

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

Doktori tézisek

Pentelényi Klára

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai 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

BEVEZETÉS

A mitochondrium

A mitochondrium a sejt energiatermelő szerve. Saját cirkuláris DNS-sel rendelkezik, mely maternálisan öröklődik. A sejtmagtól független működésre az evolúció során képtelenné vált. A működéséhez szükséges proteinek nagyrészt már a magi DNS kódolja: kb. 1000 mitochondriális proteint.

A mitochondriális betegségeket a mtDNS és a nDNS mutációi is okozhatják. A mtDNS replikációjában és transzkripciójában szerepet játszó gének a nDNS-ben vannak kódolva, mindössze két rRNS genetikai kódja található a mtDNS-ben. A transzláció molekuláris résztvevői közül már nagyobb arányban találunk mitochondriumban kódoltakat, de a vezető szerepet itt is a mag vette át az evolúció során. 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.

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

A mtDNS bizonyos evolúciósan rögzült polimorfizmusainak, delécióinak populációgenetikai jelentősége van. Vannak bizonyos népcsoportokra jellegzetes variációk, mint pl. a 9-bp deléció, mely egy kelet-ázsiai antropológiai marker. Legmagasabb előfordulási gyakorisága DK-Ázsiában, Indonéziában és a Pacifikus régióban tapasztalható. Európában eddig csak három esetben írták le.

A mitochondriális diszfunkció következtében kialakuló betegségek

A mitochondriális betegségek prevalenciája 1:5000, az érintettek 50%-a gyermek. A multisisztémás betegségek heterogén csoportját alkotják, leggyakrabban a vázizom és az idegrendszer érintett. Mitochondriális betegségben leginkább a nagy energiaigényű szövetek károsodnak (agy, retina, izom, vese). A mitochondrium károsodása következtében megváltozik az apoptózis folyamata is. A többes (multiplex) deléciók többnyire másodlagosan, nDNS mutációk következtében jönnek létre az intergenomiális kommunikációs zavarok megnyilvánulásaképpen. A klinikai kép nagyon színes, leggyakrabban epilepszia, ataxia, demencia, neuropathia, ophthalmoplegia, hallásvesztés, myopathia, hypotonia, atrophia és pszichiátriai tünetek alakulnak ki.

A mitochondriumok működészavara fontos szerepet játszik a neurodegeneratív betegségek patomechanizmusában is: csökken az energiatermelés, nő a ROS (reaktív oxidatív szabadgyök) mennyiség, károsodik a membrán és a mtDNS.

A neurodegeneratív betegségek mellett egyes neurodevelopmentális kórképekben is fontos patogenetikai faktor lehet a mitochondriális diszfunkció. Az autizmus spektrum betegségben (ASD) szenvedők leggyakrabban leírt metabolikus abnormalitása a légzési lánc zavara. OXPHOS károsodást és a mitochondriális biomarkerek szignifikáns emelkedését mutatták ki ASD-ben. Sok mitochondriális tünet ASD-asszociált fenotípus, mint a megkésett mentális és motoros fejlődés, mentális hanyatlás és a laktacidózis.

CÉLKITŰZÉSEK

Célkitűzéseim a mitochondriális károsodás hatásának elemzésére irányultak mind ritka, mind gyakori betegségekben. Az alábbi fő célokat fogalmaztam meg:

1. Neurodegeneratív (Alzheimer-kór) betegségekben a Krebs-ciklus egyik fontos enzime, az aKGDH genetikai variációik és az Alzheimer-kór asszociációjának elemzése.
2. Neurodevelopmentális (autizmus spektrum betegség) betegségekben a mitochondriális genetikai eltérések elemzése.
3. A mtDNS deplécióval ill. delécióval járó kórképekben az intergenomiális kommunikáció zavarok háttérében álló nukleáris gének azonosítása.
4. Egy kelet-ázsiai antropológiai marker, a 9-bp mtDNS deléció előfordulási gyakoriságának elemzése a magyar populációban és a mutáció hatásának elemzése.

MÓDSZEREK

Vizsgált betegek

Alzheimer-kór (AD):

A Krebs-ciklus aKGDH enzim genetikai eltéréseinek elemzése céljából a Semmelweis Egyetem Humán Agyszövet Bankjából származó post mortem agyszövetmintákat vizsgáltunk 11 Alzheimer betegben (6 nő, 77 ± 8 év és 5 férfi $69,5\pm 9$ év) és 9 kontroll egyénben (5 nő és 4 férfi, 62 ± 15 év). Egy egyénből az agy több különböző régiójából is tudunk vizsgálatokat végezni.

Mitochondriális betegségek:

Az intergenomiális kommunikációban szerepet játszó *POLG* gént 131 betegben vizsgáltuk (47 férfi, 84 nő, 40 ± 22 év). Ennek szubkohortjaiban további géneket vizsgáltunk (*TWINKLE*, *TK2*, *RRM2B*, *ANTI*) Sanger szekvenálással. NGS intergenomális panel vizsgálatot 46 beteg esetében végeztünk.

A kelet-ázsiai antropológiai marker jelentőségének meghatározására 1073 páciens (647 nő, $44,3\pm 18,5$ év, 426 férfi, $39,9\pm 19$ év) és 468 egészséges kontroll személyt vizsgáltunk (301 nő, $38,7\pm 14,4$ és 167 férfi $42,7\pm 18,1$).

Autizmus spektrum betegség (ASD):

A mitochondriális diszfunkciót 60 ASD gyermekben (54 fiú, 6 lány, $10,4\pm 7,3$ év) és 60 egészséges kontroll egyénben vizsgáltuk (26 nő, 34 férfi, $28,5\pm 7,4$ év).

Alkalmazott módszerek

A DNS izolálása vérből, illetve szövetekből “QIAamp DNA blood/tissue kit”-tel történt a gyártó által megadott metodika szerint. A mtDNS egyes és többes delécióit long PCR-rel vizsgáltuk. Az egyik leggyakoribb mitochondriális pontmutáció (m. 8344 A>G) szűrését PCR-RFLP-vel végeztük. Az emésztés BanII endonukleázzal történt. 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 mtDNS mennyiségét (depléció vizsgálat) izomból határoztuk meg Taqman próba segítségével. A citokróm B volt a mitochondriális target génünk, az albumin a nukleáris. Ezek egymáshoz viszonyított mennyisége (ddCt módszer) alapján határoztuk meg a depléciót.

Az intergenomiális kommunikációban szerepet játszó *POLG*, *TWINKLE*, *ANTI*, *TK2* és *RRM2B* gének, illetve az aKGDH alegységeinek Sanger szekvenálása ABI PRISM 3100 GeneticAnalyzer-rel 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) humán genom referencia szekvenciájához illesztettük.

Az intergenomiális kommunikációban szerepet játszó gének közül 51 fontosabb gént terveztünk egy NGS (Next-Generation Sequencing) panelbe a Sure Design szoftver segítségével. A könyvtárkészítést SureSelect QXT kittel végeztem a gyártó által megadott protokoll szerint (Agilent Technologies). A futtatást Illumina MiSeq készüléken végeztük. Az intergenomiális panel futtatása során kapott fastq file-okat Sure Call szoftverrel analizáltuk. A fastq file-ok illesztése a BWA MEM algoritmus alapján történt, a variánshívás SNPPET SNP caller programmal. A patogénnek feltételezett mutációkat Sanger szekvenálással validáltuk.

Statisztikai analízisre, a szignifikanciaszint meghatározására chi-négyzet próbát használtunk (Yates által korrigált).

EREDMÉNYEK

Az alfa-ketoglutarátdehidrogenáz mutációk és a demencia kapcsolata

A vizsgált 11 AD beteg agyszöveteinek különböző régióiban az aKGDH génekben összesen 3 missense mutációt találtunk. Az *OGDH* génben (aKGDH 1. alegysége) Ser55Leu (c.164 C>T, rs2230445) mutációt (Polyphen 0.89, MAF 0,002) detektáltunk. A kontroll mintákban és a beteg frontális lebenyében nem volt jelen ez az eltérés. A *DLST* génben (aKGDH 2. alegysége) Pro204Leu (c. 611 C>T, rs142872233) mutációt detektáltunk, melyet megtaláltunk egy kontroll mintában is, így polimorfizmusnak minősítettük. A *DLD* génben (aKGDH 3. alegysége) az Arg263His (c.788 G>A, rs145670503) mutációt azonosítottuk, melyet a kontroll mintákban nem találtunk meg. Ez a mutáció az agy frontális, temporális és parahippocampális lebenyeiből izolált DNS mintákban is jelen volt.

Intergenomiális kommunikációs zavarok - Sanger szekvenálás

A klinikai adatok és az izomszövettani vizsgálat alapján mitochondriális betegségben szenvedő 1477 betegből 267 esetben találtunk mtDNS deléciókat. A 47 vizsgált depléciós betegből 14 esetben találtuk csökkentnek a mitochondriumok számát. Kerestük az intergenomiális gének patogén eltéréseit. A *POLG* gén vizsgálata során 131 betegből 7 patogénnek feltételezett mutációt találtunk 6 betegben: Ser204Pro, Gly365Glu, Trp748Ser, Tyr955Cys, Ala1082Thr, Ala467Thr és Cys1197Arg. A *TWINKLE* gén vizsgálata során a vizsgált 48 esetből egy ritka betegség, a Perrault-szindróma hátterében (súlyos sensorineurális halláscsökkenés, ataxia, ovarium dysgenesis, pszichiátriai tünetek) sikerült patogén mutációt igazolni. A *TWINKLE* gén és a Perrault-szindróma asszociációját már felvetették korábban. A betegünkben talált egyik mutáció azonos volt (Asn399Ser) a leírt mutációval, a másik allélon talált mutáció (Arg453Gln) azonban ismeretlen eltérés. 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. Az **RRM2B** vizsgálata 41 esetből egy családnál lett pozitív. Szokatlan autoszomális domináns öröklődésű heterozigóta c.979 C>T mutációt találtunk a progresszív ophthalmoplegia externa (PEO) háttérében. Az adPEO háttérében eddig **RRM2B** mutációt nem írtak le, a korábban közölt esetek autoszomális recesszív öröklődésűek voltak és súlyos csecsemőkori manifesztációjú neurológiai tünetekkel rendelkeztek. Az általunk talált SNV korai stop kodont eredményezett (R327X).

Intergenomiális kommunikációs zavarok - Újgenerációs szekvenálás

Újgenerációs szekvenálással elemeztük 36 beteg (27 deléciós és 9 depléciós esetben) intergenomiális kommunikációban résztvevő génjeit. A mtDNS deléciós esetek közül 12 betegnél nem találtunk káros eltérést, a páciensek 2/3-ában azonban sikerült valószínűleg patogén mutációkat azonosítanunk. A mitochondriális genom integritásának fenntartásáért felelős exonukleáz (*MGME1*, mitochondrial genome maintenance exonuclease) korábban már patogénnek minősített Arg178Trp mutációját írtuk le 3 esetben heterozigóta formában. Saját szegregációs vizsgálataink is alátámasztották a patogenitását. A szakirodalomban ismert patogén mutációkat találtunk heterozigóta formában: a Krebs-ciklust katalizáló *SUCLG1* (Gly79Asp) és a fehérjeszintézisben szerepet játszó *MTO1* (Thr308Ala), ill. *MRPL3* mitochondriális riboszomális protein (Ser75Asn) génekben. Több új mutációt találtunk, melyeknek jelentőségét szegregációs vizsgálatokkal, predikációs szoftverekkel próbáltuk meghatározni.

A mtDNS depléció háttérében 9 gyermekből 4 betegben homozigóta formában azonosítottuk az Arg178Trp *MGME1* mutációt.

Autizmus spektrum betegségben a mitochondriális diszfunkció vizsgálata

A 60 ASD beteg vérében 10 esetben találtunk mtDNS deléciót. Az egészséges kontrollok vizsgálata során 60 esetből 2-ben találtunk deléciót. Az autista és kontroll csoport közötti különbség szignifikáns (Yates' chi-négyzet 4.5; p=0.03). A vizsgált betegek 16.6%-ában volt jelen a mtDNS eltérést. A vizsgált kohortból egy esetben tudtunk szindrómás autizmust azonosítani, ahol a *CHD7* gén patogén mutációja okozta

a CHARGE-szindrómát. A *CHD7* mutáció mellett egy ismeretlen jelentőségű heterozigóta *TSC2* mutáció is igazolódott. A beteg fenotípusa megfelelt a CHARGE-szindrómának.

A 10 MD-ASD esetből 4 betegben ismert patogén mutációkat azonosítottunk. Ismeretlen jelentőségű eltéréseket találtunk 6 esetben. Az intergenomiális panel érintett génjei: *MGME1*, *POLG* és *SUCLG1*. A betegek nagy részében nem találtunk eltérést az intergenomiális génekben, azonban az érintett ASD-asszociált gének direkt vagy indirekt módon összefüggésbe hozhatók a mitochondriális diszfunkcióval.

A kelet-ázsiai antropológiai marker jelentősége

A mtDNS 9-bp delécióját 14 esetben találtuk meg az 1073 mitochondriális diszfunkció miatt vizsgált betegben. A vizsgált kontroll populációban (N=468) csak egy esetben volt jelen ez a 9-bp deléció. Frekvenciája 1.3%, a kontroll csoportban 0.2%. Az 1073 betegből 203 esetben tudtuk a mitochondriális betegséget genetikailag is alátámasztani. Ebben a subkohortban tíz 9-bp deléciós páciens volt. Ha a genetikailag bizonyítottan mitochondriális betegeket összehasonlítjuk a kontroll csoporttal, a deléció előfordulása szignifikánsan magasabb ($p=0.00004$; Yates' chi-négyzet 16.69). Egy család 3 tagjában ezek mellett az eltérések mellett egy új patogén mutációt találtunk heteroplazmikus formában (m.8332 A>G) a tRNS^{Lys} anticodon karján. Nagyobb mtDNS deléciók is társultak a 9-bp delécióval 6 esetben. Egy betegben frame shift mutációt mutattunk ki a D-loopban, 4 esetben azonban semmilyen patogén eltérést sem tudtunk azonosítani.

KÖVETKEZTETÉSEK

Kutatásaimban a mitochondriális diszfunkció Alzheimer-kórral, primer mitochondriális betegségekkel és az autizmus spektrum betegséggel való összefüggéseit vizsgáltam, melynek eredményeit az alábbiakban foglalom össze.

Alzheimer-kórban az aKGDH enzim genomikai eltéréseinek vizsgálata alapján azt találtuk, hogy az aKGDH egyes alegységeinek genetikai variánsai hajlamosíthatnak ugyan az AD kialakulására, de ez a genetikai rizikó nem tekintendő a vezető genetikai rizikótényezőnek. Következtetésünket azzal a megfigyeléssel támasztjuk alá, hogy két, valószínűséggel patogén mutációt azonosítottunk heterozigóta formában az *OGDH* és *DLG* génekben.

Ismeretlen jelentőségű és eddig nem leírt eltérések jelentőségét határoztuk meg az intergenomiális kommunikációban szerepet játszó génekben. Compound heterozigóta *TWINKLE* gén mutációkat asszociáltunk egy nagyon ritka kórképpel, a Perrault-szindrómával. Igazoltuk, hogy az intergenomiális kommunikációban résztvevő gének (*POLG*, *RRM2B*, *MGME1*) nem csak egyféle öröklődéssel okozhatnak humán betegségeket, hanem egyes gének hibái autoszomális domináns módon öröklődve mtDNS deléciókat és enyhe fenotípust, autoszomális recesszív módon öröklődve pedig mtDNS depléciókat és súlyos fenotípust eredményezhetnek. Az általunk vizsgált kohortban az *MGME1* gén Arg178Trp mutációját több esetben is azonosítottuk mitochondriális tünetegyüttes hátterében. A szegregációs vizsgálatok alapján ez a mutáció több esetben is de novo eltérésnek bizonyult.

Első alkalommal végeztünk komprehenzív, több mint 150 gén egyidejű analízisére kiterjedő vizsgálatot MD-ASD betegekben. Megállapítottuk, hogy a mitochondriális deléciók szignifikánsan gyakrabban fordulnak elő ASD betegekben, mint az egészséges populációban. Minden általunk vizsgált MD-ASD esetben találtunk direkt vagy indirekt mitochondriális működéssel összefüggő génhibát. Kimutattuk, hogy a mitochondriális deléció nem önmagában, függetlenül megjelenő eltérés az MD-ASD esetekben. Szindrómás és nem szindrómás ASD betegek mitochondriuma egyaránt érintett lehet elsődleges vagy másodlagos módon a patobiokémiai folyamatok során.

Elsőként határoztuk meg a 9-bp deléció, egy 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.

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):252-6. 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):1593-8.

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):349-53. 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):116-8. 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 folyóirat, 2(1):27-32.