basel, 2002 pp202-213.

Smith M, Spence MA, Flodman P. (2009) Nuclear and mitochondrial genome defects in autism. *Ann N Y Acad Sci*, 1151:102-132.

Sokolova VA, Vasilyev VB, Delefosse T, Hänni C, Rochet D, Godinot C. (2002) A Russian family of Slavic origin carrying mitochondrial DNA with a 9-bp deletion in region V and a long C-stretch in D-loop. *Mitochondrion*, 1(6):479-483.

Soodyall H, Vigilant L, Hill AV, Stoneking M, Jenkins T. (1996) mtDNA control-region sequence variation suggests multiple independent origins of an „Asian-specific” 9-bp deletion in Sub-Saharan Africans. *Am J Hum Genet* 58(3):595-608.

Stewart JD, Horvath R, Baruffini E, Ferrero I, Bulst S, Watkins PB, Fontana RJ, Day CP, Chinnery PF. (2010) Polymerase  $\gamma$  gene POLG determines the risk of sodium valproate-induced liver toxicity. *Hepatology*, 52(5):1791-1796.

Tatuch Y, Robinson BH. (1993) The mitochondrial DNA mutation at 8993 associated with NARP slows the rate of ATP synthesis in isolated lymphoblast mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 192(1):124-128.

Taylor RW, Pyle A, Griffin H, Blakely EL, Duff J, He L, Smertenko T, Alston CL, Neeve VC, Best A, Yarham J, Kirschner J, Schara U, Talim B, Topaloglu H, Baric I, Holinski-Feder E, Abicht A, Czermin B, Kleinle S, Morris AAM, Vassallo G, Gorman GS. (2014) Use of whole-exome sequencing to determine the genetic basis of multiple mitochondrial respiratory chain complex deficiencies. *JAMA*, 312(1):68-77.

Taylor RW, Turnbull DM. (2005) Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*, 6(5):389-402.

Thomas MG, Cook CE, Miller KW, Waring MJ, Hagelberg E. (1998). Molecular instability in the COII-tRNA(Lys) intergenic region of the human mitochondrial genome: multiple origins of the 9-bp deletion and heteroplasmy for expanded repeats. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 353(1371):955-965.

Tretter L, Ádám-Vizi V. (2005) Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360(1464):2335-2345.

Tyynismaa H, Ylikallio E, Patel M, Molnar MJ, Haller RG, Suomalainen A. (2009) A heterozygous truncating mutation in RRM2B causes autosomal-dominant

Progressive External Ophthalmoplegia with multiple mtDNA deletions. *Am J Hum Genet*, 85(2):290-295.

Tzoulis C, Tran GT, Coxhead J, Bertelsen B, Lilleng PK, Balafkan N, Payne B, Miletic H, Chinnery PF, Bindoff LA. (2014) Molecular pathogenesis of Polymerase gamma-related neurodegeneration. *Ann Neurol*, 76(1):66-81.

Young MJ, Longley MJ, Li FY, Kasiviswanathan R, Wong LJ, Copeland WC. (2011) Biochemical analysis of human POLG2 variants associated with mitochondrial disease. *Hum Mol Genet*, 20(15):3052-66.

Valenti D, de Bari L, De Filippis B, Henrion-Caude A, Vacca RA. (2014) Mitochondrial dysfunction as a central act or in intellectual disability-related diseases: An overview of Down syndrome, autism, Fragile X and Rett syndrome. *Neurosci Behav Rev*, 46(Pt 2):202-217.

Van Goethem G, Dermaut B, Löfgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C. (2001) Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet*, 28(3):211-212.

Vasta V, Merritt JL, Saneto RP, Hahn SH. (2012) Next-generation sequencing for mitochondrial diseases: A wide diagnostic spectrum. *Pediatr Int*, 54(5):585-601.

Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ, Nikoskelainen EK. (1988). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, 242(4884):1427-1430.

Watkins WS, Bamshad M, Dixon ME, Bhaskara Rao B, Naidu JM, Reddy PG, Prasad BV, Das PK, Reddy PC, Gai PB, Bhanu A, Kusuma YS, Lum JK, Fischer P, Jorde LB. (1999) Multiple origins of the mtDNA 9-bp deletion in populations of South India. *Am J Phys Anthropol*, 109(2):147-158.

Wong LJC. (2010) Molecular genetics of mitochondrial disorders. *Dev Disabil Res Rev*, 16(2):154-162.

Zentner GE, Layman WS, Martin DM, Scacheri PC. (2010) Molecular and phenotypic aspects of CHD7 mutations in CHARGE syndrome. *Am J Med Genet Part A*, 152(A)3:674-686.

**Adatbázisok, internetes hivatkozások (2016. 01. 10.):**

<ftp://ftp.nectarmutation.org>

<http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2016/en#/F84.0> (2016. 07.18.)

<http://asd.sotebiobank.com>

<http://bioinf.umbc.edu/dmdm/>

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<https://earray.chem.agilent.com/suredesign/>

<http://molneur.webdokter.hu>

<http://rgd.mcw.edu/>

<http://tools.niehs.nih.gov/polg>

<http://www.biobase-international.com/product/hgmd>

<http://www.ensembl.org/index.html>

<http://www.expasy.org/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.quantpsy.org/chisq/chisq.htm>

<https://cansar.icr.ac.uk/>

## XI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

Gal A, **Pentelenyi K**, Remenyi V, Pal Z, Csanyi B, Tomory G, Rasko I, Molnar MJ. (2010) Novel heteroplasmic mutation in the anticodon stem of mitochondrial tRNA(Lys) associated with dystonia and stroke-like episodes. *Acta Neurol Scand*, 122(4):252-256. IF: 2.153

Remenyi V, Inczedy-Farkas G, Komlosi K, Horvath R, Maasz A, Janicsek I, **Pentelenyi K**, Gal A, Karcagi V, Melegh B, Molnar MJ. (2015) Retrospective assessment of the most common mitochondrial DNA mutations in a large Hungarian cohort of suspect mitochondrial cases. *Mitochondrial DNA*, 26(4):572-578. IF: 1.2

Molnar MJ, **Pentelenyi K**. Integrative PPPM Approach as the Medicine of the Future. *Advances in Predictive, Preventive and Personalized Medicine* 6. In: *Rare Diseases* (ed. Meral Özgüc), Springer Science+Business Media Dordrecht, 2015 pp.61-69.

**Pentelenyi K**, Remenyi V, Gal A, Milley GYM, Csosz A, Mende BG, Molnar MJ. (2016) Asian-specific mitochondrial genome polymorphism (9-bp deletion) in Hungarian patients with mitochondrial disease. *Mitochondrial DNA*, 27(3):1697-700. IF: 1.2

**A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk:**

Gál A, Szabó A, **Pentelényi K**, Pál Z. (2008) Maternálisan öröklődő diabetes mellitus, nagyothallás, krónikus ophthalmoplegia externa és myopathia, mint az mtDNS A3243G mutáció következménye. Orv Hetilap, 149(34):1593-1598.

Gal A, **Pentelényi K**, Remenyi V, Wappler EA, Safrany G, Skopal J, Nagy Z. (2009) Bcl-2 or bcl-XL gene therapy increases neural plasticity proteins nestin and c-fos expression in PC12 cells. Neurochem Int, 55(5):349-353. IF: 3.541

Gal A, Komlosi K, Maasz A, **Pentelényi K**, Remenyi V, Ovary C, Valikovics A, Dioszeghy P, Bereczki D, Melegh B, Molnar MJ. (2009) Analysis of mtDNA A3243G mutation frequency in Hungary. Central European Journal of Medicine, 5(3):322-328. IF: 0.244

Bereznai B, Lovas G, **Pentelényi K**, Rudas G, Molnar MJ. (2010) Coexisting huntingtin and SCA8 repeat expansion: case report of a severe complex neurodegenerative syndrome. J Neurol Sci, 293(1-2):116-118. IF: 2.32

Reményi V, **Pentelényi K**, Valikovics A, Mede K, Szegedi N, Szilágyi G, Óváry Cs, Nagy Z, Gál A, Molnár MJ. (2010) Thrombocytamembrán-glikoprotein receptor polimorfizmusainak vizsgálata a fiatalkori ischaemiás stroke szindróma hátterében. Vascularis Neurologia, 2(1):27-32.



## XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Molnár Mária Judit Professzor Asszonynak, hogy munkámban lassan 10 éve - TDK-s korom óta - támogat.

Szeretettel köszönöm a Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézet minden kedves munkatársának, hogy segítette munkámat és a sok várható és váratlan nehézség ellenére bearanyozta mindennapjaimat. Név szerint: Báthori Györgyi, Kovács Margit, Markó Mariann, Sály Mónika és Strahlendorff Metta kiváló szakasszisztensek; Tóth Andrea, mindenki koordinátora; köszönöm az orvosgárdának és az egész „diplomás laborcsapatnak”...

Dr. Gál Anikónak, hogy TDK-s korom óta felügyeli lépéseim, Bencsik Renátának az aKGDH és szegregációs vizsgálatokban, Dr. Varga Noéminek az autista kutatásban való közreműködését, Dr. Balicza Péternek az NGS analízisben nyújtotta segítségét, Illés Anettnek és Kékesi Annának az intergenomiális kutatásokban betöltött fontos szerepüket, Magyarósi Szilviának az autista projekt koordinálását.

Külön köszönöm Hársfalvi Viviennek, hogy együtt dolgozhattam és a sikereket együtt ünnepelhettem vele, és Dr. Reményi Viktóriának - mindent!

Köszönöm a kooperációs partnereinknek, az MTA Archeogenetikai Intézetben Dr. Mende Balázs Gusztáv és Csósz Aranka együttműködő segítségét; az Anatómiai Intézetben Dr. Palkovits Miklósnak, hogy biobankjából rendelkezésünkre bocsátotta az agymintákat; és a Vadaskerti Gyermekkorházban Prekop Csillának az autista gyermekek kitartó pszichológiai vizsgálatáért.

Kutatásom a BIOKLIMA KTIA\_AIK\_12-1-2013-0017 és a KTIA\_13\_NAP-A-III/6 Nemzeti Agykutatási Program támogatásával valósulhatott meg.