

A mitochondriális betegségek háttérében álló mitochondriális genom és nukleáris gének defektusainak klinikai jelentősége: az epidemiológiától a diagnosztikán át a farmakogenomikáig

Doktori értekezés

Reményi Viktória

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Molnár Mária Judit egyetemi tanár, DSc

Hivatalos bírálók: Dr. Patócs Attila egyetemi docens, PhD
Dr. Szarka András egyetemi docens, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sasvári-Székely Mária egyetemi tanár, DSc
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Igaz Péter egyetemi adjunktus, PhD
Dr. Kelemen Anna főorvos, PhD

Budapest
2014

TARTALOMJEGYZÉK

1. Rövidítésjegyzék.....	5
2. Bevezetés.....	9
2.1. A mitochondriumok genetikája.....	11
2.1.1. A mitochondriális genom általános jellemzői.....	11
2.2. Mitochondriális betegségek.....	13
2.2.1. A mitochondriális betegségek epidemiológiája.....	13
2.2.2. Az mtDNS mutációi okozta betegségek.....	14
2.2.2.1. Mitochondriális Encephalopathia Laktacidózis Stroke-szerű tünetekkel (MELAS, MIM # 540000).....	15
2.2.2.2. Myoclonus Epilepszia Ragged-Red rostokkal (MERRF, MIM # 545000).....	16
2.2.2.3. Neuropathia Ataxia és Retinitis Pigmentosa (NARP, MIM # 600750).....	16
2.2.2.4. Leber-féle optikus neuropátia (LHON, MIM # 535000).....	16
2.2.2.5. Az anyai ágon öröklődő diabetes és nagyothallás (MIDD, MIM # 520000).....	17
2.2.2.6. Mitochondriális DNS egyes és többes deléciók, duplikációk.....	18
2.3. Intergenomiális kommunikáció.....	19
2.4. Az mtDNS, mint antropológia marker.....	22
2.5. Az mtDNS diagnosztikai lehetőségei.....	25
3. Célkitűzések.....	26
4. Anyagok és módszerek.....	27
4.1. A vizsgált betegek.....	27
4.2. DNS izolálás.....	28
4.3. A DNS minták tárolása – Biobank.....	28
4.4. Myopathológiai vizsgálatok.....	29
4.5. PCR-RFLP vizsgálat.....	29
4.6. Az mtDNS deléciók vizsgálata.....	34
4.7. Az mtDNS bidirekcionális szekvenálása.....	34

4.8. A teljes mtDNS reszekvenálása (MitoChip v2.0).....	35
4.9. Haplotipizálás az mtDNS segítségével.....	36
4.10. Statisztika.....	37
5. Eredmények.....	37
5.1. Epidemiológiai vizsgálatok.....	37
5.1.1. Az m.3243 A>G pontmutáció.....	37
5.1.2. Az m.8344 A>G pontmutáció.....	37
5.1.3. Az m.8993 T>C és G pontmutációk.....	37
5.1.4. A három primer LHON mutáció: m.3460 A>G, m.11778 A>G, m.14484 T>C.....	38
5.1.5. Az mtDNS átrendeződései (egyes és többes deléciók).....	38
5.1.6. A leggyakoribb mtDNS rendellenességek vizsgálatának összefoglalása.....	39
5.2. Fenotípus-genotípus korrelációk az mtDNS betegekben.....	40
5.2.1. Az m.3243 A>G patogén mutációt hordozó betegek klinikai variabilitása...	40
5.2.2. Az m.8344 A>G patogén mutációt hordozó betegek klinikai variabilitása...	42
5.2.3. Az m.8993 T>C és m.8993 T>G patogén mutációkat hordozó betegek klinikai variabilitása.....	42
5.2.4. Az autoszómális domináns öröklődést mutató mtDNS egyes deléció de Toni-Debré-Fanconi szindrómában.....	44
5.2.5. Az mtDNS egyes és többes deléciójával együttesen előforduló mtDNS illetve nDNS eltérések.....	45
5.2.5.1. Egynél több patogén mtDNS mutáció együttes jelenléte.....	46
5.2.5.2. Az mtDNS deléció és más nukleáris gének mutációinak együttes előfordulása.....	49
5.2.5.2.1. Az mtDNS delécó és a PMP22 gén deléció/duplikáció együttes jelenléte.....	49
5.2.5.2.2. Az mtDNS deléció előfordulási gyakorisága neurodegeneratív betegségekben.....	50
5.3. Nukleáris gén által meghatározott új mitochondriális betegség fenotípus-genotípus korrelációja.....	51
5.4. A mitochondrium és a farmakogenomika	55
5.4.1. Az mtDNS homoplazmikus SNP-k farmakogenomikai szerepe.....	55

5.4.2. A <i>POLG1</i> gén szubsztitúcióinak farmakogenomikai jelentősége mitochondriális betegekben.....	57
5.5. Új metodika validálása mtDNS betegekben diagnosztikára és haplotipizálásra...	60
5.5.1 A MitoChip v2.0 microarray-jel detektált eltérések.....	61
5.5.2. Haplotipizálás - MitoChip v2.0 microarray által detektált homoplazmikus SNP-vel.....	65
6. Megbeszélés.....	67
6.1. Az mtDNS leggyakoribb eltéréseinek vizsgálata a magyar populációban.....	67
6.2. Fenotípus-genotípus korrelációk az mtDNS betegekben.....	73
6.3. Autoszomális domináns öröklődésű de Toni-Debré-Fanconi szindróma.....	74
6.4. Komplex mtDNS rendellenességek (mtDNS deléciók együttes előfordulása tRNS mutációkkal).....	75
6.5. Az mtDNS deléciók és nukleáris gének rendellenességeinek koegzisztenciája...	76
6.6. Új nukleáris mitochondriális gén, a <i>DARS2</i> mutáció azonosítása magyar családban.....	77
6.7. Az mtDNS SNP-k és a <i>POLG1</i> gén szubsztitúcióinak farmakogenomikai jelentősége.....	79
6.8. MitoChip v2.0 microarray előnyei és hátrányai, saját vizsgálataink során.....	81
7. Következtetések.....	83
8. Összefoglalás.....	85
9. Summary.....	86
10. Irodalomjegyzék.....	87
11. Saját publikációk jegyzéke.....	107
12. Köszönetnyilvánítás.....	112

1. Rövidítések jegyzéke

95% CI	95%-os konfidencia intervallum
ADP	adenozin difoszfát
AMD	időskori makula-degeneráció
ANT1	adenin nukleotid transzlokátor 1
ATP	adenozin trifoszfát
av	alsó végtag
AvaI	Anabaena variabilis I
BanII	Bacillus aneurinolyticus II
BccI	Bacteroides caccae I
BsaHI	Bacillus stearothermophilus CPW11 I
C10orf2	Chromosome 10 Open Reading Frame 2
CIPO	krónikus intestinális pseudoobstrukció, myopathia és opthalmoplegia
CK	kreatin kináz
CMT	Charcot-Marie-Tooth
COX	citokróm c-oxidáz
CPEO	krónikus opthalmoplegia externa
Cytb	citokróm b
CSB	konzervált régió
DARS2	aszparaginsav-tRNS szintetáz 2
DGUOK	deoxiguanozin kináz
D-loop	hipervariábilis régió
DM	diabetes mellitus
DNS	dezoxiribonukleinsav
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EMG	elektromiográfia
ENG	elektroneurográfia
Fw	forward
GH	growth hormone (növekedési hormon)
GSEQ 4.1	Sequence Analysis Software 4.1
HaeIII	Haemophilus aegypticus III

HCM	hypertrofiás cardiomyopathia
HD	Huntington-kór
HNPP	herediter neuropathia pressure palsy
HP	heteroplazmia
HpaII	Haemophilus parainfluenzae II
HTT	huntingtin
HV	hipervariábilis régió
HVS	hipervariábilis szegmens
kbp	kilobázispár
kDa	kilodalton
KSS	Kearns-Sayre szindróma
LBSL	agytörzsi és gerincvelői érintettséggel, emelkedett laktát szinttel járó leukoencephalopathia
LHL	letális hepatopathia és leukodystrophia
LHON	Leber-féle optikus neuropathia
LRPPRC	leucine-rich pentatricopeptide repeat containing
MB	mitochondriális betegségek
MDS	mitochondriális depléciós szindrómák
MELAS	Mitochondriális Encephalopathia Laktacidózis Stroke-szerű tünetekkel
MERRF	Myoclonusos Epilepszia Ragged-Red rostokkal
MHE	mitochondriális hepatoencephalomyopathia
MIDD	anyai ágon öröklődő diabetes és nagyothallás
MILS	maternális öröklődésű Leigh szindróma
MINGIE	mitochondriális neurogastrointestinalis encephalomyopathia
MLASA	mitochondriális myopathia és vashiányos anaemia
MM	mitochondriális myopathia
MRC	mitochondrial respiratory chain
MRI	mágneses rezonancia vizsgálat
MRPS16	mitochondriális ribosomális protein S16
MTATP6	ATP szintáz enzim 6-os alegységét kódoló gén
mt	mitochondriális
mtDNS	mitochondriális DNS

mtsai	munkatársai
n	elemek száma
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NARP	Neuropathia Ataxia és Retinitis Pigmentosa
NC	non-coding
ND	NADH dehidrogenáz alegység
nDNS	nukleáris DNS
OR	odds ratio (esélyhányados)
OXPPOS	oxidatív-foszforiláció
p	mutáció frekvencia értéke
PCR	polimeráz láncreakció
PEO	progresszív ophthalmoplegia externa
PH	promóter
PMP22	peripheral myelin protein 22
POLG	polimeráz- γ
PQ	performációs kvóciens
PUS1	pszeudouridin szintáz 1
RARS2	arginin-tRNS szintetáz 2
RFLP	restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus
RNS	ribonukleinsav
ROS	reaktív oxigén species
RRM2B	ribonukleotid Reduktáz M2 B
rRNS	riboszómális RNS
rs	referencia SNP
SANDO	sensory ataxia neuropathy dysarthria and ophthalmoplegia
SAPE	streptavidin-fikoeritrin
SCA	spinocerebelláris ataxia
SCAE	spinocelebelláris ataxia és epilepszia
SDH	szukcinát dehidrogenáz
SE	standard hiba
SfaNI	Streptococcus faecalis ND547 I
SLC25A3	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3

SLC25A4	solute carrier family 25 member 4
SNHL	szenzorineurális halláscsökkenés
SNP	single nukleotid polimorfizmus
SSEP	szomatoszenzoros kiváltott válasz
SUCLA2	szukcinát-CoA ligáz (ADP)
SUCLG1	szukcinát-CoA ligáz, α -alegység
Ta	annelációs hőmérséklet
TACO1	translational activator of mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I
TAE	tris-acetate-EDTA
TFX	mtTF1 kötőhely
TFY	mtTF1 kötőhely
TIA	transziens ischaemiás attack
TK2	timidin kináz 2
TRMU	tRNS 5-methylaminomethyl-2-thiouridylate methyltransferase
tRNS	transzfer RNS
TYMP	timidin foszforiláz
UH	ultrahang
UTR	untranslated region
UV	ultraibolya
VDAC	voltage-dependent anion channel
VPA	nátrium-valproát
VQ	verbális kvóciens
YARS2	tirozin-tRNS szintetáz 2

A rövidítések jelentését néhány helyen a szövegben is megadom a könnyebb érthetőség érdekében.

2. Bevezetés

A mitochondrium az eukarióta szervezet kis „energiatermelő” gépezete. Eredetét, valamint azt, hogy hogyan válhatott az eukarióta sejt egyik fontos kettős membránú sejtszervecskéjévé, az endoszimbionta elmélettel magyarázzák. A legújabb kutatások szerint a mitochondriumok legközelebbi őse egy α -proteobaktérium volt (Davidov és mtsai 2006), mely a legnagyobb homológiát a Rickettsia-félékkel mutatja (Fitzpatrick és mtsai 2006).

A mitochondrium a citoplazmában helyezkedik el, kb. 7 μm hosszú, 0.5-2 μm széles. Száma általában attól függően változik, hogy az adott szövetnek mekkora az energiaszükséglete (Shoubridge és Molnár 2002). Kettős membrán határolja, a belső membrán veszi körül a mátrixot, a mátrixba nyomuló belső membrán krisztákat alkot. A külső és belső membrán között helyezkedik el az intermembrán tér, mely kompartmentalizálódik (Manella és mtsai 1997). A belső membrán alakította krisztákban helyezkednek el az elektronszállító légzési lánc elemei: (komplex I-IV), az F_0F_1 ATP szintáz komplex (komplex V) (Taylor és Turnbull 2005), valamint egyéb transzporter molekulák. A transzporter molekulák egyik fő feladata a citoszol és a mátrix közötti kommunikáció biztosítása (Dimauro és Davidson 2005). A külső membránban feszültségfüggő anion csatornák helyezkednek el (VDAC vagy porin), melyek szabad diffúziót engednek kb. 3 kDa molekulasúlyig (Colombini 2004), emiatt az intermedier anyagcsere számos molekulája számára átjárhatók. Szerkezete viszonylag egyszerű, közel egyenlő arányban tartalmaz lipidet és fehérjét, bakteriális jellege miatt a külső membrán lipidösszetétele eukarióta vonásokat mutat (De Pinto és mtsai 2008; Shoshan-Barmatz és Ginzler 2003). A mitochondrium mátrixában helyezkedik el számos anyagcsere-folyamat enzimrendszere: a citrát-ciklus, a piruvát-dehidrogenáz komplex, a zsírsav (β -oxidáció) és aminosav oxidáció, hem-szintézis, és részben az ornitin-ciklus, a szteroidszintézis enzimei is, valamint itt vannak a riboszómák és a mitochondriális DNS molekula (mtDNS).

A mitochondriumok legfőbb szerepe a celluláris ATP szintézis az oxidatív-foszfosforiláción (OXPHOS) keresztül. Az ATP szintézis mellett a mitochondrium számos egyéb folyamatban is szerepet játszik, mint az apoptózis, öregedés, ROS védelem,

szteroid bioszintézis, ammónia detoxikálás (Shoubridge és Molnár 2002), neurodegeneráció (Federico és mtsai 2012).

A mitochondriális diszfunkciók klinikai tünetei általában azokban a szövetekben, szervekben manifesztálódnak, melyek nagy energiaigényűek, mint a központi idegrendszer, vázizomrendszer, szívizom, endokrin rendszer, gasztrointesztinális rendszer, valamint a szem szövetei. A mitochondrium működészavara lehet primer, azaz hereditár betegség következménye, de kialakulhat másodlagosan is, a mitochondriumokat károsító környezeti tényezők következtében (pl. UV-sugárzás). A neurodegeneratív betegségekben, mint az Alzheimer-kór (Garcia-Escudero és mtsai 2013), az ALS (Amyotrophic lateral sclerosis) (Keeney és Bartlett 2010), vagy a Huntington-kór (Quintanilla és Johnson 2009) patogenezisében is másodlagos mitochondriális működészavart figyeltek meg.

1. táblázat: A nukleáris és a mitochondriális genom összehasonlítása

(Forrás: Taylor és Turnbull 2005)

Jellemző	Nukleáris genom	Mitochondriális genom
Méret	~3.3 x 10 ⁹ bp	16.569 bp
DNS molekulák száma / sejt	23 egy haploid sejtben, 46 diploid sejtben	Több ezer kópia sejtenként (poliploid)
Kódoló gének száma	~20.000 – 30.000	37 (13 polipeptid, 2 rRNS, 22 tRNS)
Géndenzitás	~1 / 40.000 bp	1 / 450 bp
Intronok	Majd minden génben	Nincsenek
Kódoló DNS %-os aránya	~3%	~93%
Kodon használat	Univerzális genetikai kodonszótár	Eltérések az univerzális kodonszótártól: AUA-Met, TGA-Trp, AGA és AGG-STOP
Asszociált fehérjék	Hisztón és nem hisztón fehérjék	Hisztón fehérjék, hiánya, de asszociált fehérjék vannak
Öröklődés módja	Autoszómális és X-hez kötött mendeli, kodomináns, kapcsolt, Y-hoz kötött paternális	Maternális öröklődés
Replikáció	DNS polimeráz α és δ	DNS polimeráz γ
Transzkripció	Minden gén külön íródik át saját promóterről	Policisztronos, két promóter
Rekombináció	Meiozis profázisában	Nukleáris genom által irányított

2.1. A mitochondriumok genetikája

2.1.1. A mitochondriális genom általános jellemzői

A humán mitochondriumok kettősszálú cirkuláris DNS molekulája 16.569 bp-ból áll, és több kópiában van jelen (1-10 kópia). Az mtDNS 13 proteint kódoló gént tartalmaz, az általuk kódolt fehérjék az OXPHOS komponensei, ezeken kívül még két riboszómális RNS (12S rRNS, 16S rRNS) gén és 22 transzfer RNS (tRNS) gén is kódolódik az mtDNS-ben (Wong 2010). Az mtDNS replikációja független a sejtmagban zajló replikációtól. A mitochondriális genom számos tulajdonságában különbözik a nukleáris genomtól, ezeket a különbségeket foglalja össze az 1. táblázat.

Az mtDNS sajátos jellemzői:

1.) Maternális öröklődés (Giles és mtsai 1980), kivétel azon ritka esetek, ahol paternális öröklődésről számoltak be (Schwartz és Vissng 2003).

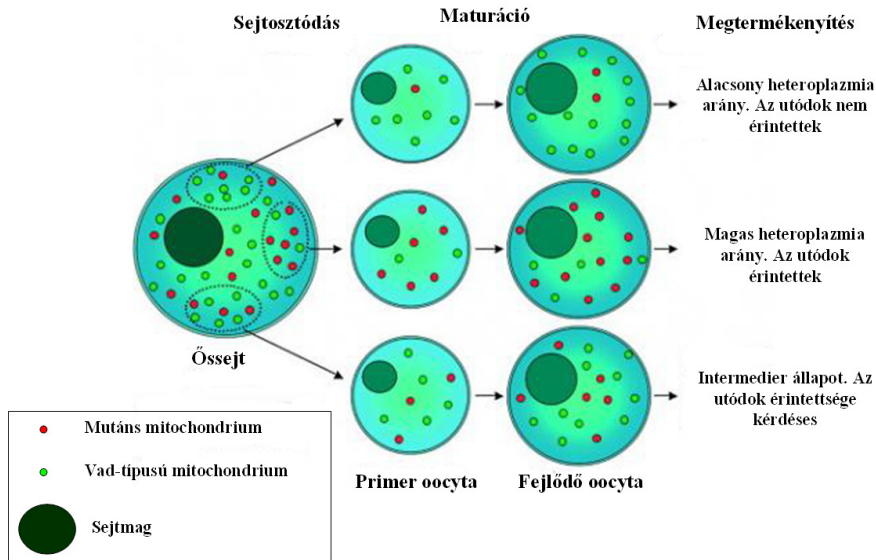
2.) Polyplazmia: minden sejtben az mtDNS több, 100-1000 kópiában fordul elő. A kóros és egészséges mtDNS együttes előfordulását nevezzük heteroplazmiának.

3.) Küszöb- (treshold) effektus: a heteroplazmia arányának egy bizonyos mennyiséget el kell érnie ahhoz, hogy a sejt funkciója károsodjon. Ezen küszöb érték eltérő a különböző szövetekben, szervekben, ez az adott szövet oxidatív metabolizmusának mértékétől függ. A klinikai tünetek súlyossága így összefüggésben állhat a heteroplazmia aránnyal, azaz minél nagyobb a heteroplazmia aránya, annál súlyosabb az adott szervrendszer érintettsége (Levinger és mtsai 2004).

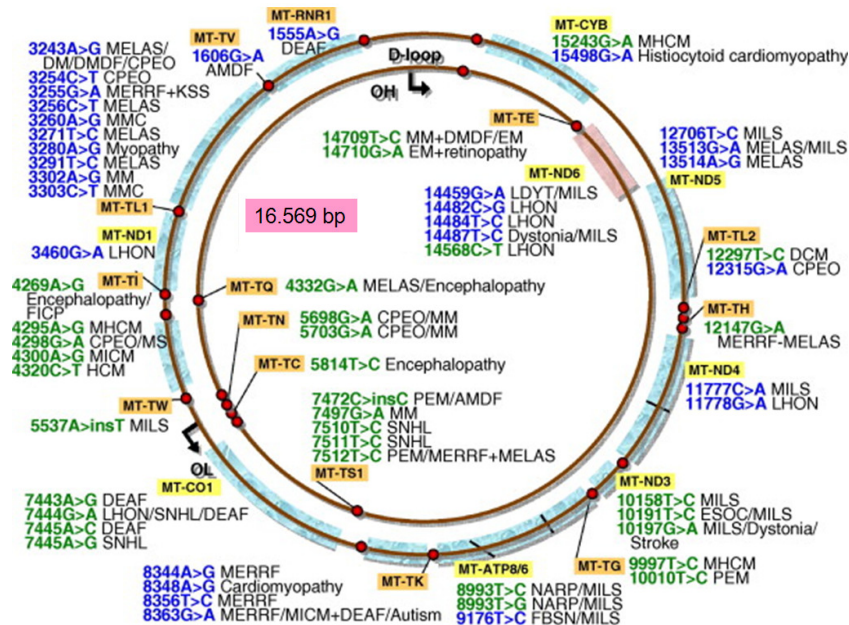
4.) Mitotikus szegregációs és palacknyak- (bottleneck) effektus: a vad és a mutáns mtDNS molekulák a sejtosztódás során az egyes leánysejtekbe véletlenszerűen jutnak be (Shoubridge 2000).

A mitotikus szegregáció miatt a mutáns mitochondriális genom aránya az egyes leánysejtekben eltérő lehet (1. ábra).

Mivel az mtDNS repair rendszere fejletlen, a mitochondriumok érzékenyek a különböző mutagén hatásokra, ezért mutációs rátája 10-szerese a nukleáris genoménak.



1. ábra: A mutáns mitochondriumok megoszlása (heteroplazmia aránya) az osztódás során az oocytákban
(Forrás: http://www.mitochondrialnecg.nhs.uk/pa_genetics.html)



2. ábra Az mtDNS számos patogén mutációinak lokalizációja, valamint a velük asszociált betegségek, szindrómák
(Forrás: <http://mtdnatest.com>)

2.2. Mitochondriális betegségek

A mitochondriális betegségek (MB) a mitochondriumok funkciójának primer károsodása miatt jönnek létre. Az MB-ek háttérében mind a mitochondriális, mind a nukleáris genom rendellenessége állhat. A tünetek nagyon heterogének, különösen mtDNS betegségek esetén (2. táblázat). Az mtDNS betegségek jellegzetessége, hogy a mitochondriális genom ugyanazon mutációjához különböző kórképek is társulhatnak. Egy klinikai tünet viszont számos mtDNS mutációval asszociálhat (DiMauro és Davidson 2005). Nem csak az egyes betegek fenotípusai között nagy a variabilitás, hanem egy családon belül is megfigyelhető ez a jelenség. Az mtDNS-ben fellépő hibák kb. 500 monogénes betegség (2. ábra) létrejöttéért felelősek (Calvo és mtsai 2010). Az mtDNS asszociált kórképek általában egyszerre több szervet, szervrendszert is érintenek.

2.2.1. A mitochondriális betegségek epidemiológiája

A mitochondriális betegségek eddig leírt epidemiológiai vizsgálatai különböző szempontok szerint elemezték a betegségek prevalenciáját. Az északkelet-angliai lakosság körében a minimum prevalenciát 1 / 2500-ra (Schaefer és mtsai 2004), a kockázati prevalenciát 16.5 / 100.000-re becsülték gyermekeknél és fiatal felnőtteknél (Schaefer és mtsai 2008). A tüneteket mutató betegek prevalenciáját 6.57-9.2 / 100.000-re becsülték, a „veszélyeztetett” családtagokat is beleszámolva ezen érték már 12.48 / 100.000-re nőtt egy másik angliai tanulmány szerint (Chinnery és mtsai 2000; Schaefer és mtsai 2008). Egy svéd közlemény a gyermekkori mitochondriális encephalomyopathiák frekvenciáját 4.7 / 100.000-re becsülte (Darin és mtsai 2000), míg egy ausztrál vizsgálat a gyerekkori légzési lánc betegségek epidemiológiájának vizsgálata során a minimum születési prevalenciát 13.1 / 100.000 –nek határozta meg a teljes populációra nézve (Skladal és mtsai 2003). Mindkét tanulmány figyelembe vette mind az mtDNS, mind pedig a nukleáris genom defektusai által okozott MB-eket.

Az Orphanet (a ritka betegségek és a ritka betegségekben használt gyógyszerek referencia-portálja) összesített prevalencia adatai: MELAS 16 / 100.000; MERRF 0.9 / 100.000; NARP 8.5 / 100.000; LHON 6.5 / 100.000 (www.orpha.net).

2. táblázat: A mitochondriális betegségekben érintett szervek
(Federico és mtsai 2012 után módosítva)

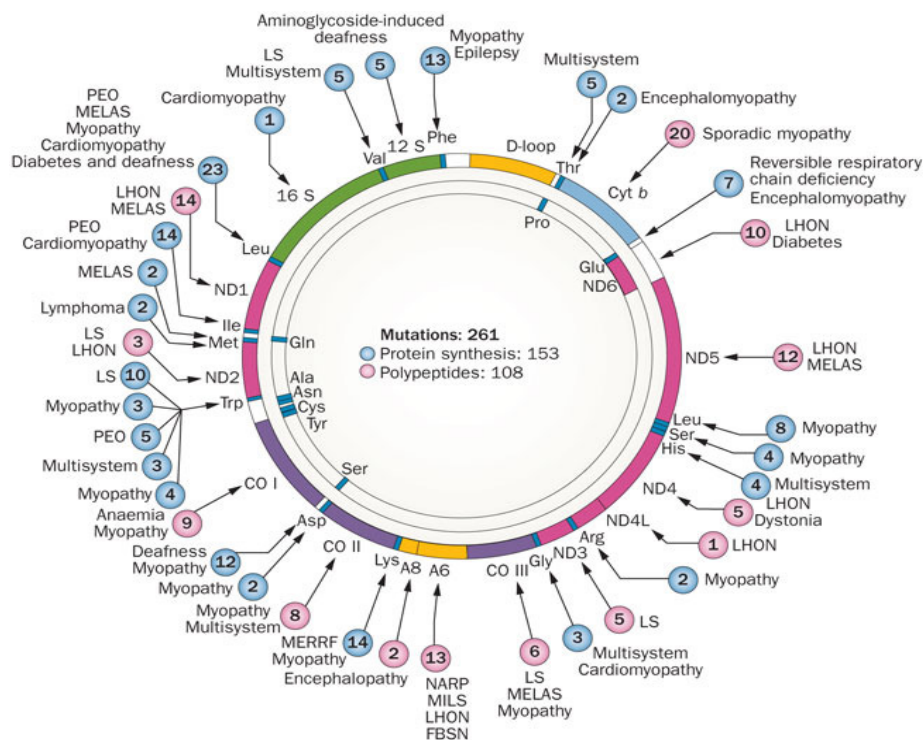
Szerv, szervrendszer	Jellemző tünetek
Központi idegrendszer	Ataxia, epilepszia, migrén, stroke-szerű tünetek, izomgyengeség, dystonia, dyskinesia, pszichózis, mentális retardáció
Perifériás idegrendszer	Myopathia, polyneuropathia
Izom	Terhelési intolerancia, hypotónia, izomgyengeség, atrophia, laktát acidózis, fáradékonyság, izommerevség, izomgörcsök
Szív	Cardiomyopathia, vezetési zavarok
Szem	Nervus opticus atrophia, retinopathia, glaucoma, cataracta
Fül	Nagyothallás, perifériás szédülés
Bél	Anorexia, ismétlődő hányás, hasmenés, felszívódási zavar, pseudo ileus
Máj	Hepatopathia
Vese	Renális tubulopátia, vese cysta
Endokrin mirigyek	Megkésett pubertás, amenorrhoea, meddőség, DM, pajzsmirigy diszfunkció, alacsony termet, hypogonadizmus, hypoglikémia,
Csontvelő	Vashiányos anémia

2.2.2. Az mtDNS mutációi okozta betegségek

Az mtDNS-ben több mint 200 patogén mutációt és számos polimorfizmust (SNP) azonosítottak, melyek változatos klinikai tüneteket, szindrómákat eredményezhetnek (3. ábra). A patogén szubsztitúciók eloszlása nem egyenletes a cirkuláris molekulában, vannak ún. mutációs „hot spot”-ok. A legfrekvenciáltabban érintett gének a tRNS-ek, melyek közül a legtöbb mutáció a tRNS^{Leu (UUR)}-ban található, ezt követik a tRNS^{Lys} és tRNS^{Ile} gének. Ezeken túl gyakran találunk mutációkat a NADH dehidrogenáz alegységeit, a citokróm és az ATPáz alegységeket kódoló génekben. Az mtDNS mutációkra jellemző, hogy egy szubsztitúció különböző fenotípust is eredményezhet. A következő fejezetekben a leggyakoribb mitochondriális genom asszociált kórképeket részletezem.

2.2.2.1. Mitochondriális Encephalopathia Laktacidózis Stroke-szerű tünetekkel (MELAS, MIM # 540000)

Az mtDNS-ben a tRNS^{Leu(UUR)} m.3243 A>G mutációja a leggyakoribb. Ezt először a MELAS háttérben írták le (Goto és mtsai 1990). A MELAS klinikai tüneteivel járó esetek kb. 80%-ában ez a mutáció okozza a betegséget, de ezt a kórképet további kb. 40 mtDNS szubsztitúcióval is összefüggésbe hozták (www.mitomap.org). A kórkép kezdete gyermekkorra és fiatal felnőttkorra tehető. A betegségre általában a maternális öröklődésű migrén és DM mellett az ischeamiás stroke-ra emlékeztető tünetek hívják fel a figyelmet. Alacsonynövés, epilepsziás rohamok, nagyothallás, epizodikus hányás, terhelési intolerancia, ptosis is gyakori társtünetek (Finsterer és mtsai 2007, Gál és mtsai 2008; Inczedy-Farkas és mtsai 2011).



3. ábra: Az mtDNS génjeiben fellépő defektusok miatt kialakult kórképek (Forrás: DiMauro és mtsai 2013)

2.2.2.2. Myoclonus Epilepszia Ragged-Red rostokkal (MERRF, MIM # 545000)

A második leggyakrabban előforduló patogén mtDNS mutáció a tRNS^{Lys} génben található m.8344 A>G, melyet a MERRF szindrómával asszociáltan írtak le (Shoffner 1990). A MERRF nevét az izomszövetben megfigyelhető „rongyos vörös” rostok jelenléte miatt kapta. A legjellegzetesebb tünet az ún. myoclonus epilepszia, emellett az ataxia, hypacusis, dysarthria, járási bizonytalanság, szemmozgászavar, kognitív funkciók hanyatlása is kialakulhat. Gyakran lipómák keletkeznek a bőr alatt.

2.2.2.3 Neuropathia Ataxia és Retinitis Pigmentosa (NARP, MIM # 600750)

Az mtDNS ATP szintáz enzim 6-os alegységét kódoló (MTATP6) génjében található m.8993-as pozíciónak két patogén variánsa is lehetséges: C>T és C>G. Az m.8993 T>C a NARP szindrómát eredményezi (Tatuch and Robinson 1993), az m.8993 C>G mutáció MILS-t (Maternális öröklődésű Leigh szindróma, MIM # 516060) okoz (Degoul és mtsai 1995). Az m.8993 T>C mutáció magas heteroplazmia aránya (70 - 90%) is NARP szindrómát eredményez, ennél magasabb heteroplazmia arány esetén akár fatális kimenetelű MILS-szel asszociálhat a mutáció. A mutációk hatására az ATP szintáz szerkezete megváltozik, funkciója károsodik, mely következtében az ATP szintézis csökken (Santorelli és mtsai 1996). A T>G mutáció homoplazmikus formában az ATP termelést 50-70%-kal csökkenti sejttípustól függően (Mattiazzi és mtsai 2004). Jellemző tünetek: sensomotoros neuropathia, törzs és végtag ataxia, valamint retinitis pigmentosa. A gyermekeknél fejlődésbeli elmaradás és tanulási nehézségek is jelentkezhetnek. Idősebb korban a beteg deméntálódhat. Társünetként megjelenhet epilepszia, hypacusis és szív-ingerületvezetési rendellenességek is.

2.2.2.4. Leber-féle optikus neuropathia (LHON, MIM # 535000)

Az mtDNS fehérjét kódoló génjeiben lokalizálódó mutációk következtében alakul ki a Leber-féle optikus neuropathia (LHON), mely az előző szindrómákhoz képest igen jól karakterizált, kizárólag a nervus opticus károsodását eredményezi. Tizennégy szubsztitúciót, és 18 ritka alterációt hoztak eddig összefüggésbe a LHON-nal, (<http://mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/MutationsLHON>). A leírt szorosabb asszociációt mutató 14 mutáció közül 3 elsődlegesnek minősül, azaz a LHON diagnózis felállításához ezek közül legalább 1-nek a jelenléte elengedhetetlen. A többi társuló

mutáció a fenotípust modifikálja, ezek jelenléte önmagában nem elegendő a LHON diagnózishoz. A 3 elsődleges mutáció, melyek a NADH dehidrogenáz (ND) alegységeiben találhatóak a következők: m.3460G>A (ND1) (Howell és mtsai 1991), m.11778G>A (ND4) (Wallace és mtsai 1998) és m.14484T>C (ND6) (Brown és mtsai 1992).

A betegség általában 10 és 20 éves kor között kezdődik, gyakrabban érinti a férfiakat, mint a nőket. Az első tünet a homályos látás, mely kezdődhet csak az egyik, vagy mindkét szemben egy időben. A látásromlás gyorsan progrediál, a színlátás is romlik, a nervus opticus sorvadása miatt gyakran fiatalon elveszíti a beteg a látását. A látásromlás mellett ritkán előfordulhatnak egyéb tünetek, mint mozgászavar, tremor, szív ingerületvezetési zavarok, melyet LHON plus-nak neveznek (Nikoskelainen és mtsai 1995).

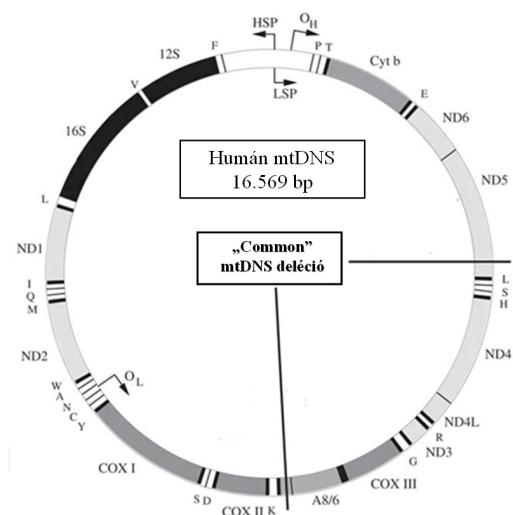
2.2.2.5. Az anyai ágon öröklődő diabetes és nagyothallás (MIDD, MIM # 520000)

A diabetes mellitus (DM) kialakulásának hátterében mind környezeti tényezők, mind genetikai faktorok is szerepet játszanak. A DM1 kialakulásában genetikai tényezők, a DM2-ben környezeti okok dominálnak (Hu 2011). A szénhidrát háztartás megfelelő fenntartásában, a glükóz-anyagcsere normális működésében a mitochondriumoknak fontos szerepük van (Kim és mtsai 2008). A mitochondriális betegségek egyik leggyakoribb, de nem specifikus tünete a DM. A már korábban említett m.3243 A>G szubsztitúciót nem csak a MELAS, hanem az anyai ágon öröklődő diabetes és nagyothallás (MIDD) hátterében is leírták (Ouweland és mtsai 1992). Az MIDD-t az mtDNS 10,4 kbp-os deléciójával is összefüggésbe hozták (Ballinger és mtsai 1992). Ezen kívül a tRNS^{Glu} génben lokalizálódó m.14709 T>C patogén mutációt is leírták DM-ben, mint okozati tényezőt. Jelenléte csökkenti a mitochondriális komplex I és IV aktivitását (Petrucca-Lostanlen és mtsai 2002). Az MIDD-el nemcsak patogén mutációkat, hanem homoplazmikus polimorfizmusokat is összefüggésbe hozták az mtDNS különböző génjeiben: m.1888 G>A, m.3396 T>C, m.3421 G>A, m.4216 T>G, m.4917 A>G, m.8381 A>G (www.mitomap.org, Petrucca-Lostanlen és mtsai 2000). A DM2 esetek 0.5-2.8%-át teszik ki az MIDD esetek (Guillaumeau és mtsai 2001). A MIDD kezdődhet már gyermekkorban is. A DM mellett a nagyothallás is gyakori.

2.2.2.6. Mitochondriális DNS egyes és többes deléciók, duplikációk

A mitochondriális genomban nem csak pontmutációk vannak, kialakulhatnak bizonyos mtDNS deléciók és duplikációk is (Wallace és mtsai 1995; Poulton és mtsai 1989). A deléciók lehetnek egyes deléciók, melyek közt a leggyakoribb az ún. „common” deléció, de előfordulhat kettő vagy több szakasz egyidejű deléciója is (Servidei és mtsai 1991). A „common” deléció (4977 bp kiesése az mt genomban) az mt8470 és mt13447 közötti szakasz hiányát eredményezi (4. ábra). Az egyes deléciós esetek kb. 50%-ában fordul elő a 4977 bp kiesése az adott mt régióban (Sadikovic és mtsai 2010). A „common” deléciót leggyakrabban a Kearns-Sayre-szindrómában (MIM # 530000), a Pearson-szindrómában (MIM # 557000) és a progresszív ophthalmoplegia externa-ban (PEO) (MIM#157640) írták le. A Pearson-szindróma a hasnyálmirigy exocrin funkciózavara mellett súlyos anaemiát is eredményez. Időnként tubulopathia és ptosis is társul hozzá (de Toni-Debré-Fanconi szindróma MIM # 134600) (Niaudet és mtsai 1994).

A multiplex deléciók másodlagosan jönnek létre. Kialakulásukat az intergenomiális kommunikáció zavara (nukleáris és mtDNS) és/vagy környezeti tényezők eredményezhetik. Az intergenomiális kommunikáció zavara következményeként kialakuló betegségek mendeli módon öröklődnek, mert háttérükben azoknak a nukleáris géneknek a hibái állnak, melyek az mtDNS replikációt, transzkripciót, transzlációt szabályozzák (Schröder és Molnár 1997). Az élet során károsító környezeti tényezők következtében (UV-sugárzás, genotoxikus anyagok, gyulladás) mtDNS mutációk jönnek létre.



4. ábra: A „common” deléció lokalizálódása az mtDNS-ben
(Forrás: Andreu és mtsai 2003)

2.3. Intergenomiális kommunikáció

A mitochondriális gének által kódolt fehérjéken kívül a nukleáris genom kódolja a megfelelő működéshez szükséges mitochondriális proteomot (kb. 1500 gén) (Calvo és mtsai 2010). A nukleáris genom a felelős egyes OXPHOS fehérjék szintetizálásáért és összeszereléséért, az mtDNS fenntartásáért, transzlációjáért, a mitochondriális dinamikáért, valamint a membrán védelemért. A nukleáris génekben fellépő defektusok okozta mitochondriális betegségek klinikai-genetikai szempontból több csoportba sorolhatók: *i*) a légzési lánc alegységeit kódoló gének hibái, *ii*) lipid milieu-ért felelős gének hibái, *iii*) egyéb fehérjéket kódoló gének hibái, *iv*) intergenomiális kommunikációban részt vevő gének hibái, *v*) a mitochondriális dinamikát befolyásoló gének hibái (Spinazzola és Zeviani 2007). A nukleáris genom defektusai a legtöbb esetben mtDNS depléciót és multiplex deléciókat eredményeznek a mitochondriális genomban (Wong 2010). Az általuk okozott szindrómák igen variábilisak (3. táblázat).

Az intergenomiális kommunikáció zavara megjelenhet az mtDNS mennyiségi eltéréseiben: mitochondriális depléciós szindróma (MDS), mely súlyos csecsemőkori betegségeként nyilvánul meg. Az MDS-k fenotípusai heterogén csoportot alkotnak, érintheti pl. a gastrointestinális rendszert (mitochondriális neurogastrointestinalis encephalomyopathia (MNGIE MIM # 612075)). Számos nukleáris gén defektusához

kötött az MDS kialakulása, mint a *TK2*, *SUCLA2*, *SUCLG1*, *RRM2B*, *DGUOK*, *TYMP*, *POLG1*, *C10orf2* vagy *MPV17* (El-Hattab és Scaglia 2013).

Az mtDNS minőségi szintjén megjelenő intergenomiális kommunikáció zavarát az mtDNS multiplex deléciók megjelenése mutatja, az ezzel leggyakrabban összefüggő tünet a progresszív ophthalmoplegia externa (PEO). Az mtDNS biogenezisében egyik kulcsszerepet játszó gén a *POLG1* (polimeráz gamma), melynek defektusai egyes és multiplex deléciókat is okozhatnak az mtDNS-ben (Wong és mtsai 2008). 2001 óta több mint 160 szubsztitúciót azonosítottak ebben a génben (<https://www.tools.niehs.nih.gov/polg/>). A *POLG1* mutációk által okozott betegségek legtöbbször autoszómális recesszíven öröklődnek, de több esetben is leírtak autoszómális domináns transzmissziót. Ezekben az esetekben a mutációk a polimeráz katalitikus doménjére lokalizálódnak. A gén patogén mutációi széles spektrumú klinikai tüneteket okozhatnak, több szervet, szervrendszert érintve. Legjellegzetesebb betegségek: Alpers-Huttenlocher szindróma (Naviaux és Nguyen 2004), spinocerebelláris ataxia és epilepszia (SCAE MIM # 607459) (Naimi és mtsai 2006), krónikus ophthalmoplegia externa (CPEO) (Van Goethem és mtsai 2001), mitochondriális neurogastrointestinalis encephalomyopathia (MNGIE) (Tang és mtsai 2012), sensoros ataxia neuropathia dysarthria és ophthalmoplegia (SANDO MIM # 607459) (Spinazzola és Zeviani 2005), mitochondriális encephalopathia laktacidózis stroke-szerű tünetekkel (MELAS) (Deschauer és mtsai 2007) és a mitochondriális depléciós szindrómák (MDS). Farmakogenomikailag jelentősek a *POLG1* egyes szubsztitúciói (L304R, A467T, G588D, Q879H, T885S, E1143G, Q1236H), melyeket összefüggésbe hoztak a valproát (VPA) okozta májkárosodással. Ez akár fatális kimenetelű is lehet (Pronicka és mtsai 2011).

A mitochondriális aszpartil-tRNS szintetáz enzim kódolásáért felelős a *DARS2* gén, mutációinak hatására az enzim aktivitása csökken, melynek következtében az aszparaginsav nem tud kötődni a mitochondriális fehérjékhez. A *DARS2* gén mutációi az LBSL (Leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and lactate elevation, MIM # 611105) betegség hátterében állnak, mely autoszómális recesszív módon öröklődik, az agy és a gerincvelő érintettségével jár (Scheper és mtsai 2007).

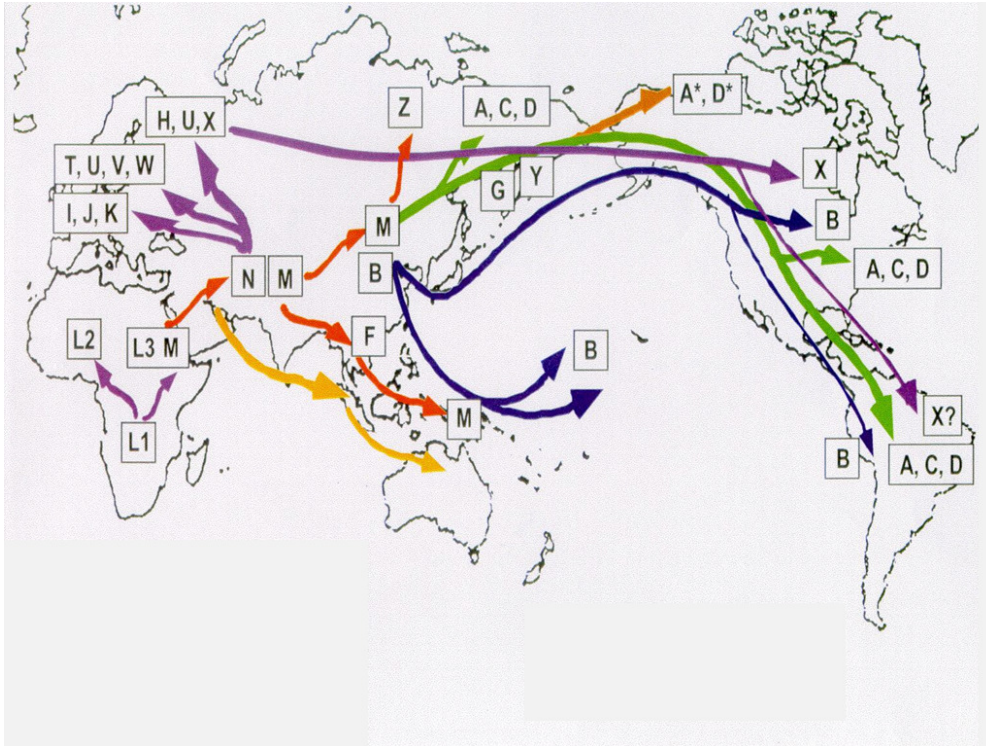
3. táblázat: Az intergenomiális kommunikációban résztvevő legfontosabb gének, klinikai manifesztációjuk, valamint funkcióik
(Forrás: Almeida és mtsai 2012)

Gén	Klinikai fenotípus	Funkció	Referencia
POLG1	PEO, Alpers szindróma, SCAE, SANDO, OXPHOS deficiencia, ataxia, epilepszia, komplex I deficiencia	mtDNS replikáció	Copeland 2008
POLG2	PEO, hallásvesztés	mtDNS biogenezis	Copeland 2008
SLC25A4 / ANT1	PEO, MM, HCM	ADP-ATP transzlokáció	Copeland 2008
SLC25A3	Hipotónia, HCM	transzport folyamatok	Mayr és mtsai 2011
C10orf2 / TWINKLE	PEO, MDS, SCA, kolesztatikus hepatitis, demencia, komplex I deficiencia, PEO	mtDNS metabolizmus	Copeland 2008
TYMP	MNGIE	timidin-szint fenntartás	Taanman és mtsai 2009
TK2	MDS, MDS hallásvesztéssel, PEO, epilepszia	mtDNS szintézis	Copeland 2008
DGUOK	MDS	purin dezoxiribonukleozidok foszforiláció (mt mátrix)	Copeland 2008
RRM2B	MDS, PEO, MNGIE, KSS	DNS szintézis	Copeland 2008
MPV17	Hepatocerebrális MDS, gyermekkori májkárosodás, LHL	mitochondriális homeosztázis	Copeland 2008
SUCLA2	MDS	ATP-függő szukcinát-koenzimA - szukcinil-koenzimA átalakulás katalizálása	Copeland 2008
SUCLG1	Laktát acidózis mtDNS deplécióval, újszülött laktát acidózis metilmalonsav acidúriával, szukcinil-koenzim A-szintetáz deficiencia, MHE	ATP, - vagy GTP- függő szukcinát-koenzimA - szukcinil-koenzimA átalakulás katalizálása	Rivera és mtsai 2010
PUS1	MM szideroblasztos anémiával, szideroblasztos anémia	RNS struktúrák stabilitása	Bykhovskaya és mtsai 2004
TRMU	Gyermekkori májkárosodás, légzési lánc rendellenességek	mtDNS tRNS-ek modifikáció	Gaignard és mtsai 2013
LRPPRC	Leigh szindróma	nukleáris és mt gének regulálása	Debray és mtsai 2011
TACO1	Leigh szindróma	mt COI transzláció aktiválás	Weraarpachai és mtsai 2009
MRPS16	MRC betegség	mitochondriális riboszóma	Miller és mtsai 2004
RARS2	Pontocerebelláris hipoplázia	mt tRNS ^{Arg} szintetáz	Cassandrini és mtsai 2013
DARS2	LBSL, epizodikus ataxia	mt tRNS ^{Asp} szintetáz	Wong 2012
YARS2	MLASA szindróma	katalizálja a tirozin hozzákötődését a tRNS-hez	Riley és mtsai 2010

2.4. Az mtDNS, mint antropológia marker

A mitochondriális genom sajátos jellemvonása a kódoló szakaszok magas aránya, van azonban egy kb. 1000 nukleotid hosszúságú hipervariábilis régió, ahol nincsenek gének (D-loop). Az itt felelhető SNP-k a törzsfajlás során rögzültek, nincs fenotipikus következményük, viszont a populációgenetikai vizsgálatokban fontos szerepet játszanak az mtDNS maternális öröklődése miatt. Ezen hipervariábilis szakasz bázissorrendje meghatározza, hogy mely mitochondriális haplocsoportba tartozunk. Az mtDNS variánsok hasonlósági vizsgálatai alapján egy matriarchális családfát lehet felállítani, ezen alapul a humán leszármazástan, a filogeográfia. A D-loop-ban 50 – 500 nukleotid különbség van két nem rokon ember között. Ezen szakasz bázissorrendjéből nyert információkból földrajzi régiókba sorolhatóak az emberek: európai, ázsiai és afrikai populációkra. E bázissorrendből meg lehet állapítani, hogy a vizsgált egyének között mekkora a genetikai távolság és egy ún. leszármazási fát állíthatunk fel. Maternális ágon legkorábbi ősünkig, a „mitochondriális Éváig” visszavezethető.

Huszonöt haplocsoportot különböztetünk meg (van Owen és Kayser 2009), jellemző markereik a törzsfajlás során egyszer következtek be az mtDNS-ben. A legősibb haplocsoport az afrikai L, melyből az összes többi származtatják. Ebből következik, hogy a mitochondriális Éva Afrikából származik (kb. 160-200 ezer éve). A molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával ma 8 superhaplocsoportot és ezeken belül haplocsoportokat különböztetünk meg. A nyolc superhaplocsoport: **L**, **L3**, **M** (ezen belül: C, E, G, Q, Z), **D**, **N** (ezen belül: A, I, O, S, W, X, Y), **R** (ezen belül: B, F, J, P, T), **R0** (ezen belül: HV, H, V), **U** (ezen belül: K) (www.phylotree.org).



5. ábra: A mitochondriális haplocsoportok migrációs térképe

(Forrás: <http://www.roperld.com/mtdna.htm>)

A mai magyar populáció nagy része - mint a legtöbb európai - az R0 szuperhaplocsoportba tartozik, de a migráció miatt az egyéb szuperhaplocsoportok is képviseltetik magukat, (K, U, E1, I). A legősibb haplocsoport az L, mely az afrikai kontinensre jellemző, ezen haplocsoportból származtatható az összes többi. A mai emberek az intenzív migráció miatt igen heterogéneen alakították ki a kontinensek haplocsoport megoszlását (5. ábra). Számos vizsgálat kimutatta, hogy a különböző haplocsoportok rizikó tényezőként szerepelnek bizonyos kórképek kialakulásában, vagy esetenként csökkentik az adott betegség rizikóját. Néhány jellegzetes kórkép asszociációját összegzi a 4. táblázat (4. táblázat).

4. táblázat: A mitochondriális haplocsoportokkal asszociált kórképek
(Rövidítések: LHON - Leber-féle optikus neuropathia, AIDS - szerzett immunhiányos betegség,
DM2- 2-es típusú diabetes mellitus, na – nincs adat)

Haplocsoport	Asszociált kórkép	Kockázatot növel (+) Kockázatot csökkent (-) Védő szerep (*)	Odds ratio (OR)	Referencia
H	Alzheimer-kór	+	1.85	Santoro és mtsai 2009
	Parkinson-kór	+	2.58	Khusnutdinova e és mtsai 2008
	Asthenozoospermia	-	2.97	Feng és mtsai 2013
	Szeepszis	+	0.95	Baudouin és mtsai 2005
J	Hosszú élet	+	1.12	Rea és mtsai 2013
	LHON	-	3.66	Udar és mtsai 2009
	Alzheimer-kór	*	na	Coskun és mtsai 2004
K	Parkinson-kór	*	0.59	Ghezzi és mtsai 2005
N	Mellrák	+	0.39	Fang és mtsai 2010
T	LHON	-	5	Udar és mtsai 2009
	Szívkoszorúér betegség	-	2.36	Kofler és mtsai 2009
	Elhízás	-	1.94	Nardelli és mtsai 2013
U	AIDS	-	2.02	Hendrikson és mtsai 2008
	Időskori hallásvesztés	+	1.12	Mainwaring és mtsai 2007
X	DM2	-	1.1-1.2	Chinnery és mtsai 2007
D	Mellrák	-	3.11	Fang és mtsai 2010
	Nyelőcsőrák	-	2.69	Li és mtsai 2011
M	Mellrák	-	1.77	Fang és mtsai 2010

2.5. Az mtDNS diagnosztikai lehetőségei

A leggyakoribb mtDNS szubsztitúciók detektálására a legelterjedtebb módszer a PCR-RFLP (restrikciós fragment hossz polimorfizmus). Emellett Sanger és újgenerációs szekvenálás is alkalmas az mtDNS illetve a nukleáris genom bázissorrendjének megismeréséhez. A szekvenálási technikák mellett a MitoChip microarray technika is alkalmazható. A DNS microarray alapja, hogy a szilárd hordozón meghatározott elrendezésben találhatóak az ismert nukleotid-szekvenciák, míg az ismeretlen szekvencia szolubilis (ill. jelzett) formában van jelen. Az elemsűrűsége a microarray-eknek igen nagy: 100 próba elem/cm², a hagyományos array-eké ennél kisebb. A hagyományos array-eknél porózus hibridizációs membránt használtak, míg ezt a microarray-eknél már nem-porózus üveg vagy szilikon alapúra cserélték, így a megnövekedett reakciósebesség és csökkent reakció-térfogat miatt lecsökkent a reakcióidő. A microarray-eknél fluoreszcens jelölést használnak, mely által a jelfeldolgozás igen nagyfokú lett, így mennyiségi analízisre is alkalmas, sőt kettő vagy több flouorfor egyidejű alkalmazásával egyszerre több minta is futtatható egy microarray-en. A DNS microarray-ek így alkalmassá váltak az egy időben több százezer molekuláris vizsgálat kivitelezésére, így széles körben alkalmazhatóak fehérje szinten, genomiális, valamint farmakogenomikai vizsgálatoknál (Petrik 2001).

A kópiaszám változások Real-time PCR-el azonosíthatóak, az egyes és többes deléciók kimutatására a long PCR a legalkalmasabb. Régebben ezek azonosítására Southern blot technikát használtak.

3. Célkitűzések

Vizsgálataink céljaként a következőket tűztük ki:

1. A leggyakoribb mtDNS pontmutációk (m.3243 A>G; m.8344 A>G; m.8993 T>C,G; m.3460 G>A, m.11778 G>A és m.14484 T>C) és mtDNS deléciók előfordulási gyakoriságának vizsgálata a magyar populációban
2. Az mtDNS mutációk és deléciók fenotípus-genotípus korrelációjának meghatározása
3. Gén-gén interakciók vizsgálata: egyes mtDNS ill. nukleáris DNS rendellenességek együttes előfordulásának vizsgálata
4. Az mtDNS és a *POLG1* gén farmakogenomikai szerepének elemzése
5. A „MitoChip” microarray technika klinikai diagnosztikai célokra való használatának elemzése

4. Anyagok és módszerek

4.1. A vizsgált betegek

A disszertációban összesen 1568 klinikai tünetek és laboreredmények alapján feltételezett mitochondriális beteg genetikai vizsgálatának eredményét foglaljuk össze. Az 1568 betegből 543 eset a Pécsi Tudományegyetemről (Általános Orvostudományi Kar, Klinikai Központ, Orvosi Genetikai Intézet) származik, míg 252 esetet az Országos Környezetegészségügyi Intézet Molekuláris Genetikai és Diagnosztikai Osztálya bocsátott rendelkezésünkre. Intézetünkben a minták gyűjtése: 1999 januárjától 2014 márciusáig tartott. Az észak-keleti, valamint a közép-magyarországi régiókból is érkeztek minták.

A vizsgált betegek két alcsoportba sorolhatóak: az első, 1082 betegből álló kohort, akiknél az mtDNS hot spot régiók (az m.3243A > G , m.8344A > G , m.8993T > C, m.8993T > G patogén mutációk), valamint az egyes és multiplex deléciók analízise zajlott, míg a második alcsoport 486 beteget foglal magába, akiknél a 3 primer LHON mutációk (m.3460 G>A, m.11778 G>A, m.14484 T>C) detektálása történt.

Az 1082 betegből álló alcsoport átlag életkora: 38.6 ± 18.2 év volt (1-75 év). A nemek megoszlási aránya: 595 nő (átlag életkor: 38.1 ± 14.6 év), 487 férfi (átlag életkor: 32.8 ± 16.7 év). A felnőtt/gyermek (kiskorú) arány: 908/174. A betegeket genetikai vizsgálatra a tüneteik és laboreredményeik, valamint családi halmozódást mutató anamnéziséjük alapján küldték. A beválasztási kritériumnál a jellemző tünetek különböző kombinációja lett figyelembe véve, mint az alacsony termet, epilepszia, ataxia, myopathia, PEO, hypoacusis, terhelési intolerancia, izomfájdalom, visszatérő ischaemiás stroke szindróma, kognitív diszfunkció, pszichiátriai vagy endokrin betegség. A betegek kb. 70%-ánál több mint 5 szervrendszer érintett. A vezető tünetek: myopathia, terhelési intolerancia, ataxia, PEO és pszichiátriai betegségek voltak. Kizárási tényezőt jelentett az előrehaladott kor és/vagy az autoimmun betegségek. Kisgyermekeknél a mitochondriális betegség gyanúját vetik fel a következő tünetek: izom hypotonia, késleltetett pszichomotoros fejlődés, laktát acidózis és epilepsziás rohamok kombinációja.

A második, 486 betegből álló alcsoport átlag életkora: 34.91 ± 17.5 év (7-63 év). A nemek megoszlása: 248 nő (átlag életkor: 36.98 ± 17.56), 238 férfi (átlag életkor:

32.64±18.33). A 486 betegből 398 felnőttet és 88 gyermeket vizsgáltunk a három primer LHON mutációra. Ezen betegek tünetei igen karakterisztikusak: látóideg sorvadás, gyorsan kialakuló látásvesztés, makula degeneráció és scotoma.

A vizsgálatok elvégzése előtt részletes felvilágosítás kaptak a betegek, amely alapján beleegyező nyilatkozatot írtak alá a genetikai vizsgálat elvégzésére, a minták további kutatási célú megőrzésére és az eredmények szakirodalmi megjelentetésére. A minták tárolása az Európai Unió követelményi rendszerének megfelelően a Semmelweis Egyetem Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézet NEPSY biobankjában valamint a PTE Orvosi Genetikai Intézet Biobankjában történt.

4.2. DNS izolálás

Genetikai vizsgálatokra a betegektől a perifériás vért etilén-diamin-tetraecetsavas (EDTA) csövekbe gyűjtöttük 1206 esetben, míg 352 páciensnél izomszövetből nyertük az mtDNS-t. Az izolálást Qiagen Blood Mini kittel (Qiagen, Valencia, CA, USA), valamint szövet esetében a Qiagen Tissue kittel (Qiagen, Valencia, CA, USA) végeztük. Az EDTA-s csöveket feldolgozásig 4°C-on, a maradék vért pedig -20°C-on tároltuk, az izoláláshoz 200 µl-nyi térfogattal dolgoztunk. A kivont DNS koncentrációját és tisztaságát fotometriás módszerrel határoztuk meg Nanodrop 2000-rel (Spektrophotometer, Thermo Scientific, NYSE, USA). A kapott DNS tisztasági fokát a 260 nm-en, valamint a 280 nm-en mért abszorbancia értékek hányadosával határoztuk meg.

4.3. A DNS minták tárolása - Biobank

A kinyert DNS minták -20°C -ra, hosszú távú tárolásra -70°C -os ultramélyhűtőbe kerültek. A minták a SE Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetében és a PTE Orvosi Genetikai Intézetében használt regisztrációnak megfelelően reverzibilisen, anonimizált módon kerültek tárolásra.

A vizsgált betegek biológiai mintáit és a hozzá tartozó adatokat munkacsoportunk a NEPSYBANK-ban tárolta. A NEPSYBANK egy olyan betegség-alapú biobank, mely fenotípusos és környezeti adatokat egyaránt tartalmaz. Biológiai minták gyűjtésén alapszik, melyek lehetnek DNS, RNS, vér, plazma, gerincvelő-folyadék, izom-, ideg-, bőr biopsziából származó minták, agyszövet és fibroblaszt. Az adatok, mint pl.

gyermekkorai fejlődés, családi anamnézis, egészségügyi állapot, neurológiai státusz, EKG, elektrofiziológiai feljegyzések, képalkotók, laboratóriumi eredmények, patológiás elváltozások, légzési lánc enzimaktivitás, gyógyszerelés és genetikai eredmények is rögzítésre kerülnek a biobankban (<http://molneur.webdokter.hu>).

4.4. Myopathológiai vizsgálatok

Izomszöveti vizsgálat 352 esetben történt. A fénymikroszkópos vizsgálatok során az esetek kb. 30%-ában találtunk a metszetekben „ragged red / blue” rostokat, valamint COX negatív rostokat, illetve kóros mitochondriumokat elektronmikroszkóppal. A mitochondriális rendellenességek vizsgálatára a módosított Gömori trikróm festés (Gomori 1950) mellett, mely a „ragged red” (vörös) rostokat vizualizálja, a következő hisztokémiai festéseket alkalmaztuk: módosított szukcinát dehidrogenáz (SDH) festés (Lillie és Fulmer 1976) a „ragged blue” (kék) rostok azonosítására, a citokróm-oxidáz (COX) festést (Lillie és Fulmer 1976) a COX negatív rostok, valamint a COX aktivitás egyenetlenségek detektálására alkalmaztuk. Az ultrastrukturális vizsgálatokat JEOL JEM EXII típusú elektronmikroszkóppal végeztük, a felvételek 80 kV-nál készültek.

4.5. PCR-RFLP vizsgálat

Az mtDNS hot spot-jaiban lokalizálódó leggyakoribb patogén pontmutációkat (mt. 3243 A>G (MELAS); mt. 8344 A>G (MERRF); mt. 8993 T>C,G (NARP); mt. 3460 A>G; mt. 11778 A>G, mt.14484 C>T (LHON)) PCR-RFLP módszer segítségével vizsgáltuk. A PCR reakciót (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystem) 20 µl ösztérfogatban mértük össze: 20-20 pmol az egyes primerekből, 10 µl ImmoMix (2x PCR reaction mix, Bioline USA Inc, Taunton, MA), a reakcióelegyet 7 µl RNáz-mentes desztillált vízzel (RT-PCR grade water, AMBION) egészítettük ki. A reakciók során használt primerek adatait az 5. táblázat foglalja össze (5. táblázat). A PCR reakciók során 35 ciklussal dolgoztunk és a denaturáció, annealáció, szintézis szakaszokra különböző beállításokat használtunk (6. táblázat). Az emésztésig a PCR termékeket 4 °C-on tároltuk.

5. táblázat: Az mtDNS hot spot-jaiban lokalizálódó patogén mutációk vizsgálatára használt primerek és adataik

(rövidítések: Mt – mitochondriális; Fw – Forward; Rev – Reverse; bp – bázispár; Ta – Annelációs hőmérséklet)

Primer	Mt mutáció	Szekvencia	Régió (mt.)	Termék mérete	Ta (°C)
MELAS-Fw	m.33243	5'AGCGCCTTCCCCCGTAAATG3'	3160-3296	137 bp	55
MELAS-Rev	A>G	5'AGAGGAATTGAACCTCTGAC3'			
MERRF-Fw	m.8344	5'GGTATACTACGGTCAATGCTCT3'	8155-8367	213 bp	50
MERRF-Rev	A>G	5'TTTCACTGTAAAGAGGTGTGGG3'			
NARP-Fw	m.8993	5'CCAACACCTCTTTACAGTGA3'	8345-10011	1666 bp	50
NARP-Rev	T>C, G	5'ACTATTTATACTAAAAGAGT3'			
LHON1-Fw	m.3460	5'GCGCCTTCCCCCGTAAATGAT3'	3161-3600	380 bp	50
LHON1-Rev	G>A	5'GAGGTTGACCAGGGGGTTGGGTA3'			
LHON2-Fw	m.11778	5'GCCACATAGCCCTCGTAGTA3'	11634-11949	316 bp	50
LHON2-Rev	G>A	5'CCTGTAAGTAGGAGAGTGAT3'			
LHON3-Fw	m.14484	5'GCACCAATCCTACCTCCAT3'	14364-14686	323 bp	50

AZ RFLP során a PCR-termékeket 20 egységnyi, az adott mutációra specifikus restrikciós endonukleázokkal (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) emésztettük 3 órán keresztül 37°C-on (7. táblázat). Az így kapott hasított band-eket vizualizáltuk etídium–bromiddal, majd elektroforetizáltuk TAE pufferral hígított 3 illetve 4%-os agaróz gélen. A gélképen elkülönült band-ek nagyságát, Quantity One Software (Bio-Rad Corp. Hertfordshire, UK) segítségével határoztuk meg.

6. táblázat: A PCR beállítások összefoglalása a patogén mutációk keresésére

	Kezdeti hődenaturáció		Denaturáció		Anneláció		Szintézis		Végső szintézis	
	$T(^{\circ}\text{C})$	Idő	$T(^{\circ}\text{C})$	Idő	$T(^{\circ}\text{C})$	Idő	$T(^{\circ}\text{C})$	Idő	$T(^{\circ}\text{C})$	Idő
MELAS	94	5 min	94	1 min	55	40 sec	72	1 min 40 sec	72	4 min
MERRF	94	5 min	94	30 sec	50	30 sec	72	30 sec	72	7 min
NARP	94	5 min	94	30 sec	50	30 sec	72	1 min 15 sec	72	7 min
LHON	94	5 min	94	45 sec	50	45 sec	72	1 min 15 sec	72	7 min

7. táblázat: A vizsgálatok során használt restriktációs endonukleázok, valamint hasítási helyeik

Pontmutáció	Restriktációs enzim	Restriktációs hasítási helyek
m.3243 A>G	HaeIII	5'...GGCC...3' 3'...CCGG...5'
m.8344 A>G	BanII	5'...GRG [▼] CYC...3' 3'...CYCGRG...5'
m.8993 T>C	HpaII	5'...CCGG...3' 3'...GGC [▲] C...5'
m.8993 T>G	AvaI	5'...CYCGRG...3' 3'...GRG [▼] CYC...5'
m.3460 G>A	BsaHI	5'...GR [▼] CGYC...3' 3'...CYGC [▲] RG...5'
m.11778 G>A	SfaNI	5'...GCATC(N) ₅ ...3' 3'...CGTAG(N) ₉ ...5'
m.14484 T>C	BccI	5'...CCATC(N) ₄ ...3' 3'...GGTAG(N) ₅ ...5'

8. táblázat: A teljes mtDNS szekvenálásához használt primerek fontosabb adatai
(a primerek által érintett mitochondriális szakaszok)

Primer	Írány	Szekvencia	Régió (mt.)	Részlegesen vagy teljesen lefedett mt gének
Mito-1	Fw	5'CCCACACGTTCCCCTTAAAT3'	16536-566	HV2, HV3, CSB1, CSB2, CSB3, OH, TFX, TFY, mt4H, mt3H, PL
	Rev	5'GTCTTTGGGGTTTGGTTGGT3'		
Mito-2	Fw	5'TTATCTTTTGGCGGTATGCAC3'	399-987	mt4H, mt3H, PL, PH1, PH2, F, HV3, tRNS ^{Phe}
	Rev	5' TCAGGTGAGTTTTAGCTTTATTGG3'		
Mito-3	Fw	5' CACGGGAAACAGCAGTGATT3'	806-1404	12S rRNS
	Rev	5' TTTCATAAGGGCTATCGTAGTTTT3'		
Mito-4	Fw	5' ACCACCTCTTGCTCAGCCTA3'	1229-1832	12S rRNS, tRNS ^{Val} , 16S rRNS
	Rev	5' TCCTTGCTATATTATGCTTGGTT3'		
Mito-5	Fw	5' TGACCGCTCTGAGCTAAACC3'	1659-2255	tRNS ^{Val} , 16S rRNS
	Rev	5'GGAGTTCAGTTATATGTTTGGGATTT3'		
Mito-6	Fw	5' AGAACCTCTAAATCCCCTTG3'	2062-2660	tRNS ^{Val} , 16S rRNS
	Rev	5' AGAGACAGCTGAACCCTCGT3'		
Mito-7	Fw	5' GCCTGTTTACCAAAAACATCA3'	2492-3091	tRNS ^{Val} , 16S rRNS
	Rev	5' CCTGGATTACTCCGGTCTGA3'		
Mito-8	Fw	5' ACCAACGGAACAAGTTACCC3'	2910-3505	16S rRNS, tRNS ^{Leu1} , NC1, ND1
	Rev	5' TAGATGTGGCGGGTTTTAGG3'		
Mito-9	Fw	5'TCCTCATTGTACCCATTCTAATC 3'	3329-3928	ND1
	Rev	5'CTAGTTCGGACTCCCCTTCG 3'		
Mito-10	Fw	5' TGAAGTCACCCTAGCCATCA3'	3732-4379	tRNS ^{Ile}
	Rev	5' GCACGGAGAATTTTGGATT3'		
Mito-11	Fw	5' GATTCCGCTACGACCAACT3'	4142-4798	tRNS ^{Gln} , NC2, tRNS ^{Met}
	Rev	5' GGGGCTATTCCAGTTTTATTGC3'		
Mito-12	Fw	5' GCTTTTATTCCAGTTCTAACCAAAA3'	4584-5218	ND2
	Rev	5' GAGAGGAGGTGGATGGAAT3'		
Mito-13	Fw	5' GCATACTCCTCAATTACCCACA3'	5007-5606	tRNS ^{Trp} , NC3
	Rev	5' GTGGGGTTTTGCAGTCCTTA3'		
Mito-14	Fw	5' CATTCTCCCCACTCATC3'	5440-6025	tRNS ^{Ala} , NC4, tRNS ^{Asn} , OL, tRNS ^{Cys} , tRNS ^{Tyr} , NC5
	Rev	5' AGCTCGGCTCGAATAAGGAG3'		
Mito-15	Fw	5' TTTACAGTCCAATGCTTCACTCA3'	5852-6455	COI
	Rev	5' GAAGAGGGGCGTTTGGTATT3'		
Mito-16	Fw	5' TGAACAGTCTACCCTCCCTTAG3'	6289-6878	COI
	Rev	5' GCGAGTCAGCTAAATACTTTGA3'		
Mito-17	Fw	5'CCATATTGTAACCTACTACTCCGGAAA3'	6668-7295	COI
	Rev	5' TGCTGTTAGAGAAATGAATGAGC3'		
Mito-18	Fw	5' AGACCAAACCTACGCCAAA3'	7118-7709	COI, tRNS ^{Ser1} , NC6, tRNS ^{Asp}
	Rev	5' GGCATACAGGACTAGGAAGC3'		

Mito-19	Fw	5' GAAAAACCATTTTCATAACTTTGTCA3'	7527-8121	COII
	Rev	5' GTTTAGACGTCCGGAATTG3'		
Mito-20	Fw	5' CCCCATTATTCCTAGAACCA3'	7955-8548	NC7, tRNS ^{Lys} , NC8, ATPáz8
	Rev	5' AAGCGAACAGATTTTCGTTCA3'		
Mito-21	Fw	5' TACTACCGTATGGCCACCA3'	8380-8977	ATPáz8
	Rev	5' TGAGTAGGCTGATGGTTTCG3'		
Mito-22	Fw	5' CATTACACCAACCACCCAAC3'	8798-9382	ATPáz8, COIII
	Rev	5' CGCCATCATTGGTATATGGTT3'		
Mito-23	Fw	5' CCTCTACCTGCACGACAACA3'	9183-9797	COIII, tRNS ^{Gly}
	Rev	5' GGAAGCCTGTGGCTACAAAA3'		
Mito-24	Fw	5' TCAATCACCTGAGCTCACCA3'	9633-10231	COIII, tRNS ^{Gly}
	Rev	5' ACTAAGAAGAATTTTATGGAGAAAGG3'		
Mito-25	Fw	5' AAAAAAGAGTAATAAACTTCGCCTTAAT3'	10049-10648	ND3
	Rev	5' GGCACAATATTGGCTAAGAGG3'		
Mito-26	Fw	5' TTTACCAAATGCCCTCATT3'	10462-11096	tRNS ^{Arg} , ND4L
	Rev	5' TGGCTGTGAATGTTATAATTAAGGA3'		
Mito-27	Fw	5' CCAAATCAACAACAACCTATTTAGC3'	10888-11484	ND4
	Rev	5' CCATAGCCGCCTAGTTTTAAG3'		
Mito-28	Fw	5' TCAAACCTCCTGAGCCAACAA3'	11318-11902	ND4
	Rev	5' CACAGAGAGTTCTCCCAGTAGG3'		
Mito-29	Fw	5' TTCTGCCTAGCAAACCTCAAAC3'	11738-12334	ND4
	Rev	5' CTTTTATTTGGAGTTGCACCA3'		
Mito-30	Fw	5' CCGGGTTTTCTCTTGTAAC3'	12123-12770	tRNS ^{His}
	Rev	5' TCTCAGCCGATGAACAGTTG3'		
Mito-31	Fw	5' AACCCAAACAACCCAGCTCT3'	12546-13189	tRNS ^{Ser2} , tRNS ^{Leu2}
	Rev	5' TGGTGATAGCGCCTAAGCAT3'		
Mito-32	Fw	5' CAGGCAAATCAGCCCAATTA3'	13017-13590	ND5
	Rev	5' CAGGGAGGTAGCGATGAGAG3'		
Mito-33	Fw	5' GGAGGACTACTCAAACCATACC3'	13436-14004	ND5
	Rev	5' GGTTAGGTCTAGGAGGAGTAGGG3'		
Mito-34	Fw	5' CCCTCGCTGTCACCTTCCTA3'	13805-14447	ND6
	Rev	5' AGGAGTATCCTGAGGCATGG3'		
Mito-35	Fw	5' CCAATAGGATCCTCCCGAAT3'	14252-14840	tRNS ^{Glu} , NC9
	Rev	5' TTCATCATGCGGAGATGTTG3'		
Mito-36	Fw	5' TCTCGCACGGACTACAACC3'	14695-15275	Cytb
	Rev	5' GTGTGAGGGTGGGACTGTCT3'		
Mito-37	Fw	5' CGGCATTATCCTCCTGCTT3'	15109-15690	Cytb, tRNS ^{Thr}
	Rev	5' TGCTTTGTTGTTGGATATATGG3'		
Mito-38	Fw	5' CCCTAGCCAACCCCTTAAAC3'	15516-16113	tRNS ^{Thr} , ATT
	Rev	5' TGGCTGGCAGTAATGTACGA3'		
Mito-39	Fw	5' CCTTTTTCCAAGGACAAATCA3'	15958-16522	NC10, tRNS ^{Pro} , CR, HV1, 7S DNS, TAS, mt5, mt3L
	Rev	5' TGACCCTGAAGTAGGAACCAG3'		
Mito-40	Fw	5' CTCACCCACTAGGATACCAA3'	16261-152	mt3L, HV2
	Rev	5' AGGATGAGGCAGGAATCAA3'		

4.6. Az mtDNS deléciók vizsgálata

Az mtDNS egyes és multiplex deléciók meghatározására long PCR metodikát alkalmaztunk. A PCR reakció összemérésénél 20 µl végtérfogattal dolgoztunk: 20-20 pmol az egyes primerekből, 0.2 µl Phusion DNA Polymerase (Finnzymes, Vantaa, Finland), 4 µl Phusion GC Reaction Buffer (Finnzymes, Vantaa, Finland), 0.4 µl dNTP, valamint a reakcióelegyet 12.4 µl RNáz-mentes desztillált vízzel (RT-PCR grade water, AMBION) egészítettük ki. A long PCR-nél használt primerek: Del_Long Fw 5' TAAAAATCTTTGAAATAGGGC 3', Del_Long Rev 5' CGGATACAGTTCACTTTAGCT 3'. A long PCR-ek során két különböző programot használtunk, mindkettőnél 30 ciklussal dolgoztunk: a kezdeti hődenaturáció: 98 °C 30 másodperc, denaturáció: 98 °C 10 másodperc, anelláció: 63 °C, 10 másodperc, szintézis: 72 °C 3 illetve 8 perc, a végső szintézis 72 °C-on történt 7 percig. Az így kapott amplifikátumokat TAE pufferrel hígított 2%-os agaróz gélen futtattuk meg. A kapott terméket etídium-bromiddal vizualizáltuk és az így kapott band-ek nagyságát, valamint a heteroplazmia arányt Quantity One Software (Bio-Rad Corp. Hertfordshire, UK) segítségével határoztuk meg. Az alkalmazott metodikánál a 8 perces amplifikáció a nagyobb, míg a 3 perces amplifikáció a kisebb mtDNS deléciók kimutatására szolgál.

4.7. Az mtDNS bidirekcionális szekvenálása

A teljes mtDNS vizsgálatát, illetve a microarray által felmerült mutációk validálását bidirekcionális szekvenálással végeztük. A PCR során alkalmazott primerek (8. táblázat) az mtDNS-t teljes egészében lefedik. A PCR reakció után a termék ellenőrzését követően megmaradt 15-17 µl PCR termékből a felesleges DNS-t és a primer dimereket SureClean PCR tisztító kittel (BIOLINE, Taunton, MA, USA) távolítottuk el a gyártó általi útmutatás szerint. A procedúra végén 70%-os alkohollal kicsapatott DNS-hez kiszárítás után 10-15 µl steril desztillált vizet adtunk, majd ezt a további felhasználásig 4°C-on tároltuk. A megtisztított termékhez 1 egység 3.1. Big Dye Terminator enzimet adtunk (Big Dye Terminator v 3.1 cycle sequencing RR-24, Thermo Fisher Scientific), valamint ugyanennyi térfogatú Big Dye puffert, amely tartalmazza a fluoreszcensen jelölt dideoxinukleotidokat. A szekvenálendő szakaszra specifikus Forward és Reverse primereket használtunk. A szekvenáló PCR során 25 ciklussal dolgoztunk a következő beállításokkal: kezdeti hődenaturáció: 95 °C 2 perc, denaturáció: 95 °C, anelláció: 51°C 15 másodperc, szintézis: 60 °C 4 perc, a kész

termékeket további felhasználásig 4°C-on tároltuk. A szekvenáló reakció 20 µl végtérfogatban zajlik: 1 µl BigDye terminátor 3.1 enzim, 2 µl szekvenáló puffer, 1 µl oligo (10 pmol/µl koncentrációban), 2 µl tisztított PCR termék és 4 µl RNáz-mentes desztillált víz. A szekvenáló PCR során feleslegesen maradt BigDye enzimet BigDye XTerminator® Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével távolítottuk el. A kérdéses mtDNS szakaszok szekvenálását ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer szekvenátorral (Applied Biosystem) végeztük. A szekvenálás során kapott szekvenciákat a cambridge-i humán mitochondriális referencia genom bázissorrendjéhez illesztettük (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi; NC_012920.1).

4.8. A teljes mtDNS reszekvenálása (MitoChip v2.0)

Az mtDNS vizsgálatához az GeneChip® Human Mitochondrial Resequencing Array v2.0 (MitoChip v2.0) egycsatornás microarray-t (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) használtuk. Az egycsatornás microarray-ek zárt rendszerek, a hibridizációs és a mosási körülmények állandóak. A rendszer alapja 4x4x25mer-es szekvencia beépülése a chip-re reverz-forward irányban (32 pozíció), így határozva meg 4 bázisból álló szekvenciát. A teljes mtDNS-t MitoChip-re való felvitel előtt három részletben (4116 bp-os, 5614 bp-os és 8200 bp-os mtDNS szakaszokat) long PCR segítségével amplifikáltuk. Az amplifikátumokat enzimatikusan fragmentáltuk, a fragmentumokat jelöltük, így egy hibridizációs mixet készítettünk, amit a chipre feltöltöttünk (egy chip/ egy minta) és ezután következett a hibridizáció: 45 °C-on 16 órán keresztül inkubáltuk a feltöltött chip-eket Affymetrix GeneChip® Hybridization Oven 640 készülékben. A hibridizált chip-eket mosásnak és fluoreszcens festésnek (streptavidin-phycoerythrin, SAPE) vetettük alá Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450 készülék segítségével. Végül a chip-ek szkennelése következett Affymetrix GeneChip Scanner 3000-el. A szkennelés során kapott adatokat az Affymetrix honlapjáról (<http://www.affymetrix.com>) letölthető szoftver segítségével elemeztük: Sequence Analysis Software 4.1 (GSEQ 4.1), mely az adatokat bázissorrendre, valamint szekvenogramokra fordította, amelyeket a humán mitochondriális referencia genomhoz illesztettünk (www.mitomap.org). Mivel a MitoChip v2.0 a HVSI és a HVSII régió variánsait is tartalmazta, ezért haplotipizálásra is használható.

4.9. Haplotipizálás az mtDNS segítségével

A mitochondriális haplotípusok haplocsoportba történő sorolása a HVSI (401 bázispárból álló hipervariábilis szegment 1) haplocsoport specifikus szekvencia polimorfizmusai alapján történik a phylotree.org honlap segítségével. Nem minden esetben elegendő a haplocsoport megállapításánál a HVSI polimorfizmus-mintázata, ilyenkor a HVSII (315 bázispárból álló hipervariábilis szegment 2) és a kódoló régiók polimorfizmus vizsgálata is szükséges. A haplotipizálásban az MTA Régészeti Intézet - Archeogenetikai Laboratóriumában Mende Balázs Gusztáv munkacsoportjától és a Szegedi Tudományegyetemen Raskó István munkacsoportjától kaptunk segítséget.

4.10. Statisztika

Az mtDNS leggyakoribb mutációinak előfordulási gyakoriságának (frekvencia) értékeléséhez a patogén mutációt hordozó betegek (beleértve az index betegeket és a mutációt hordozó családtagokat is) számát elosztottuk a teljes vizsgált betegek számával. A 95%-os konfidencia intervallumot (95% CI) a standard módszer szerint számítottuk ki (6. ábra).

$$SE(\hat{p}) = \sqrt{\frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{n}} \quad 95\% \text{ CI} = p \pm SE$$

6. ábra: A 95 %-os konfidencia intervallum kiszámításánál használt képletek.
(Jelölések: SE – a standard hiba, p – a mutáció frekvencia értéke, n – elem szám)

5. Eredmények

5.1. Epidemiológiai vizsgálatok

5.1.1. Az m.3243 A>G pontmutáció

A leggyakrabban vizsgált m.3243 A>G szubsztitúciót a tRNS^{Leu (UR)} génben 16 index betegben (12 nő és 4 ffi) és további 13 családtagban találtuk meg heteroplazmikus formában, az 1082 vizsgált betegből (Gál és mtsai 2008, Komlósi és mtsai 2005, Komlósi és mtsai 2004, Inczédy-Farkas és mtsai 2011). A heteroplazmia aránya 22% és 80% között volt. Az mtDNS-t 25 esetben vérből és 4 esetben izomszövetből izoláltuk. Két betegnél a mutációt csak izomból tudtuk kimutatni, míg vérből nem. A mutációt hordozó betegeknek, valamint családtagjaiknak is egyaránt voltak klinikai tüneteik, melyek közül kiemelendő a szenzorineurális halláscsökkenés (SNHL) és a DM. A stroke, mint ezen mutációval asszociált tünet mindössze 5 esetben, míg pszichiátriai tünet 6 esetben szerepelt a betegek klinikai tüneteinek között. Az m.3243 A>G patogén mutáció frekvenciája az általunk vizsgált kohortban 2.68%. A 95%-os konfidencia intervallum (95% CI): 0.0219 – 0.0317.

5.1.2. Az m.8344 A>G pontmutáció

Az mtDNS tRNS^{Lys} génjében lokalizált m.8344 A>G pontmutáció heteroplazmikus formában 8 index betegnél (2 nő és 6 ffi) és 5 családtagnál volt jelen az 1082 betegből álló szubkohort vizsgálatánál (Molnár és mtsai 2009, Vastagh és mtsai 2011). A heteroplazmia aránya 25% és 82% között változott. A mutációt 8 esetben mutattuk ki vérből, 5 esetben pedig izomszövetből. Két esetben a mutációt csak izomszövetből tudtuk detektálni. A mutációt hordozó betegek klinikai fenotípusa is igen változatos, viszont a klasszikus myoclonusos epilepszia tünete a legtöbbször nem szerepel az anamnézisben. Az m.8344 A>G pontmutáció előfordulási gyakorisága a vizsgált 1082 beteg esetében: 1.20% volt, a 95 % CI: 0.0087 – 0.0153.

5.1.3. Az m.8993 T>C és G pontmutációk

Az mtDNS proteint kódoló génei közül az ATP szintáz 6-os alegységét kódoló génben (MTATP6) lokalizált 8993-as pozíció két patogén eltérését vizsgáltuk. Az m.8993 T>C-t 3 férfi index betegnél és egy női családtagnál detektáltuk, míg az m.8993 C>G

mutációt egy nőbetegnél találtuk meg. Minden érintettnél heteroplazmikus formában volt jelen a mutáció. A két mutációt 3 esetben vérből, 2 esetben izomszövetből mutattunk ki, egy beteg estében mind vérből, mind izomszövetből magas heteroplazmia aránnyal detektáltuk a T>C cserét. A HP arányok vérből: 58% és 95%, míg izomszövetből 85% és 99% között változtak. A vezető tünet a mutációval rendelkező betegnél a cerebelláris ataxia volt. A mutációt hordozó női családtagnak a magas heteroplazmia arány ellenére (80%) egyértelműen az mtDNS mutációval magyarázható klinikai tünetei nincsenek. A két mutáció együttes előfordulási gyakorisága a vizsgált 1082 betegnél 0.46% volt (m.8993 T>C frekvenciája: 0.37%; m.8993 T>G frekvenciája: 0.09%). A 95% CI (mindkét mutációra): 0.0025 – 0.0067 (m.8993 T>C CI: 0.0019 – 0.0055; m.8993 T>G CI: 0.0000 -0.0018).

5.1.4. A három primer LHON mutáció: m.3460 A>G, m.11778 A>G, m.14484 T>C

Az mtDNS NADH dehidrogenáz (ND) alegységeit kódoló génekben található 3 elsődleges LHON mutációt: m.3460G>A (ND1), m.11778G>A (ND4) és m.14484T>C (ND6) összesen 486 betegnél vizsgáltuk. A betegek klinikai tünete a gyors progressziójú maternálisan öröklődő fiatalkori látásvesztés nagyon homogén szubkohortjának összeállítását tette lehetővé. A szubkohorton belül összesen 81 esetben (39 nő és 42 ffi) találtuk meg a 3 mutációt homoplazmikus formában vérből izolált mtDNS vizsgálatával.

Az m.3460 A>G mutációt 9 betegnél (3 nő és 6 ffi) detektáltuk, az m.11778 A>G-t találtuk meg a legtöbb 67 esetben (32 nő és 35 ffi), míg az m.14484 T>C alterációt a legkevesebb 5 betegnél (3 nő és 2 ffi) azonosítottuk.

Az együttes előfordulási gyakoriságuk a 486 beteg estében: 16.68%, a 95% CI: 0.1501 – 0.1839. Az m.3460 A>G frekvenciája: 1.85%, 95% CI: 0.0124 – 0.0246; az m.11778 A>G frekvenciája: 13.8%, 95% CI: 0.1223 – 0.1535; az m.14484 T>C frekvenciája: 1.03%, 95% CI: 0.0058 – 0.0148.

5.1.5. Az mtDNS átrendeződései (egyes és többes deléciók)

Az mtDNS-ben előforduló egyes és többes (multiplex) deléciók aránya viszonylag magas. Az 1082 beteg vizsgálata során 185 esetben detektáltunk egyes deléciókat, a frekvenciája 17%, 95% CI: 0.1588 – 0.1814. A 185 mtDNS delécióval rendelkező beteg

40%-ában azonosítottuk az ún. „common” delécióit, mely egy 4977 bp-os szakasz kiesését jelenti. A 185 pozitív esetben az mtDNS 103 esetben származott izomszövetből, míg 82 esetben vérből.

Az mtDNS multiplex delécióját 65 betegnél azonosítottuk, 34 esetben izomszövetből, 31 esetben vérszövetből. A többes deléciók frekvenciája: 6%, 95% CI: 0.0528 – 0.0672. Az esetek többségénél családi halmozódás figyelhető meg (63.1%, 41/65). Az 1082 beteg közül 68 esetben rendelkezünk vér- és izomszövettel is. Ezen 68 esetből 6 betegnél vérben és izomszövetben is azonosítottuk az egyes mtDNS delécióit, míg 31 esetben a vérből izolált mtDNS analízise negatív lett, viszont izomszövetben ott volt a deléció (16 esetben „common” deléció; 15 esetben multiplex deléció). Az egyes és a multiplex mtDNS deléciók együttes előfordulási gyakorisága 23%, 95% CI: 0.2172 – 0.2428.

5.1.6. A leggyakoribb mtDNS rendellenességek vizsgálatának összefoglalása

Az mtDNS leggyakoribb patogén pontmutációinak, valamint egyes és többes delécióinak vizsgálata során 377 esetben (24.04%) találtunk eltérést az 1568 beteg mtDNS-ének elemzése során (9. táblázat).

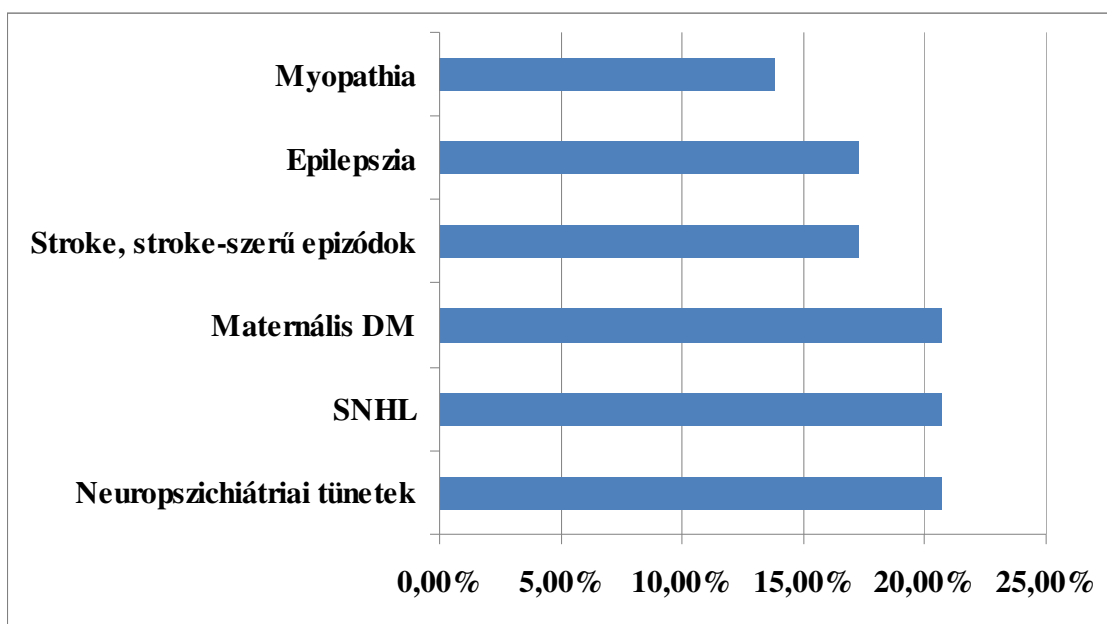
9. táblázat: A leggyakoribb mtDNS alterációk vizsgálatának összegzése

MtDNS alterációk	Vizsgált betegek száma	Pozitív esetek	Frekvencia (%)	Betegség kezdete (átlag év)	Legfőbb klinikai tünetek
m.3243 A>G	1082	29	2.68	17.06±12.87	SNHL, PEO, DM, epilepszia
m.8344 A>G	1082	13	1.20	31.18±10.23	Myopathia, ataxia
m.8993 T>C,G	1082	5	0.46	31.32±21.39	Ataxia, neuropathia
m.3460 G>A, m.11778 G>A, m.14484 T>C	486	81	16.7	42.15±9.85	Nervus opticus érintettség
mtDNS egyes és multiplex deléciók	1082	250	23.0	34.25±11.47	Myopathia, PEO

5.2. Fenotípus-genotípus korrelációk az mtDNS betegekben

5.2.1. Az m.3243 A>G patogén mutációt hordozó betegek klinikai variabilitása

A legfrekvenciáltabb mtDNS mutációhoz az m.3243 A>G-hez eseteinkben számos klinikai tünet asszociált, mint neuropszichiátriai tünetek (depresszió, mentális hanyatlás) (6/29 esetben), idegi jellegű halláscsökkenés (6/29 esetben), fiatalkori stroke és stroke-szerű epizódok (5/29 esetben), DM (6/29 esetben), az epilepszia (5/29 esetben), valamint myopathia (4/29 esetben) (10. táblázat, 7. ábra). Ezen eredményekből is látszik, hogy a mutáció milyen variábilis tünetek, tünetegyüttesek háttérében állhat, valamint az, hogy a mutációval elsőként asszociált stroke szindróma a betegeink nagy részében nem jelentkezett.



7. ábra: A leggyakoribb tünetek százalékos megoszlása az m.3243 A>G pontmutációt hordozó betegeknél

A mutációt hordozó betegek közül csak két esetben állt rendelkezésünkre mind vér, mind pedig izomszövet. A heteroplazmia arányokból látszik, hogy ezen eseteknél izomszövetben magasabb az arány, ami alátámasztja a poszmitotikus szövet jelentőségét. Megjegyzendő, hogy két esetben csak izomszövetben lehetett kimutatni a mutációt.

10. táblázat: Az m.3243 A>G mutációt hordozó betegek klinikai tünetei

(rövidítések: HP – heteroplazmia, cst – családtagok, nv – nincs vizsgálva, nvj – nem volt jelen, PEO – progresszív optalmoplegia externa, DM - diabetes mellitus, SNHL – szenzorineurális hallásvesztés)

Beteg	Nem	Betegség kezdete (év)	HP arány vérből (%)	HP arány izomból (%)	Klinikai tünetek	Hordozó cst-ok / tünettel rendelkező cst-ok
1	nő	17	35	45	DM, PEO, hypacusis, myopathia, myalgia	1/3
2	nő	35	35	nv	Stroke, depresszió, pszichózis	nv
3	ffi	13	40	nv	SNHL, myalgia	2/2
4	nő	2	70	nv	Stroke, laktát acidózis, progresszív mentális hanyatlás	2/1
5	nő	3	nvj	22	DM, hypogonadizmus, ataxia, mentális retardáció	0/0
6	nő	30	30	nv	SNHL, migrén	nv
7	nő	3	35	nv	Epilepszia, myalgia, dysarthria, stroke, anémia	2/2
8	nő	6	35	55	Stroke-szerű epizódok, mentális retardáció, hányás	2/2
9	nő	10	60	nv	Terhelési intolerancia, fáradékonyság, SNHL, epilepszia	1/0
10	ffi	4	48	nv	Stroke-szerű epizódok, mentális retardáció, DM, epilepszia	0/0
11	nő	25	42	nv	Memóriazavarok, depresszió	2/2
12	ffi	20	nv	55	SNHL	nv
13	nő	35	nvj	15	DM, ptosis, fáradékonyság	nv
14	nő	34	nv	30	Stroke-szerű epizódok, SNHL	nv
15	nő	31	38	nv	Diplópia, dysphagia terhelési intolerancia	nv
16	ffi	5	50	nv	SNHL	1/0

5.2.2. Az m.8344 A>G patogén mutációt hordozó betegek klinikai variabilitása

Az m.8344 A>G mutáció által determinált MERRF legjellegzetesebb tünete a myoclonus epilepszia egy családnál volt jelen. Az általunk vizsgált esetekben az ataxia és a myopathia volt a mutációt hordozók szubkohortjában a leggyakoribb tünet. Emellett terhelési intolerancia és két betegnél tranzienis ischaemiás attack is előfordult, melyet az irodalom sokkal inkább az m.3243 A>G mutációval hoz kapcsolatba. (11. táblázat).

5.2.3. Az m.8993 T>C és m.8993 T>G patogén mutációkat hordozó betegek klinikai variabilitása

A két mutáció két szindróma hátterében áll, az m.8993 T>C-t leggyakrabban a NARP-pal asszociál, függően a heteroplazmia aránytól, a betegség klasszikus tünete a nevéből adódó retinitis pigmentosa, az ataxia, valamint a szenzomotoros neuropathia. Az m.8993 T>G-t a maternálisan öröklődő Leigh Szindrómával (MILS) hozzák összefüggésbe, melyre jellemző szimptómák többek között az ataxia, nystagmus, dystonia, pszichomotoros regresszió, retinitis pigmentosa.

A legmagasabb heteroplazmia aránnyal detektált T>C cserét hordozó férfi beteg mutatja a klasszikus tüneteket, míg az édesanyja 80%-os heteroplazmia aránnyal (vérből) aszimptómás. A másik két férfi beteg kissé alacsonyabb HP aránnyal hordozza a mutációt, tüneteik nem jellegzetesek, hiszen laktát acidózisuk mellé pszichiátriai tünetek (hallucinációk) társultak, myoclonus epilepszia a családban nem fordult elő. Az m.8993 T>G mutációt hordozó nő betegnél viszonylag későn kezdődtek a tünetek, a cerebelláris ataxia, dysphagia, hyperthyreosis, nem követve a MILS klasszikus tüneteit (12. táblázat).

11. táblázat: Az m.8344 A>G mutációt hordozó betegek klinikai tünetei
 (rövidítések: HP – heteroplazmia, cst – családtagok, nv – nincs vizsgálva, na – nincs adat, TIA - tranziens ischaemic attack (átmeneti ischaemiás roham), CPEO – krónikus progresszív ophthalmoplegia externa)

Család	Nem	Betegség kezdete (év)	HP arány vérből (%)	HP arány izomból (%)	Klinikai tünetek	Családi anamnézis	Hordozó cst-ok/tünettel rendelkező cst-ok
1	Ffi	35	58	79	Myopathia, cardiomyopathia, ataxia, depresszió, szorongás, kognitív hanyatlás	Mater: hypacusis, súlyos depresszió, myopathia, ataxia Ikertestvére: depresszió, anxietas, fóbia	3/3
1	Ffi	35	44	63	Súlyos depresszió, anxietas, fóbia	Mater: hypacusis, súlyos depresszió, myopathia, ataxia; Ikertestvér: Myopathia, cardiomyopathia, ataxia, depresszió, szorongás, kognitív hanyatlás	
1	Nő	48	46	82	Súlyos hypoacusis, depresszió, myopathia, s ataxia	Ikerfiai: Myopathia, cardiomyopathia, ataxia, kognitív hanyatlás, depresszió, szorongás	
2	Ffi	28	40	45	Myoclonus epilepszia, fejtremor, dysarthria, ataxia, kognitív hanyatlás, depresszió, thrombocytopenia	Ikertestvére: myoclonusos epilepszia, ataxia, depresszió, thrombocytopenia	3/2
2	Ffi	25	40	nv	Myoclonus epilepszia, ataxia, depresszió, thrombocytopenia	Myoclonus epilepszia, fejtremor, dysarthria, ataxia, kognitív hanyatlás, depresszió, thrombocytopenia	
2	Nő	-	30	nv	Tünetmentes	Ikerfiai: Myoclonus epilepszia, fejtremor, dysarthria, ataxia, kognitív hanyatlás, depresszió, thrombocytopenia epilepszia	2/2
3	Nő	48	30	nv	TIA	Maternális ágon: colon tumor, DM, csecsemőhalálozás, vesebetegség	na
4	Ffi	22	30	nv	Ischaemiás stroke	Maternális ágon unokatestvér: epilepszia	0
5	Ffi	35	40	nv	Ptosis, myopathia, CPEO,	Negatív	na

					hypothyreosis		
6	Ffi	41	35	nv	Myopathia, izomgörcsök	Negatív	na
7	Nő	16	45	55	Myalgia	Mater: mutációt hordozó, tünetmentes	2/1
7	Nő	-	32	nv	Tünetmentes	Lánya: myalgia	
8	Ffi	30	38	nv	Migrén, depresszió, polyneuropathia, beszűkült vesefunkció	Anyai ágon halmozódó depresszió, migrén	na

12. táblázat: Az m.8993 T>C vagy G mutációt hordozó betegek klinikai tünetei
(rövidítések: HP – heteroplazmia, cst – családtagok, nv – nincs vizsgálva, DM - diabetes mellitus)

Beteg	Nem	Betegség kezdete (év)	HP arány vérből (%)	HP arány izomból (%)	Klinikai tünetek	Családi anamnézis	Hordozó cst-ok / tünettel rendelkező cst-ok
1 T>C	ffi	17	95	99	Dysdiadochokinesis , ataxia, polyneuropathia, kognitív hanyatlás,	DM, mentális retardáció, cataracta, demencia	1/0
2 T>C	ffi	48	65	nv	Avt-i paresis, ataxia	nv	nv
3 T>C	ffi	36	nv	85	Pszichotikus állapot, dadogás, kyphoscoliosis	HypertensioD M, mellrák, szívbetegség schizofrénia	nv
4 T>G	nő	68	58	nv	Dysphagia, cerebelláris ataxia, hyperthyreosis	nv	nv

5.2.4. Az autoszómális domináns öröklődést mutató mtDNS egyes deléció de Toni-Debré-Fanconi szindrómában

Az egyes deléciók általában sporadikusak, csak nagyon ritkán számol be az irodalom familiáris formákról. A 9 éves fiú beteg ovulatio indukciós kezelést követően fogant, veszélyeztetett, toxaemiás terhességből, mely az 5. gestációs hónapig zavartalan volt. A 30. gestációs héttől az UH vizsgálat intrauterin dystrophiát észlelt. A 33. héten fenyegető magzati asphyxia miatt sürgős sectio caesareaval alacsony (1395 g) születési súllyal jött a csecsemő a világra. Az újszülöttkori hasi UH bal oldali pyelectasiát talált. Anaemiája miatt vaspótló kezelésben is részesült. Két hónapos korától két éves koráig összesen 12 alkalommal kapott vért súlyos aplasticus anaemiája miatt. Két éves korában csontvelő átültetést terveztek, de a kontroll vizsgálatok javuló eredményei miatt a

beavatkozás elmaradt, transzfúzióra nem szorult többet, csak thrombocytopeniája maradt fenn (60-100 G/l). Két éves korától észlelték növekedésben elmaradását, melynek háttérében a GH hiánya igazolódott. A csontkor 1-1.5 évvel elmaradott, viszont mozgás-, beszéd- és, szellemi fejlődése normális volt. 2009-ben, 4 éves korában a laborvizsgálataiban a K, P, Mg értékek alacsonyok voltak, a hasi UH mindkét oldali vese kéregállományának hyperreflektivitását mutatta. Ekkor merült fel a komplett tubulus-funkció zavarral járó vesebetegség gyanúja. Négy éves korában kezdődött jobb oldali túlsúllyal kétoldali ptosis. Édesanyja kényszeres cselekedetekről számolt be.

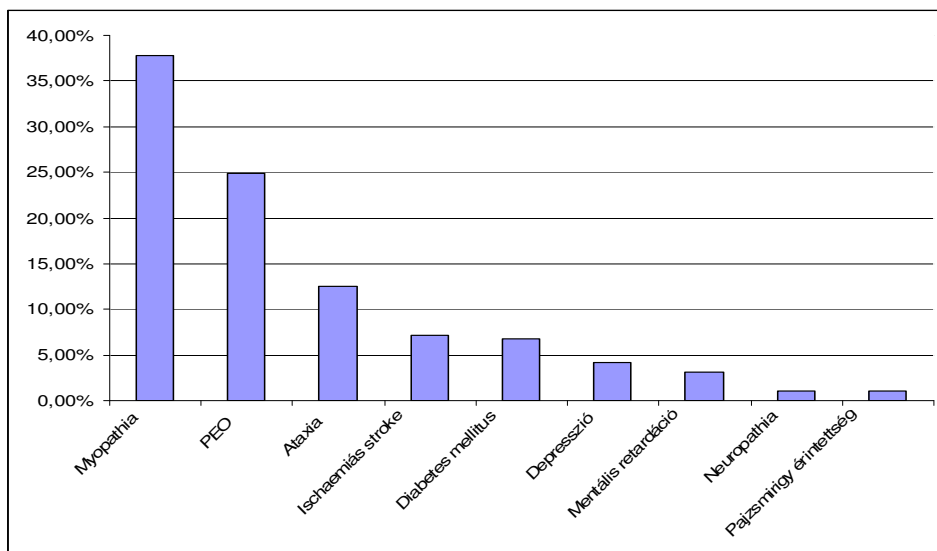
Az előzmények és a szemészeti eredmények alapján eleinte Pearson szindróma igazolódott, mely átment de Toni-Debré-Fanconi szindrómába. 2011-ben intenzív osztályra került akut anyagcsere felborulás miatt, ketogén diéta mellett állapota lassan javult.

Családi anamnézis: édesanyjának 20 éves kora óta migrénes fejfájásai vannak, koleszterinszintje szülése óta magas (5.6 mmol/l), évek óta gondolják szorongás miatt, neurológiai vizsgálata jelzett kétoldali ptosist talált. Fiútestvére egészséges. Anyai nagyanyjának hipertensioja, szívbetegsége és generalizált szorongása van. Mind az anyai, mind pedig az apai nagyapjának végbéldaganata volt. Anyai nagynénjének másfél éves korában bélelzáródása volt, azóta is folyamatosan vannak hasi panaszai. Őt pánik szindróma miatt pszichiátrián kezelik. A kisfiú genetikai vizsgálata során a vérben 35% HP aránnyal az mtDNS common delécióját detektáltuk. Édesanyjánál ez a rendellenesség 25% HP aránnyal, nagynénjének 20 % HP arányban, nagyanyjának 15 % HP arányban igazolódott.

5.2.5. Az mtDNS egyes és többes deléciójával együttesen előforduló mtDNS illetve nDNS eltérések

A mutációt hordozó betegek fenotípusa rendkívül variábilis, sok szervrendszert érintett. Ez a mitochondriális betegség egyik fontos jellemzője. Befolyásoló tényező lehet, hogy esetenként nem egy, hanem egyszerre több genetikai hibát (gén-gén interakció) is hordozhat a beteg, mely eltérések lehetnek az mtDNS-ben valamint az nDNS-ben is. Több esetet is bemutatunk a következőkben, melyeknél az mtDNS hiba egy másik mtDNS hibával, vagy egy nukleáris gén mutációval társul.

Az egyes mtDNS deléciókkal az irodalmi adatok szerint leggyakrabban szemészeti tünetek társulnak, mint a PEO, ptosis. Az általunk detektált egyes deléciót hordozó érintettek közül 46 betegnek (24.9%) PEO-ja, míg 70 betegnek (37.8%) myopathiája volt szemtünetek nélkül. Mindezek mellett az általunk vizsgált kohortban ischaemiás stroke, ataxia, DM, migrén, depresszió társult ehhez az mtDNS hibához (8. ábra). Betegeink 30 %-ában jelentkezett a betegség multiszisztémás tünetek formájában, a leggyakrabban a vázizomzat volt érintett.



8. ábra: A leggyakoribb tünetek százalékos megoszlása az egyes deléciót hordozó betegeknél

Az alábbiakban néhány érdekes esetet mutatunk be:

5.2.5.1. Egynél több patogén mtDNS mutáció együttes jelenléte

Három beteg esetét mutatjuk be, akiknél az mtDNS kettős hibát is hordoz (13. táblázat).

Az m.3243 A>G patogén mutációt hordozó betegek közül két esetben találtunk még a szubsztitúción kívül mtDNS-beli eltérést.

a) Egy 43 éves nőbetegnél izomszövetből 38%-os HP aránnyal detektáltuk az m.3243 A>G mutációt, valamint alacsony HP aránnyal multiplex mtDNS deléció is jelen volt az izomszövetben. Az anamnézisében a 30-as évei elején kezdődő diplópia szerepelt,

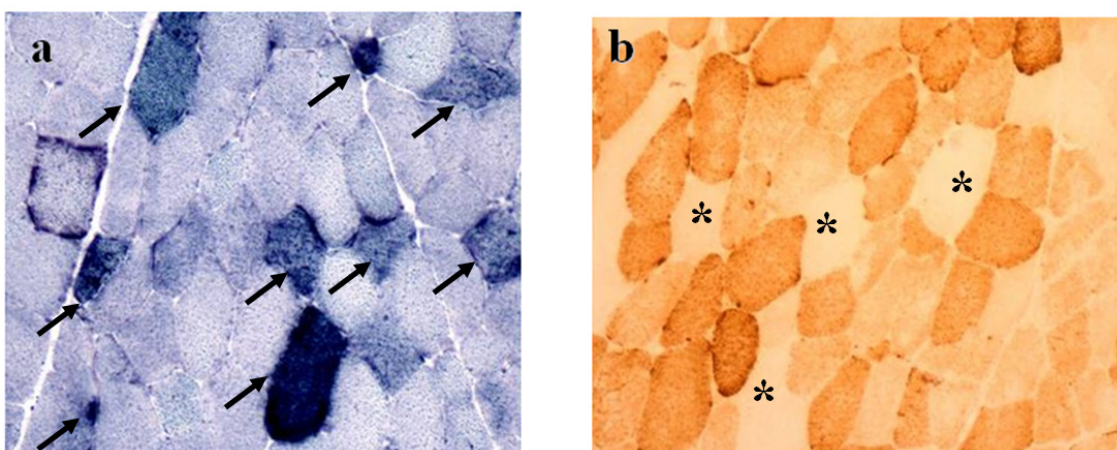
melyhez később terhelési intolerancia is társult. Az alsó végtagokban gyengeséget érzékelt, combizmai sorvadtak. Nyelési panaszai vannak, nyelve zsibbad, a beszéd is nehezebbre esik. A családi anamnézisében maternálisan öröklődő DM szerepel, valamint édesanyjának, anyai nagynénjének és mindkét nagyszülőjének struma nodosa-ja volt. Édesapjának szívritmuszavara van, míg anyai ágú unokatestvérénél sclerosis multiplexet gyanítottak. Két gyermeke van, akik egészségesek. A beteg izmának szövettani elemzésénél a módosított SDH készítményben subsarcolemmálisan enyhe enzimaktivitás fokozódást lehetett látni illetve egy-egy a többinél intenzívebben festődő „ragged blue”-ra emlékeztető rost is feltűnt a vizsgált mintában.

b) Egy 42 éves nő, akinél szintén detektáltuk az m.3243 A>G mutációt, alacsonyabb HP aránnyal (15%) és vérből, emellett egy egyes deléciót: 7,9 kbp-os kiesést találtunk viszonylag magas 40%-os HP aránnyal. A betegnek 39 évesen igazolódott a DM-a, egy-két éve romlik a hallása, mindkét oldali ptosisa van, fáradékonyságról panaszodik. Testvére és 10 éves kislánya egészséges.

c) Az mtDNS tRNS-einek vizsgálata során a tRNS Izoleucint kódoló génben (tRNS^{Ile}) m. 4298 G>A heteroplazmikus patogén mutációt detektáltunk, melyet 65%-os HP aránnyal találtunk meg az izomszövetben egy 54 éves afrikai férfi betegnél. Az ismert mutáció mellett kis HP aránnyal multiplex deléciót is azonosítottunk long PCR technikával. A talált multiplex deléció felvetette az intergenomiális kommunikáció zavarát ezért tovább vizsgáltuk a mintáját, de patogén eltérésre nem leltünk a *POLG1*, *C10orf2 / TWINKLE*, *RRM2B* és a *TK2* génekben.

A betegben talált m.4298 G>A szubsztitúciót korábban CPEO-val, sclerosis multiplexszel (Taylor és mtsai 1998), rhabdomyolissal myoglobinuriával, myalgiával összefüggésben írták le (Crimi és mtsai 2004). Betegünknek 47 évesen kezdődtek panaszai hyperCKaemiával, izomfájdalommal. Statin indukálta hiperCKaemia volt ekkor a diagnózisa, a statin elhagyása után a CK értéke csökkent, de nem normalizálódott teljesen. Izomfájdalmakra most is panaszodik, főleg a proximális izomcsoportokban. Hideg-meleg urticariája van. Családi anamnézise: édesanyjának egyik lábát amputálták, 4 testvére van (3 fiú és 1 lány), az egyik bátyja DM miatt exitált, míg egy másik bátyjának stroke-ja volt. Lánytestvére és annak gyermekei

egészségesek. Az izommintában a módosított Gömri trikróm festéssel „ragged red”, míg módosított SDH festéssel „ragged blue” rostokat azonosítottunk fénymikroszkóppal, valamint a COX készítményben ezek a rostok COX negatívak voltak. Az elektronmikroszkópos vizsgálattal látható volt, hogy subsarcolemmálisan a mitochondriumok száma felszaporodott, illetve degeneratív jelenségek is megfigyelhetők voltak. Intermyofibrillárisan enyhe mitochondrium-szaporulatot identifikáltunk, valamint a mitochondriumok mellett nagy lipid vakuólák ábrázolódtak. A szövettani kép mind fény-, mind elektronmikroszkóppal egyértelműen alátámasztotta a mitochondriális betegség gyanúját, így vizsgálva tovább a beteg mtDNS-ét (9. ábra).



9. ábra: Az mt 4298 A>G mutációt hordozó beteg mitochondriális betegség gyanúját igazoló szövettani képei

a: Ragged blue rostok (nyilak) módosított SDH festéssel (x 100); **b:** COX negatív rostok (csillag) COX festéssel (x 100)

13. táblázat: Az mtDNS tRNS patogén mutációt és mtDNS egyes vagy multiplex deléciókat hordozó betegek összesítése

Beteg	Nem	Betegség kezdete (év)	mtDNS tRNS mutáció	HP arány	mtDNS deléció	HP arány
1	Nő	31	m.3243 A>G tRNS ^{Leu(UUR)}	38% (izom)	Multiplex deléció	17% (izom)
2	Nő	39	m.3243 A>G tRNS ^{Leu(UUR)}	15% (vér)	7,9 kbp-os egyes deléció	40% (vér)
3	Ffi	47	m.4298 G>A tRNS ^{Ile}	65% (izom)	Multiplex deléció	19% (izom)

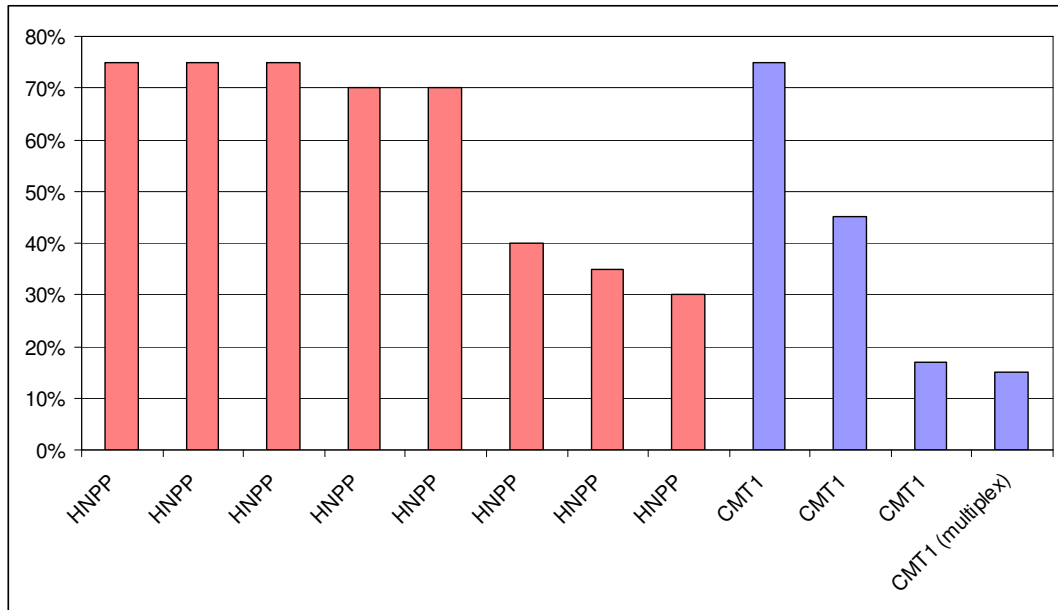
5.2.5.2. Az mtDNS deléció és más nukleáris gének mutációinak együttes előfordulása

5.2.5.2.1. Az mtDNS deléció és a PMP22 gén deléció/duplikáció együttes jelenléte

Az mtDNS árendeződések általában másodlagosan alakulnak ki. Legtöbb esetben a nukleáris és mitochondriális genom intergenomiális kommunikáció zavara eredményezi a mitochondriális DNS károsodását, de sérülhet az egyéb nagy mennyiségű szabadgyök felszabadulással járó folyamatokban is, mint pl.: autoimmun betegségek, UV sugárzás, degeneratív folyamatok (pl. inclusios testes myositis). A perifériás idegek egyik leggyakoribb genetikai eredetű betegségét okozó *PMP22* gén duplikációk/deléciók, megfigyeléseink szerint szintén együtt járnak más gének érintettségével, valamint autoimmun betegségekkel (Pál és mtsai 2009; Reményi és mtsai 2014). Célkitűzésünk az volt, hogy vizsgáljuk meg milyen gyakran társul az mtDNS deléció a *PMP22* gén deléciójával / duplikációjával. A *PMP22* deléciója a HNPP-t (Hereditær neuropathia pressure palsy), míg a duplikációja CMT1-et (Charcot-Marie-Tooth 1) eredményez.

Száz beteg (47 nő, 53 ffi) vérből izolált mtDNS-ében kerestük az mtDNS deléciókat long PCR metodikával. Az átlag életkor: 34.78 ± 12.17 év volt. A vizsgálatból kizártuk az 55 évnél idősebb *PMP22* delécióval vagy duplikációval rendelkező betegeket, mivel az mtDNS deléciók a kor előrehaladtával is kialakulhatnak. Így igyekeztünk elkerülni a szomatikus mutációkat.

Az elemzést 43 *PMP22* deléciót és 57 *PMP22* duplikációt hordozó beteg esetén végeztük el. Összesen 12 betegnél találtunk eltérést, 11 esetben egyes deléciót, egy esetben alacsony HP arányú multiplex deléciót detektáltunk. Mindegyik egyes deléciós pozitív esetben egy 7.8 kbp-os szakasz esett ki 17% - 75% közötti heteroplazmia aránnyal. Nyolc esetben (1 nő, 7 ffi) a betegek *PMP22* deléciót hordoztak, a HP arány 30% és 75% között volt. Az átlag életkor: 38.56 ± 9.11 év volt. A *PMP22* duplikációt hordozó betegek közül 3 férfinál találtuk még meg az egyes deléciót, mindannyian 40 év felettek (41 éves, 43 éves, 46 éves; az átlag életkoruk: 43.34 ± 2.52 év). A HP arányuk a 17% és 75% között volt. Egy esetben alacsony heteroplazmia aránnyal (15%) multiplex deléciót találtunk egy 49 éves férfi betegnél. Összegezve: a 100 fős *PMP22* duplikációval / delécióval rendelkező esetek 12%-ában találtunk mtDNS deléciót, változatos HP aránnyal (10. ábra) (95% CI: 0.0875-0.1525).



10. ábra: A HNPP-s és CMT1-es betegekben talált mtDNS deléciók heteroplazmia arányának (%) eloszlása

5.2.5.2.2. Az *mtDNS* deléció előfordulási gyakorisága neurodegeneratív betegségekben

A legtöbb neurodegeneratív betegségben a mitochondriumok szekunder módon károsodnak még abban az esetben is, ha a primer, a betegséget kiváltó ok nem a mitochondriális DNS-ben van (Johri és Flint 2012). Vizsgálataink során egy klasszikus monogénes neurodegeneratív betegségben voltunk kíváncsiak arra, hogy a neurodegenerációt indító primer mutáció következtében kialakuló biokémiai folyamatok milyen hatással vannak az *mtDNS*-re.

Az autoszómális dominánsan öröklődő monogénes Huntington-kór kialakulásához a *huntingtin* (*HTT*) gén 1. exonjában történő CAG repeat expanzió vezet. A megnövekedett CAG repeat szám poliglutamin szintet eredményez a huntingtin proteinben, ami a molekuláris és celluláris kaszkádok patomechanizmusát befolyásolja (Nithianantharajah és Hannan 2012). A normál CAG repeat szám 28-nál kevesebb, ha 29-35 közötti, akkor intermedier, átmeneti (nem érintett), ha 36 és 39 közötti a repeat szám, az a csökkent penetrancia tartományát jelenti, melynél már van esély a betegség kialakulására, és 40 CAG repeat szám felett alakul ki mindenképp a kórkép.

Pilot vizsgálatunkban száz Huntington-kóros beteg vérmintájából izolált DNS-ét analizáltuk mtDNS deléciókra. A vizsgált betegek (58 nő és 42 ffi) CAG repeat száma minden esetben 40 feletti volt (41 és 56 közötti). Az átlag életkor 52.35 ± 12.56 év volt (32 és 76 éves kor között). A vizsgálat során hét beteg (5 nő és 2 ffi) esetében detektáltunk egyes nagy deléciót, mely során egy 7.9 kbp-os szakasz esett ki, 13% és 75% között változó HP aránnyal, multiplex deléciót egy esetben sem találtunk. A vizsgált esetek 7%-ában találtunk mtDNS egyes deléciót (95% CI: 0.0445-0.0955).

5.3. Nukleáris gén által meghatározott új mitochondriális betegség fenotípus-genotípus korrelációja

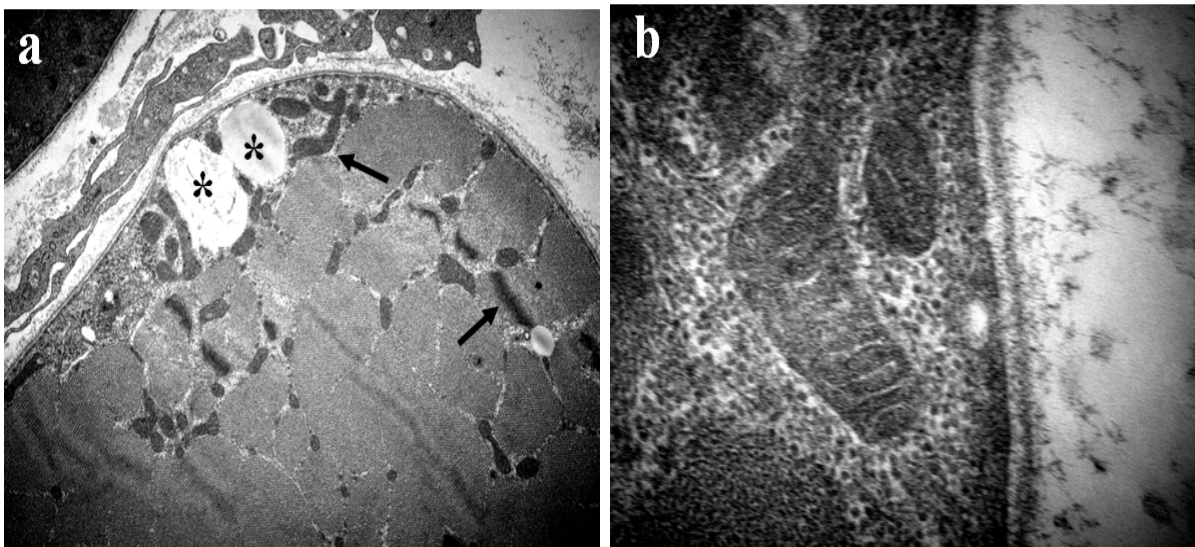
A technológia fejlődésének köszönhetően évente több százzal nő az új betegségek száma. Így van ez a mitochondriális betegségek területén is. Mindössze néhány éve ismerjük az agytörzsi és gerincvelői érintettséggel, emelkedett laktát szinttel járó leukoencephalopathiát az LBSL (Leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and lactate elevation) nevű betegséget, melyet kohortunkban is sikerült azonosítanunk.

Esetbemutató:

Huszonegy éves index férfi betegünk járása 15 éves korától kacsázó, vádlijában és bokájában fokozódó gyengeséget érez, lábujjhegyre és sarokra nem tud állni. Az alsó végtagi izmokban fasciculatio észlelhető. Distalis túlsúlyú közepesen súlyos spasztikus paraparesise volt vizsgálatkor piramis jelekkel. Ízületi helyzetérzése megtartott, de kiesett a vibráció, a graphaesthesiában pedig tévesztett. Kétoldali Friedreich lába volt.

Laboreredményei enyhén emelkedett CK értéket mutattak: 313 U/l (normál - tartomány: 24-195 U/l). Az EMG vizsgálata myogen károsodást talált, az ENG nem mutatott eltérést. SSEP vizsgálata mindkét oldali alsó végtagon súlyos fokú demyelinisations jellegű corticospinalis funkciózavart mutatott ki. A koponya MRI a periventricularis fehérállományban a capsula interna, a coronaria radiata és a centrum semiovale területén szimmetrikus kétoldali 3-15 mm nagyságú, helyenként konfluáló léziókat talált, melyek a pedunculus cerebelli superiorban is láthatóak voltak (12. ábra). A C és a Th gerinc MRI a craniospinalis átmenettől a conusig követhető hyperintenzitás írt le sáv szerűen. Neuropszichológiai vizsgálata szubklinikus depressziót valamint átlagos intelligenciát (IQ=101 VQ=108 PQ=92) állapított meg. Izomszövetében fénymikroszkóppal számos kisebb-nagyobb csoportos elrendeződésben anguláris

atrophiás rostok mellett, szintén csoportosan elhelyezkedő lekerekített atrophiás rostokat detektáltunk. A centrális magok száma a szokottnál nagyobb. A mintában COX negatív, ragged blue/red rostokat nem láttunk. Az elektronmikroszkópos vizsgálat során a szokottnál nagyobb mitochondriumok voltak láthatók, mellettük helyenként óriás vakuólák tűntek fel (11. ábra).



11. ábra: Az LBSL beteg izombiopsziájának elektronmikroszkópos képei
a: izomrost subsarcolemmalis szerkezete (x 15.000) óriás lipid vakuólák (csillag) és elongált mitochondriumok (nyilak); **b:** megnagyobbodott mitochondrium (x 60.000)

A beteg nővérének lábfejei kissé excaváltak, igen enyhe bal és distalis túlsúlyú alsó végtagi paresise volt, pyramis jelek nélkül. A nővér koponya MRI-je a corticospinalis pályák mentén, a paraventricularis fehérállományban mérsékelt (legkevésbé occipitalis) a pedunculus cerebellaris superiorokban és inferiorokban, valamint a nervus trigeminus agytörzsi lefutása mentén a T2 jellegű képeken kifejezetten fokozott jelintenzitású, csaknem szimmetrikus elváltozásokat talált. A vizsgálat a laktát egyértelmű jelenlétét mutatja egy paraventriculáris fehérállományi gócban. A gerincvelő felső szakaszán is a fehérállomány kiterjedten érintett. Az idősebb lánytestvér elektrofiziológiai vizsgálatának eredménye a testvérével azonos volt (12. ábra). Mindkét szülőnek készült koponya MRI vizsgálat, mely sem az édesanyjánál sem az édesapánál nem talált fehérállomány laesiot.

A koponya és gerinc MRI jellegzetes képe azonban felvetette az agytörzsi és gerincvelői érintettségel, emelkedett laktát szinttel járó leukoencephalopathiát (LBSL), mely háttérben korábban a nukleáris *DARS2* gén mutációt írták le (Scheper és mtsai 2007). A gén szekvenálása során egy splice site patogén mutáció igazolódott az Intron 5-6-ban: c. 492+2 T>C (rs142433332; IVS5+2 T>C) heterozigóta formában (Centogene, Rostock, Germany), melyet korábban patogénnek minősítettek. A másik allélon a patogén mutációt nem sikerült azonosítanunk a kódoló és az exon határon lévő introni szakaszok vizsgálatával. A családi szegregáció során ez a mutáció heterozigóta formában az édesanyjánál és a lánytestvérénél is igazolódott. Mivel csak a lánytestvér rendelkezik klinikai tünetekkel és fehérállomány laesióval, feltételezzük, hogy olyan autoszómális recesszív betegségről van szó, ahol compound heterozigóta mutáció eredményezi a klinikai képet, csak a másik allél mutációja olyan nem kódoló vagy szabályozó régióban helyezkedik el, amely nincs a rutin genetikai diagnosztika fókuszában.



12. ábra: Az LBSL férfi beteg (a, c) és lánytestvérének (b) koponya MRI felvételei
a és b: mindkét T2 jellegű (hyperintens szignál) felvételen: az agytörzsi coronaris szeleteken fehérállományi laesio a piramis pálya érintettségével; **c:** T2 jellegű (hyperintens szignál) felvétel: sagittalis metszet a fej-nyak régióról, a nyúltagy és a felső gerincvelőben piramispálya laesio

5.4. A mitochondrium és a farmakogenomika

A mitochondrium működését biztosító gének variációi nem csak különböző betegségeket eredményezhetnek, hanem több gyógyszer mellékhatásért is felelősek lehetnek. Ezek a gének lehetnek az mtDNS-ben és a nukleáris genomban is. Létezhetnek olyan genetikai variációk is, melyek azon túl, hogy bizonyos klinikai tünetekkel asszociálnak, még farmakogenomikai jelentőséggel is bírnak.

5.4.1. Az mtDNS homoplazmikus SNP-k farmakogenomikai szerepe

Az mtDNS patogén mutációi mellett a homoplazmikus polimorfizmusok is állhatnak különböző betegségek hátterében. Míg az mtDNS egy, legtöbb esetben heteroplazmikus patogén alterációja önmagában meghatároz egy kórképet, addig több homoplazmikus SNP együttes előfordulása hajlamosíthat bizonyos kórképek kialakulására.

A következő esetünkben egy olyan gyógyszer mellékhatásra szeretnénk felhívni a figyelmet, mely alapját véleményünk szerint a mitochondriális genom variációja képezi. Egy 58 éves férfi betegünknek a harmincas éveiben diagnosztizáltak 2-es típusú diabetes mellitust. Az anamnézisében szerepel magas vérnyomás, fiatalkori ischaemiás stroke (47 éves), 2 myokardiális infarktus, és stent beültetés a szívkoszorúerekbe. 2008 óta ismert struma nodosa-ja. Családi anamnézisében: édesanyjának magas vérnyomása, apjának DM-a, magas vérnyomása és szívbetegsége szerepel. Anyja testvérei egészségesek voltak. Lánytestvérenek zsibbad a karja, valamint két lánya egészséges.

A beteg intézetünket 2009-ben általános izomfájdalmak, feszülő bőr és izom panaszok miatt kereste fel. Már az enyhe fizikai aktivitás is súlyos izomfájdalmat provokált a végtagjaiban. 2010-ben a betegnek súlyos átmeneti bal oldali hypacusisa lett, mely vazoaktív infúziók hatására hallása javult. A beteg a panaszok kezdete előtt egy évvel, 2008-ban kezdett el metformint szedni. A metformin terápia kezdetét követően 2-3 hónappal 8-10 kg-ot hízott. A jobb diabetes kontroll miatt inzulinterápiára tértek át néhány hónap múlva, az inzulin szükséglete azonban egyre növekedett, egy év alatt 300 egységre kellett azt felemelni. A CK értéke enyhén emelkedett 311 U/l (normál - tartomány: 24-195 U/ l). Izomfájdalma és inzulinrezisztenciája hátterében lactacidozis igazolódott, nyugalmi laktát szintje igen magas 6.6 mmol/l (normál - tartomány: 0,5 - 2,2 mmol / l) volt. Az ENG vizsgálat mindkét oldali carpalis alagút szindrómát igazolt, az EMG a m. tibialis anteriorban myogen laesio-kat detektált. Az izom myopathológiai

vizsgálata során az izomrostok oedemásan fellazultak és a módosított SDH festés több fragmentált szerkezetű „ragged” blue” rostot talált. Az elektronmikroszkópos vizsgálat mind subsarcolemmalisan, mind intermyofibrillarisan a mitochondriumok közelében óriási lipid vakuólákat talált. A mitochondriumok száma kissé emelkedett, több helyen lipofuscin szaporulat is látható volt. A metformin elhagyása után a laktát szintje lényegesen lecsökkent 4.4 mmol/l-re, izomfájdalmai jelentősen enyhültek, valamint az inzulin napi adagját 97 egységre lehetett redukálni. A beteg mtDNS-ének vizsgálata során az izomban 12% HP aránnyal „common” deléció igazolódott. A teljes mtDNS, reszekvenálásával 32 homoplazmikus SNP-t detektáltunk (14. táblázat), melyek között az irodalom többet is asszociált különböző betegségekkel (15. táblázat). A talált SNP-k közül több mutat a MIDD-del asszociációt.

14. táblázat: A MitoChip v2.0 microarray-jel detektált homoplazmikus SNP-k

Érintett mitochondriális gén	Szubsztitúció
Hipervariábilis szegment 2	m.41C>T, m.73A>G
H-kötő origó	m.150C>T
Nem kódoló régió	m.263A>G
12S rRNS	m.709G>A, m.750A>G, m.1438A>G
16S rRNS	m.1888G>A, m.2706A>G
ND1	m.3335T>C, m.4216T>C
ND2	m.4769A>G
COI	m.7028C>T
ATPáz6	m.8697G>A, m.8856G>A, m.8860A>G
tRNS ^{Arg}	m.10463T>C
ND4	m.11251A>G, m.11719G>A, m.11812A>G
ND6	m.14180T>C, m.14233A>G
Cytb	m.14766C>T, m.14905G>A, m.15326A>G, m.15452C>A, m.15607A>G
tRNS ^{Thr}	m.15928G>A
Hipervariábilis szegment 1	m.16126T>C, m.16153G>A, m.16294C>T
Nem kódoló régió	m.16519T>C

15. táblázat: Az 58 éves férfi betegünk homoplazmikus mtDNS SNP-khez asszociált kórképek az irodalmi adatok alapján

SNP	Asszociált kórkép	Referencia
m.73A>G	AMD	Udar és mtsai 2009
m.263A>G	Mellrák	Czarnecka és mtsai 2010
m.709G>A	SNHL	Wei és mtsai 2009
m.1438A>G	Schizophrenia	Rollins és mtsai 2009
m.1888G>A	MIDD	Perucca-Lostanlen és mtsai 2000
m.2706A>G	Linezolid indukálta laktát acidózis	Carson és mtsai 2007
m.4216T>C	MIDD, LHON Inzulinrezisztencia	Perucca-Lostanlen és mtsai 2000
m.4917A>G	MIDD, LHON, Inzulinrezisztencia, AMD	Perucca-Lostanlen és mtsai 2000
m.16126T>C	AMD	Udar és mtsai 2009
m.16519T>C	Mellrák, ciklikus hányás szindróma migrénnel	Zaki és mtsai 2009

5.4.2. A *POLG1* gén szubsztitúcióinak farmakogenomikai jelentősége mitochondriális betegekben

A multiplex mtDNS deléciókkal rendelkező betegeknél, felvetődik az intergenomiális kommunikáció zavara, ezért ezekben az esetekben a két genom kommunikációjában legfontosabb géneket is vizsgáltuk. Ezek közül a gének közül a legtöbb hiba a *POLG1* génben szokott előfordulni az irodalmi adatok alapján, ezért a többes deléciót hordozó 65 betegnél elsőként a *POLG1* gén teljes kódoló szakaszát és határoló régióit analizáltuk. A vizsgált 65 beteg (45 nő és 20 ffi) átlag életkora: 39.02±18.36 év (nő: 42±24.84, ffi: 30.5±21.63). A betegek kb. 50%-ánál volt pozitív a családi anamnézis.

A *POLG1* gén vizsgálata során számos eltérést - ismert és új patogén mutációkat - találtunk valamint, számos exoni és introni SNP-t, változó hosszúságú CAG repeat

expanziót, és 3' UTR variánsokat (Kékesi és mtsai 2014). Jelen munkában csak a farmakogenomikai jelentőségű szubsztitúciók jelentőségét elemezzük.

A *POLG1* gén variáció közül eddig 7-et írtak le a valproát toxicitással asszociáltan az irodalomban (L304R, A467T, G588D, Q879H, T885S, E1143G, Q1236H) (<http://tools.niehs.nih.gov/polg/>). Ezek közül a kohortunkban 3-at találtunk meg, melyek a következők:

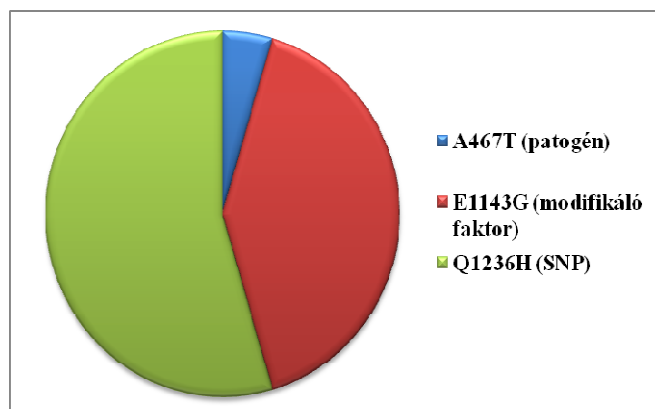
- Az Exon 7-re lokalizálódó c.1399 G>A, p.Ala467Thr (rs113994095) patogén mutációt egy esetben találtuk meg compound heterozigóta formában egy 5 éves kisfiúnál, akinek testvére valproát toxicitás miatt meghalt. Az általunk vizsgált kisfiúnak myoclonus epilepsziája, krónikus intestinális pseudoobstrukciója, myopathiája és ophthalmoplegiája (CIPO) volt. Tizennégy hónapos korában adenovírus fertőzést követően kezdődött a súlyos myoclonus epilepsziája, melyet valproáttal (VPA) kezeltek. Ekkor májenzim értékei hirtelen megemelkedtek. Nővérének 18 hónapos korában hasonló tünetei voltak, ő is kapott akkor VPA-ot és ezt követően a gyógyszer hepatotoxicitása miatt exitált. A VPA toxicitással asszociációt mutató, de ugyanakkor patogén mutáció szegregációs elemzése során ugyanezt a szubsztitúciót az édesapánál és tünetmentes öccsénél is megtaláltuk, szintén heterozigóta formában. A mutáció frekvenciája 1.54 % (95% CI: 0.0001 – 0.0307). A kisfiú esetében a másik allélen az édesanyja által is hordozott Exon 21-ben: c.3589 T>C (p.Cys1198Arg) nagy valószínűséggel patogén mutáció is igazolódott. Az Alpers szindrómát a két mutáció együttes jelenléte okozta.
- A VPA toxicitással összefüggésben az Exon 21-ben: c.3428 A>G p.Glu1143Gly (rs2307441) polimorfizmus 9 esetben volt jelen (7 nő és 2 ffi) heterozigóta formában. Az átlagéletkor: 44 ± 19,68 év volt. Egy 48 éves nőbetegnél az SNP compound heterozigótaként volt jelen, mivel az Exon12-ben egy ismert heterozigóta patogén mutációt detektáltunk: c.2243 G>C (p.Trp748Ser). A beteg anamnézisében vesetumor, lipomák, myopathia, myalgia, hypothyreosis, valamint depresszió szerepel. Családi szegregációs vizsgálata során, mind a

modifikáló faktort, mind pedig az ismert patogén mutációt megtaláltuk, az édesanyjánál, két fiútestvérénél és a lányánál is.

A c.3428 A>G p.Glu1143Gly SNP az irodalom szerint modifikáló faktorként ismert. A modifikáló faktor frekvenciája a multiplex deléciós kohortban: 13.85% (95% CI: 0.0957 – 0.1813).

- A *POLG1* gén 23-as exonjában lévő c.3708 G>T, p.Gln1236His (rs3087374) polimorfizmust detektáltuk a legtöbb, 12 esetben (9 nő, 3 ffi). Az SNP csak két esetben igazolódott homozigóta formában, a többi 10 betegnél heterozigóta formában volt jelen. Azon két beteg esetében, akiknél az SNP-t homozigóta formában találtuk meg, a klinikai tünetek hasonlóak voltak: cerebelláris ataxia és myopathia. Az SNP-t heterozigóta formában hordozó 10 betegnél a klinikai fenotípus igen változatos volt: PEO, ptosis, hypacusis, dysarthria, dysphagia, ataxia, myopathia, migrén, depresszió, mentális retardáció. Négy beteg esetében a családi anamnézis is egyértelműen mitochondriális betegség lehetőségét vetette föl. A 12 beteg átlagéletkora: 42.02±23.75 év volt. Az SNP előfordulási gyakorisága a vizsgált kohortban: 18.46% (95% CI: 0.1365 – 0.2327).

A VPA toxicitással asszociált szubsztitúciókat összesen 22 esetben találtuk meg a 65 multiplex delécióval rendelkező betegeknél. Összesítve a farmakogenetikai jelentőségű patogén mutációt 1 betegnél (1.54%), nem patogén modifikáló faktort 9 esetben (13.85%), míg a polimorfizmusnak minősített Q1236H-t 12 betegnél (18.46%) (13. ábra) találtuk meg. A három szubsztitúció együttes előfordulási gyakorisága viszonylag magas: 33.85% volt (95% CI: 0.2798 – 0.3972) (13. ábra).



13. ábra: A VPA toxicitással asszociált *POLG1* szubsztitúciók eloszlása az érintett betegeknél

5.5. Új metodika validálása mtDNS betegekben diagnosztikára és haplotipizálásra

Az mtDNS teljes bázissorrendjének meghatározása sok esetben fontos diagnosztikai feladat. A hagyományos Sanger szekvenálás azonban költség- és időigényes. Annak vizsgálatára, hogy microarray technika könnyítheti-e ezt a diagnosztikai tevékenységet egy összehasonlító vizsgálatot terveztünk. Tizenöt beteget vizsgáltunk MitoChip v2.0 microarray-jel, melyek közül 4-nek ismert mtDNS eltérése volt az m.8344 A>G (monozigóta férfi ikerpár) és az m.8993 C>T (édesanya és fia) mutációk. A további 11 beteg mtDNS hot spot-jainak analizálása során nem találtunk patogén eltérést, de klinikai tüneteik, laboreredményeik, myopatológiai vizsgálataik (izomszövet esetén) és családi anamnéziséik mitochondriális betegségekre utaltak. A 15 beteg (9 nő és 6 ffi) átlag életkora: 39.4±15.51 év volt (16. táblázat).

16. táblázat: A MitoChip v2.0 microarray-jel vizsgált betegek klinikai tünetei

	Nem	Életkor	Klinikai tünetek
1. beteg	nő	62	Myopathia, bipoláris affektív betegség
2. beteg	nő	27	Súlyos hypacusis, dysarthria, ataxia
3. beteg	nő	62	Alacsony növés (144 cm), hormonális diszfunkció, myopathia
4. beteg	nő	46	Axonális neuropathia, hypothyreosis, bipoláris affektív betegség
5. beteg	nő	42	Schizophrenia, epilepszia
6. beteg	nő	45	Végtagtremor, ataxia, kognitív hanyatlás
7. beteg	ffi	24	Szemmozgászavar, axonális típusú neuropathia, distalis paresis az avt-ban, hallucinációk
8. beteg	nő	40	Cardiomyopathia, kognitív hanyatlás, szorongás
9. beteg	nő	25	Generalizált dystonia
10. beteg	ffi	6	Congenitális ptosis, generalizált hypotonia, mentális retardáció
11. 12. beteg (monozigóta ikrek)	ffi	39	Myoclonusos epilepszia, fej tremor, dysarthria, dysphagia, izom atrophia, ataxia, kognitív diszfunkció
13. beteg	ffi	28	Dysdiadochokinesis, ataxia, kognitív diszfunkció, distalis típusú hypaesthesia
14. beteg	nő	48	Aszimptomás
15. beteg	ffi	58	II-es típusú diabetes mellitus, inzulinrezisztencia, laktacidózis, izomfájdalom, izomhypertrophia

5.5.1 A MitoChip v2.0 microarray-jel detektált eltérések

Egy kivétellel valamennyi esetben izomból izolált mtDNS-t vizsgáltunk azon megfontolásból, hogy a posztmitotikus szövetben a HP arány minél nagyobb legyen. Egyidőben 5 microarray-t tudtunk lefuttatni (1 beteg / 1 chip), így három körben kaptuk meg a 15 beteg eredményét. A chip által adott szekvenciákat a GSEQ 4.0 ingyenesen letölthető software-rel (www.affymetrix.com) analizáltuk és a humán mtDNS referencia genomjához hasonlítottuk (www.mitomap.org). A patogénnek vélt mutációkat Sanger szekvenálással validáltuk.

A Mitochip microarray segítségével 6 betegben találtunk patogén heteroplazmikus mutációt, a 4 ismertén kívül még két esetben: c.12770 A>G az mtDNS ND5-ben ismert

patogén és a c.14771 C>T az mtDNS Cytb génben feltételezett patogén mutációt. A HP arány 25-95% között mozgott. A patogén mutációk 66 %-át sikerült Sanger szekvenálással validálni. Minden beteg esetében számos eltérést tapasztaltunk, mely felvetette a szubsztitúciók jelenlétét, akár 12 különböző pontján az mtDNS-nek, de azokat bidirekcionális szekvenálással nem minden esetben tudtuk megerősíteni (17. táblázat). A betegeknél a homoplazmikus SNP-k száma (17. táblázat) igen széles tartományt ölelt fel (9-32 db SNP / beteg), melyek közül számos a hipervariábilis régióba esett, így a haplotipizálásban adtak támpontokat. A talált szinonim és nem szinonim SNP-k közül több asszociál különböző kórképekkel, melyet a 18. táblázatban foglaltunk össze.

17. táblázat: A microarray-jel vizsgált 15 beteg mtDNS-ében talált SNP-k, valamint a fals pozitív szubsztitúciók számának összesítése
(rövidítések: nsz – nonszinoním; sz – szinoním; nc – nem kódoló)

Beteg	Talált SNP-k száma	Nsz SNP-k száma	Sz SNP-k száma	NC régióban talált SNP-k száma	Fals pozitív esetek száma
1. beteg	9	1	2	6	2
2. beteg	24	3	12	9	4
3. beteg	15	7	3	5	6
4. beteg	29	6	9	14	4
5. beteg	29	10	11	8	11
6. beteg	21	6	6	9	7
7. beteg	31	8	6	17	3
8. beteg	24	7	8	9	5
9. beteg	25	5	11	9	8
10. beteg	29	7	6	15	7
11. beteg	29	7	10	12	9
12. beteg	29	7	10	12	9
13. beteg	11	1	2	8	12
14. beteg	11	1	2	8	12
15. beteg	32	7	10	15	10

18. táblázat: A MitoChip v2.0 microarray-jel detektált homoplazmikus SNP-kkel asszociált kórképek

(rövidítések: AMD – időskori makula-degeneráció; ND – NADH dehidrogenáz; MIDD - anyai ágon öröklődő diabetes és nagyothallás; LHON - Leber-féle optikus neuropathia; Cytb – citokróm b)

Beteg	SNP	Aminosav csere	Lokalizáció (mt gén)	Irodalom által asszociált kórképek	Referencia
1. beteg	m. 8343A>G	-	tRNS ^{Lys}	Parkinson-kór	Khusnutdinova és mtsai 2008
2. beteg	m. 73A>G	-	Hipervariábilis szegment 2	AMD	Udar és mtsai 2009
	m. 152T>C	-	H-strand origin	Hányálmirigygrák	Navaglia és mtsai 2006
	m. 2706A>G	-	16S rRNS	Linezolid-asszociált laktát acidózis	Carson és mtsai 2007
	m.16519T>C	-	Nem kódoló régió	Mellrák, ciklikus hányás szindróma migrénnel	Zaki és mtsai 2009
3. beteg	m. 5460G>A	Ala-Thr	ND2	Parkinson-kór	Schnopp és mtsai 1996
4. beteg	m.4216T>C	Tyr-His	ND1	MIDD	Perucca-Lostanlen és mtsai 2000
	m.4917A>G	Asn-Asp	ND2	MIDD, LHON, Inzulinrezisztencia, AMD	Perucca-Lostanlen és mtsai 2000
	m.10398A>G	Thr-Ala	ND3	Mellrák	Rohan és mtsai 2010
	m.13368G>A	Gly-Gly	ND5	AMD	Udar és mtsai 2009
	m.16126TC	-	Hipervariábilis szegment 1	AMD	Udar és mtsai 2009
	m.16519T>C	-	Nem kódoló régió	Mellrák, ciklikus hányás szindróma migrénnel	Zaki és mtsai 2009
5. beteg	m. 73A>G	-	Hipervariábilis szegment 2	AMD	Udar és mtsai 2009
	m. 2706A>G	-	16S rRNS	Linezolid-asszociált laktát acidózis	Carson és mtsai 2007
	m.10398A>G	Thr-Ala	ND3	Mellrák	Rohan és mtsai 2010
	m.10400C>T	Thr-Thr	ND3	Bipoláris betegségek	Kazuno és mtsai 2005

	m.11696G>A	Val-Ile	ND4	Süketség, LHON	De Vries és mtsai 1996
	m.14783T>C	Leu-Leu	Cytb	Pszichiátriai betegségek	Rollins és mtsai 2009
	m.15043G>A	Gly-Gly	Cytb	Pszichiátriai betegségek	Rollins és mtsai 2009
6. beteg	m.1438 A>G	-	12S rRNS	Schizofrénia	Rollins és mtsai 2009
7. beteg	m. 73A>G	-	Hipervariábilis szegment 2	AMD	Udar és mtsai 2009
	m.4216T>C	Tyr-His	ND1	MIDD	Perucca-Lostanlen és mtsai 2000
	m.16126TC	-	Hipervariábilis szegment 1	AMD	Udar és mtsai 2009
8. beteg	m. 5004T>C	Leu-Leu	ND2	Vastagbél daganat	Girald-Rosa és mtsai 2004
9. beteg	m.16519T>C	-	Nem kódoló régió	Mellrák, ciklikus hányás szindróma migrénnel	Zaki és mtsai 2009
10. beteg	m.4216T>C	Tyr-His	ND1	MIDD	Perucca-Lostanlen és mtsai 2000
11.-12. beteg (monozi góta ikerpár)	m. 263A>G	-	Nem kódoló régió	Mellrák	Tan és mtsai 2002
	m.1438 A>G	-	12S rRNS	Schizofrénia	Rollins és mtsai 2009
	m.4769A>G	Met-Met	ND2	Schizofrénia	Rollins és mtsai 2009
	m.16126TC	-	Hipervariábilis szegment 1	AMD	Udar és mtsai 2009
	m.16519T>C	-	Nem kódoló régió	Mellrák, ciklikus hányás szindróma migrénnel	Zaki és mtsai 2009
13.-14. beteg (fiú és édesanya)	m.152T>C	-	H-kötő origó	Hasnyálmirigy-rák	Navaglia és mtsai 2006
	m. 263A>G	-	Nem kódoló régió	Mellrák	Tan és mtsai 2002
	m.709 G>A	-	12S rRNS	Hallásvesztés	Wei és mtsai 2009
	m. 2706A>G	-	16S rRNS	Linezolid-asszociált laktát acidózis	Carson és mtsai 2007
	m. 5460G>A	Ala-Thr	ND2	Parkinson-kór	Schnopp és mtsai 1996

	m.7028 C>T	Ala-Ala	COI	Mellrák	Bai és mtsai 2008
	m.16519T>C	-	Nem kódoló régió	Mellrák, ciklikus hányás szindróma migrénnel	Zaki és mtsai 2009

A 15. beteget már korábban ismertettem, a metformin indukálta laktacidózis esetbemutatáskor (15. táblázat), így a 18. táblázatban már nem szerepel.

5.5.2. Haplotipizálás - MitoChip v2.0 microarray által detektált homoplazmikus SNP-ek

A vizsgált 15 beteg közül, 10 esetben nyílt lehetőségünk a részletes haplotipizálásra Raskó István munkacsoportja (Szegedi Tudományegyetem) segítségével. Meghatároztuk a haplocsoportokat mind a teljes mtDNS szekvenciára nézve, mind pedig külön csak a hipervariábilis régiókat figyelembe véve (19. táblázat), így kaptunk pontos, részletes haplotípusokat. A 10 betegből 9, az Európára jellemző R szuperhaplocsoportba tartozó haplocsoportokba tartozik (H, U, T, J). Az 5. beteg, akinek schizophreniája és epilepsziája van, a D4j haplocsoportba tartozik, mely D ma Ázsiában gyakori haplotípus, Európára nem jellemző. A teljes mtDNS szekvencia és a nem kódoló régiók alapján megállapított haplocsoportok között szinte nincs eltérés, csak még specifikusabbá tette a haplotipizálást, ha az egész mtDNS-t vettük alapul.

A további 5 beteg haplocsoportját Mende Balázs Gusztáv és munkacsoportja (Régészeti Intézet - Archeogenetikai Laboratórium) közreműködésével határoztuk meg a phylotree.org honlap alkalmazásával, hipervariábilis régiókban található homoplazmikus SNP-k segítségével, ezen esetekben a teljes mtDNS szekvenciáját nem vettük figyelembe. A harmadik sorozatban futtatott chip-ekhez tartozó öt beteg közül a monozigóta ikerpár esetében W haplocsoportot határoztunk meg, mely Európára jellemző. Az m.8993 T>C patogén mutációt (NARP) hordozó édesanya és fia az egyik leggyakoribb európai haplocsoportba tartoznak a H-ba, míg a 15. beteget, akinek metformin indukálta laktacidózisa volt, a T5 haplocsoportba soroltuk a hipervariábilis régióban detektált homoplazmikus SNP-i alapján, ami szintén európai haplocsoport.

19. táblázat: Tíz beteg részletes haplotípus elemzése, a teljes mtDNS szekvencián valamint csak a hipervariábilis régiókat alapul véve

Beteg	SNP-k	A teljes mtDNS szekvencián alapuló			A kontroll régió szekvenciáján alapuló		
		Teljes találat	Nem teljes találat	Hiányzó	Teljes találat	Nem teljes találat	Hiányzó
1.	236 456 8343 12771 13434 16294 16304	H5		nincs	H5		nincs
2.	73 152 195 235 499 1811 2706 3672 4646 5294 5999 7028 7705 11332 11339 11467 11719 12308 12372 14620 14766 15693 16356 16519 498 4647 12770	U4b1 a		nincs	U4		nincs
3.	262 3866 5060 5460 10124 14118 14433 14952 15617 72 558 1085 2058 6292 14772		HV0	16298		HV0	16298
4.	73 709 1888 2706 4216 4917 7028 8697 10398 10463 11251 11719 11812 13368 13965 14233 14687 14766 14905 15452 15607 15928 16126 16209 16294 16295 16296 16519 16355	T2a1		nincs	T2		nincs
5.	73 489 2706 3010 4883 5178 5460 7028 8414 8701 9540 10398 10400 10873 11696 11719 12705 14668 14766 14783 15043 15301 15323 16171 16223 16311 16362 1838 14784	D4j		nincs	D4j		nincs
6.	263 456 750 1438 4769 8860 15326 16167 16304 16311 6317 8080 10939 12997 13950 14771 14932 14948 15263 15625 16330	H5		nincs	H5		nincs
7.	73 111 185 188 228 239 263 295 462 489 750 1438 2706 3010 4216 4769 7028 8860 9591 10398 11251 11422 11719 12612 14766 14798 15326 15452 16069 16111 16126 103 106 107 234 235 302 461 463 7029 13707	J1c2		nincs	J1c2		nincs
8.	263 326 538 750 1438 3992 4024 4769 4691 5004 8269 8860 9123 14365 14582 15326 15734 16093 146 3999 4772 5005 8270 8278	H4a1		nincs	H1h; H1n		nincs
9.	263 750 1438 3010 4769 5460 7897 8512 14902 15326 16519 77 95 3897 5447 5911 5912 6878 7864 8080 8083 8275 8905 12549 16093	H1e1 a		nincs	R0		nincs
10.	73 185 228 263 295 462 489 750 1438 1958 2706 3010 4216 4769 7028 8860 9632 10398 11251 11719 12083 12612 14766 14798 15326 15450 16067 16124 463	J1c4		nincs	J1c		nincs

6. Megbeszélés

6.1. Az mtDNS leggyakoribb eltéréseinek vizsgálata a magyar populációban

Az mtDNS mutációs rátája magas, mely elsősorban fejletlen repair-rendszerével magyarázható. Ezek a patogén mutációk elszórta helyezkednek el a kettőszálú cirkuláris mtDNS-en belül, de vannak ún. mutációs „hot-spot”-ok, melyek frekvenciált helyek a patogén mutációkra nézve. Ezen „hot-spot”-okat minden olyan betegben megvizsgáltuk, akiknek a klinikai tüneteik, anamnéziséjük alapján mitochondriális betegséget gyanítottunk. Munkacsoportunk foglalta össze legelőször Magyarországon, egy retrospektív tanulmány keretein belül ezeknek a mutációknak (m.3243 A>G , m.8344 A>G , m.8993T >C m.8993 T>G , m.3460 G>A, m.11778 G>A és m.14484 T>C, az egyes és többes mtDNS deléciók) a frekvenciáit a magyar betegek körében, (Reményi és mtsai 2014).

A legtöbb eddig publikált vizsgálat középpontjában az m.3243 A>G mutáció áll, mely a leggyakrabban előforduló mtDNS hiba azoknál a mitochondriális betegeknek, akik izomszövetében mitochondriális diszfunkciókat igazol a myopathológiai vizsgálat (Sternberg és mtsai 2001). Kibővített beválasztási kritériumok mellett, (a klasszikus mitochondriális multiszisztémás tünetek mellett, önmagában SNHL és DM is szerepelt szelekciós kritériumként az irodalomban). Ennek a mutációnak az előfordulási gyakorisága a vizsgált kohortokban 0.07 és 44.33% között mozgott (20. táblázat). Az általunk vizsgált 1082 beteg esetében az m.3243 A>G mutáció frekvenciája 2.68% volt. Egy korábbi tanulmányunkban kisebb kohort (631 beteg) elemzésekor az előfordulási gyakoriság: 2.22% volt (Gál és mtsai 2010). A mi munkacsoportunkhoz hasonló beválasztási kritériumokkal a mutációs frekvenciák 6.17% és 22.35% közöttiek voltak (Chae és mtsai 2004; Sternberg és mtsai 2001; Rodríguez- Hernández és mtsai 2000; Majamaa és mtsai 1998; Marotta és mtsai 2004) más országokban. A kubai munkacsoport által talált különösen magas frekvenciát azzal magyarázzuk, hogy kicsi volt az elemszámuk és kizárólag izomszövetből izolált mtDNS-t vizsgáltak (Rodríguez- Hernández és mtsai 2000). Ezzel szemben a többi kutatócsoport a mi munkánkhoz hasonlóan az perifériás vérből és / vagy izomszövetből nyert mtDNS-en végezte a genetikai vizsgálatokat. Feltehetően a jobb klinikai átvizsgálás eredményezett magasabb találati arányt.

20. táblázat: Az m.3243 A>G mutáció előfordulási gyakorisága a nemzetközi irodalomban

Frekvencia (%)	Vizsgált betegek száma	m.3243 A>G mutációt hordozók száma	mtDNS eredete	Beválasztási kritérium	Ország	Referencia
44.33	97	43	Perifériás vér és izomszövet	Mitochondriális encephalomyopathia	Kína	Wang és mtsai 2008
22.35	85	19	Perifériás vér és/vagy izomszövet	Mitochondriális encephalomyopathia, pszichomotoros regresszió, cardiomyopathia, visszatérő stroke-szerű epizódok, SNHL, DM, vesebetegség	Dél-Korea	Chae és mtsai 2004
12.65	166	32	Perifériás vér, fibroblaszt és izomszövet	Morfológiai és biokémiai mitochondriális elváltozások jelenléte	Franciaország	Sternber és mtsai 2001
11.11	9	1	Izomszövet	Feltételezett mitochondriális encephalomyopathia, PEO	Kuba	Rodríguez-Hernandez és mtsai 2000)
6.50	615	40	Perifériás vér és szájnyalkahártya	DM, SNHL, epilepszia, stroke, PEO, ataxia, cardiomyopathia, intracranialis meszesedés	Finnország	Majamma és mtsai 1998
6.17	1184	73	Perifériás vér, izomszövet, haj	Feltételezett mitochondriális encephalomyopathia	Ausztrália	Marotta és mtsai 2004
3.45	29	1	Perifériás vér	SNHL	Franciaország	Lévêque és mtsai 2007
2.29	1482	34	Perifériás vér, vizelet, köröm, haj, szájnyalkahártya	SNHL	Lengyelország	Iwanicka-Pronicka és mtsai 2012

A legmagasabb frekvencia értéket: 44.33%-ot publikáló kínai tanulmány (Wang és mtsai 2008) szintén perifériás vérből és/vagy izomszövetből nyert mtDNS-ből vizsgálta a mutáció jelenlétét, azonban a beválasztási kritériumaik a publikációjuk alapján nem jól definiáltak.

Több olyan közlemény is született, melynek beválasztási kritériuma mindössze a DM volt (Martin-Kleiner és mtsai 2004; Ohkubo és mtsai 2001; Lechto és mtsai 1999; Salles és mtsai 2007; Wang és mtsai 2013; Duraisamy és mtsai 2010; Bouhaha és mtsai 2010; Francisco és mtsai 2005; Klemm és mtsai 2001). Ezek, két értekezés kivételével relatíve kisszámú beteget vizsgáltak (99-280). Ennek ellenére ezekben a csoportokban a mutáció

frekvenciája időnként relatíve magasnak bizonyult: 0.72% - 9.09% (21. táblázat). Ezek az adatok arra utalnak, hogy, a DM az m.3243 A>G-vel gyakran asszociált klinikai manifesztáció. Összességében azonban azt mondhatjuk, hogy a beválasztási kritériumok és a klinikai vizsgálatok alaposága nagymértékben befolyásolja egy adott betegcsoportban a mutációs frekvenciát.

21. táblázat: Az m.3243 A>G mutáció előfordulási gyakorisága különböző országokban diabetes mellitus-szal kezelt betegek esetében

Frekvencia (%)	Vizsgált betegek száma	m.3243 A>G mutációt hordozók száma	mtDNS eredete	Beválasztási kritérium	Ország	Referencia
9.09	22	2	Perifériás vér és szájnyalkahártya	DM2	Horvátország	Martin-Kleiner és mtsai 2004
2.92	240	7	Perifériás vér	DM1, DM2, terhességi DM	Japán	Ohkubo és mtsai 2001
2.61	115	3	Májszövet	Korai kezdetű DM	Svédország és Finnország	Lechto és mtsai 1999
2.03	148	3	Perifériás vér	DM2	Portugália	Salles és mtsai 2007
1.69	770	13	Perifériás vér	DM	Kína	Wang és mtsai 2013
1.33	150	2	Nincs adat	DM	India	Duraisamy és mtsai 2010
1.07	280	3	Perifériás vér	DM1, DM2	Tunézia	Bouhaha és mtsai 2010
0.72	138	1	Perifériás vér	DM	Spanyolország	Francisco és mtsai 2005
0.07	1460	1	Perifériás vér	DM	Németország	Klemm és mtsai 2001

A második leggyakoribb patogén mutációt az m.8344 A>G-t ritkábban tanulmányozták. Az általunk idézett hét közleményben a frekvencia értékek 1.20% és 6.18% között mozogtak (22. táblázat) (Wang és mtsai 1999; Kwon és mtsai 2004; Chinnery és mtsai 2000; Marotta és mtsai 2004; Scaglia és mtsai 2004; Cao és mtsai 2010; Stenberg és mtsai 2001). A magyar betegek frekvencia értéke az alsó intervallumba esett (1.20%). A beválasztási kritériumok a legtöbb esetben igen hasonlóak voltak a mi vizsgálatunkhoz, de három tanulmányban az mtDNS-t csak egyfajta szövetből nyerték, a dél-koreai és kínai esetében (Kwon és mtsai 2004; Cao és mtsai 2010) perifériás vérből, míg a

texasinál (Scaglia és mtsai 2004) izomszövetből. Az m.3243 A>G esetében már említett kínai tanulmány (Wang és mtsai 2008) igazolta a legmagasabb frekvencia értéket, az m.8344 A>G mutáció esetében is megjegyzendő, hogy a beválasztási kritérium itt sem volt jól definiált. Az m.8344 A>G mutáció vonatkozásában kiemelendő egy finnországi közlemény is, melyben 621 beteget vizsgáltak, az mtDNS perifériás vérből származott, a beválasztási kritérium igen széles skálát ölelt fel: ataxia, epilepszia, lipóma, myopathia, PEO, optikus atrophia, neuropathia, és hypacusis. Ennek ellenére nem találtak meg egyetlen esetben sem ezt az mtDNS mutációt (Remes és mtsai 2003).

22. táblázat: Az m.8344 A>G mutáció előfordulási gyakorisága a nemzetközi irodalomban

Frekvencia (%)	Vizsgált betegek száma	m.8344 A>G mutációt hordozók száma	mtDNS eredete	Beválasztási kritérium	Ország	Referencia
6.18	97	6	Perifériás vér és izomszövet	Mitochondriális encephalomyopathia	Kína	Wang és mtsai 2008
4.73	63	3	Perifériás vér	Feltételezett mitochondriális encephalomyopathia, MERRF-re jellemző tünetekkel	Dél-Korea	Kwon és mtsai 2004
2.26	265	6	Perifériás vér és izomszövet	Feltételezett mitochondriális (mtDNS) betegség	Északkelet Anglia	Chinnery és mtsai 2000)
2.21	1184	27	Perifériás vér, izomszövet, haj	Feltételezett mitochondriális encephalomyopathia	Ausztrália	Marotta és mtsai 2004
2.00	102	2	Izomszövet	Meghatározott mitochondriális betegség (a módosított Walker kritérium szerint)	Texas, USA	Scaglia és mtsai 2004
1.50	930	14	Perifériás vér	Feltételezett mitochondriális betegség az emelkedett laktát és piruvát szint, valamint az abnormális koponya MRI alapján	Kína	Cao és mtsai 2010
1.20	166	2	Perifériás vér, fibroblaszt és izomszövet	Morfológiai és biokémiai mitochondriális elváltozások jelenléte	Franciaország	Sternber és mtsai 2001

Felvetődik a gondolat, hogy vajon az egyes népcsoportokban eltérő mutációs frekvencia (ázsiai vs. európai populáció) összefüggésben van-e más antropológiai genomikai markerek jelenlétével. Az m.8344 A>G mutáció ázsiai tanulmányokban leírt magas előfordulási gyakorisága egy Ázsiában igen gyakori, az mtDNS 9 bázispáros deléciójának (mt8272 - mt8280) jelenlétével összefüggést mutathat, mivel feltételezzük, hogy ez a polimorfizmus sérülékenyebbé teszi az mtDNS-nek közeli régióját (Pentelényi és mtsai 2014, publikálás alatt). A mi eseteink között ez ugyan egy alkalommal sem fordult elő, de találtunk a közvetlen közelében az m.8332 lokalizációban egy új, mások által korábban még le nem írt mutációt, mely a család összes érintett tagjában szegregálódott (Gál és mtsai, 2010).

Epidemiológiailag igen ritkán tanulmányozott mutációk az m.8993 T>C és az m.8993 T>G. Egy tajvani közleményben 177 betegből 1-nél T>C, 2-nél T>G szubsztitúciót találtak (Pang és mtsai 1999). Két kínai értekezés a két mutációt 2-2 betegben azonosította, azonos bevásztási kritériummal: mitochondriális encephalopathia és Leigh vagy Leigh-szerű szindróma, a frekvenciák: 2.06% (Wang és mtsai 2008) és 1.61% (Zhang és mtsai 2007) voltak. A már korábban említett 2010-es kínai tanulmány (Cao és mtsai 2010) 10 esetben találta meg ezeket a mutációkat (1.07%) perifériás vérben. Az ausztrál vizsgálat 0.32%-os előfordulási gyakorisággal detektálta a két mutációt 1184 beteg bevonásával (Marotta és mtsai 2004). Spinocerebellaris ataxia (SCA) volt a bevásztási kritérium egy tajvani vizsgálatban, melyben 265 beteg mtDNS-ét elemezték és egy esetben sem találták meg az m.8993 szubsztitúcióit (Lee és mtsai 2007). A mi kohortunkban is hasonlóan alacsony volt ezeknek a mutációknak az előfordulási gyakorisága.

A fentiekkel ellentétben a három elsődleges LHON mutáció: m.3460 G>A, m.11778 G>A, m.14484 T>C vizsgálatánál a karakterisztikus tünetek miatt a bevásztási kritériumok egységesek és jól definiáltak. Így nem meglepő, hogy sokkal magasabbak a mutációs frekvenciák. A mi kohortunkban talált 16.7% nagyon hasonló a kaukázusi népcsoportban más munkacsoportok által kapott eredményekhez. A LHON betegek 95%-ánál jelen van valamely elsődleges patogén mutáció (Man és mtsai 2002). Öt európai országot magába foglaló meta-analízis alapján a három mutáció prevalenciáját 1 / 45.000-re becsülték Európában (Mascialiano és mtsai 2012). Az irodalmi adatok alapján a legtöbb esetben az m.11778 G>A mutációt detektálják, melyet a mi

tanulmányunk is alátámasztott, mivel a 81 pozitív esetből 67 betegnél ezt a mutációt azonosítottuk. Az első populáció-alapú LHON tanulmány Északkelet-Angliában történt, mely a minimum pont prevalenciát 11.82 / 100.000-re becsülte (Man és mtsai 2003). Néhány példa a mutációk előfordulási gyakoriságára: az 1184 beteget vizsgáló ausztrál tanulmány 0.29% (m.3460 G>A), 6.60% (m.11778 G>A) és 5.76% (m.14484 C>T) értékeket kapott (Marotta és mtsai 2004), míg egy kínai közlemény, mely 903 feltételezett LHON betegből álló csoportot analizált: 0.44% (m.3460 G>A), 34.55% (m.11778 G>A) és 3.32% (m.14484 C>T) (Jia és mtsai 2006). Összehasonlítva ezen tanulmányokkal vizsgálatainkat, az m.3460 G>A és az m.14484 T>C mutációk gyakoriságát fordított aránnyal kaptuk meg (m.3460 G>A: 1.85%; m.14484 T>C: 1.03%). Nem csak nálunk ritkább az m.14484 T>C mutáció jelenléte, hanem Finnországban és az Egyesült Királyságban is (Chinnery és Turnbull 2001).

A mitochondriális deléciókat viszonylag nagy számban 250 esetben detektáltuk a vizsgált 1082 fős kohortban. A mitochondriális betegségekben a nagy deléciók a legfrekvenciáltabb mtDNS alterációk, incidenciájuk 1 / 8000 (Tonska és mtsai 2012), ezzel jól korrelálnak a mi adataink is. A felnőtt finn populációban 1.6 / 100.000 prevalencia értéket kaptak a nagyméretű mtDNS deléciókra (Remes és mtsai 2005), míg ugyancsak a felnőtt lakosság vizsgálata során Északkelet-Angliában a nagyméretű deléciók prevalenciáját 1.2 / 100.000-re becsülték (Shaefer és mtsai 2008). Az irodalmi adatokat megerősítve, igen magas 40%-ban találtuk meg az egyes deléciók között a 4977 bp hosszú ún. „common” deléciót, mely az m.8470 és az m.13.447 között helyezkedik el.

Magyarországhoz legközelebb eső Csehországban a vizsgálatba bevont betegcsoportot szigorúan stratifikálták: 180 biokémiailag igazolt Citokróma c oxidáz hiányban szenvedő gyermek vizsgálata során 15 esetben igazolódott mtDNS betegség (az m.3243 A>G mutációt 6 esetben, az m.8344 A>G-t 1, míg a nagy egyes deléciókat 8 betegnél detektálták) (Böhm és mtsai 2006).

Az egyes mutációk vonatkozásában a HP arányok az egyes szövetekben nagyon változóak voltak. Az m.3243 A>G mutációt két esetben csak izomszövetből tudtuk kimutatni (HP:15% és 22%), vérből a HP arányok 35% - 70% között változtak, az izomszövetből: 15% - 55% HP arányt kaptunk. Sajnos nem minden beteg esetében volt lehetőségünk a vizsgálatot izomszövetből is elvégezni. Azon betegnél, akiknél mindkét

szövetből meg tudtuk nézni a mutációt, az izomszövet HP aránya magasabb volt, mind az m.3243 A>G, mind az m. 8344 A>G esetében. Az m.8993 T>C mutációnál kaptuk a legmagasabb HP arány értékeket, az izomszövetben majdnem homoplazmikus formában volt jelen a szubsztitúció, mely az előző alterációkkal korrelál. A HP arány leginkább a vérben és az izomszövetben az mtDNS deléciók vonatkozásában különbözött, hasonlóan nemzetközi tanulmányokhoz (Carozzo és mtsai 1999; Tonska és mtsai 2012). A mi eredményeinknél 31 esetben a vizsgált 68 betegnél (akiknél a deléciós vizsgálat eltérő eredményt hozott vérből és izomszövetből) nem volt jelen a deléció a vérben, az izomszövetben pedig nagy HP arányban detektáltuk azt. Ez az adat arra hívja fel a figyelmet, hogy kritikus jelentőségű az, hogy mely szövetet vizsgáljuk a genetikai diagnosztika során. Az mtDNS mutáció hiánya nem posztmitotikus szövetben nem tudja biztonsággal kizárni az mtDNS betegségeket.

6.2. Fenotípus-genotípus korrelációk az mtDNS betegekben

Az m.3243 A>G mutációval asszociáló klinikai tüneteknek igen széles palettája ismert (www.mitomap.org). Azt a legtöbb esetben a MELAS szindróma háttérében írták le, így a prezentációs tünete a mutációnak a fiatalkori stroke / stroke-szerű epizódok. Számos tanulmány, esetismertetés taglalja ezen mutáció sokfajta fenotípusos megjelenését, melyet a saját vizsgálatink is alátámasztanak. A mutációt összesen 29 esetben (16 index beteg és 13 családtag) találtuk meg. A klinikai tünetek igen variábilisak voltak. A leggyakrabban előforduló tünetek azon betegek között, akik ezt a mutációt hordozták: 1.) a neuropszichiátriai tünetek (6/29), 2.) depresszió (2/29), 3.) pszichózis (1/29), 4.) mentális retardáció (3/29), 5.) a sensorineuralis hypacusis (6/29); 6.) diabetes mellitus (6/29) volt. A betegek kb. felében fordult elő életükben legalább egy alkalommal ischaemiás stroke vagy epilepsziás roham. Az érintettek többségében a fentiekén kívül még egyéb szervet, szervrendszert érintő tünetet is találtunk, mint pl. PEO (2/29), myopathia (4/29). Az mtDNS mutációkat hordozó betegek klinikai tüneteinek variabilitása adódhat a különböző HP arányokból is, mely az eltérő szövetekben is különböző. Például az m.8344 A>G mutációt hordozó egyik családunkban a tünetmentes édesanya vérében detektált 30%-os HP aránya nem okozott klinikai tüneteket, míg egy másik családban szintén az édesanya vérében mért 46% HP arány

kifejezett klinikai tüneteket eredményezett. Betegeink közül kiemelendő egy monozigóta férfi ikerpár. Mindketten hasonló HP aránnyal (vérben 40%) hordozzák a mutációt, klinikai tüneteik mégis különböznek. Az egyiküket elveszítettük progresszív myoclonus epilepszia és súlyos ataxia miatt, míg testvérét még most is gondozzuk, igaz gyakran vannak metabolikus krízisei. Ezek a különbségek valószínűleg az epigenetikai hatások következményei. Más gének mutációjának esetén is figyeltek meg hasonló jelenséget, amit epigenetikai hatásokra vezettek vissza. Egy *PMP22* duplikációval rendelkező monozigóta ikerpár esetét közölték spanyol szerzők, akiknél a mi betegeinkhez hasonlóan, eltérő fenotípus alakult ki (Garcia és mtsai 1995).

A mitochondriális „common” deléciókat legtöbb esetben a PEO, a Kearns-Sayre és a Pearson szindróma háttérében írták le (Zeviani és mtsai 1988). A nagy egyes deléciók okozta PEO prevalenciáját egy északnyugati finn tanulmány 0.66 / 100.00-re becsülte (Martikainen és mtsai 2012). Az általunk vizsgált betegek - akik egyes deléciókat hordoztak - vezető tünete a myopathia (37.8%) volt és csak utána következett a PEO (24.9%). Az irodalomban számos sporadikus esetet találhatunk, de vannak familiáris formák is. Az egyes mtDNS deléciót hordozó betegeink közel 38%-ában fordult elő családi halmozódás. Véleményünk szerint az mtDNS deléciók jelenléte esetén nagyon kritikusnak kell lenni a kezelőorvosnak, ugyanis ismert, hogy ezek a deléciók szomatikus mutációként is kialakulhatnak genotoxikus anyagok, szabad oxigén gyökök károsító hatására (Schröder és Molnár 1997). Ezért egy ilyen genetikailag determinált betegség epidemiológiai vizsgálatokor azon eseteket mindig ki kell zárni, ahol a beteg anamnézisében szomatikus mutációkra hajlamosító környezeti hatásokról tudomást szerzünk.

6.3. Autoszomális domináns öröklődésű de Toni-Debré-Fanconi szindróma

Gyermekeknél az mtDNS „common” deléciója leggyakrabban Pearson szindrómát okoz, melynek vezető tünetei a hasnyálmirigy exocrin funkciózavara, és súlyos anaemia. Ha mindezek mellett proximalis renalis tubulopathia is megjelenik, akkor de Toni-Debré-Fanconi szindrómának hívjuk a kórképet (Niaudet és mtsai 1994). Felnőttkorban az mtDNS „common” deléciójához leggyakrabban társuló szindrómák a Kearns-Sayre szindróma (KSS) és a progresszív ophthalmoplegia externa (PEO). A gyermekkori Pearson szindróma felnőttkorban átalakulhat KSS-be vagy PEO-ba. Ezek a

kórképek gyakran sporadikusak. Valamennyi mtDNS delécióval járó kórkép esetén ritásnak számít a családi halmozódás. Az általunk ismertetett 9 éves fiú beteg esetéhez hasonlóan, már egy 1994-es publikáció is összefüggésbe hozta a „common” deléciót a de Toni-Debré-Fanconi szindrómával, melyet korábban sporadikusnak írtak le (Niaudet és mtsai 1994). Egy francia tanulmány 30 Pearson szindrómás beteg vizsgálata során két gyermeket írt le még de Toni-Debré-Fanconi szindrómával, akiknél szintén mtDNS egyes deléció igazolódott, bár nem a „common” deléció (4799 bp), hanem egy 3.5 kbp-os és egy 4.9 kbp-os deléció volt jelen (Atale és mtsai 2009). Ezek az esetek is sporadikusak voltak. Nem csak Pearson, hanem Kearns-Sayre szindrómával diagnosztizált betegeknél is írtak le veseérintettséget és mtDNS deléciót (Mihai és mtsai 2009). Jelen esetünkben a de Toni-Debré-Fanconi szindrómás kislánknak mtDNS deléciója maternális ági vagy autoszomális domináns transzmissziót sejtetett, ugyanis édesanyjának, anyai nagymamájának és anyai nagynénjének is voltak neurológiai tünetei, mely elsősorban PEO-ban és generalizált anxiétásban nyilvánult meg. Valószínűleg nukleáris gén károsodása okozta a kórképet, ennek vizsgálata teljes exom analízissel folyamatban van.

6.4. Komplex mtDNS rendellenességek (mtDNS deléciók együttes előfordulása tRNS mutációkkal)

Három esetben találtunk az mtDNS deléciókkal egyszerre előforduló patogén mitochondriális tRNS pontmutációkat. Az irodalomban nem ritás a mitochondriális betegeknél több mtDNS alteráció együttes jelenléte. A mi kohortunkban az m.3243 A>G mutáció két nőbeteg esetében fordult elő mtDNS deléciókkal együtt. A 43 éves nőbeteg esetében a 38%-os HP arányú tRNS^{Leu (UUR)} mutáció mellett multiplex deléciót detektáltunk. Az irodalomban mindössze egy esettanulmányt találtunk ezzel a kombinációval, egy 52 éves betegnél, akinek anamnézisében DM2, hypertensio, SNHL, stroke, dezorientáció szerepel. A multiplex deléció miatt analizálták a *POLG1* gént is, de eltérést nem detektáltak (Aharoni és mtsai 2010). A *POLG1* gén elemzése nálunk is megtörtént betegünkönél és mi sem találtunk benne patogén mutációt.

A 42 éves betegünkönél, akinek DM-a, minkét oldali ptosis, hypoacusis, enyhe myopathiája van, az m.3243 A>G mutációt egyes delécióval együtt (7.9 kbp) találtuk

meg. Az irodalomban egy hasonló esetet találtunk, akinél egy sokkal kisebb méretű: 2.532 kbp-os egyes deléció társult az m.3243 A>G-mutációhoz (Ohno és mtsai 1996). Az m.3243 A>G-mutációt vérben és izomban is azonosították, míg a deléciót csak izomszövetben találták meg. Ennél a betegnél ismétlődő hányások, cachexia, myopathia, hyperthyreoidizmus, insomnia a vezető tünetek. Családi szegregációja során vérben édesanyjának csak az m.3243 A>G-t detektálták, a deléciót nem. Az anyai nagymamájánál egyik eltérést sem találták meg a vérében. Ez felveti azt a lehetőséget, hogy az m.3243 A>G mutáció után jöhetett létre az egyes deléció, azáltal, hogy a patogén pontmutáció befolyásolta az mtDNS replikációját, így segítve elő a deléciót, de természetesen nem zárható ki annak az esélye sem, hogy a két eltérés egymástól függetlenül alakult ki véletlenszerűen (Ohno és mtsai 1996).

A harmadik esetünkben az 54 éves férfi betegnél egy heteroplazmikus tRNS^{lle} patogén mutációt: az m. 4298 G>A-t detektáltuk a multiplex deléció mellett. Ezt a pontmutációt CPEO-val és sclerosis multiplex-szel asszociálták (Taylor és mtsai 1998). Az irodalomban ezt a mutációt nem találtuk más mtDNS delécióval együttesen leírva. Azt valószínűsítjük, hogy az együttesen jelenlevő ún. „double hit” jelenség hátterében az mtDNS eleve fejletlen repair rendszeréért felelős nukleáris gének hibái állnak. Ezirányú vizsgálataink folyamatban vannak.

6.5. Az mtDNS deléciók és nukleáris gének rendellenességeinek koegzisztenciája

Az mtDNS deléciókat nem csak a mitochondriális genom egyes pontmutációival együtt találtuk meg, az a nukleáris genom génjeinek mutációjához is társult.

A *PMP22* gén kvantitatív eltérései (deléciója vagy duplikációja) relatíve gyakoriak, ez a genetikai hiba áll leggyakrabban a CMT1a és/vagy a HNPP hátterében. A mi 100 *PMP22* deléciót / duplikációt hordozó betegünk mtDNS-ének vizsgálata során 12%-ban találtunk mtDNS deléciót. Az irodalomban a *PMP22* gén és az mtDNS kapcsolatára nem találtunk hivatkozást, a mi pilot jellegű vizsgálatunk felveti annak a lehetőségét, hogy a DNS replikációért felelős mechanizmusok hibája állhat mindkét genetikai hiba hátterében. Természetesen nem zárható ki az sem, hogy a két különböző helyen történő eltérések egymástól függetlenül jöttek létre.

Egy központi idegrendszeri neurodegeneratív betegségben, a Huntington-kórban, melyet a *HTT* génben található kórosan megnövekedett CAG repeat expanziója okoz, is

vizsgáltuk az mtDNS deléció jelenlétét. Ebben a kórképben a felszabaduló szabad oxigén gyökök miatt szekunder módon is kialakulhatnak mtDNS deléciók (Horton és mtsai 1995). Pilot vizsgálatunkban a betegek 7%-ában találtunk perifériás vérben egyes nagy (7.9 kbp) deléciót, míg többes / multiplex, vagy a gyakori „common” deléciót egy esetben sem. A szekunder szomatikus mutációk általában multiplex deléciók formájában jelentkeznek, így azt feltételezzük, hogy a talált egyes deléciók nem a szabad oxigén gyökök hatására alakultak ki a vérben.

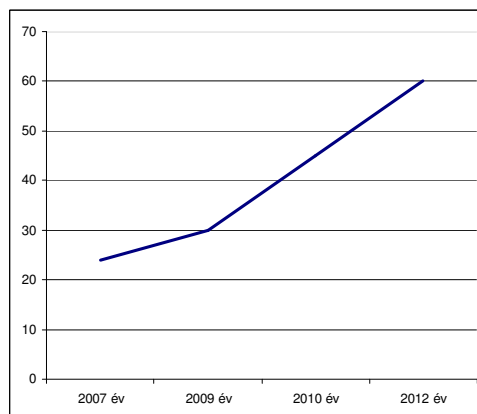
A tény, hogy mindkét vizsgált nukleáris genom által meghatározott betegségben mtDNS deléciókat találtunk, arra enged következtetni, hogy esetleg a betegségben primernek gondolt DNS hiba, mint *PMP22* deléció / duplikáció, valamint a *HTT* gén CAG repeat expanziója és az mtDNS deléció eredete közös, esetleg a DNS replikáció során a DNS repair-ért felelős gének valamelyikének hibája miatt alakulhat ki. Munkacsoportunk ezen pilot vizsgálatok alapján kezdte meg ezekben a többes genetikai hibákat (kópiaszám rendellenességeket) hordozó betegekben ez egyes DNS replikációs hibákat javító gének vizsgálatát.

6.6. Új nukleáris mitochondriális gén, a *DARS2* mutáció azonosítása magyar családban

Az LBSL (leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and lactate elevation) szindróma egy 2007-ben leírt monogénes betegség, mely autoszomális recesszív módon öröklődik (Scheper és mtsai 2007). A kórkép általában gyermekkorban manifesztálódik, legjellegzetesebb tünetei: az ataxia, spastikus paresis és enyhe kognitív zavar. A betegség oka a *DARS2* gén hibája. Eddig 60 különböző *DARS2* mutációt írtak le 78 betegben (van Berge és mtsai 2014). A patogén mutációk egy része introni szakaszra lokalizálódik. Az azonosított *DARS2* mutációk számának emelkedése várható, mivel a jellegzetes MRI elváltozás nagymértékben segíti a klinikust a megfelelő genetikai vizsgálat kiválasztásához, amennyiben ismeri a betegséget (14. ábra).

A mi betegünknel azonosított patogén splice site variáns az 5. exont követő introni részben található: c. 492+2 T>C (rs142433332; M134_K165del). A mutáció az irodalomban patogénnek ismert Kelet-Európában, Németországban, Oroszországban, Törökországban és az USA-ban (Scheper és mtsai 2007).

Esetünk érdekessége, hogy csak az egyik patogén mutációt sikerült megtalálni a kódoló régiók és az azt határoló introni régiók vizsgálata során. Ennek ellenére nem gondolunk autoszomális domináns öröklésmentre, mivel nővérének is vannak tünetei és ő is hordozza az egyik allélen a patogén mutációt. Az ő tünetei a húszas évei elején is nagyon enyhék, azonban a koponya MRI már mutatja a jellegzetes elváltozásokat. A *DARS2* gén által kódolt mitochondriális aszpartil-tRNS szintetáz aktivitása nagymértékben meghatározza a klinikai képet (van Berge és mtsai 2014). A beteg szülei közül is az egyik hordozza a patogén mutációt, azonban sem klinikai tünetei nincsenek, sem a képalkotó vizsgálatok nem igazolják a fehérállomány laesiót. Így igen nagy valószínűséggel a másik patogén mutáció is vagy introni lokalizációjú, vagy szabályozó régióban van.



14. ábra: Az azonosított *DARS2* mutációk számának növekedése az évek során

6.7. Az mtDNS SNP-k és a *POLG1* gén szubsztitúcióinak farmakogenomikai jelentősége

Ma már számos közlemény bizonyítja, hogy az mtDNS homoplazmikus SNP-k együttes előfordulása asszociálhat egyes betegségek kialakulásával, valamint farmakogenomikai és filogenetikai jelentőséggel is bírhat.

Az 58 éves DM-os férfi betegünknel az mtDNS SNP-k farmakogenomikai jelentőségére utalt a metformin szedés mellett kialakult súlyos laktát acidózis. Dykens és munkacsoportja biguanidokon: metforminon, butforminon, phenforminon végzett kísérleteik során azt tapasztalták, hogy ezen hatóanyagok a komplex I aktivitásának csökkentésével rontják a mitochondrium funkcióját és így ATP depléciót, ennek következtében laktát acidózist eredményeznek (Dykens és mtsai 2008). A metformin és a laktát acidózis összefüggését legelőször 1979-ben vizsgálták, de nem találtak szoros asszociációt (Hermann 1979). Egy új-zélandi összefoglaló viszont 1998-ban fatális kimenetelű laktát acidózisról számolt be metformin szedés mellett. Ezeknek a betegeknek súlyos vese-, vagy szívbetegségük volt, vagy nagy műtéten estek át (Gowardman és Havill 1995). Egy 2003-as meta-analízis 56.692 DM2-ben szenvedő betegnél vizsgálta a metformin és laktát acidózis összefüggését. A metforminnal kezelt és nem kezelt alcsoportokban a laktát acidózis incidenciája a kezelték esetében 8.1/100.000, míg a nem kezelték csoportjánál 9.9/100.000 volt, ami nem igazolt szoros asszociációt a metformin szedés és a laktát acidózis között. Felhívjuk viszont a figyelmet arra, hogy a vizsgálatnál a beválasztási kritérium egyedül a DM2 volt és nem történt a DM2 háttérben álló etiológiai faktorok alapján további stratifikáció (Salpeter és mtsai 2003).

A mi betegünk teljes mtDNS-ének vizsgálata során 3 olyan SNP-t találtunk (m.1888 G>A, m.4216 T>C, a m.4917 A>G), melyek az MIDD-al asszociáltak. Ezen asszociációt korábban Petrucca-Lostanlen és munkacsoportja közölte (Petrucca-Lostanlen és mtsai 2000). Megfigyeléseink alapján azon betegek esetében, akiknél a metformin szedés laktát acidózist eredményez, érdemes a mitochondriális betegségre is gondolni, vagy már diagnosztizált mitochondriális betegnél ajánlott ezen SNP-k jelenlétét vizsgálni metformin terápia megkezdése előtt (Reményi és mtsai 2014, publikálás alatt).

A nátrium-valproát (VPA) világszerte széles körben alkalmazott készítmény az epilepszia, migrén, bipoláris zavarok kezelésére. A hatóanyag mellékhatásaként fellépő májelégtelenség kialakulásának valószínűsége felnőtteknél 1 / 37.000, míg gyermekek esetében ez a szám: 1 / 500 (Dreifuss és mtsai 1989). Eddig a *POLG1* gén 7 eltérését (L304R, A467T, G588D, Q879H, T885S, E1143G, Q1236H) hozták összefüggésbe VPA toxicitás kialakulásával. A *POLG1* gén az egyik kulcsszereplő az intergenomiális kommunikációban, ezért azon betegek esetében vizsgáljuk elsősorban, akiknél az mtDNS multiplex deléciójának jelenléte felveti a mitochondriális és a nukleáris genom közötti kommunikáció zavarát. Az általunk vizsgált kohortban a 7 eltérés közül 3-at (A467T, E1143G, Q1236H) sikerült detektálnunk a betegek 33.85%-ában (22/65). E három eltérés közül az egyik egyben patogén mutáció is (A467T). A patogén mutációt hordozó Alpers szindrómás 5 éves kisfiú esete jól tükrözi, hogy szoros asszociáció van a mutáció jelenléte és a fatális kimenetelű VPA okozta hepatotoxicitás között, melyet az irodalom is megerősít (Kollberg és mtsai 2006). Azon betegeknél, akiknél az mtDNS-ben multiplex deléció igazolódott, és klinikai tünetei alapján intergenomiális kommunikáció zavart feltételezünk, pl. PEO, cerebelláris ataxia, pszichiátriai tünetek, érdemes legalább a *POLG1* gén VPA toxicitásra hajlamosító SNP-it megvizsgálni. Eddig a *POLG1* gén E1143G szubsztitúcióját csak heterozigóta formában írták le, mint ahogy az általunk vizsgált betegek esetében is. Ezt a nagy valószínűséggel más mutációk hatását modifikáló faktort az irodalmi adatok alapján relatíve gyakran figyelték meg a W748S patogén mutációval együtt (Chan és mtsai 2006), ahogy azt mi is megtaláltuk egy 48 éves betegünkénél és négy családtagjánál. A W748S patogén mutáció csökkenti a DNS polimeráz aktivitását, de az E1143G jelenléte kompenzálja a patogén compound heterozigóta mutáció hatását. Az általunk legtöbb esetben detektált SNP-t, a Q1236H-t az irodalomban is a *POLG1* gén egyik leggyakrabban detektált eltéréseinek írják le szerte a világban. Élesztőkön végzett kísérletek során azt tapasztalták, hogy növeli az mtDNS mutációs rátáját (Stewart és mtsai 2010). Ezt az SNP-t eddig Alpers szindrómában, homozigóta formában (Horvath és mtsai 2006), egy sokkal enyhébb klinikai tünetekkel járó kórképben a PEO-ban (Di Fonzo és mtsai 2003), és a VPA toxicitással összefüggésben heterozigóta formában írták le (Stewart és mtsai 2010). Az általunk vizsgált multiplex deléciót hordozó betegeknél, akiknél az SNP-t heterozigóta formában detektáltuk, több esetben is PEO volt az első prezentációs

tünet. Az eltérések magas arányának detektálása miatt a mitochondriális betegeknel a VPA adása általánosan kerülendő lenne. Ha erre nincs mód, akkor a multiplex mtDNS delécióval rendelkező betegeknel a *POLG1* gén ismert VPA toxicitásra hajlamosító SNP-inek analízise mindenképpen ajánlott.

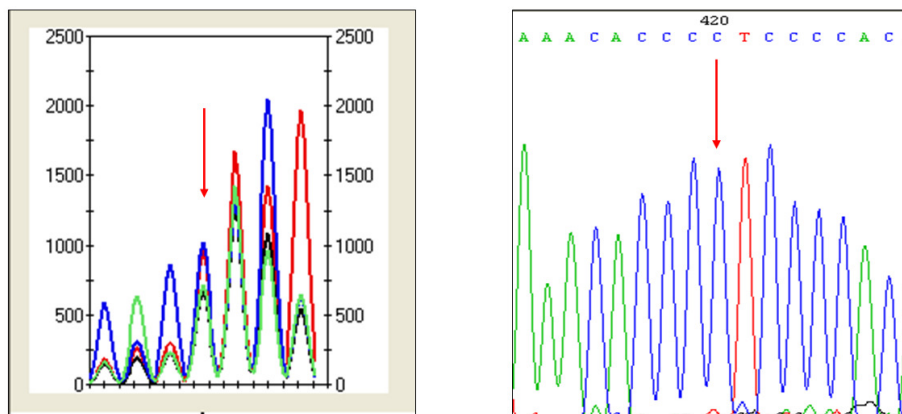
6.8. MitoChip v2.0 microarray előnyei és hátrányai, saját vizsgálatunk során

A microarray technika előnye, hogy egy időben több beteg teljes mtDNS-ének analizálására képes, valamint a homoplazmikus mtDNS polimorfizmusok detektálására jól használható a gyártó ajánlása szerint a módszer. Ezt a véleményt egy kanadai munkacsoport vizsgálata is alátámasztja, mely során MitoChip microarray segítségével sikeresen azonosították a mellrákkal asszociált mtDNS SNP-eket és mutációkat, aspirátum folyadékból nyert mtDNS-en (Jakupciak és mtsai 2008). A GSEQ 4.1 software a microarray-jel kapott jeleket lefordítja egy szekvencia sorrendre, mely megegyezik a humán mtDNS referencia szekvenciával (15. ábra). Vizsgálataink során mi arra voltunk kíváncsiak, hogy a metodika alkalmas-e heteroplazmikus patogén mtDNS mutációk azonosítására.



15. ábra: A GSEQ 4.1 Software-rel szekvencia sorrendre lefordított microarray jelek

Mint ahogy a 15. ábrából is látható, egy rövid szakaszon is számos eltérést nem ismert fel a program, ezeket „n”-nel jelölte. A software által készített szekvenogramok alapján több pozícióban is felmerült az esetleges szubsztitúciók megléte. Ezeket a pozíciókat bidirekcionális Sanger szekvenálással validáltuk, és azt tapasztaltuk, hogy a keresett pozíciókon számos helyen nincs eltérés (16. ábra). Ez alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a microarray technika a heteroplazmikus mtDNS mutációk kimutatására nem minden esetben megbízható módszer. Annak alkalmazását haplotipizálásra tudjuk csak biztonságosan ajánlani.



16. ábra: A GSEQ 4.1 által készített szekvenogram és a bidirekcionális szekvenálással kapott szekvenogram, a kérdéses pozícióról (piros nyíl)

7. Következtetések

A mitochondriális betegségek háttérében álló mtDNS és nukleáris DNS rendellenességek vizsgálata során a következő megállapításokat tettük:

1. Első alkalommal végeztünk genetikai epidemiológiai vizsgálatot mtDNS hibák következtében kialakuló mitochondriális betegségekben Magyarországon.
A vizsgált betegekben a leggyakoribb mtDNS pontmutációk, valamint az mtDNS deléciók előfordulási gyakoriságának értékei: m.3243 A>G 2.68%, m.8344 A>G 1.20%, m.8993 T>C,G 0.46%, m.3460 G>A, m.11778 G>A és m.14484 T>C együttesen 16.7%, mtDNS deléciók 23.0%, hasonlóak más kaukázusi népcsoport adataival annak ellenére, hogy a magyar betegekben egy kelet-ázsiai antropológiai marker jelenléte is igazolható.
2. A genetikai epidemiológiai vizsgálat során rendkívül fontosnak tartjuk, hogy a genetikai diagnosztikai vizsgálat ne csak vérből, hanem lehetőség szerint posztmitotikus szövetből is történjen.
3. Az egyes mtDNS mutációk és deléciók genotípus-fenotípus korrelációjának vizsgálata során egy mutációhoz esetenként nagyon szokatlan fenotípus is társulhat, a családtagok között is lényegesen különbözhetnek a tünetek. Egyes mutációknál pl. m.8993 T>C relatíve magas vérben mért HP arány se okoz klinikai tünetet. Más mutáció esetén, mint pl. az m.8344 A>G a HP arány mellett epigenetikai hatások is nagymértékben befolyásolták a klinikai képet és a betegség kórlefolyását.
4. Elsőként figyeltük meg, hogy az mtDNS deléciók sok esetben társultak más, az mtDNS-ben, vagy a nukleáris genomban lévő patogén mutációkhoz. Ennek háttérében a DNS replikációs hibákat javító mechanizmusok elégtelenségét véljük és ezt a területet tovább vizsgáljuk.
5. Az mtDNS homoplazmikus SNP-inek farmakogenomikai jelentőségét igazoltuk metformin asszociálta mellékhatás háttérében.

6. A *POLG1* gén bizonyos SNP-i szűrésének fontosságát igazoltuk a multiplex mtDNS delécióval rendelkező mitochondriális betegeknél a valproát kezelés megkezdése előtt.

7. A MitoChip v2.0 microarray-t alkalmasnak minősítettük az mtDNS homoplazmikus SNP-k detektálására, haplotipizálásra, azonban nem javasoljuk ennek használatát az mtDNS betegségek genetikai diagnosztikája során.

8. Összefoglalás

A mitochondriális betegségek hátterében állhatnak mind az mtDNS hibái, mind pedig a nukleáris genom mitochondrium működéséért felelős kb. 1500 génjének defektusai. Ma már több mint 200 patogén mtDNS mutációt ismernek, mely az mtDNS magas mutációs rátájával magyarázható. A patogén mutációk mellett számos homoplazmikus SNP is rögzült az mtDNS-ben, melyek együttesen több kórképre hajlamosító tényezők is lehetnek, de filogenetikai szempontból fontos markerek.

Vizsgálataink fókuszában a következők álltak: 1.) az 1568 feltételezeten mitochondriális betegségben szenvedő egyén véréből ill. izomszövetéből nyert mtDNS elemzése a leggyakoribb mtDNS patogén pontmutációkra (m.3243 A>G; m.8344 A>G; m.8993 T>C,G; m.3460 G>A, m.11778 G>A és m.14484 T>C) és mtDNS deléciókra; 2.) az mtDNS SNP-k és a *POLG1* gén szubsztitúcióinak farmakogenomikai szerepe; 3.) a teljes mtDNS szekvencia analízise MitoChip microarray technikával.

Összegezve munkánk eredményeit:

- meghatároztuk a leggyakoribb mtDNS patogén mutációk és deléciók előfordulási gyakoriságát, frekvencia értékeit a magyar populációban, melyek illeszkedtek más kaukázusi népcsoport adataihoz, annak ellenére, hogy a magyar betegekben egy kelet-ázsiai antropológiai marker jelenléte is igazolható.
- vizsgálataink alátámasztották, hogy a mitochondriális betegségek hátterében álló mtDNS mutációk igazolására a posztmitotikus szövet használata a legbiztonságosabb.
- egy mtDNS mutációhoz igen heterogén tünetek társulhatnak, melyek a HP arány mellett a gén-gén interakciók és az epigenetikai hatások következtében alakulhatnak ki.
- az mtDNS deléciók gyakran társulhatnak még patogén mtDNS, és nukleáris génhibákkal is.
- a metformin egyes mellékhatásának hátterében jelentős befolyásoló tényezőként ismertük fel a mtDNS egyes homoplazmikus SNP-it.
- a VPA toxicitás hátterében a *POLG1* gén szubsztitúcióinak farmakogenomikai szerepét igazoltuk mitochondriális betegségekben.
- a MitoChip microarray technikát homoplazmikus mtDNS SNP-k detektálására, így ezen adatokból nyert haplotipizálásra megbízható módszernek találtuk, de ismeretlen heteroplazmikus eltérések vizsgálatára, már nem.

9. Summary

Mitochondrial disorders can be caused by mutations of the mtDNA or of the 1500 different nuclear genes that code for mitochondrial proteins.

The high number of known mtDNA mutations (~200) is explained by the high mutation rate of the mtDNA. These pathogenic mutations, together with a number of homoplasmic SNPs, may predispose to a number of different disorders and they also serve as phylogenetic markers. The focus of our studies were: **1.** Testing of mtDNA samples of 1568 individuals with presumed mitochondrial disorder for point mutations (m.3243 A>G; m.8344 A>G; m.8993 T>C,G; m.3460 G>A, m.11778 G>A and m.14484 T>C) as well as mtDNA deletions **2.** Elucidating the pharmacogenomic role of certain mtDNA and *POLG1* gene SNPs **3.** Sequence analysis of the entire mtDNA using MitoChip microarray technology.

Based on our studies, we can conclude:

- The frequency rates for the most common mtDNA pathogenic mutations and deletions in the Hungarian population are similar to those published in other Caucasian populations despite the fact that Hungarians also harbor an East Asian anthropological marker.
- The use of postmitotic tissue is recommended when looking for pathogenic mtDNA mutations.
- Due to heteroplasmy, gene-gene interactions and epigenetic effects, a variety of different symptoms can be associated to a given mtDNA mutation.
- MtDNA deletions are frequently associated with pathogenic mtDNA point mutations or nuclear DNA mutations.
- Certain homoplasmic mtDNA SNPs play an important pharmacogenomic role in the pathomechanism of the adverse effects of metformin.
- Valproate toxicity associated to *POLG1* gene substitutions play also an important role in mitochondrial diseases.
- The MitoChip microarray technique has been found to be a reliable method in detecting and haplotyping homoplasmic mtDNA SNPs but not in studying heteroplasmic changes.

10. Irodalomjegyzék

1. Aharoni S, Traves TA, Melamed E, Cohen S, Silver EL. (2010) MELAS syndrome associated with both A3243G-tRNA^{Leu} mutation and multiple mitochondrial DNA deletions. *J Neurol Sci*, 296:101-103.
2. Almeida LS, Nogueirao C, Vilarinho L. Skeletal Muscle – From Myogenesis to Clinical Relations. *Nuclear-Mitochondrial Intergenomic Communication Disorders*. 2012:294-316.
3. Andreu AL, Martl R, Hirano M. (2003) Analysis of Human Mitochondrial DNA Mutations. *Neurogenetics Methods in Molecular Biology*, 217:185-197.
4. Atale A, Bonneau-Amati P, Rötig A, Fischer A, Perez-Martin S, de Lonlay P, Niaudet P, De Parscau L, Mousson C, Thauvin-Robinet C, Munnich A, Huet F, Faivre L. (2009) Tubulopathy and pancytopenia with normal pancreatic function: a variant of Pearson syndrome. *Eur J Med Genet*, 52:23-26.
5. Ballinger SW, Shoffner JM, Hedaya EV, Trounce I, Polak MA, Koontz DA, Wallace DC. (1992) Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. *Nat Genet*, 1:11-15.
6. Baudouin SV, Saunders D, Tiangyou W, Elson JL, Poynter J, Pyle A, Keers S, Turnbull DM, Howell N, Chinnery PF. (2005) Mitochondrial DNA and survival after sepsis: a prospective study. *Lancet*, 366:2118-2121.
7. Bouhaha R, Abid Kamoun H, Elgaaied A, Ennafaa H. (2010) A3243G mitochondrial DNA mutation in Tunisian diabetic population. *Tunis Med*, 88:642-645.
8. Böhm M, Pronicka E, Karczmarewicz E, Promicki M, Piekutowska-Abramczuk D, Sykut-Cegielska J, Mierzewska H, Hansikova H, Vesela K, Tesarova, M, Houstkova H, Houstek J, Zeman J. (2006) Retrospective, multicentric study of 180 children with cytochrome C oxidase deficiency. *Pediatr Res*, 59:21-26.

9. Brown MD, Voljavec AS, Lott MT, MacDonald I, Wallace DC. (1992) Leber's hereditary optic neuropathy: a model for mitochondrial neurodegenerative diseases. *FASEB J*, 6:2791-2799.
10. Bykhovskaya Y, Casas K, Mengesha E, Inbal A, Fischel-Ghodsian N. (2004) Missense mutation in pseudouridine synthase 1 (PUS1) causes mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia (MLASA). *Am J Hum Genet*, 74:1303-1308.
11. Calvo SE, Mootha VK. (2010) The mitochondrial proteome and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 11:25-44.
12. Cao Y, Ma Y, Zhang Y, Li Y, Fang F, Wang S, Bu D, Xu Y, Pei P, Li L, Xiao Y, Wu H, Yang Y, Zou L, Qi, Y. (2010) Detection of eight frequently encountered point mutations in mitochondria in Chinese patients suggestive of mitochondrial encephalomyopathies. *Mitochondrion*, 10:330-334.
13. Carrozzo R, Davidson MM, Walker WF, Hirano M, Miranda AF. (1999) Cellular and molecular studies in muscle and cultures from patients with multiple mitochondrial DNA deletions. *J Neurol Sci*, 170:24-31.
14. Carson J, Cerda J, Chae JH, Hirano M, Maggiore P. (2007) Severe lactic acidosis associated with linezolid use in a patient with the mitochondrial DNA A2706G polymorphism. *Pharmacotherapy*, 27:771-774.
15. Cassandrini D, Cilio MR, Bianchi M, Doimo M, Balestri M, Tessa A, Rizza T, Sartori G, Meschini MC, Nesti C, Tozzi G, Petruzzella V, Piemonte F, Bisceglia L, Bruno C, Dionisi-Vici C, D'Amico A, Fattori F, Carrozzo R, Salviati L, Santorelli FM, Bertini E. (2013) Pontocerebellar hypoplasia type 6 caused by mutations in RARS2: definition of the clinical spectrum and molecular findings in five patients. *J Inherit Metab Dis*, 36:43-53.
16. Chae JH, Hwang H, Lim BC, Cheong HI, Hwang YS, Kim KJ. (2004) Clinical features of A3243G mitochondrial tRNA mutation. *Brain Dev*, 26:459-462.
17. 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*, 15:3473-3483.
18. Chinnery PF, Johnson MA, Wardell TM, Singh-Kler R, Hayes C, Brown

- DT, Taylor RW, Bindoff LA, Turnbull DM. (2000) The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann Neurol*, 48:188-193.
19. Chinnery PF, Mowbray C, Patel SK, Elson JL, Sampson M, Hitman GA, McCarthy MI, Hattersley AT, Walker M. (2007) Mitochondrial DNA haplogroups and type 2 diabetes: a study of 897 cases and 1010 controls. *J Med Genet*, 44:e80.
 20. Chinnery PF, Turnbull DM. (2001) Epidemiology and treatment of mitochondrial disorders. *Am J Med Genet*, 106:94-101.
 21. Colombini M.(2004) VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol Cell Biochem*, 256-257: 107-115.
 22. Copeland WC. (2008) Inherited Mitochondrial Diseases of DNA Replication. *Annu Rev Med*, 59: 131–146.
 23. Coskun PE, Beal MF, Wallace DC. (2004) Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:10726-10731.
 24. Crimi M, Galbiati S, Sciacco M, Bordoni A, Natali MG, Raimondi M, Bresolin N, Comi GP. (2004) Mitochondrial-DNA nucleotides G4298A and T10010C as pathogenic mutations: the confirmation in two new cases. *Mitochondrion*, 3:279-283.
 25. Czarnecka AM, Krawczyk T, Plak K, Klemba A, Zdrozny M, Arnold RS, Kofler B, Golik P, Szybinska A, Lubinski J, Mossakowska M, Bartnik E, Petros JA. (2010) Mitochondrial genotype and breast cancer predisposition. *Oncol Rep*, 24:1521-1534.
 26. Darin N, Oldfors A, Moslemi AR, Holme E, Tulinius M. (2001) The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical, and DNA abnormalities. *Ann Neurol*, 49:377-383.
 27. Davidov Y, Huchon D, Koval SF, Jurkevitch E. (2006) A new alpha-proteobacterial clade of *Bdellovibrio*-like predators: implications for the mitochondrial endosymbiotic theory. *Environ Microbiol*, 8:2179-288.

28. De P, V, Reina S, Guarino F, Messina A. (2008) Structure of the voltage dependent anion channel: state of the art. *J Bioenerg Biomembr*, 40: 139-147.
29. De Vries DD, Went LN, Bruyn GW, Scholte HR, Hofstra RM, Bolhuis PA, van Oost BA.(1996) Genetic and biochemical impairment of mitochondrial complex I activity in a family with Leber hereditary optic neuropathy and hereditary spastic dystonia. *Am J Hum Genet*, 58:703-711
30. Debray FG, Morin C, Janvier A, Villeneuve J, Maranda B, Laframboise R, Lacroix J, Decarie JC, Robitaille Y, Lambert M, Robinson BH, Mitchell GA. (2011) LRPPRC mutations cause a phenotypically distinct form of Leigh syndrome with cytochrome c oxidase deficiency. *J Med Genet*, 48:183-189.
31. Degoul F, Diry M, Rodriguez D, Robain O, Francois D, Ponsot G, Marsac C, Desguerre I. (1995) Clinical, biochemical, and molecular analysis of a maternally inherited case of Leigh syndrome (MILS) associated with the mtDNA T8993G point mutation. *J Inherit Metab Dis*, 18:682-688.
32. Deschauer M, Tennant S, Rokicka A, He L, Kraya T, Turnbull DM, Zierz S, Taylor RW. (2007) MELAS associated with mutations in the POLG1 gene. *Neurology*, 68:1741-1742.
33. Di Fonzo A, Bordoni A, Crimi M, Sara G, Del Bo R, Bresolin N, Comi GP. (2003) POLG mutations in sporadic mitochondrial disorders with multiple mtDNA deletions. *Hum Mutat*, 22:498-499.
34. Dimauro S, Davidzon G. (2005) Mitochondrial DNA and disease. *Ann Med*. 37:222-232.
35. DiMauro S, Schon EA, Carelli V, Hirano M. (2013) The clinical maze of mitochondrial neurology. *Nat Rev Neurol*, 9:429-444.
36. Dreifuss FE.(1989) Valproic acid hepatic fatalities: revised table. *Neurology*, 39:1558
37. Duraisamy P, Elango S, Vishwanandha VP, Balamurugan R. (2010) Prevalence of mitochondrial tRNA gene mutations and their association with specific clinical phenotypes in patients with type 2 diabetes mellitus of Coimbatore. *Genet Test Mol Biomarkers*, 14:49-55.

38. Dykens JA, Jamieson J, Marroquin L, Nadanaciva S, Billis PA, Will Y. (2008) Biguanide-induced mitochondrial dysfunction yields increased lactate production and cytotoxicity of aerobically-poised HepG2 cells and human hepatocytes in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*, 233:203-210.
39. El-Hattab AW, Scaglia F. (2013) Mitochondrial DNA depletion syndromes: review and updates of genetic basis, manifestations, and therapeutic options. *Neurotherapeutics*, 10:186-198.
40. Fang H, Shen L, Chen T, He J, Ding Z, Wei J, Qu J, Chen G, Lu J, Bai Y. (2010) Cancer type-specific modulation of mitochondrial haplogroups in breast, colorectal and thyroid cancer. *BMC Cancer*, 10:421.
41. Federico A, Cardaioli E, Da Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E. (2012) Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J Neurol Sci*, 15:254-262.
42. Feng GF, Zhang J, Feng LM, Shen NX, Li LJ, Zhu YM. (2013) Mitochondrial DNA haplogroup associated with sperm motility in the Han population. *Asian J Androl*, 15:630-633.
43. Finsterer J. (2007) Genetic, pathogenetic, and phenotypic implications of the mitochondrial A3243G tRNA^{Leu}(UUR) mutation. *Acta Neurol Scand*, 116: 1-14.
44. Fitzpatrick DA, Creevey CJ, McInerney JO. (2006) Genome phylogenies indicate a meaningful a-proteobacterial phylogeny and support a grouping of the mitochondria with the Rickettsiales. *Mol Biol Evol*, 23:74–85.
45. Francisco G, Hernández C, Martínez R, García-Arumí E, Andreu A, Simó R. (2005) Prevalence of mitochondrial A3243G mutation in adult type 1 diabetic patients in Catalonia. *Diabetes Metab*, 31:621-622.
46. Gaignard P, Gonzales E, Ackermann O, Labrune P, Correia I, Therond P, Jacquemin E, Slama A. (2013) Mitochondrial Infantile Liver Disease due to TRMU Gene Mutations: Three New Cases. *JIMD Rep*, 11:117-123.
47. Gál A, Komlósi K, Maász A, Pentelényi K, Reményi V, Óváry Cs, Valikovics A, Diószeghy P, Bereczki D, Melegh B, Molnár MJ. (2010) Analysis of mtDNA A3243G mutation frequency in Hungary. *Cent Eur J Med*, 5:322-328.

48. Gál A, Pentelényi K, Reményi V, Pál Z, Csányi B, Tömöry G, Raskó I, Molnár MJ. (2010) Novel heteroplasmic mutation in the anticodon stem of mitochondrial tRNA(Lys) associated with dystonia and stroke-like episodes. *Acta Neurol Scand*, 122:252-256.
49. Gál A, Szabó A, Pentelényi K, Pál Z. (2008) Maternálisan öröklődő diabetes mellitus, nagyotthallás, krónikus ophthalmoplegia externa és myopathia mint az mtDNS A3243G mutáció következménye. *Orvosi Hetilap*, 149: 1593-1598.
50. Garcia CA, Malamut RE, England JD, Parry GS, Liu P, Lupski JR. (1995) Clinical variability in two pairs of identical twins with the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication. *Neurology*, 45:2090-2093.
51. García-Escudero V, Martín-Maestro P, Perry G, Avila J. (2013) Deconstructing mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2013:162152.
52. Ghezzi D, Marelli C, Achilli A, Goldwurm S, Pezzoli G, Barone P, Pellecchia MT, Stanzione P, Brusa L, Bentivoglio AR, Bonuccelli U, Petrozzi L, Abbruzzese G, Marchese R, Cortelli P, Grimaldi D, Martinelli P, Ferrarese C, Garavaglia B, Sangiorgi S, Carelli V, Torroni A, Albanese A, Zeviani M. (2005) Mitochondrial DNA haplogroup K is associated with a lower risk of Parkinson's disease in Italians. *Eur J Hum Genet*, 13:748-752.
53. Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. (1980) Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:6715-6719.
54. Giraldo-Rosa W, Vleugels RA, Musiek AC, Sligh JE. (2004) High-throughput mitochondrial genome screening method for nonmelanoma skin cancer using multiplexed temperature gradient capillary electrophoresis. *Clin Chem*, 51:305-311.
55. Gomori G. (1950) A rapid one-step trichrome stain. *Am J Clin Pathol*, 20:661-664.
56. Goto YI, Nonaka I, Horai S. (1990) A mutación in the tRNA^{Leu} (UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*, 348: 651-653.

57. Gowardman JR, Havill J. (1995) Fatal metformin induced lactic acidosis: case report. *NZ Med J*, 108:230-231.
58. Guillausseau PJ, Massin P, Dubois-LaFogue D, Timsit J, Virally M, Gin H, Bertin E, Blickle JF, Bouhanick B, Cahen J, Caillat-Zucman S, Charpentier G, Chedin P, Derrien C, Ducluzeau PH, Grimaldi A, Guerci B, Kaloustian E, Murat A, Olivier F, Paques M, Paquis-Flucklinger V, Porokhov B, Samuel-Lajeunesse J, Vialettes B. (2001) Maternally inherited diabetes and deafness: a multicenter study. *Ann Intern Med*, 134:721-728.
59. Hendrickson SL, Hutcheson HB, Ruiz-Pesini E, Poole JC, Lautenberger J, Sezgin E, Kingsley L, Goedert JJ, Vlahov D, Donfield S, Wallace DC, O'Brien SJ. (2008) Mitochondrial DNA haplogroups influence AIDS progression. *AIDS*, 22:2429-2439.
60. Hermann LS. (1995) Metformin: a review of its pharmacological properties and therapeutic use. *Diabete Metab*, 5:233-245.
61. Horton TM, Graham BH, Corral-Debrinski M, Shoffner JM, Kaufman AE, Beal MF, Wallace DC. (1995) Marked increase in mitochondrial DNA deletion levels in the cerebral cortex of Huntington's disease patients. *Neurology*, 45:1879-1883.
62. Horvath R, Hudson G, Ferrari G, Fütterer N, Ahola S, Lamantea E, Prokisch H, Lochmüller H, McFarland R, Ramesh V, Klopstock T, Freisinger P, Salvi F, Mayr JA, Santer R, Tesarova M, Zeman J, Udd B, Taylor RW, Turnbull D, Hanna M, Fialho D, Suomalainen A, Zeviani M, Chinnery PF. (2006) Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gamma gene. *Brain*, 129:1674-1684.
63. 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*, 49:939-950.
64. Hu FB. (2011) Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. *Diabetes Care*, 34:1249-1257.

65. Inczédy-Farkas G, Reményi V, Mészáros A, Gál A, Blasko G, Bereznai B, Molnár MJ. (2011) MELAS syndrome mimicking somatoform disorder. *Cent Eur J Med*, 6:758-761.
66. Iwanicka-Provicka K, Pollak A, Skórk A, Lechowicz U, Pajdowska M, Furmanek M, Rzeski M, Korniszewski L, Skarzynki H, Ploski R. (2012) Postlingual Hearing Loss as a Mitochondrial 3243A>G Mutation Phenotype. *PLoS One*, 7:e44054.
67. Jakupciak JP, Maggrah A, Maragh S, Maki J, Reguly B, Maki K, Wittock R, Robinson K, Wagner PD, Thayer RE, Gehman K, Gehman T, Srivastava S, Ngom A, Dakubo GD, Parr RL. (2008) Facile whole mitochondrial genome resequencing from nipple aspirate fluid using MitoChip v2.0. *BMC Cancer*, 8:95.
68. Jia X, Li S, Xiao X, Guo X, Zhang Q. (2006) Molecular epidemiology of mtDNA mutations in 903 Chinese families suspected with Leber hereditary optic neuropathy. *J Hum Genet*, 51:851-856.
69. Johri A, Beal MF. (2012) Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *J Pharmacol Exp Ther*, 342:619-630.
70. Kazuno AA, Munakata K, Mori K, Tanaka M, Nanko S, Kunugi H, Umekage T, Tochigi M, Kohda K, Sasaki T, Akiyama T, Washizuka S, Kato N, Kato T. (2005) Mitochondrial DNA sequence analysis of patients with 'atypical psychosis'. *Psychiatry Clin Neurosci*, 59:497-503.
71. Keeney PM, Bennett JP Jr. (2010) ALS spinal neurons show varied and reduced mtDNA gene copy numbers and increased mtDNA gene deletions. *Mol Neurodegener*, 5:21.
72. Kékesi A, Gál A, Reményi V, Hársfalvi V, Komlósi K, Melegh B, Molnár MJ. (2014) The frequency of POLG1 gene mutations in Hungarian patients with mitochondrial disorders and the analysis of phenotype - genotype correlation. *European Journal of Human Genetics*, 22.
73. Khusnutdinova E, Gilyazova I, Ruiz-Pesini E, Derbeneva O, Khusainova R, Khidiyatova I, Magzhanov R, Wallace DC. (2008) A mitochondrial etiology of neurodegenerative diseases: evidence from Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1147:1-20.

74. Kim JA, Wei Y, Sowers JR. (2008) Role of Mitochondrial Dysfunction in Insulin Resistance. *Circ Res*, 102:401-414.
75. Klemm T, Neumann S, Trülsch B, Pistrosch F, Hanefeld M, Paschke R. (2001) Search for mitochondrial DNA mutation at position 3243 in German patients with a positive family history of maternal diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 109:283-287.
76. Kofler B, Mueller EE, Eder W, Stanger O, Maier R, Weger M, Haas A, Winker R, Schmut O, Paulweber B, Iglseider B, Renner W, Wiesbauer M, Aigner I, Santic D, Zimmermann FA, Mayr JA, Sperl W. (2009) Mitochondrial DNA haplogroup T is associated with coronary artery disease and diabetic retinopathy: a case control study. *BMC Med Genet*, 10:35.
77. Kollberg G, Moslemi AR, Darin N, Nennesmo I, Bjarnadottir I, Uvebrant P, Holme E, Melberg A, Tulinius M, Oldfors A. (2006) POLG1 mutations associated with progressive encephalopathy in childhood. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65:758-768.
78. Komlósi K, Bene J, Havasi V, Tihanyi M, Herczegfalvi A, Móser J, Melegh B. (2004) Phenotypic variants of A3243G mitochondrial DNA mutation in a Hungarian family. *Orv Hetil*, 145:1805-1809.
79. Komlósi K, Kellermayer R, Maász A, Havasi V, Hollódy K, Vincze O, Merkli H, Pál E, Melegh B. (2005) Maternally inherited deafness and unusual phenotypic manifestations associated with A3243G mitochondrial DNA mutation. *Pathol Oncol Res*, 11:82-86.
80. Kwon SJ, Park SS, Kim JM, Ahn TB, Kim SH, Kim J, Lee SH, Ha CK, Ahn MY, Jeon BS. (2004) Investigation of common mitochondrial point mutations in Korea. *Ann N Y Acad Sci*, 1011:339-344.
81. Lee YC, Lu YC, Chang MH, Soong BW. (2007) Common mitochondrial DNA and POLG1 mutations are rare in the Chinese patients with adult-onset ataxia on Taiwan. *J Neurol Sci*, 254: 65-68.
82. Lehto M, Wipemo C, Ivarsson SA, Lindgren C, Lipsanen-Nyman M, Weng J, Wibell L, Widén E, Tuomi T, Groop L. (1999) High frequency of mutations in MODY and mitochondrial genes in Scandinavian patients with familial early-onset diabetes. *Diabetologia*, 42:1131-1137.

83. Lévêque M, Marlin S, Jonard L, Procaccio V, Reynier P, Amati-Bonneau P, Baulande S, Pierron D, Lacombe D, Duriez F, Francannet C, Mom T, Journal H, Catros H, Drouin-Garraud V, Obstoy MF, Dollfus H, Eliot MM, Faivre L, Duvillard C, Couderc R, Garabedian EN, Petit C, Feldmann D, Denoyelle F. (2007) Whole mitochondrial genome screening in maternally inherited non-syndromic hearing impairment using a microarray resequencing mitochondrial DNA chip. *Eur J Hum Genet*, 15:1145-1155.
84. Levinger L, Morl M, Florentz C. (2004) Mitochondrial tRNA 3' end metabolism and human disease. *Nucleic Acids Research*, 32: 5430-5441.
85. Li XY, Guo YB, Su M, Cheng L, Lu ZH, Tian DP. (2011) Association of mitochondrial haplogroup D and risk of esophageal cancer in Taihang Mountain and Chaoshan areas in China. *Mitochondrion*, 11:27-32.
86. Lillie RD, Fulmer HM. (1976) *Histopathologic technic and practical histochemistry*. McGraw-Hill, New York, pp 52-53.
87. Majamaa K, Moilanen JS, Uimonen S, Remes AM, Salmela PI, Kärppä M, Majamaa-Voltti KA, Rusanen H, Sorri M, Peuhkurinen KJ, Hassinen IE. (1998) Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: prevalence of the mutation in an adult population. *Am J Hum Genet*, 63:447-454.
88. Man PY, Griffiths PG, Brown DT, Howell N, Turnbull DM, Chinnery PF. (2003) The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North of England. *Am J Hum Genet*, 72:333-339.
89. Man PY, Turnbull DM, Chinnery PF. Leber hereditary optic neuropathy. (2002) *J Med Genet*, 39:162-169.
90. Mannella CA, Marko M, Buttle K. (1997) Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle. *Trends Biochem Sci*, 22: 37-38.
91. Manwaring N, Jones MM, Wang JJ, Rohtchina E, Howard C, Newall P, Mitchell P, Sue CM. (2007) Mitochondrial DNA haplogroups and age-related hearing loss. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 133:929-933.
92. Marotta R, Chin J, Quigley A, Katsabanis S, Kapsa R, Byrne E, Collins S. (2004) Diagnostic screening of mitochondrial DNA mutations in Australian adults 1990-2001. *Intern Med J*, 34:10-19.

93. Martikainen MH, Hinttala R, Røyttä M, Jääskeläinen S, Wendelin-Saarenhovi M, Parkkola R, Majamaa K. (2012) Progressive external ophthalmoplegia in southwestern Finland: a clinical and genetic study. *Neuroepidemiology*, 38:114-119.
94. Martin-Kleiner I, Pape-Medvidović E, Pavlić-Renar I, Metelko Z, Kusec R, Gabrilovac J, Boranić M. (2004) A pilot study of mitochondrial DNA point mutation A3243G in a sample of Croatian patients having type 2 diabetes mellitus associated with maternal inheritance. *Acta Diabetol*, 41:179-184.
95. Mascialino B, Leinonen M, Meier T. (2012) Meta-analysis of prevalence of Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations in Europe. *Eur J Ophthalmol*, 22:461-465.
96. Mattiazzi M, Vijayvergiya C, Gajewski CD, DeVivo DC, Lenaz G, Wiedmann M, Manfredi G. (2004) The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants. *Hum Mol Genet*, 13:869-879.
97. Mayr JA, Zimmermann FA, Horváth R, Schneider HC, Schoser B, Holinski-Feder E, Czermin B, Freisinger P, Sperl W. (2011) Deficiency of the mitochondrial phosphate carrier presenting as myopathy and cardiomyopathy in a family with three affected children. *Neuromuscul Disord*, 21:803-808.
98. Mihai CM, Catrinou D, Toringhibel M, Stoicescu RM, Hancu A. (2009) De Toni-Debré-Fanconi syndrome in a patient with Kearns-Sayre syndrome: a case report. *J Med Case Rep*, 3:101.
99. Miller C, Saada A, Shaul N, Shabtai N, Ben-Shalom E, Shaag A, Hershkovitz E, Elpeleg O. (2004) Defective mitochondrial translation caused by a ribosomal protein (MRPS16) mutation. *Ann Neurol*, 56:734-738.
100. Molnár MJ, Perényi J, Siska E, Németh G, Nagy Z. (2009) The typical MERRF (A8344G) mutation of the mitochondrial DNA associated with depressive mood disorders. *J Neurol*, 256:264-265.
101. Naïmi M, Bannwarth S, Procaccio V, Pouget J, Desnuelle C, Pellissier JF, Rötig A, Munnich A, Calvas P, Richelme C, Jonveaux P, Castelnovo G, Simon M, Clanet M, Wallace D, Paquis-Flucklinger V. (2006) Molecular

analysis of ANT1, TWINKLE and POLG in patients with multiple deletions or depletion of mitochondrial DNA by a dHPLC-based assay. *Eur J Hum Genet*, 14:917-922.

102. Nardelli C, Labruna G, Liguori R, Mazzaccara C, Ferrigno M, Capobianco V, Pezzuti M, Castaldo G, Farinaro E, Contaldo F, Buono P, Sacchetti L, Pasanisi F. (2013) Haplogroup T is an obesity risk factor: mitochondrial DNA haplotyping in a morbid obese population from southern Italy. *Biomed Res Int*, 2013:631082.
103. Navaglia F, Basso D, Fogar P, Sperti C, Greco E, Zambon CF, Stranges A, Falda A, Pizzi S, Parenti A, Pedrazzoli S, Plebani M. (2006) Mitochondrial DNA D-loop in pancreatic cancer: somatic mutations are epiphenomena while the germline 16519 T variant worsens metabolism and outcome. *Am J Clin Pathol*, 126:593-601.
104. Naviaux RK, Nguyen KV. (2004) POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann Neurol*, 55:706-712.
105. Niaudet P, Heidet L, Munnich A, Schmitz J, Bouissou F, Gubler MC, Rötig A. (1994) Deletion of the mitochondrial DNA in a case of de Toni-Debré-Fanconi syndrome and Pearson syndrome. *Pediatr Nephrol*, 8:164-168.
106. Nikoskelainen EK1, Marttila RJ, Huoponen K, Juvonen V, Lamminen T, Sonninen P, Savontaus ML. (1995) Leber's "plus": neurological abnormalities in patients with Leber's hereditary optic neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 59:160-164.
107. Ohkubo K, Yamano A, Nagashima M, Mori Y, Anzai K, Akehi Y, Nomiyama R, Asano T, Urae A, Ono J. (2001) Mitochondrial gene mutations in the tRNA(Leu(UUR)) region and diabetes: prevalence and clinical phenotypes in Japan. *Clin Chem*, 47:1641-1648.
108. Ohno K, Yamamoto M, Engel AG, Harper CM, Roberts LR, Tan GH, Fatourechhi V. (1996) MELAS- and Kearns-Sayre-type co-mutation [corrected] with myopathy and autoimmune polyendocrinopathy. *Ann Neurol*, 39:761-766.

109. Pál Z, Kiss E, Gál A, Csépany T, Lengyel A, Molnár MJ. (2009) Genetically determined neuropathy (CMT 1A) accompanied by immune dysfunction: a case report. *Inflamm Res*, 58:359-361.
110. Pang CY, Huang CC, Yen MY, Wang EK, Kao KP, Chen SS, Wei YH. (1999) Molecular epidemiologic study of mitochondrial DNA mutations in patients with mitochondrial diseases in Taiwan. *J Formos Med Assoc*, 98:326-334.
111. Pentelényi K, Reményi V, Gál A, Milley GM, Csósz A, Mende BG, Molnár MJ. (2014) Asian-specific mitochondrial genome polymorphism (9-bp deletion) in Hungarian mitochondrial patients. (Közlés folyamatban)
112. Perucca-Lostanlen D, Narbonne H, Hernandez JB, Staccini P, Saunieres A, Paquis-Flucklinger V, Vialettes B, Desnuelle C. (2000) Mitochondrial DNA variations in patients with maternally inherited diabetes and deafness syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*, 277:771-775.
113. Perucca-Lostanlen D, Taylor RW, Narbonne H, Mousson de Camaret B, Hayes CM, Saunieres A, Paquis-Flucklinger V, Turnbull DM, Vialettes B, Desnuelle C. (2002) Molecular and functional effects of the T14709C point mutation in the mitochondrial DNA of a patient with maternally inherited diabetes and deafness. *Biochim Biophys Acta*, 1588:210-216.
114. Petrik J. (2001) Microarray technology: the future of blood testing? *Vox Sang*, 80:1-11.
115. Poulton J, Deadman ME, Gardiner RM. (1989) Duplications of mitochondrial DNA in mitochondrial myopathy. *Lancet*, 1:236-240.
116. Pronicka E, Weglewska-Jurkiewicz A, Pronicki M, Sykut-Cegielska J, Kowalski P, Pajdowska M, Jankowska I, Kotulska K, Kalicinski P, Jakobkiewicz-Banecka J, Wegrzyn G. (2011) Drug-resistant epilepsy and fulminant valproate liver toxicity. Alpers-Huttenlocher syndrome in two children confirmed post mortem by identification of p.W748S mutation in POLG gene. *Med Sci Monit*, 17:203-209.
117. Quintanilla RA, Jin YN, von Bernhardi R, Johnson GVW. (2013) Mitochondrial permeability transition pore induces mitochondria injury in Huntington disease. *Molecular Neurodegeneration*, 8:45.

118. Rea I, McNerlan SE, Archbold GP, Middleton D, Curran MD, Young IS, Ross OA. (2013) Mitochondrial J haplogroup is associated with lower blood pressure and anti-oxidant status: findings in octo/nonagenarians from the BELFAST Study. *AGE*, 35:1445-1456.
119. Reményi V, Inczedy-Farkas G, Gál A, Bereznai B, Pál Z, Karcagi V, Mechler F, Molnár M.J. (2014) The modifying effect a PMP22 deletion in a family with Charcot-Marie-Tooth type 1 neuropathy due to an EGR2 mutation. *Ideggyogy Sz*, [Epub ahead of print]
120. Reményi V, Inczedy-Farkas G, Komlósi K, Horváth R, Maász A, Janicssek I, Pentelényi K, Gál A, Karcagi V, Melegh B, Molnár MJ. (2014) Retrospective assessment of the most common mitochondrial DNA mutations in a large Hungarian cohort of suspect mitochondrial cases. *Mitochondrial DNA*, [Epub ahead of print]
121. Reményi V, Inczedy-Farkas G, Hársfalvi V, Pentelényi K, Gál A, Somogyi A, Molnár MJ. (2014) Individualized treatment with metformin to avoid lactic acidosis. (*Közlés folyamatban*)
122. Remes AM, Kärppä M, Moilanen JS, Rusanen H, Hassinen IE, Majamaa K, Uimonen S, Sorri M, Salmela PI, Karvonen SL. (2003) Epidemiology of the mitochondrial DNA 8344A>G mutation for the myoclonus epilepsy and ragged red fibres (MERRF) syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 74:1158-1159.
123. Remes AM, Majamaa-Voltti K, Kärppä M, Moilanen JS, Uimonen S, Helander H, Rusanen, H, Salmela PI, Sorri M, Hassinen IE, Majamaa K. (2005) Prevalence of large-scale mitochondrial DNA deletions in an adult Finnish population. *Neurology*, 64:976-981.
124. Riley LG, Cooper S, Hickey P, Rudinger-Thirion J, 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 anemia--MLASA syndrome. *Am J Hum Genet*, 87:52-59.
125. Rivera H, Merinero B, Martinez-Pardo M, Arroyo I, Ruiz-Sala P, Bornstein B, Serra-Suhe C, Gallardo E, Marti R, Moran MJ, Ugalde C,

- Perez-Jurado LA, Andreu AL, Garesse R, Ugarte M, Arenas J, Martin MA. (2010) Marked mitochondrial DNA depletion associated with a novel SUCLG1 gene mutation resulting in lethal neonatal acidosis, multi-organ failure, and interrupted aortic arch. *Mitochondrion*, 10:362-368.
126. Rodríguez-Hernández M, Hirano M, Arrieta T, Lestayo Z, Estrada R, Santiesteban R, Guerra-Badía R, Galarraga J, Gutierrez J, Hechevarría E, Andreu A, Montoya J, DiMauro S. (2000) Molecular studies in Cuban patients with progressive external ophthalmoplegia. *Rev Neurol*, 30:1001-1005.
127. Rohan TE, Wong LJ, Wang T, Haines J, Kabat GC. (2010) Do alterations in mitochondrial DNA play a role in breast carcinogenesis? *J Oncol*, 2010:604304.
128. Rollins B, Martin MV, Sequeira PA, Moon EA, Morgan LZ, Watson SJ, Schatzberg A, Akil H, Myers RM, Jones EG, Wallace DC, Bunney WE, Vawter MP. (2009) Mitochondrial variants in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *PLoS One*, 4:e4913.
129. Sadikovic B, Wang J, El-Hattab A, Landsverk M, Douglas G, Brundage EK, Craigen WJ, Schmitt ES, Wong LJ. (2010) Sequence homology at the breakpoint and clinical phenotype of mitochondrial DNA deletion syndromes. *PLoS One*, 5:e15687.
130. Salles JE, Kalinin LB, Ferreira SR, Kasamatsu T, Moisés RS. (2007) Diabetes mellitus associated with the mitochondrial mutation A3243G: frequency and clinical presentation. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 51:559-565.
131. Salpeter SR, Greyber E, Pasternak GA, Salpeter EE. (2003) Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*, 163:2594-2602.
132. Santorelli FM, Mak SC, Vazquez-Memije ME, Shanske S, Kranz-Eble P, Jain KD, Bluestone DL, De Vivo DC, DiMauro S. (1996) Clinical heterogeneity associated with the mitochondrial DNA T8993C point mutation. *Pediatr Res*, 39:914-917.

133. Santoro A, Balbi V, Balducci E, Pirazzini C, Rosini F, Tavano F, Achilli A, Siviero P, Minicuci N, Bellavista E, Mishto M, Salvioli S, Marchegiani F, Cardelli M, Olivieri F, Nacmias B, Chiamenti AM, Benussi L, Ghidoni R, Rose G, Gabelli C, Binetti G, Sorbi S, Crepaldi G, Passarino G, Torroni A, Franceschi C. (2009) Evidence for sub-haplogroup h5 of mitochondrial DNA as a risk factor for late onset Alzheimer's disease. *PLoS One*, 5:e12037.
134. Scaglia F, Towbin JA, Craigen WJ, Belmont JW, Smith EO, Neish SR, Ware SM, Hunter JV, Fernbach SD, Vladutiu GD, Wong LJ, Vogel H. (2004) Clinical spectrum, morbidity, and mortality in 113 pediatric patients with mitochondrial disease. *Pediatrics*, 114:925-931.
135. Schaefer AM, McFarland R, Blakely EL, He L, Whittaker RG, Taylor RW, Chinnery PF, Turnbull DM. (2008) Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann Neurol*, 63:35-39.
136. Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, Chinnery PF. (2004) The epidemiology of mitochondrial disorders--past, present and future. *Biochim Biophys Acta*, 1659: 115-120.
137. Scheper GC, van der Klok T, van Andel RJ, van Berkel CG, Sissler M, Smet J, Muravina TI, Serkov SV, Uziel G, Bugiani M, Schiffmann R, Krägeloh-Mann I, Smeitink JA, Florentz C, Van Coster R, Pronk JC, van der Knaap MS. (2007) Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. *Nat Genet*, 39:534-539.
138. Schnopp NM, Kösel S, Egensperger R, Graeber MB. (1996) Regional heterogeneity of mtDNA heteroplasmy in parkinsonian brain. *Clin Neuropathol*, 15:348-352.
139. Schröder JM, Molnár M. (1997) Mitochondrial abnormalities and peripheral neuropathy in inflammatory myopathy, especially inclusion body myositis. *Mol Cell Biochem*, 174:277-281.
140. Schwartz M, Vissing J. (2003) New patterns of inheritance in mitochondrial disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 310: 247-251.
141. Servidei S, Zeviani M, Manfredi G, Ricci E, Silvestri G, Bertini E,

- Gellera C, Di Mauro S, Di Donato S, Tonali P. (1991) 'Dominantly inherited mitochondrial myopathy with multiple deletions of mitochondrial DNA: clinical, morphologic, and biochemical studies. *Neurology*, 41:1053-1059.
142. Shoffner JM, Brown MD, Torroni A, Lott MT, Cabell MF, Mirra SS, Beal MF, Yang CC, Gearing M, Salvo R. (1993) Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer disease and Parkinson disease patients. *Genomics*, 17:171-184.
143. Shoshan-Barmatz V, Gincel D. (2003) The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. *Cell Biochem Biophys*, 39: 279-292.
144. Shoubridge E, Molnár MJ (2002). Oxidative phosphorylation defects in structural and molecular basis of skeletal muscle diseases. *International Society of Neuropathology and World Federation of Neurology*, Ed. G Karpati; 202 -213.
145. Shoubridge EA. (2000) Mitochondrial DNA segregation in the developing embryo. *Hum Reprod*, 15:229-234.
146. Skladal D, Halliday J, Thorburn DR. (2003) Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain*, 126:1905-1912.
147. Spinazzola A, Zeviani M. (2005) Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signaling. *Gene*, 354:162-168.
148. Spinazzola A, Zeviani M. (2007) Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic communication. *Biosci Rep*, 27:39-51.
149. Sternberg D, Chatzoglou E, Laforêt P, Fayet G, Jardel C, Blondy P, Fardeau M, Amselem S, Eymard B, Lombès A. (2001) Mitochondrial DNA transfer RNA gene sequence variations in patients with mitochondrial disorders. *Brain*, 124:984-994.
150. Stewart JD, Horvath R, Baruffini E, Ferrero I, Bulst S, Watkins PB, Fontana RJ, Day CP, Chinnery PF. (2010) Polymerase γ gene POLG determines the risk of sodium valproate-induced liver toxicity. *Hepatology*, 52:1791-1796.

151. Taanman JW, Daras M, Albrecht J, Davie CA, Mallam EA, Muddle JR, Weatherall M, Warner TT, Schapira AH, Ginsberg L. (2009) Characterization of a novel TYMP splice site mutation associated with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *Neuromuscul Disord*, 19:151-154.
152. Tan DJ, Bai RK, Wong LJ. (2002) Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer. *Cancer Res*, 62:972-976.
153. Tang S, Dimberg EL, Milone M, Wong LJ. (2012) Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE)-like phenotype: an expanded clinical spectrum of POLG1 mutations. *J Neurol*, 259:862-868.
154. 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*, 192:124-128.
155. Taylor RW, Chinnery PF, Bates MJ, Jackson MJ, Johnson MA, Andrews RM, Turnbull DM. (1998) A novel mitochondrial DNA point mutation in the tRNA(Ile) gene: studies in a patient presenting with chronic progressive external ophthalmoplegia and multiple sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 243:47-51.
156. Taylor RW, Turnbull DM. (2005) Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet*, 6:389-402.
157. Tońska K, Piekutowska-Abramczuk D, Kaliszewska M, Kowalski P, Tańska A, Bartnik E, Pronicka E, Krajewska-Walasek M. (2012) Molecular investigations of mitochondrial deletions: evaluating the usefulness of different genetic tests. *Gene*, 506:161-165.
158. Udar N, Atilano SR, Memarzadeh M, Boyer DS, Chwa M, Lu S, Maguen B, Langberg J, Coskun P, Wallace DC, Nesburn AB, Khatibi N, Hertzog D, Le K, Hwang D, Kenney MC. (2009) Mitochondrial DNA haplogroups associated with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50:2966-2974.
159. van Berge L, Hamilton EM, Linnankivi T, Uziel G, Steenweg ME, Isohanni P, Wolf NI, Krägeloh-Mann I, Brautaset NJ, Andrews PI, de Jong BA, al Ghamdi M, van Wieringen WN, Tannous BA, Hulleman E,

- Würdinger T, van Berkel CG, Polder E, Abbink TE, Struys EA, Scheper GC, van der Knaap MS; LBSL Research Group. (2014) Leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and lactate elevation: clinical and genetic characterization and target for therapy. *Brain*,137:1019-1029.
160. van den Ouweland JM, Lemkes HH, Ruitenbeek W, Sandkuijl LA, de Vijlder MF, Struyvenberg PA, van de Kamp JJ, Maassen JA. (1992) Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet*, 1:368-371.
161. 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*, 28:211-212.
162. van Oven M, Kayser M. (2009) Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat*, 30:386-394.
163. Vastagh I, Gál A, Reményi V, Semjén J, Lukács T, Valikovics A, Molnár MJ. (2011) A8344G mutation of the mitochondrial DNA with typical mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes syndrome. *Ideggyogy Sz*, 64:399-403.
164. 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*, 242:1427-1430.
165. Wallace DC. (1995) 1994 William Allan Award Address. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging. *Am J Hum Genet*, 57:201-223.
166. Wang S, Wu S, Zheng T, Yang Z, Ma X, Jia W, Xiang K. (2013) Mitochondrial DNA mutations in diabetes mellitus patients in Chinese Han population. *Gene*, 531:472-475
167. Wang ZX, Luan XH, Zhang Y, Yang YL, Qi Y, Bu DF, Yuan Y (2008) Mitochondrial DNA mutation analysis in 97 Chinese patients with mitochondrial cephalomyopathy. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 88:3254-3256.
168. Wei Q, Lu Y, Zhang Y, Chen Z, Xing G, Cao X. (2009) Mutation analysis of mitochondrial 12S rRNA gene G709A in a maternally inherited

pedigree with non-syndromic deafness. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 26:610-614.

169. Weraarpachai W, Antonicka H, Sasarman F, Seeger J, Schrank B, Kolesar JE, Lochmüller H, Chevrette M, Kaufman BA, Horvath R, Shoubridge EA. (2009) Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome. *Nat Genet*, 41:833-837.
170. Wong LJ, Naviaux RK, Brunetti-Pierri N, Zhang Q, Schmitt ES, Truong C, Milone M, Cohen BH, Wical B, Ganesh J, Basinger AA, Burton BK, Swoboda K, Gilbert DL, Vanderver A, Saneto RP, Maranda B, Arnold G, Abdenur JE, Waters PJ, Copeland WC. (2008) Molecular and clinical genetics of mitochondrial diseases due to POLG mutations. *Hum Mutat*, 29:150-172.
171. Wong LJC. (2010) Molecular genetics of mitochondrial disorders. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 16:154-162.
172. Zaki EA, Freilinger T, Klopstock T, Baldwin EE, Heisner KRU, Adams K, Dichgans M, Wagler S, Boles RG. (2009) Two common mitochondrial DNA polymorphisms are highly associated with migraine headache and cyclic vomiting syndrome. *Cephalalgia*, 29:719–728.
173. Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, Rowland LP. (1988) Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology*, 38:1339-1346.
174. Zhang Y, Yang YL, Sun F, Cai X, Qian N, Yuan Y, Wang ZX, Qi Y, Xiao JX, Wang XY, Zhang YH, Jiang YW, Qin J, Wu XR. (2007) Clinical and molecular survey in 124 Chinese patients with Leigh or Leigh-like syndrome. *J Inherit Metab Dis*, 30:265.

Honlapok

www.affymetrix.com

www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi ; NC_012920.1

www.mitochondrialncg.nhs.uk/pa_genetics.html

www.mitomap.org

www.mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/MutationsLHON

mtdnatest.com

molneur.webdokter.hu

www.orpha.net

www.phylotree.org

www.roperld.com/mtdna.htm

www.tools.niehs.nih.gov/polg/

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1. A disszertáció témájához kapcsolódó publikációk listája

1. **Reményi V**, Inczedy-Farkas G, Komlósi K, Horváth R, Maász A, Janicsek I, Pentelényi K, Gál A, Karcagi V, Melegh B, Molnár MJ. (2014) Retrospective assessment of the most common mitochondrial DNA mutations in a large Hungarian cohort of suspect mitochondrial cases. *Mitochondrial DNA*, [Epub ahead of print] **IF: 1.705****
2. Inczedy-Farkas G, Trampush JW, Perczel-Forintos D, Beech D, Andrejkovics M, Varga Z, **Reményi V**, Bereznai B, Gál A, Molnár MJ. (2014) Mitochondrial DNA Mutations and Cognition: A Case-Series Report *Arch Clin Neuropsychol*, 29:315-321. **IF: 2.000****
3. Inczedy-Farkas G, **Reményi V**, Gál A, Varga Z, Balla P, Mészáros A, Bereznai B, Molnár MJ. (2012) Psychiatric symptoms of patients with primary mitochondrial DNA disorders. *Behav Brain Funct*, 8:9. **IF: 2.789**
4. Vastagh I, Gál A, **Reményi V**, Semjén J, Lukács T, Valikovics A, Molnár MJ. (2011) A8344G mutation of the mitochondrial DNA with typical mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke like episode syndrome. *Ideggyogy Sz*, 64:399-403. **IF: 0.488**
5. Inczedy-Farkas G, **Reményi V**, Mészáros A, Gál A, Blasko G, Bereznai B, Molnár MJ. (2011) MELAS syndrome mimicking somatoform disorder. *Cent Eur J Med*, 6:758-761. **IF: 0.312**
6. Gál A, Komlósi K, Maász A, Pentelényi K, **Reményi V**, Óváry Cs, Valikovics A, Diószeghy P, Bereczki D, Melegh B, Molnár MJ. (2010) Analysis of mtDNA A3243G mutation frequency in Hungary. *Cent Eur J Med*, 5:322-328. **IF: 0,244**
7. Gál A, Pentelényi K, **Reményi V**, Pál Zs, Csányi B, Tömöry G, Raskó I, Molnár MJ. (2010) Novel heteroplasmic mutation in the anticodon-stem of mitochondrial tRNA^{Lys} associated with dystonia and stroke-like episodes *Acta Neurol Scand*, 122:252-256. **IF: 2.153**
8. Pentelényi K, **Reményi V**, Gál A, Milley GM, Csósz A, Mende BG, Molnár MJ. (2014) Asian-specific mitochondrial genome polymorphism (9-bp deletion) in Hungarian mitochondrial patients. (Közlés folyamatban)

9. **Reményi V**, Inczédy-Farkas G, Hársfalvi V, Pentelényi K, Gál A, Somogyi A, Molnár MJ. (2014) Individualized treatment with metformin to avoid lactic acidosis. (Közlés folyamatban)

11.2. A disszertáció témájához kapcsolódó idézhető absztraktok listája

1. **Reményi V**, Inczédy-Farkas G, Kalmár T, Spisák S, Bereznai B, Gál A, Raskó I, Molnár MJ. Potentials and pitfalls of Mitochip v.2.0 in the diagnostic of mitochondrial encephalomyopathies, European Humangenetics Conference 2011, Amsterdam RAI, The Netherlands, May 28 - 31, 2011, European Journal of Human Genetics, 19(2):373.
2. **Reményi V**, Inczédy-Farkas G, Kalmár T, Spisák F, Bereznai B, Gál A, Raskó I, Molnár MJ. The use of Mitochip V.2.0. in the diagnosis of mitochondrial encephalomyopathies, 15th Congress of the European Federation of Neurological Societies 2011 Budapest, European Journal of Neurology 18(2):559
3. Inczédy-Farkas G, **Reményi V**, Varga Zs, Gál A, Bereznai B, Molnár MJ. Psychiatric Symptoms occurring with primary mutations of the mitochondrial DNA, 15th Congress of the European Federation of Neurological Societies 2011 Budapest, European Journal of Neurology 18(2):559
4. **Reményi V**, Inczédy-Farkas G, Kalmár T, Spisák S, Bereznai B, Gál A, Raskó I, Molnár MJ. The potentials and pitfalls of genetic resequencing in mitochondrial encephalomyopathies. 7th PhD Symposium Young Scientist Association of the Medical University of Vienna, June 15-16th 2011, Vienna, Austria
5. **Reményi V**, Kékesi A, Pentelényi K, Milley GM, Gál A, Molnár MJ. Analysis of the mitochondrial DNA and it's mutational „hot spots” in patients with mitochondrial disease. XXI. International Semmelweis Symposium 2012: Principal Questions of the Genomic Medicine: Prediction, Prevention and Personalized Treatment, Semmelweis University, Budapest, Hungary November 9-10, 2012.
6. Kékesi A, Gál A, **Reményi V**, Rácz A, Molnár MJ. POLG1 gene analysis in patients with multiple mtDNA deletion. XXI. International Semmelweis

Symposium 2012: Principal Questions of the Genomic Medicine: Prediction, Prevention and Personalized Treatment, Semmelweis University, Budapest, Hungary November 9-10, 2012.

7. Pentelényi K, **Reményi V**, Tömöry G, Csányi B, Gál A, Rasó I, Molnár MJ. Asian-specific mitochondrial genom polymorphism (9 bp deletion) in the Hungarian population. XXI. International Semmelweis Symposium 2012: Principal Questions of the Genomic Medicine: Prediction, Prevention and Personalized Treatment, Semmelweis University, Budapest, Hungary November 9-10, 2012.
8. Pentelényi K, **Reményi V**, Tömöry G, Csányi B, Gál A, Raskó I, Molnár MJ. Asian-specific mitochondrial genom polymorphism (9 bp deletion) in the Hungarian population. European Humangenetics Conference 2013. June 8-11, Paris, France
9. Kékesi A, **Reményi V**, Pentelényi V, Hársfalvi V, Gál A, Molnár MJ. The frequency of POLG1 gene mutations in Hungarian patients with mitochondrial disorders and the analysis of phenoty-genotype correlarion. European Humangenetics Conference 2014. May 31- June 3, Milan, Italy

11.3. A disszertáció témájához nem kapcsolódó publikációk listája

1. Gál A, Pentelényi K, **Reményi V**, Wappler EA, Sáfrány G, Skopál 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*, 55:349-353. **IF: 3.541**
2. Pál Zs, Gál A, **Reményi V**, Tordai A, Molnár MJ. (2009) Oestrogen receptor alpha gene intronic polymorphisms and autoimmune myasthenia gravis in Caucasian women. *Neuromuscul Disord*, 19:822-824. **IF: 2.977**
3. **Reményi V**, Pentelényi K, Valikovics A, Mede K, Szegedi N, Szilágyi G, Óváry Cs, Nagy Z, Gál A, Molnár MJ. (2010) Thrombocytamembrán-glikoproteinreceptor polimorfizmusainak vizsgálata a fiatakkori ischaemiás stroke szindróma hátterében. *Vaszkuláris Neurológia*, 2:27-32.

4. Nyíró G, Inczédy-Farkas G, **Reményi V**, Gál A, Pál Zs, Molnár M J. (2012) The effect of the CYP 2C19*2 polymorphism on stroke care. *Acta Physiol Hung*, 99:33-39. **IF: 0.882**
5. **Reményi V**, Inczédy-Farkas G, Gál A, Bereznai B, Pál Z, Karcagi V, Mechler F, Molnár M.J. (2014) The modifying effect a PMP22 deletion in a family with Charcot-Marie-Tooth type 1 neuropathy due to an EGR2 mutation. *Ideggyogy Sz*, [Epub ahead of print] **IF: 0.348**

11.4. A disszertáció témájához nem kapcsolódó idézhető absztraktok listája

1. Gál A, Komlósi K, Maász A, **Reményi V**, Pentelényi K, Óváry Cs, Valikovics A, Diószeghy P, Bereczki D, Melegh B, Molnár MJ. The molecular epidemiology and phenotype of the mtDNA A3243G mutation in Hungary. 2009 *European Journal of Neurology*. 16(3):289.
2. Molnár MJ, Pentelényi K, **Reményi V**, Pál Z, Bereznai B, Gál A. (2009) The clinical importance of variability of tRNALYs and its neighbouring mtDNA sequence. *European Journal of Human Genetics*. 2009 17(2):69-70.
3. Pál Z, Pentelényi K, Gál A, **Reményi V**, Rolfs A, Molnár MJ. Phenotype-Genotype Correlation of Four Novel Senataxin Gene Mutations in Hungarian Patients. *Neurology* 2010 74(2):A265.
4. **Reményi V**, Szabó A, Gál A, Mechler F, Báthori Gy, Molnár MJ. The coexistence of the PMP22 gene deletion and the EGR2 gene mutation in background of patients with CMT 1/a hereditary sensomotor neuropathy. *European Journal of Human Genetics*. 2010 18(1):336.
5. **Reményi V**, Miltenberger-Miltényi G, Nyíró G, Kovács T, Molnár MJ. Double hit for the neurons: the coexistence of a novel presenilin 2 mutation and a huntingtin gene CAG repeat expansion. *Journal of Neurology* 2012 259(1):S183.
6. **Reményi V**, Miltenberger-Miltényi G, Nyíró G, Kovács T, Molnár MJ. The coexistence of Huntington's disease and Alzheimer's disease. 8th PhD Symposium Young Scientist Association of the Medical University of Vienna, 13-14th of June 2012, Vienna, Austria

7. Balicza P, Bereznai B, Takáts A, Dibó Gy, Klivényi P, Hidas E, Aschermann Zs, Balogh I, Gál A, Kékesi A, Milley Gy, **Reményi V**, M.J. Molár. Genetic basis and phenotype of early onset and familial Parkinson's disease in the Hungarian population. XXI. International Semmelweis Symposium 2012: Principal Questions of the Genomic Medicine: Prediction, Prevention and Personalized Treatment, Semmelweis University, Budapest, Hungary November 9-10, 2012.
8. Inczédy-Farkas G, **Reményi V**, Gál A, Udvardy- Mészáros Á, Varga Zs, Molnár MJ. Mitochondrial psychiatry: clinical practice supports the hypothesis. XXI. International Semmelweis Symposium 2012: Principal Questions of the Genomic Medicine: Prediction, Prevention and Personalized Treatment, Semmelweis University, Budapest, Hungary November 9-10, 2012.

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek Prof. Dr. Molnár Mária Juditnak, hogy éveken át irányította és segítette kutatómunkámat a molekuláris genetikai útvesztőiben, valamint, hogy lehetővé tette sikeres doktori munkám feltételeit, elkészültét.

Szeretném megköszönni a sok segítséget és támogatást a Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézet összes munkatársának legfőképp: Báthori Györgyinek, Magyarósi Szilviának, Sáry Mónikának, Strallendorrf Mettának, Gál Anikónak, Kékesi Annának, Hársfalvi Viviennek, Markó Mariannak. Külön köszönet illeti Dr. Inczédy-Farkas Gabriellát és Pentelényi Klárát, akik kreatív ötleteikkel segítették PhD munkám megírását.

A MitoChip microarray vizsgálatokban Dr. Spisák Sándornak köszönöm a technikai segítséget.

Az epidemiológiai vizsgálatokban köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dr. Melegh Bélának és munkacsoportjának, valamint Dr. Karcagi Veronikának és Dr. Horváth Ritának.

A belgyógyászati vonatkozású tanácsokért Dr. Somogyi Anikónak fejezem ki köszönetemet.

A haplotipizálásban nyújtott segítségért Dr. Raskó Istvánnak és munkacsoportjának, valamint Dr. Mende Balázs Gusztávnak és munkatársainak.

Köszönöm a betegeknek a támogató együttműködést.

Végül, de nem utolsósorban szüleimnek és Nagypapámnak tartozom hálával a szeretetükért, támogatásukért és kitartásukért.