

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

## **BEVEZETÉS**

### **A mitochondrium**

A mitochondrium az eukarióta szervezet kis „energiatermelő” gépezete. Eredetét, valamint azt, hogy hogyan válhatott az eukarióta sejt egyik fontos kettős membránú sejszervecskéjévé, az endoszimbionta-elmélettel magyarázzák.

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

### **A mitochondriumok genetikája**

A humán mitochondriumok kettősszálú cirkuláris DNS (mtDNS) molekulája 16.569 bp-ból áll, 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. A mitochondriális genom számos tulajdonságában különbözik a nukleáris genomtól.

Az mtDNS sajátos jellemzői: *maternális öröklődés*, kivétel azon ritka esetek, ahol paternális öröklődésről számoltak be; *polyplazmia*: minden sejtben az mtDNS több, 100-1000 kópiában fordul elő. A kóros és egészséges mtDNS együttes előfordulását nevezzük *heteroplazmiának*; *küszöb - (threshold) effektus*: a heteroplazmia arányának egy bizonyos mennyiséget el kell érnie ahhoz, hogy a sejt funkciója károsodjon; *mitotikus szegregációs és bottleneck effektus*: a vad és a mutáns mtDNS molekulák a sejtosztódás során az egyes leánysejtekbe véletlenszerűen jutnak be.

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

### **Mitochondriális betegségek**

A mitochondriális betegségek (MB) a mitochondriumok funkciójának primer károsodása miatt jönnek létre. Az MB-ek hátterében mind a mitochondriális, mind a nukleáris genom rendellenessége állhat. A tünetek nagyon heterogének, különösen mtDNS betegségek esetén. Az mtDNS betegségek jellegzetessége, hogy a mitochondriális genom ugyanazon mutációjához különböző kórképek is társulhatnak.

Egy klinikai tünet viszont számos mtDNS mutációval asszociálhat. 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 létrejöttéért felelősek. Az mtDNS asszociált kórképek általában egyszerre több szervet, szervrendszert is érintenek.

Az MB-ek prevalenciája a tüneteket mutató betegek esetében 6.57-9.2 / 100.000-re becsülték.

Az mtDNS-ben több mint 200 patogén mutációt és számos polimorfizmust (SNP) azonosítottak, melyek változatos klinikai tüneteket, szindrómákat eredményezhetnek. A patogén szubsztitúciók eloszlása nem egyenletes a cirkuláris molekulában, vannak ún. mutációs „hot spot”-ok.

A leggyakoribb mitochondriális genom asszociált kórképek: MELAS (Mitochondriális Encephalopathia Laktacidózis Stroke-szerű tünetekkel), MERRF (Myoclonus Epilepszia Ragged-Red rostokkal), NARP (Neuropathia Ataxia és Retinitis Pigmentosa), LHON (Leber-féle optikus neuropátia), PEO (Progresszív Ophthalmoplegia Externa).

### **Intergenomiális kommunikáció**

A mitochondriális gének által kódolt fehérjéken kívül a nukleáris genom kódolja a megfelelő működéshez szükséges mitochondriális proteomot, ebben kb. 1500 gén vesz részt. Ezen génekben történő defektusok okozzák a két genom közti intergenomiális kommunikáció zavarát, mely megjelenhet az mtDNS mennyiségi eltérésében: mitochondriális depléciós szindróma (MDS), mely súlyos csecsemőkori betegségeként nyilvánul meg; valamint mtDNS minőségi szintjén: az mtDNS multiplex deléciók megjelenésével, az ezzel leggyakrabban összefüggő tünet a PEO.

Az mtDNS biogenezisében egyik kulcsszerepet játszó gén a *POLG1* (polimeráz gamma), melynek defektusai egyes és multiplex deléciókat is okozhatnak az mtDNS-ben. A *POLG1* mutációk által okozott betegségek legtöbbször autoszómális recesszíven öröklődnek, legjellegzetesebb betegségek pl.: az Alpers-Huttenlocher szindróma vagy a krónikus ophthalmoplegia externa. Farmakogenomikailag jelentősek a *POLG1* egyes szubsztitúciói (L304R, A467T, G588D, Q879H, T885S, E1143G, Q1236H), melyeket összefüggésbe hozták a valproát (VPA) okozta májkárosodással.

A mitochondriális aszpartil-tRNS szintetáz enzim kódolásáért felelős a *DARS2* gén egy nem oly régóta tanulmányozott intergenomiális kommunikáció résztvevő, melynek mutációi az autoszómális recesszíven öröklődő LBSL (agytörzsi és gerincvelői érintettséggel, emelkedett laktát szinttel járó leukoencephalopathia) háttérében állnak.

### **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. Ezen hipervariábilis szakasz bázissorrendje meghatározza, hogy mely mitochondriális haplocsoportba tartozunk.

A molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával ma 8 superhaplocsoportot és ezeken belül 25 haplocsoportot különböztetünk meg. A mai magyarok többsége az R superhaplocsoportba tartozik.

## 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

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### Vizsgált betegek

Összesen 1568, klinikai tünetek és laboreredmények alapján feltételezett mitochondriális beteg mtDNS-ét vizsgáltuk, melyek közül 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 bocsátotta 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 (595 nő, 487 férfi; átlag életkor:  $38.6 \pm 18.2$  év) álló kohort, akiknél az mtDNS hot spot régiók (az m.3243 A>G, m.8344 A>G, m.8993 T>C, m.8993 T>G patogén mutációk), valamint az egyes és multiplex deléciók analízise zajlott, míg a második alcsoport 486 beteget (248 nő, 238 férfi; átlag életkor:  $34.91 \pm 17.5$  év) foglal magába, akiknél a 3 primer LHON mutációk (m.3460 G>A, m.11778 G>A, m.14484 T>C) detektálása történt. 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.

A LHON-ra vizsgált 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.

### DNS izolálás és tárolás (Biobank)

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 ill. Tissue kittel (Qiagen, Valencia, CA, USA), végeztük, a gyártó utasításai szerint.

A kinyert DNS minták  $-20^{\circ}\text{C}$ -ra, hosszú távú tárolásra  $-70^{\circ}\text{C}$ -os ultra mélyhűtőbe kerültek. A vizsgált betegek biológiai mintáit és a hozzá tartozó adatokat a NEPSYBANK-ban, egy betegség-alapú biobankban tároljuk.

### **Myopathológiai vizsgálatok**

Izomszöveti vizsgálat 352 esetben történt. A „ragged red” (vörös) rostokat Gömöri trikróm festéssel, míg a „ragged blue” (kék) rostokat módosított szukcinát dehidrogenáz (SDH) festéssel azonosítottuk. A COX negatív rostok, valamint a COX aktivitás egyenetlenségek detektálására citokrom-oxidáz (COX) festést alkalmaztunk.

### **PCR-RFLP vizsgálat**

Az mtDNS hot spot-jaiban lokalizálódó leggyakoribb patogén pontmutációkat (m. 3243 A>G (MELAS); m. 8344 A>G (MERRF); m. 8993 T>C,G (NARP); m. 3460 A>G; m. 11778 A>G, m.14484 C>T (LHON)) PCR-RFLP módszer segítségével vizsgáltuk. A PCR reakciót követően PCR-termékeket, az adott mutációra specifikus restrikciós endonukleázokkal (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) emésztettük. (m. 3243 A>G: HaeIII; m. 8344 A>G: BanII; m. 8993 T>C,G: HpaII, AvaI; m. 3460 A>G: BsaHI; m. 11778 A>G: SfaNI; m.14484 T>C: BccI ). Az így kapott hasított band-ek nagyságát és a heteroplazmia arányokat Quantity One Software (Bio-Rad Corp. Hertfordshire, UK) segítségével határoztuk meg.

### **Az mtDNS deléciók vizsgálata**

Az mtDNS egyes és multiplex deléciók meghatározására long PCR metodikát alkalmaztunk, melynél a szintézist két időtartamon végeztük (3 és 8 min). A kapott termékek 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.

### **Az mtDNS bidirekcionális szekvenálása**

A teljes mtDNS vizsgálatát, illetve a microarray által felmerült mutációk validálását bidirekcionális szekvenálással végeztük. 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](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi); NC\_012920.1).

### **A teljes mtDNS reszekvenálása (MitoChip v2.0)**

A teljes mtDNS vizsgálatához az GeneChip® Human Mitochondrial Resequencing Array v2.0 (MitoChip v2.0) egycsatornás microarray-t (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) használtuk. A kapott eredményeket Sequence Analysis Software 4.1 (GSEQ 4.1) szoftver segítségével elemeztük, mely az adatokat bázissorrendre, valamint szekvenogramokra fordította, amelyeket a humán mitochondriális referencia genomhoz illesztettünk ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)). A feltételezett eltéréseket Sanger szekvenálással validáltuk.

### **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](http://phylotree.org) honlap segítségével.

### **Statisztika**

Az mtDNS leggyakoribb mutációinak előfordulási gyakoriságának (frekvencia) értékeléséhez a patogén mutációt hordozó betegek (beleértve az index betegek 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.



## **EREDMÉNYEK**

### **Epidemiológiai vizsgálatok**

A mutációs „hot spot”-okban lokalizálódó leggyakoribb mtDNS mutációkat és mtDNS deléciókat összesen 377 esetben (24.04%) találtuk meg az 1568 magyar beteg vizsgálata során. Az mtDNS tRNS-ekben elhelyezkedő m.3243 A>G (MELAS) mutációt 16 index betegben és további 13 családtagban találtuk meg 2.68%-os frekvencia értékkel (95% CI: 0.0219 – 0.0317); míg az m.8344 A>G (MERRF) 8 index betegnél és 5 családtagnál detektáltuk, frekvencia: 1.20% (95 % CI: 0.0087 – 0.0153). A proteinkódoló génekben lokalizálódó mutációkat a következő előfordulási gyakoriságokkal találtuk meg: m.8993 T>C, G (NARP, MILS) a két mutációt 5 beteg esetében 0.46%-os frekvencia értékkel (95% CI: 0.0025 – 0.0067); a három elsődleges LHON mutációt m.3460G>A, m.11778G>A, m.14484T>C, a 486 betegből összesen 81 esetben detektáltuk a frekvencia értéke: 16.68%, a (95% CI: 0.1501 – 0.1839).

Az mtDNS egyes és multiplex deléciókat az 1082 betegből összesen 250 esetben találtuk meg (23%). Az 1082 beteg közül 68 esetben rendelkezünk vér és izomszövettel is. Ezen 68 esetből 6 betegnél vérben és izomszövetben is azonosítottuk az egyes mtDNS deléciót, míg 31 esetben a vérből izolált mtDNS analízise negatív lett, viszont izomszövetben ott volt a deléció (16 esetben „common” deléció; 15 esetben multiplex deléció).

### **Genotípus-fenotípus korreláció**

Az m.3243 A>G mutációval leggyakrabban asszociáló klinikai tüneteknek a stroke és a stroke-szerű epizódok, azon betegeink között, akik ezt a mutációt hordozták: a vezető szimptomák a neuropszichiátriai tünetek (depresszió, pszichózis, mentális retardáció), valamint a sensorineuralis hypacusis és a diabetes mellitus volt. Az m.8344 A>G mutáció prezentációs tünete a myoclonus epilepszia, mely a hordozó betegek közül csak egy családnál volt jelen, a leggyakoribb tünetek a kohortunkban az ataxia és a myopathia volt.

Az mtDNS mutációkat hordozó betegek klinikai tüneteinek variabilitása adódhat a különböző heteroplazmia (HP) arányokból is, mely az eltérő szövetekben is különböző. Például az m.3243 A>G mutációt hordozók közül már a 15%-os HP arány is okozhat

tüneteket, míg az m.8993 T>C esetében a 80%-os HP arány mellett a hordozó lehet tünetmentes.

A mitochondriális „common” deléciókat legtöbb esetben a PEO, a Kearns-Sayre-, és a Pearson-szindróma háttérében írták le, míg az általunk talált pozitív eseteknél a vezető tünet a myopathia volt. Az mtDNS deléciók általában sporadikus esetek egy 9 éves de Toni-Debré-Falconi szindrómás kisfiú esetében azonban familiáris maternális ági mtDNS „common” deléciót találtunk (beteg: 35% HP, édesanya: 25% HP, anyai nagynéni: 20% HP, anyai nagymama: 15% HP).

### **Koegszisztáló mtDNS eltérések**

Az mtDNS deléciók több esetben is társultak egyéb mtDNS hibákkal. Az m.3243 A>G patogén mutációt hordozó betegek (2 nő beteg) közül két esetben együttes előfordulás detektáltunk egy egyes nagy (7.9 kbp) mtDNS delécióval valamint egy multiplex delécióval. Az m.4298 G>A (tRNS<sup>Ile</sup>) patogén mutációt hordozó férfi betegnél esetében a szubsztitúció mellett multiplex deléciót is találtunk.

### **Az mtDNS és nukleáris gén defektusok együttes előfordulása**

Az mtDNS deléciók más kópia szám elváltozásokkal együtt is előfordultak. Száz *PMP22* duplikációt / deléciót (43 *PMP22* deléció és 57 *PMP22* duplikáció) hordozó beteg vizsgálata során az esetek 12%-ában találtunk mtDNS deléciót, (95% CI: 0.0875-0.1525). Tizenegy esetben 7.8 kbp-os egyes deléciót (17% - 75% közötti heteroplazmia aránnyal), és egy esetben alacsony heteroplazmia arányú multiplex deléciót detektáltunk. Szintén 100 a huntigtin génben kóros CAG repeat számmal rendelkező Huntington-kóros beteg vizsgálata során 7 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).

### **Nukleáris gén által meghatározott új mitochondriális betegség fenotípus-genotípus korrelációja**

Magyarországon elsőként találtuk meg az LBSL (agytörzsi és gerincvelői érintettséggel, emelkedett laktát szinttel járó leukoencephalopathia) betegség háttérében álló *DARS2*

mutációt, egy 24 éves férfi beteg esetében kinek tünetei 15 éves korában kezdődtek járásnehézségekkel. Az MRI felvételének igen karakterisztikus képe vetette fel az LBSL betegség lehetőségét, mely genetikailag igazolódott, a *DARS2* vizsgálata során egy splice site patogén mutáció igazolódott az Intron 5-6-ban: c. 492+2 T>C (rs142433332; IVS5+2 T>C) heterozigóta formában. A mutációt a szegregációs vizsgálat során megtaláltuk még a lánytestvérénél és az édesanyjánál. A testvére tünetei enyhébbek édesanyja viszont tünetmentes.

### **Az mtDNS farmakogenomikai szerepe a metformin mellékhatása szempontjából**

Az mtDNS több homoplazmikus SNP-inek együttes előfordulása hajlamosíthat bizonyos kórképek kialakulására. Egy 58 éves férfi betegünk esete kapcsán olyan gyógyszer mellékhatásra szeretnénk felhívni a figyelmet, mely alapját véleményünk szerint a mitochondriális genom variációja képezi. A betegnek a harmincas éveiben diagnosztizáltak 2-es típusú diabetes mellitust, melynek kezelésére 2009-től metformint kapott, melynek megkezdését követő 2-3 hónap alatt 8-10 kg-ot hízott. A jobb diabetes kontroll miatt inzulinterápiát is kapott, de 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 volt. 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. Izomfájdalma és inzulinrezisztenciája hátterében lactacidozis igazolódott, nyugalmi laktát szintje igen magas 6.6 mmol/l volt. A metformin elhagyása után 2 nappal laktát szintje lecsökkent 4.4 mmol/l-re, majd néhány hónap múlva 2,2 mmol/l-re. Az izomfájdalmak a laktátszint csökkenéssel szinkronban jelentősen enyhültek, 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 az azonosított 32 homoplazmikus SNP közül három (m.1888G>A, m.4216T>C, m.4917A>G) az anyai ágon öröklődő diabetes és nagyothallással (MIDD) asszociál.

### **A *POLG1* gén farmakogenomikai szerepe**

A multiplex mtDNS deléciót hordozó betegeinknél (65 beteg) felvetődik az intergenomiális kommunikáció zavara, akiknél először a *POLG1* gént analizáljuk, mivel

a legtöbb hiba ebben a génben szokott előfordulni az irodalmi adatok alapján. A *POLG1* gén variáció közül eddig 7-et írtak le a valproát toxicitással asszociáltan az irodalomban (L304R, A467T, G588D, Q879H, T885S, E1143G, Q1236H). Ezek közül a kohortunkban 3-at találtunk meg: egy patogén mutációt (A467T), egy modifikáló faktort (E1143G) és egy polimorfizmust (Q1236H), ezen szubsztitúciókat összesen 22 esetben azonosítottuk a 65 betegből (frekvencia: 33.85%; 95% CI: 0.2798 – 0.3972). A farmakogenetikai jelentőségű patogén mutációt 1 betegnél (1.54%), a nem patogén modifikáló faktort 9 esetben (13.85%), míg a polimorfizmus-t 12 betegnél (18.46%) találtuk meg.

### **MitoChip v2.0 microarray**

A microarray használatával egy összehasonlító vizsgálatot terveztünk, melynek során az idő-, és költséghatékonyságát vetettük össze a Sanger szekvenálással. 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 chip által adott szekvenciákat a GSEQ 4.1 ingyenesen letölthető software-rel ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)) analizáltuk és a humán mtDNS referencia genomjához hasonlítottuk ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)). A patogénnek vélt mutációkat Sanger szekvenálással validáltuk. A patogén mutációk 66%-át sikerült Sanger szekvenálással validálni. Minden beteg esetében számos eltérést tapasztaltunk, mely felvetette a szubsztitúciók jelenlétét. A validálások eredményei alapján azt tapasztaltuk, hogy a keresett pozíciókon, számos helyen nincs eltérés, így heteroplazmikus mtDNS mutációk kimutatására nem minden esetben megbízható módszernek tartjuk.

A talált homoplazmikus SNP-k segítségével haplotipizáltuk a betegeket, a 15 beteg közül egy haplocsoportja (D) a mai Ázsiára jellemző, míg a többi beteget európai (H, U, T, J) haplocsoportba soroltuk.

## 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 egy retrospektív tanulmány keretén belül.

Az összesen 1568 vizsgált betegeknél 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. A genetikai epidemiológiai vizsgálat során rendkívül fontosnak tartjuk, hogy a genetikai diagnosztikai vizsgálat ne csak vérből, hanem lehetőség szerint posztmitotikus szövetből is történjen.

2. 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 szimptomák. 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 kórlefordulását.

3. 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.

4. Az mtDNS homoplazmikus SNP-inek farmakogenomikai jelentőségét igazoltuk metformin asszociálta mellékhatás háttérében.

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

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

## SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### A disszertációhoz kapcsolódó saját közlemények

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, Molnar 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<sup>Lys</sup> 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, Csősz 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)

#### **A disszertációtól független saját közlemények**

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 fiatalkori 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**