

Új generációs szekvenálási eljárások klinikai alkalmazása ritka neurológiai betegségek diagnosztikájában

Doktori értekezés

Dr. Balicza Péter

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Wiener Zoltán, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Sebők Ágnes, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Réthelyi János, Ph.D., egyetemi docens
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szatmári Ildikó, Ph.D., tudományos munkatárs
Dr. Liptai Zoltán, Ph.D., főorvos

Budapest
2018

TARTALOMJEGYZÉK

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
II. BEVEZETÉS	12
II/1 A ritka betegségek ismérvei és a diagnosztikájuk során leginkább használt eljárások	12
II/2. A ritka neurológiai betegségek epidemiológiája.....	13
II/3. Egyes ritka örökletes neurológiai betegségek genetikai háttere	14
II/3.1. A hereditaer spasticus paraparesisek	14
II/3.2. Az örökletes ataxiák	21
II/3.3. Az amyotrophias lateral sclerosis.....	22
II/3.4. A nukleáris mitochondriális neurológiai megbetegedések.....	25
II/4. Az új generációs szekvenálási eljárások	26
II/4.1. Az új generációs szekvenálási eljárások laboratóriumi technikai háttere	26
II/4.2. Az új generációs szekvenálás bioinformatikai háttere	28
II/5. Az új generációs szekvenálási eljárások által detektált variációk hatásának értékelése	29
II/6. Az új generációs szekvenálási eljárások etikai aspektusai.....	30
III. CÉLKITŰZÉSEK	32
IV. MÓDSZEREK	33
IV/1. Genetikai kutatás során vizsgált betegek.....	33
IV/1.1. Hereditaer spasticus paraparesissel diagnosztizált betegek	33
IV/1.2. Ataxia prezentációs tünettől induló HSP esete	34
IV/1.3. Amyotrophias lateral sclerissal diagnosztizált betegek	34

IV/1.4. Komplex mitochondriális fenotípussal rendelkező család.....	34
IV/2. Kérdőívet kitöltő egyének kiválasztásának módszertana	35
IV/3. Diagnosztikai vizsgálatok.....	35
IV/4. Genetikai laboratóriumi vizsgáló módszerek	35
IV/4.1. Sanger szekvenálás	36
IV/4.2. Hereditaer spasticus paraparesis panelvizsgálat Illumina MiSeq platformon ..	36
IV/4.3. Az exomszekvenálás laboratóriumi módszerei.....	37
IV/5. Az új generáció szekvenálási eljárások során alkalmazott elemzési módszerek.....	38
IV/5.1. Használt szoftverek.....	38
IV/5.2. A variánsok szűrése során használt módszertan	38
IV/6. A felmérés alapját képező kérdőív felépítése	39
IV/7. Statisztikai módszerek	40
V. EREDMÉNYEK	42
V/1. A genetikai vizsgálatok eredményei örökletes neurodegeneratív betegségekben	42
V/1.1. A HSP betegek klinikai jellemzői	42
V/1.2. Hereditaer spasticus paraparesisben azonosított genetikai eltérések megoszlása, az egyes vizsgálmódszerek találati aránya	43
V/1.3. Genotípus-fenotípus összefüggések HSP-ben.....	50
V/1.4. Exomszekvenálással, illetve panelvizsgálattal azonosított fenokópiák HSP-ben	53
V/1.5. Exomszekvenálás nem tisztázott háttérű cerebellaris ataxiában	55
V/1.6. Hereditaer spasticus paraparesis gének vizsgálata ALS-ben és primer lateral sclerosisban	61
V/1.7. Exomszekvenálás egy komplex mitochondriális családban.....	71

V/2. A nagy áteresztő képességű genetikai vizsgálatok által felvetett etikai kérdések nagy populációt érintő elemzése.....	78
V/2.1. A kérdőívet kitöltő személyek adatai	78
V/2.2. Az önértékelő genetikai ismeret pontszám.....	78
V/2.3. A genetikai meghatározottság pontszám.....	80
V/2.4. A genetikai vizsgálatok iránt mutatott attitűdöt befolyásoló tényezők	81
VI. MEGBESZÉLÉS.....	87
VI/1. A HSP epidemiológiája Magyarországon	87
VI/2. HSP gének variációinak genotípus-fenotípus összefüggései.....	89
VI/2.1. A <i>SPAST</i> gén genotípus-fenotípus összefüggései.....	89
VI/2.2. Az <i>SPG7</i> gén genotípus-fenotípus összefüggései.....	90
VI/2.3. Pleiotropia az <i>SPG11</i> gén variációk klinikai megjelenésében.....	91
VI/2.4. További azonosított SPG gének genotípus-fenotípus összefüggései.....	92
VI/3. A HSP vizsgálata során azonosított fenokópiák.....	92
VI/4. Ritka variációk vizsgálata ALS-ben	93
VI/4.1. Az ALS oligogénes modellje	95
VI/4.2. <i>BSCCL2</i> variáció azonosítása ALS-ben	96
VI/4.3. Nukleárisan kódolt mitochondriális génekben azonosított ritka variációk lehetséges szerepe ALS-ben.....	97
VI/5. Az <i>MSTO1</i> gén azonosítása komplex mitochondriális betegség hátterében	99
VI/6. Exom- és panelszekvenálási vizsgálatok klinikai alkalmazása	102
VI/7. Exom- és panel szekvenálási vizsgálatok leletezése	103
VI/8. A nagy áteresztő képességű genetikai vizsgálatok és a közvetlenül a felhasználó által indikált genetikai vizsgálatok iránt mutatott attitűd Magyarországon.....	104

VI/8.1. A genetikai vizsgálatok iránt mutatott attitűd egészséges személyek esetében	104
VI/8.2. A genetikai vizsgálatok iránt mutatott attitűdöt befolyásoló tényezők.....	106
VII. KÖVETKEZTETÉSEK.....	110
VIII. ÖSSZEFOGLALÁS.....	113
IX. SUMMARY	114
X. IRODALOMJEGYZÉK	115
XI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	145
XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	146

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AAA	diverz sejtfuncióval rendelkező ATPázok (ATPases associated with diverse cellular activities)
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
AD	autoszomális domináns
AFP	alfa foetoprotein
ALD	adrenoleukodystrophia
ALS	amyotrophias lateral sclerosis
AMN	adrenomyeloneuropathia
AMN	alsó motoneuron
ANS	ataxia-neuropathia spektrum
AOA2	ataxia oculomotor apraxia 2
AR	autoszomális recesszív
ARSACS	Charlevoix-Saguenay autoszomális recesszív spasticus ataxia
ASD	autizmus spektrumzavar
ASH	Alpers-Huttenlocher syndroma
ASS	ataxia spasticitas spektrum
AV	alsó végtag
BTOP	bilaterális temporooccipitalis polymicrogyria
BWA	Burrows-Wheeler Aligner

CHARGE	coloboma, szívdefektusok, choanalis atresia, növekedési retardáció, genitális abnormitások, fül abnormitások syndroma (coloboma, heart defects, atresia choanea, growth retardation, genital abnormalities, ear abnormalities syndrome)
cHSP	komplikált (complicated) hereditaer spasticus paraparesis
CI	konfidencia intervallum
CLA	kongenitális laktacidosis
CMT	Charcot-Marie-Tooth betegség
CNV	kópiaszám variáció (copynumber variation)
COX	citokróom c oxidáz
CPEO	krónikus progresszív külső szemizom bénulás (chronic progressive external ophthalmoplegia)
CRT	ciklikus reverzibilis termináció
CT	komputertomográfia
dbGAP	Database of Genotypes and Phenotypes
DNS	deoxiribonukleinsav
DSMA2	distalis spinalis muscularis atrophia 2
DTC	közvetlenül a felhasználóknak (direct to consumer)
EEG	elektroencephalográfia
EGA	European Genome-Phenome Archive
EIEE	korai csecsemőkorai epilepsziás encephalopathia (early infantile epileptic encephalopathy)

EMG	elektromyográfia
ENG	elektroneurográfia
ExAC	Exome Aggregation Consortium
FAHN	zsírsav hidroxiláz asszociált neurodegeneráció (fatty-acid hydroxylase associated neurodegeneration)
FLAIR	fluid attenuation inversion recovery
FMN	felső motoneuron
FTD-ALS	frontotemporalis dementia-amyotrophias lateral sclerosis
FV	felső végtag
GB	gigabyte
GHS	Gordon-Holmes syndroma
GUS	bizonytalan jelentőségű gén (gene of uncertain significance)
GWAS	teljes genomra kiterjedő asszociációs vizsgálat (genome wide association study)
HGMD	Human Gene Mutation Database
HH5	hypogonadotrop hypogonadismus 5
HHH	hyperornithinaemia-hyperammonaemia-homocitrullinuria syndroma
HIV	humán immundeficiencia vírus
HLD2	hypomyelinisatioval járó leukodystrophia 2
HPO	humán fenotípus ontológia (Human Phenotype Ontology)
HSAN2	hereditaer sensoros és autonóm neuropathia 2

HSN2C	hereditaer sensoros neuropathia 2C
HSP	hereditaer spasticus paraparesis
HTLV	humán T-sejt lymphotrop vírus
IAHSP	csecsemőkori kezdetű felszálló hereditaer spasticus bénulás (infantile onset ascending hereditary spastic paralysis)
IBM	inklúziós testes myopathia (inclusion body myopathy)
IBMPFD1	korai kezdetű Paget betegséggel és frontotemporalis dementiával járó inklúziós testes myopathia (inclusion body myopathy with early onset Paget disease and frontotemporal dementia)
IMMD	autoszomális domináns izolált mitochondriális myopathia (isolated mitochondrial myopathy, autosomal dominant)
INDEL	insertio/deletio
ISOD	izolált szulfit oxidáz hiány
JALS	juvenilis amyotrophias lateral sclerosis
JPLS	juvenilis primer lateral sclerosis
KIR	központi idegrendszer
KO	knock out
KVLT ALS	klinikailag valószínű, laboratóriumiilag támogatott ALS
MAF	minor allélfrekvencia
MCHS	myocerebrohepatopathia spektrum

MEGDEL	süketséggel, encephalopathiával, Leigh-szerű tünetekkel járó 3-methylglutaconic aciduria (3-methylglutaconic aciduria with deafness, encephalopathy and Leigh-like syndrome)
MEMSA	myoclonusos epilepsia, myopathia, sensoros ataxia spektrum
MIP	molekuláris inverziós próba
MLPA	multiplex ligációs próba amplifikáció
MNGIE	mitochondriális neurogastrointestinalis encephalopathia
MRD9	autoszomális domináns mentális retardatio 9
MRI	mágneses rezonancia képalkotás
mtDNS	mitochondriális DNS
MTDPS4A/4B	mitochondriális DNS depletios syndroma 4A/4B
NADGP	ataxiával, dystoniával, tekintés bénulással járó neurodegeneráció (neurodegeneration with ataxia, dystonia and gaze palsy)
NBIA	agyi vastárolással járó neurodegeneráció (neurodegeneration with brain iron accumulation)
NGS	új generációs szekvenálás (next generation sequencing)
NHLBI ESP	National Heart, Lung and Blood Institute Exome Sequencing Project
OKJ	Országos Képzési Jegyzék
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OR	esélyhányados (odds ratio)
OXPHOS	oxidatív foszforiláció
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)

PD	Parkinson-kór (Parkinson disease)
PEO	progresszív külső szemizom bénulás (progressive external ophthalmoplegy)
pHSP	tiszta (pure) hereditaer spasticus paraparesis
PLS	primer lateral sclerosis
RNS	ribonukleinsav
ROS	reaktív oxigén speciesek
SANDO	sensoros ataxia, neuropathia, dysarthria, ophthalmoparesis
SCA	spinocerebellaris ataxia
SCAR1	autoszomális recesszív spinocerebellaris ataxia 1
SDH	szukcinát dehidrogenáz
SM	sclerosis multiplex
SMA	spinalis muscularis atrophia
SMALED	alsó végtagi dominanciájú spinalis muscularis atrophia (spinal muscular atrophy with lower extremity predominance)
SMAPAD	autoszomális domináns proximális felnőttkori spinalis muscularis atrophia (spinal muscular atrophy, proximal, adult, autosomal dominant)
SNA	egy nukleotid hozzáadás (single nucleotide addition)
SPAX5	spasticus ataxia 5
SPOAN	spasticus paraparesis, opticus atrophia, neuropathia
TB	terabyte
VLCFA	nagyon hosszú szénláncú zsírsavak (very long chain fatty acid)

VUS	bizonytalan jelentőségű variáns (variant of uncertain significance)
WES	teljes exomszekvenálás (whole exome sequencing)
X-LSA/A	X-hez kötött sideroblastos anaemia és ataxia
YVS	Yunis-Varon syndroma

II. BEVEZETÉS

II/1. A ritka betegségek ismérvei és a diagnosztikájuk során leginkább használt eljárások

A ritka betegségek definíciója nem egységes az egyes országokban. Olyan betegségeket értünk alattuk, amelyek gyakorisága a népbetegségekéhez képest alacsonyabb, ezáltal speciális szempontok merülnek fel a diagnosztikájuk, kezelésük kapcsán. Az Európai Unióban az 5/10,000 lakos alatti prevalenciájú betegségeket tekintjük ritkának [1]. A ritka betegségek egy része nem genetikai eredetű, azonban a genetikai betegségek teszik ki mintegy 80%-ukat [2]. Mintegy 8000 ritka betegség ismert, amelyek előfordulása külön-külön ritka, azonban összesítve jelentős számú egyént érintenek. Becslések szerint az Európai Unióban 27-36 millió ember érintett ritka betegségben [3]. Az elérhető információk, a szakértők hiánya, az elhúzódó diagnózis, az elérhető kezelés hiánya jellemzi a betegségeknek ezt a csoportját. Az első tünetek gyakran gyermekkorban megjelennek, és krónikus beteggondozást tesznek szükségessé. Mivel a ritka betegségek jelentős hányada genetikai eredetű így a diagnosztika során leggyakrabban molekuláris genetikai módszereket alkalmazunk. Ez korábban klinikai genetikussal történő konzultációt követő, gyakran szekvenciális genetikai vizsgálatokat jelentett. Később a kromoszomális microarray módszer, majd az új generációs szekvenálás (NGS) paradigmaváltást hozott a diagnosztikában [4]. Amennyiben a fenotípus egyértelmű továbbra is elérhetőek az egyéni vizsgáló módszerek (pl. Sanger szekvenálás a pontmutációk, kis deletiók/insertiók; MLPA a nagyobb kópiaszám változások kimutatására). Gyermekkor kezdetű, komplex szervkárosodásokkal, malformatiókkal járó esetekben citogenetikai vizsgálatok állnak rendelkezésre. Ha a fenotípus jól körülhatárolható (pl. ataxia szindrómák, spasticus paraparesis) targetált panelszekvenálási módszerek alkalmazhatóak. Komplex fenotípus, vagy a fenti diagnosztikai módszerek sikertelensége esetén teljes exom szekvenálás végezhető. A genetikai vizsgálatok értelmezéséhez részletes fenotipizálásra is szükség van. Az úgynevezett mély fenotipizálás („deep phenotyping”) a szokásos orvosi

dokumentációban részletezett jellemzőknél több, precízebben leírt, tudományos igényességgel rögzített információgyűjtést jelent [5]. Bár a fenotípusos jegyek összegyűjtése önmagában nem feltétlenül vezet diagnózishoz, jelentősen segíti –akár szoftverrel támogatottan- a nagy áteresztő képességű genetikai tesztek során nyert adatok értelmezését. A részletes fenotípusos adatokhoz gyakran műszeres vizsgálatokra van szükség. A neurogenetikai betegségek diagnosztikájában leggyakrabban használt kiegészítő vizsgálatok az elektrofiziológia (ENG/EMG, EEG), a képalkotó vizsgálatok (CT, MRI), az izomszövettani vizsgálatok, enzimaktivitás vizsgálatok. A jelenlegi gyakorlatban a fenotípus ismeretében értelmezzük a genetikai leleteket. Szükséges azonban megemlíteni a reverz fenotipizálás fogalmát, amely során a masszív parallel szekvenálásból származó, priorizált variánslista ismeretében kezdünk részletes fenotípus elemzésbe [6].

II/2. A ritka neurológiai betegségek epidemiológiája

A ritka monogénes betegségek gyakran (>50%-ban) neurológiai érintettséggel járnak, így az egyes orvosi szakmák közül, a klinikai genetikusokat követően, a neurológusok találkoznak leggyakrabban ritka betegségekkel [7]. A neurogenetikai betegségek palettája széles, és magában foglalja a gyakori neurológiai betegségek ritka, monogénes genetikai formáit is. Fenotípus tekintetében a neurogenetikai betegségek felölelik a teljes neurológiai tünettant, többek közt megjelenhetnek, mint dementia, izomdystrophiák, mozgászavarok, spasticus paraparesisek, epilepsiák, neuropathiák. A neurogenetikai betegségek összesített előfordulása pontosan nem ismert, az egyes monogénes neurogenetikai betegségekről külön-külön is kevés prevalencia adat áll rendelkezésre. Egy komprehenzív Észak-Angliai vizsgálatban a különböző neurogenetikai betegségek összesített prevalenciája 90.9/100,000 fő volt [8], amely alapján elmondható, hogy összesítve jelentős morbiditási tényezőt képviselnek. Az egyes betegségek hátterében számos gén hibája állhat, amelyet a lókuszt heterogenitás fogalmával foglalunk össze. A különböző gének által okozott neurogenetikai betegségek egyes esetekben egymástól klinikai alapon nehezen különíthetők el. Tovább színezi a képet a pleiotropia jelensége, amely szerint egy adott gén hibái különböző fenotípusokkal is jelentkezhetnek. Így összességében a neurogenetikai betegségek

differenciál diagnosztikája során gyakran ezres nagyságrendű gént kell figyelembe vennünk.

II/3. Egyes ritka örökletes neurológiai betegségek genetikai háttere

II/3.1. A hereditaer spasticus paraparesisek

A hereditaer spasticus paraparesisek (HSP) klinikailag és genetikailag heterogén neurodegeneratív megbetegedések, amelyek közös jellemzője a genetikai okból bekövetkező pyramispálya károsodás. A betegség prevalenciája 1,2-9,6/100,000 lakos [9]. A társuló neurológiai tünetek megléte, vagy hiánya alapján a betegséget nem komplikált, „tisztá” hereditaer spasticus paraparesisek (pHSP), és komplikált hereditaer spasticus paraparesisek (cHSP) csoportjára osztják [10]. Jelenleg már több mint 70 ismert SPG lókuszt írtak le az irodalomban, amelyek autoszomális domináns, autoszomális recesszív, X-hez kötött vagy mitochondriális öröklésmentet is követhetnek, valamint de novo is megjelenhetnek [11]. A klinikai alapon történő molekuláris differenciál diagnosztika gyakran nem lehetséges, mivel az egyes fenotípusok hátterében gyakran több gén eltérései állhatnak, valamint egy adott gén eltérései nem minden esetben azonos fenotípussal jelentkeznek [9]. A korábbi gyakorlatban frekvencia adatok alapján a leggyakrabban szóba jövő gének vizsgálatát végeztük, azonban így számos esetben nem jutottunk molekuláris diagnózishoz. A HSP hátterében ismert géneket, a leírt esetek számát, és a jellemző fenotípust foglalja össze az **1. Táblázat**. Néhány esetben az összetett klinikai kép alapján valószínűsíthető egy-egy gén eltérése, ezek a HSP úgynevezett szindrómás formái. Ezek jellemzően a HSP általános előfordulásához viszonyítva is ritkák, és gyakran egyes népcsoportokban halmozódnak. A Troyer szindrómában alacsony növény, distalis amyotrophia, mentális retardatio jelenik meg az *SPG20* gén pathogén variációi következtében [12]. A Mast szindrómára az extrapyramidalis tünetek társulása hívja fel a figyelmet [13], míg a Kjellin szindrómára a pigmentált maculopathia jelenléte [14]. A Charlevoix-Saguenay autoszomális recesszív spasticus ataxiában (ARSACS) az ataxia mellett a szemészeti vizsgálattal detektálható retinális idegrost réteg megvastagodás lehet jellegzetes [15]. A *BSCL2* gén pathogén variáció következtében fellépő Silver szindrómára a distalis izomatrophia mellett a vállövi izmok érintettsége hívhatja fel a figyelmet [16].

1. Táblázat: A HSP betegségek öröklődése és klinikai tünetei

? = a gén nem ismert. AD = autoszomális domináns; AR = autoszomális recesszív; C = komplikált; FK = felnőttkori kezdet; KK = korai kezdet (csecsemőkor); Mat = maternalis; Örökl. = öröklésmenet; P = tiszta; SK = serdülőkori kezdet; SPOAN = spasticus paraparesis, opticus atrophia, neuropathia; VK = variábilis kezdet (csecsemőkor, serdülőkor, vagy felnőttkori kezdet).

Forrás: Lo Giudice et al. (2014) *Hereditary spastic paraparesis: Clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms. Experimental Neurology*, 261:518-539 nyomán, az Elsevier engedélyével [17].

Típus Gén	Örökl.	Családok száma	Kezdet	Fenotípus	Egyéb jellemzők
SPG1 <i>LICAM</i>	X-hez kötött	~ 20	KK	C	Mentalis retardatio; aphasia; csoszogó járás; adducált hüvelykujj; hydrocephalus; corpus callosum agenésia.
SPG2 <i>PLP1</i>	X-hez kötött	~ 10	VK	P vagy C	Epilepsia; mentális retardatio; nystagmus; ataxia; fehérállományi laesiok, polyneuropathia.
SPG3A <i>ATL1</i>	AD	~ 35	KK	P vagy C	Alsó végtagi izomatrophia; epilepsia; ataxia; opticus atrophia; felső végtagi spasticitás; sensomotoros axonalis polyneuropathia; kognitív hanyatlás; agyideg tünetek; mentális retardatio; pes cavus; vékony corpus callosum.
SPG4 <i>SPAST</i>	AD	~ 130	VK	P vagy C	Kognitív hanyatlás; epilepsia; ataxia; psychosis; felső végtagi spasticitás; pes cavus; hátsó scala eltérések; polyneuropathia; kéz tremor; fehérállományi laesiok; kis kézizmok atrophia.
SPG5A <i>CYP7B1</i>	AR	~ 35	VK	P vagy C	Opticus atrophia; fehérállományi laesiok; cerebellaris ataxia.
SPG6 <i>NIPA1</i>	AD	11	SK	P vagy C	Epilepsia; dysarthria; polyneuropathia; kognitív hanyatlás; facialis dystonia; kis kézizom atrophia; felső végtagi spasticitás; pes cavus.
SPG7 <i>SPG7</i>	AR	~ 30	VK	P vagy C	Cerebellaris tünetek; cerebellaris atrophia; polyneuropathia; opticus atrophia; supranuclearis tekintés bénulás; figyelmi és executív zavarok; vékony corpus callosum; scoliosis; pes cavus.
SPG8 <i>KIAA0196</i>	AD	10	FK	P	-
SPG9 ?	AD	1	SK	C	Cataracta; motoros polyneuropathia; csont deformitások; gastrooesophagealis reflux.
SPG10 <i>KIF5A</i>	AD	17	KK	P vagy C	A felső végtagokon distalis amyotrophia; kognitív hanyatlás; polyneuropathia; dysautonomia; Parkinsonismus; süketség; retinitis pigmentosa.

Típus <i>Gén</i>	Örökl.	Családok száma	Kezdet	Fenotípus	Egyéb jellemzők
SPG11 <i>SPG11</i>	AR	~ 35	VK	C	Cerebellaris tünetek; polyneuropathia; fehérállományi laesiok; cerebellaris atrophia; vékony corpus callosum; epilepsia; kognitív hanyatlás; szemészeti tünetek; amyotrophia; Parkinsonismus; maculopathia; akciós tremor; mentális retardatio; felső végtagi gyengeség.
SPG12 <i>RTN2</i>	AD	4	KK	P	–
SPG13 <i>HSPD1</i>	AD	2	VK	P vagy C	Dystonia.
SPG14 ?	AR	1	FK	C	Motoros polyneuropathia; mentális retardatio.
SPG15 <i>ZFYVE26</i>	AR	20	KK	C	Pigment retinopathia; cerebellaris tünetek; polyneuropathia; amyotrophia; epilepsia; mentális retardatio; vékony corpus callosum.
SPG16 ?	X-hez kötött	2	KK	P vagy C	Aphasia; látászavar; nystagmus; mentális retardatio.
SPG17 <i>BSCL2</i>	AD	13	SK	C	Kis kézizmok és lábizmok atrophiaja; alsó motoneuron betegség.
SPG18 <i>ERLIN2</i>	AR	3	KK	C	Epilepsia; mentális retardatio; congenitalis csípőfícam; többszörös ízületi contractura.
SPG19 ?	AD	1	FK	P	-
SPG20 <i>SPART</i>	AR	~ 25	KK	C	Mentális retardatio; dysarthria; felső végtagi spasticitás; cerebellaris tünetek; euphoria; sírás; fehérállományi laesiok.
SPG21 <i>SPG21</i>	AR	2	KK	C	Dementia; vékony corpus callosum; fehérállományi laesiok; cerebellaris tünetek; mozgászavarok; callosalis disconnectiós syndroma.
SPG22 <i>SLC16A2</i>	X-hez kötött	~ 10	KK	C	Mentális retardatio; distalis izomatrophia; dyskinesia; nystagmus; ataxia.
SPG23 ?	AR	4	KK	C	Kognitív hanyatlás; pigmentatios zavarok; facialis és skeletalis dysmorphia; tremor.
SPG24 ?	AR	1	KK	C	Pseudobulbaris jelek.
SPG25 ?	AR	1	FK	C	Cataracta; polyneuropathia; discus herniatio.
SPG26 ?	AR	5	KK	C	Mentális retardatio; corticalis atrophia; polyneuropathia; distalis atrophia; cerebellaris ataxia; fehérállományi laesiok.
SPG27 ?	AR	2	VK	C	Dysarthria; mentális retardatio; polyneuropathia.

Típus <i>Gén</i>	Örökl.	Családok száma	Kezdet	Fenotípus	Egyéb jellemzők
SPG28 <i>DDHD1</i>	AR	3	KK	P vagy C	Saccadicus szemmozgások; axonális polyneuropathia.
SPG29 ?	AD	1	SK	C	Pes cavus; halláscsökkenés; hiatus hernia; hyperbilirubinaemia.
SPG30 <i>KIF1A</i>	AR	3	SK	P vagy C	Sensoros polyneuropathia; cerebellaris tünetek; hypacusis; distalis izom atrophia.
SPG31 <i>REEP1</i>	AD	~ 30	KK	P vagy C	Polyneuropathia; cerebellaris ataxia; tremor; dementia; kis kézizom atrophia; pes cavus.
SPG32 ?	AR	1	KK	C	Mentalis retardatio; pontin dysraphismus; vékony corpus callosum.
SPG33 <i>ZFYVE27</i>	AD	1	FK	C	Pes equinus.
SPG34 ?	X-hez kötött	1	VK	P	–
SPG35 <i>FA2H</i>	AR	2	KK	P vagy C	Kognitív hanyatlás; epilepsia.
SPG36 ?	AD	1	VK	C	Sensoros polyneuropathia.
SPG37 ?	AD	1	VK	P	-
SPG38 ?	AD	1	VK	C	Kis kézizom atrophia; polyneuropathia.
SPG39 <i>PNPLA6</i>	AR	2	KK	C	Felső végtagi distalis izomatrophia; axonális polyneuropathia.
SPG40 ?	AD	1	FK	P vagy C	Felső végtagi élénk reflexek; kognitív hanyatlás.
SPG41 ?	AD	1	SK	P	-
SPG42 <i>SLC33A1</i>	AD	1	VK	P	-
SPG43 <i>C19orf12</i>	AR	1	VK	C	Kis kézizom atrophia; kétoldali opticus atrophia; axonális sensomotoros polyneuropathia; vaslerakódás a globus pallidusban.
SPG44 <i>GJC2</i>	AR	1	FK	C	Kognitív hanyatlás; cerebellaris tünetek; dysarthria; fehérállományi laesiok; pes cavus; vékony corpus callosum; scoliosis; felső végtagi érintettség.
SPG45 ?	AR	1	KK	C	Mentalis retardatio; pendularis nystagmus; opticus atrophia.

Típus <i>Gén</i>	Örökl.	Családok száma	Kezdet	Fenotípus	Egyéb jellemzők
SPG46 <i>GBA2</i>	AR	4	KK	C	Mentalis retardatio; cataracta; cerebellaris atrophia; vékony corpus callosum; hypogonadismus férfiakban.
SPG47 <i>AP4B1</i>	AR	2	KK	C	Periventricularis fehérállományi laesiok; vékony corpus callosum; microcephalia; epilepsia; kacsázó járás; ízületi lazaság.
SPG48 <i>AP5Z1</i>	AR	1	FK	P vagy C	Gerincvelői hyperintensitasok.
SPG49 <i>TECPR2</i>	AR	3	KK	C	Meglassult psychomotoros fejlődés, mentális retardatio; vékony corpus callosum; cerebralis és cerebellaris diszfunkció; dysmorphias jegyek; centralis apnoe.
SPG50 <i>AP4M1</i>	AR	1	KK	C	Tetraplegias cerebralis paresis; mentális retardatio; a cerebralis fehérállomány fogyása; cerebellaris atrophia.
SPG51 <i>AP4E1</i>	AR	2	KK	C	Microcephalia; növekedési és mentális visszamaradás.
SPG52 <i>AP4S1</i>	AR	1	KK	C	Megkésett beszédfejlődés; sztereotipikus nevetés; megkésett szomatikus fejlődés.
SPG53 <i>VPS37A</i>	AR	3	KK	C	Felső végtagi spasticitas; megkésett beszéd és kognitív fejlődés; kyphosis; pectus carinatum; hypertrichosis.
SPG54 <i>DDHD2</i>	AR	6	KK	C	Mentalis retardatio; strabismus; dysarthria; dysphagia; nervus opticus hypoplasia; alacsony növés; vékony corpus callosum; láb deformitások; kóros lipid csúcs agyi spectroscopián; fehérállományi laesiok.
SPG55 <i>C12Orf65</i>	AR	1	KK	C	Opticus atrophia; polyneuropathia, pes equinovarus.
SPG56 <i>CYP2U1</i>	AR	5	KK	P vagy C	Vékony corpus callosum; kognitív hanyatlás; felső végtagi érintettség; basalis ganglion calcificatio; dystonia; fehérállományi laesiok.
SPG57 <i>TFG</i>	AR	1	KK	C	Opticus atrophia; polyneuropathia.
SPG58 <i>KIF1C</i>	AR	3	KK	P vagy C	Chorea; myoclonus; ataxia; hypodontia; süketség; alacsony növés; pes planus; ptosis; fejlődési megkésetttség; mentális retardatio; fehérállományi laesiok.
SPG59 <i>USP8</i>	AR	1	KK	C	Nystagmus; határértéki intelligencia.
SPG60 <i>WDR48</i>	AR	1	KK	C	Alsó végtagi polyneuropathia; nystagmus.
SPG61 <i>ARL6IP1</i>	AR	1	KK	C	Distalis ujjpercek elvesztése; acromutilatio; polyneuropathia.
SPG62 <i>ERLIN1</i>	AR	3	KK	P	–

Típus Gén	Örökl.	Családok száma	Kezdet	Fenotípus	Egyéb jellemzők
SPG63 <i>AMPD2</i>	AR	1	KK	C	Vékony corpus callosum; fehérállományi laesiok; alacsony testsúly; alacsony növés.
SPG64 <i>ENTPD1</i>	AR	2	KK	C	Pes equinovarus; agresszivitás; kései pubertás; microcephalia; határértéki intelligencia.
SPG65 <i>NT5C2</i>	AR	5	KK	P vagy C	Vékony corpus callosum; myelinisatiós zavar; kis kétoldali cysticus occipitalis leukomalacia; tanulási zavarok; pes equinovarus.
SPG66 <i>ARSI</i>	AR	1	KK	C	Corpus callosum és cerebellaris hypoplasia; colpocephalia; határértéki intelligencia; polyneuropathia; pes equinovarus.
SPG67 <i>PGAP1</i>	AR	1	KK	C	Kitágult hasfal; határértéki intelligencia; corpus callosum agenésia; vermis hypoplasia; myelinisatiós zavar.
SPG68 <i>KLC2</i>	AR	1	KK	C	Nystagmus; opticus atrophia; polyneuropathia; amyotrophia; peroneus gyengeség.
SPG69 <i>RAB3GAP2</i>	AR	1	KK	C	Mentalis retardatio; süketség; cataracta.
SPG70 <i>MARS</i>	AR	1	KK	C	Scoliosis; kétoldali Achilles kontraktúra; határértéki intelligencia; nephrosis syndroma.
SPG71 <i>ZFR</i>	AR	1	KK	C	Vékony corpus callosum.
SPG72 <i>REEP2</i>	AD és AR	3	KK	P	-
<i>GAD1</i> gén	AR	1	KK	C	Spasticus cerebralis paresis; mentalis retardatio.
<i>CCT5</i> gén	AR	1	KK	C	Mutiláló sensoros neuropathia.
<i>OPA3</i> gén	AR	1	KK	C	Opticus atrophia; chorea; cerebellaris ataxia; dementia.
<i>BICD2</i> gén	AR	1	KK	P	-
<i>MAG</i> gén	AR	1	KK	C	Nystagmus; tanulási zavarok.
<i>LYST</i> gén	AR	1	FK	C	Polyneuropathia; cerebellaris ataxia.
<i>ATPase6</i> gén	Mat	1	FK	C	Diabetes mellitus; hypertrophias cardiomyopathia; supraventricularis arrhythmia; cerebellaris tünetek.
SPOAN ?	AR	2	KK	C	Opticus atrophia; polyneuropathia; dysarthria; fokozott akusztikus startle válasz; ízületi deformitások; gerinc deformitások; fixatiós nystagmus; distalis amyotrophia; mozgászavarok.

A HSP differenciál diagnosztikája során számos szerzett és örökletes okot szükséges kizárni. A szerzett kórképek közt szükséges megemlíteni a gyulladásos eredetű kórképeket (sclerosis multiplex, különösen is annak primer progresszív formája), a strukturális kórképeket (nyaki gerincvelő compressio discus hernia, tumor, vagy egyéb okból), a motoneuron betegségek egyéb formáit (ALS, PLS), az infektív okokat (HTLV, HIV, syphilis és egyéb kórokozók), a gerincvelő arteriovenosus malformatioit, vitamin és nyomelem hiány szindrómákat (B12, folsav, réz hiány), toxikus okokat (lathyrismus). A genetikai differenciál diagnosztikában különösen fontos az adrenoleukodystrophia (ALD), adrenomyeloneuropathia (AMN), valamint a kezelhető dopa-reszponzív dystonia kizárása [18]. Emellett jelentős átfedés mutatkozik klinikailag az ataxiák felé, valamint több, felnőttkorban kezdődő hereditaer enzimopathia manifesztálódhat spasticus paraparesisben [19]. A spasticus paraparesissel jelentkező beteg esetében tehát számos vizsgálatot szükséges elvégezni: részletes neurológiai, szemészeti vizsgálat, koponya és nyaki gerinc MRI, lumbal punctio, rutin és speciális biokémiai laborvizsgálatok, elektrofiziológiai vizsgálatok, egyes esetekben izombiopszia.

A HSP pathogenezisét tekintve sem egységes. A HSP háttérében álló, több mint 70 különböző gén 10 funkcionális útvonalba sorolható be [17]: 1.) Az oxidatív stressz fokozódásával, mitochondriális diszfunkcióval járó génelterések (*PGN, HSP60, MT-ATP6*). 2.) Az axonális transzport zavarával járó génelterések (*SPAST, KIF5A*). 3.) A lipid metabolizmus zavarával járó génelterések (*CYP7B1, PNPLA6*). 4.) A DNS javítómechanizmus zavarával járó génelterések (*AP5Z1*). 5.) A myelinizáció zavarával járó génelterések (*PLP1, FA2H, GJC2*). 6.) Az autophagia zavarával járó génelterések (*KIAA0329, SPG15*). 7.) Az axon fejlődés zavarával járó génelterések (*LI-CAM, SLC16A2*). 8.) Az endosomal membrán és vesiculum transzport zavarával járó génelterések (*AP4B1, VPS37A, KIAA0196*). 9.) A cellularis szignáltranszdukció zavarával járó génelterések (*ATL1, SPAST, NIPA1, SPG20, ERLIN2*). 10.) A membrán transzport és sejtorganellum képződés zavarával járó génelterések (*SPAST, ATL1, REEP1, RTN2*). A különböző pathogenetikai folyamatok végső közös útvonala az axon károsodás, amely elsőként a leghosszabb axonokat károsítja, azonban nem specifikus módon.

Hálózatelemzési módszerekkel a HSP-ben érintett géneket más neurodegeneratív betegségekhez is tudták kapcsolni (ALS, Alzheimer-kór, Parkinson-kór) [20].

II/3.2. Az örökletes ataxiák

Az ataxia egy igen széles differenciál diagnosztikával rendelkező neurológiai tünet, amelynek háttere sok esetben nem tisztázódik. Egyértelmű családi halmozódás esetén a genetikai formák kivizsgálása elkezdhető, azonban nem egyértelmű esetekben, illetve sporadikus ataxiák esetében számos szekunder okot szükséges kizárni. Ebben segítséget nyújtanak a tünetek jelentkezésének időbeli jellemzői, a beteg életkora a tünetek kezdetekor, a fizikális vizsgálat, és a koponya MRI [21]. A strukturális, toxikus, infekciózus, parainfekciózus, paraneoplasias, metabolikus, autoimmun okok, más neurodegeneratív betegségekhez társuló ataxiák kizárása szükséges mielőtt a genetikai tesztekkel tovább tudnánk lépni. Az ataxia hereditaer formái minden fajta öröklésmentel előfordulhatnak. Az autoszomális domináns ataxiák prevalenciáját 1,2-41/100,000 közöttire becsülik, a recesszív ataxiák ennél ritkábbak [22]. Az ataxiák hereditaer formáinak összesített, pontos előfordulása azonban nem ismert. Az autoszomális domináns ataxiák hátterében álló lókusztokat 'SCA'-val és egy azt követő számmal jelölik. Jelenleg több mint 30 SCA lókuszt ismert. A recesszív ataxiák hátterében ennél is több (>100) gén állhat. A recesszív ataxiák etiológiájának felderítésében a genetikai tesztet megelőzően végzett fókuszált fizikális vizsgálat (szemmozgás zavarok vizsgálata) biokémiai tesztek (albumin, AFP, lipidszintek), elektrofiziológiai vizsgálat (polyneuropathia detektálására), MRI (cerebellaris atrophia jelenléte vagy hiánya) segíthet [23]. Emellett a hereditaer ataxiák más genetikai betegségekkel is átfedést mutathatnak. Gyakori jelenség a spasticus paresis és ataxia társulása, és egyes esetekben nehéz annak eldöntése, hogy a betegnél HSP vagy hereditaer ataxia irányába érdemes-e vizsgálatokat kezdeményezni. A spasticus ataxiákra tekinthetünk külön klinikai entitásként, amelynek hátterében szintén több gén eltérései állhatnak [24]. Emellett azonban az eddigi új generációs szekvenálási (NGS) vizsgálatok eredményei alapján felvetődött, hogy a spasticus paraparesisek és a hereditaer ataxiák valójában egy spektrumon helyezkednek el („ASS – Ataxia Spasticity Spectrum”) [25].

II/3.3. Az amyotrophias lateral sclerosis

Az amyotrophias lateral sclerosis (ALS) egy progresszív, fatális, az agytörzsi és gerincvelői motoneuronokat egyaránt érintő neurodegeneratív megbetegedés, amelynek incidenciája 1-3/100,000/év [26]. A betegség kórélettani háttere nem ismert egyértelműen. Neuropathológiai szempontból a leginkább jellegzetes eltérés a TDP-43 immunoreaktív cytoplasmikus inklúziók jelenléte [27]. A neurodegeneratív folyamat hátterében több kórélettani folyamat is állhat, úgy mint a proteostasis zavara, RNS processzálas zavara, mitochondriális diszfunkció, a citoskeleton felépülésének, és az axonalis transzportnak a zavart működése [28]. Az esetek körülbelül 10%-ában familiáris halmozódású a betegség, amelynek hátterében monogénes genetikai okok ismertek [29]. Genetikai faktorok azonban ennél nagyobb hányadban játszanak szerepet a betegség kialakulásában. A GWAS vizsgálatokon alapuló becslés szerint az ALS heritabilitása 21% [30], míg ikervizsgálaton alapuló becslés szerint ennél is magasabb (61%) [31], amely még számos nem ismert genetikai rizikótényező jelenlétére utal. Emellett ismert, hogy a sporadikus ALS jelentős (~14%) hányadában is azonosíthatóak monogénes okok [32], amely a fentiek ismeretében a familiáris és sporadikus megkülönböztetést megkérdőjelezi. A betegség genetikai vizsgálatát megnehezíti a nagyfokú klinikai heterogenitás [33]. A tünet fellépésének helye szerint megkülönböztetünk bulbaris, spinalis kezdetű betegséget. A felső és alsó motoneuronok érintettségének aránya eltérő lehet, amely kapcsán a két extrém pont a túlnyomóan alsó motoneuron érintettséggel járó progresszív muscularis atrophia, valamint a túlnyomóan felső motoneuron érintettséggel járó primer lateral sclerosis (PLS). Míg a betegség medián túlélése három év körül van, a betegek mintegy 10%-a 10 éven túli túlélést mutat. A frontotemporalis lebeny érintettsége alapján az ALS-FTD spektrumon is osztályozható a betegség. A klinikai heterogenitás ellensúlyozására, elsősorban a gyógyszervizsgálatokban, hasznos az El Escorial kritériumrendszer alkalmazása, azonban genetikai vizsgálatokban használatának korlátai is vannak [34], éppen a pleiotropia miatt. **2. Táblázatban** az ALS-hez köthető nagy penetranciájú gének láthatóak, amelyeknek a száma mára már 20 feletti. Látható, hogy az ALS génekre is jellemző a pleiotropia jelensége, egyes esetekben HSP, vagy ahhoz hasonló fenotípus is megjelenhet.

2. Táblázat: Az ALS-hez köthető legfontosabb gének

A saját vizsgálatunkban alkalmazott HSP-ALS panelen is szereplő gének félkövér betűtípussal szerepelnek, míg a HSP-vel korábban összefüggésbe hozott géneket pirossal emeltem ki. AD = autoszomális domináns; AR = autoszomális recesszív; XD = X-hez kötött domináns. **Forrás:** Washington Neuromuscular Disease Center adatbázis (<http://neuromuscular.wustl.edu>), GeneCards adatbázis (<http://www.genecards.org>) alapján összeállítva.

ALS típus	Gén név	Lókusz	Öröklődés	Pleiotropia
ALS1	<i>SOD1</i>	21q22.11	AD	Nem ismert
ALS4	<i>SETX</i>	9q34.13	AD	Spinocerebellaris ataxia (SCAR1)
ALS6	<i>FUS</i>	16p11.2	AD/AR	Hereditaer essentialis tremor (ETM4)
ALS7	Nem ismert	20p13	AD	Nem ismert
ALS8	<i>VAPB</i>	20q13.32	AD	Spinalis muscularis atrophia (SMAPAD)
ALS9	<i>ANG</i>	14q11.2	AD	Nem ismert
ALS10	<i>TDP43</i>	1p36.22	AD	Nem ismert
ALS11	<i>FIG4</i>	6q21	AD	Charcot-Marie-Tooth betegség (CMT4J) Polymicrogyria (BTOP) Yunis-Varon syndroma (YVS)
ALS12	<i>OPTN</i>	10p13	AD/AR	Glaucoma (GLC1E)
ALS13	<i>ATXN2</i>	12q24.12	AD	Spinocerebellaris ataxia (SCA2)
ALS14	<i>VCP</i>	9p13.3	AD	Charcot-Marie-Tooth betegség (CMT2Y) Inklúziós testes myopathia (IBMPFD1)
ALS17	<i>CHMP2B</i>	3p11.2	AD	Frontotemporalis dementia (FTD3)
ALS18	<i>PFN1</i>	17p13.2	AD	Nem ismert
ALS19	<i>ERBB4</i>	2q34	AD	Nem ismert
ALS20	<i>HNRNPA1</i>	12q13.13	AD	Inklúziós testes myopathia (IBMPFD3)

ALS típus	Gén név	Lókusz	Öröklődés	Pleiotropia
ALS21	<i>MATR3</i>	5q31.2	AD	Nem ismert
ALS22	<i>TUBA4A</i>	2q35	AD	Nem ismert
FTDALS1	<i>C9ORF72</i>	9p21.2	AD	Nem ismert
FTDALS2	<i>CHCHD10</i>	22q11.23	AD	Myopathia (IMMD) Spinalis muscularis atrophia (SMAJ)
FTDALS3	<i>SQSTM1</i>	5q35.3	AD	Neurodegeneratio ataxiával, dystoniával, tekintésbénulással (NADGP) Paget betegség (PDB3)
FTDALS4	<i>TBK1</i>	12q14.2	AD	Glaucoma (GLC1P)
ALS2	<i>ALS2</i>	2q33.1	AR	Korai kezdetű felszálló hereditaer spasticus paraparesis (IAHSP) Juvenilis primer lateral sclerosis (JPLS)
ALS5	<i>SPG11</i>	15q21.1	AR	Charcot-Marie-Tooth betegség (CMT2X) Spasticus paraparesis (SGP11)
ALS16	<i>SIGMAR1</i>	9p13.3	AR	Spinalis muscularis atrophia (DSMA2)
ALS15	<i>UBQLN2</i>	Xp11.21	XD	Nem ismert

II/3.4. A nukleáris mitochondriális neurológiai megbetegedések

Szemben a klinikailag jól karakterizálható spasticus paraparesissel, ALS-sel és ataxiával, a mitochondriális megbetegedések klinikailag kevésbé egységesek, ezeket a változatos tünettan jellemzi [35]. Mitochondriális betegség lehetőségére hívhatja fel a figyelmet a többszervi érintettség, valamint a nagy energiaigényű szervek, szövetek (idegrendszer, szem, harántcsíkolt izomzat, vese, endokrin szervek) diszfunkciója. Az egyes klinikai tünetegyütteseket szindrómákba sorolják, azonban ezek között jelentős átfedés lehet. A mitochondriális betegségeket a genetikai károsodás helye szerint is feloszthatjuk; a mitochondriális DNS (mtDNS) variációi, valamint a nukleáris DNS (nDNS) variációi következtében megjelenő betegségekre. Az mtDNS betegségek prevalenciáját mintegy 9,6/100,000-re, míg a nukleáris mitochondriális betegségek prevalenciáját 2,9/100,000-re becsülik [36]. Míg az mtDNS 13 strukturális proteint és 24 RNS molekulát kódol, és mintegy 300 patogén variációja ismert [37], addig a nukleáris mitochondriális gének száma jóval nagyobb (1000 feletti) [35]. Utóbbi csoport esetében azonban kevesebb genotípus-fenotípus információ áll rendelkezésünkre, így ezek patogén variációihoz társuló klinikai tünetegyüttesek felismerése jelentős kihívást jelent. A mitochondriális betegségekre általánosságban igaz, hogy a tünetek megjelenhetnek gyermekkorban és felnőttkorban egyaránt és minden ismert öröklésmenettel. A nukleáris mitochondriális DNS defektushoz társuló klinikai szindrómák közt szerepel a Leigh syndroma, az Alpers-Huttenlocher-syndroma (AHS), a gyermekkori myocerebrohepatopathia spektrum (MCHS), az ataxia-neuropathia spektrum (ANS), a myoclonusos epilepsia-myopathia-sensoros ataxia spektrum (MEMSA), a Sengers-syndroma, a MEGDEL syndroma, a kongenitalis lactacidosis (CLA), a krónikus külső szemizom bénulás (CPEO), valamint a mitochondriális neurogastrointestinalis encephalopathia (MNGIE) [35]. Az mtDNS eltéréseivel asszociált betegségek esetében a képet tovább bonyolítja a heteroplasmia jelensége, és a treshold effektus. A nukleáris mitochondriális betegségek csoportján belül külön csoportot képviselnek a mitochondriális dinamikát érintő génelterésekhez asszociált betegségek [38], amelyekhez gyakran társulnak idegrendszeri tünetek is. A mitochondriumok dinamikus sejtorganellumok, amelyek optimális működéséhez a fúzió-fisszió megfelelő egyensúlyára van szükség [39]. A mitochondriális dinamika zavara

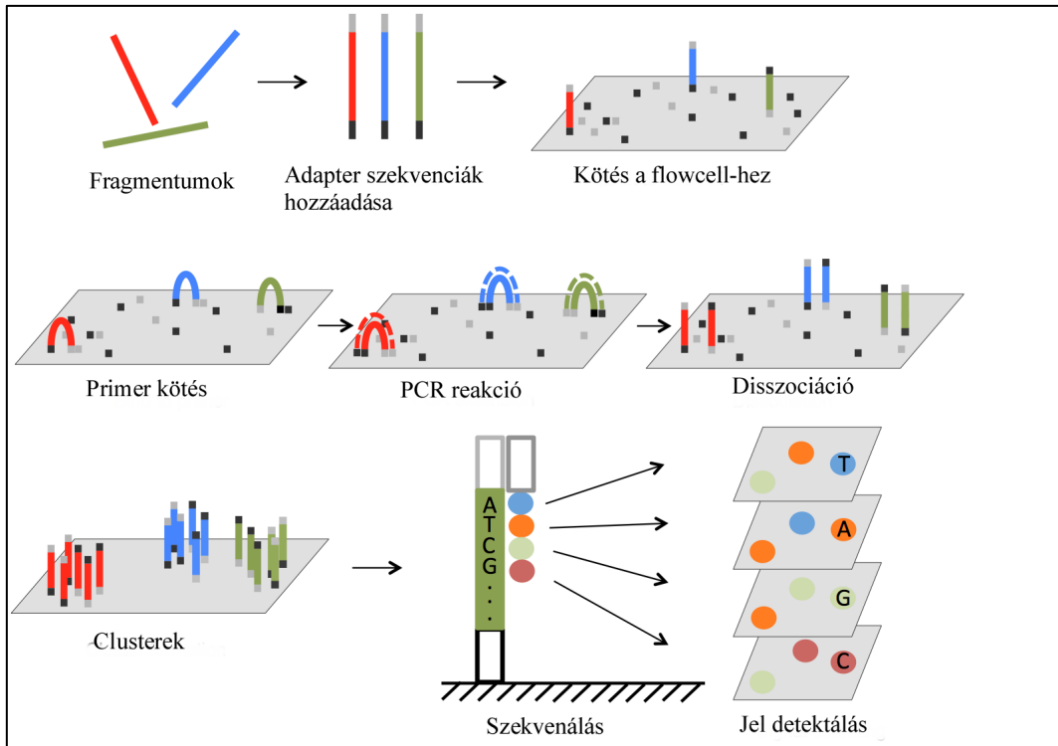
következtében kialakuló neurodegeneratív megbetegedések többek között a Charcot-Marie-Tooth betegség egyes formái, az opticus atrophia egyes izolált és szindrómás formái [40]. A komplex tünettan miatt a mitochontriális betegségek klinikai diagnosztikája nehéz. A diagnózist egyes biomarkerek használata (laktát, szérum kreatin-kináz, FGF21), az izomszövet strukturális és hisztokémiai vizsgálata (különösen az SDH és COX festés), valamint a mitochontriális komplexek biokémiai vizsgálata segíti [38].

II/4. Az új generációs szekvenálási eljárások

II/4.1. Az új generációs szekvenálási eljárások laboratóriumi technikai háttere

Az új generációs szekvenálási eljárások lényege a masszív parallel szekvencia analízis, amely a korábbi technológiákhoz képest (Sanger szekvenálás) jelentősen gyorsabb és költséghatékonyabb bázis sorrend meghatározást tesz lehetővé. Jelenleg mintegy 30, különböző technológiát képviselő, illetve különböző áteresztő képességű NGS platform érhető el [41]. Az NGS laboratóriumi folyamatában általánosságban a következő lépéseket különböztetjük meg: 1.) Könyvtárkészítés. 2.) Klonális amplifikáció. 3.) Szekvenálás. A könyvtárkészítés során a DNS molekulát fizikai behatással, vagy enzimatis módon fragmentáljuk, majd a DNS molekulákhoz adapter szekvenciákat kapcsolunk. Ezt követően a DNS molekulákat méret szerint szelektáljuk, majd a target régiókat (exom vagy target gének panelszekvenálása esetén) felsokszorozzuk [42]. A target régió felsokszorozása leggyakrabban polimeráz láncreakció (PCR), molekuláris inverziós próba (MIP), vagy hibridizáció alapú [43]. A klonális amplifikáció szerepe a jelfelerősítés, amely a különböző szekvenáló platformok esetében lehet emulziós PCR, híd-amplifikáció, vagy ún. „template-walking”, illetve „DNS nanolabda” (DNA nanoball) alapú [41]. A szekvenált DNS szakasz hossza szerint az NGS technológiákat feloszthatjuk rövid és hosszú leolvasásokat lehetővé tevő platformokra. A rövid leolvasást lehetővé tevő NGS platformokon belül megkülönböztethetünk ligáció és szintézis alapú szekvenálást. A ligációs eljárások egy jelölt oligonukleotid próba hibridizációján és ligációján alapulnak, míg a szintézis alapú rendszerek polimerázokat alkalmaznak és a jelölt nukleotid beépülését detektálják. A szintézis alapú szekvenálást tovább oszthatjuk ciklikus reverzibilis terminatio-t (CRT) alkalmazó, és egy nukleotid hozzáadásával (single nucleotide addition – SNA) működő

rendszerekre. A vizsgálataink során Illumina platformokat alkalmaztunk, amelyek CRT alapú szekvenálást tesznek lehetővé (1. Ábra).



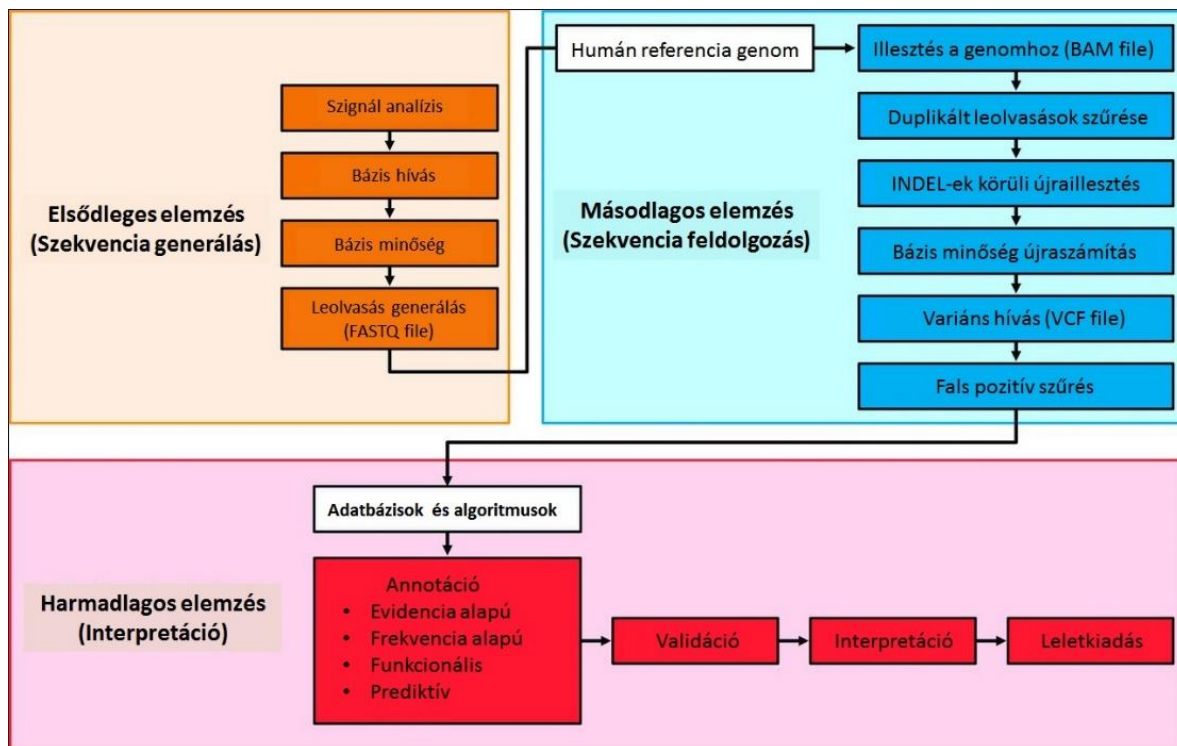
1. Ábra: A szintézis alapú szekvenálás lépései Illumina platformon

*Első lépésben a DNS fragmentumokhoz adapter szekvenciák kapcsolása történik. A fragmentumok random módon kötnek a primerekkel ellátott flowcell-en majd a hídamplifikáció révén clusterek keletkeznek. Ezt követően az egyes szekvenáló ciklusokban egy-egy fluorescens jelölt nukleotid épül be a növekvő DNS láncba. A laser által excitált fluorophore felvillanását detektálja a platform. **Forrás:** Yuan Lu et al. (2016) Next Generation Sequencing in Aquatic Models, in Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges, Dr. Jerzy Kulski (Szerk.), InTech nyomán [44] (<https://www.intechopen.com/books/next-generation-sequencing-advances-applications-and-challenges/next-generation-sequencing-in-aquatic-models>)*

A CRT alapú szekvenálás során a Sanger technikában alkalmazotthoz hasonló, jelölt láncterminátorok fényfelvillanását detektálja a platform, az egyes ciklusokban. A CRT alapú szekvenálás előnyei a relatíve nagy pontosság, és a homopolymer hibák ritkább előfordulása. Hátrányt jelent az AT-, GC-gazdag DNS régiók alulreprezentáltsága, a substitúciós hibák gyakoribb előfordulása. Emellett a rövid leolvasási hossz miatt, a strukturális variánsok iránt alacsony az érzékenysége [41].

II/4.2. Az új generációs szekvenálás bioinformatikai háttere

Az új generációs szekvenálás nagy mennyiségű (GB, illetve TB nagyságrendű) adatot generál, amely csak további bioinformatikai feldolgozás után értékelhető, majd értelmezhető. Így az NGS alkalmazása során az adatelemzési lépések összességében gyakran több időt vesznek igénybe, mint a laboratóriumi lépések. Az elemzési lépéseket három fázisra oszthatjuk [45] (2. Ábra).



2. Ábra: A klinikai NGS analízis fő komponenseinek folyamatábrája

Forrás: Oliver et al. (2015) Bioinformatics for Clinical next Generation Sequencing. Clinical Chemistry, 61(1):124–35 nyomán [45].

Az elsődleges elemzési lépések során a képi információkból, általában a szekvenáló platformhoz kapcsoltan generálódik a FASTQ file. A FASTQ file formátum a nyers szekvenciadatok standard formátuma, amely a rövid leolvasásokat (bázissorrend) és leolvasásokhoz társuló minőségi mutatókat (Phred score) tartalmazza. A FASTQ file-ok értékelésével már információkat nyerhetünk a szekvenálás minőségéről. A másodlagos elemzési lépésekben a FASTQ file-ok további feldolgozásával a végső cél a variánsok listáját tartalmazó VCF file létrehozása. Ehhez első lépésben a leolvasásokat a referencia genomhoz illesztik, amelyet követő további lépések a variáns kivonatolás minőségének javítását szolgálják (PCR duplikátumok kiszűrése, INDEL-ek körüli újraillesztés). Az illesztés során nyert BAM file-ok közvetlenül is vizualizálhatóak. A variáns kivonatolási lépésben az adott genomi pozícióban, a különböző leolvasásokból származó információ alapján kerül kiszámításra a genotípus. Ezt követően a variánsokat minőségi mutatók szerint szűrjük. Ahhoz, hogy a variánsok szerepét értékelni tudjuk, az annotáció lépésében, adatbázisokból származó információkat társítunk az adott variánsokhoz. A másodlagos és harmadlagos elemzési lépésekhez számos különböző szoftver érhető el, amelyek eredménye sok esetben csak részben átfedő [46]. Így az egyes laboratóriumoknak saját bioinformatikai elemzési módszert szükséges kialakítaniuk.

II/5. Az új generációs szekvenálási eljárások által detektált variációk hatásának értékelése

Az adatelemzési lépésben nyert annotált variánslista exomszekvenálás esetében mintegy 20,000 variánst tartalmaz [47], azonban panelszekvenálás esetén is, a lista több száz nagyságrendű lehet. A ritka betegségek vizsgálatakor általában egy-két kauzális mutáció azonosítása a célunk, így a variánsok számának szűkítésére további bioinformatikai és manuális lépésekre van szükség. Nehézséget okoz, hogy a variánsok jelentős hányada ismeretlen jelentőségű. Még a gyakran vizsgált *BRCA1/2* gén esetében is az irodalomban közölt variánsok ~20%-a ún. bizonytalan szignifikanciájú variáns („variant of uncertain significance”, VUS) [48]. A variánslista szűkítésére tehát különböző szűrési feltételeket alkalmazunk, amelyek általában a következő elveken alapulnak [47,49]: 1.) Öröklésment alapján történő szűrés. 2.) Evolúciós konzerváltságot mérő, valamint a biokémiai struktúra változását prediktáló szoftverek pontszámai. 3.) Pathogén variánsok listáját tartalmazó

adatbázisokban történő keresés. 4.) Populációs illetve belső adatbázisokból származó minor allél frekvencia adatok. 5.) Fenotípus alapú szűrés.

A predikciós szoftverek gépi tanulási eljárásokat alkalmaznak annak becslésére, hogy a nukleotid, vagy aminosav változás mekkora valószínűséggel okoz a fehérjében károsodást [50]. Mivel a különböző predikciós szoftverek eltérő jellemzőkkel bírnak [51], és eredményeik csak részben átfedőek, ezért általában ajánlott több predikciós szoftver alkalmazása. A minor allél frekvencia adatok szintén fontosak a ritka betegségekben végzett genetikai vizsgálatok esetében, azonban figyelembe kell venni, hogy az egyes adatbázisokban nem csak egészséges egyének adatai jelenhetnek meg [52]. Az elmúlt években az adatelemzésben szerepet kapnak a fenotípust is figyelembe vevő, variáns szűrést támogató szoftverek [53]. Ehhez elengedhetetlen a fenotípus standardizált, számítógép által feldolgozható leírása, amelyre a humán fenotípus ontológia (HPO) (<http://human-phenotype-ontology.github.io/>) ad többek között lehetőséget. A végső lépésben, minden esetben szükség van a talált variánsok kutató, illetve genetikus orvos általi értékelésére. Az NGS kísérletek elterjedésének köszönhetően egyre több variáns került közlésre az irodalomban, így szükség volt a variánsok kategorizálásának egységesítésére. Az American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) ajánlása alapján [54] a variánsokat, megszabott kritériumok szerint, 5 osztályba soroljuk (pathogén, valószínűleg pathogén, benignus, valószínűleg benignus, ismeretlen szignifikanciájú).

II/6. Az új generációs szekvenálási eljárások etikai aspektusai

Az új generációs szekvenálási eljárások alkalmazása az utóbbi években egyre elterjedtebb, mind a kutatásban mind klinikai alkalmazásban [55,56]. Az NGS szekvenálás számos genetikai betegség diagnosztizálását megkönnyítette, meggyorsította [57]. Ugyanakkor a technológia széles körű alkalmazása számos etikai kérdést is felvet. A klinikai genetikusok elé új kihívást állít a korábbihoz képest jelentősen megnövekvő információmennyiség kezelése, annak értelmezése [58]. Az elmúlt években elterjedő, közvetlenül a felhasználó által indikált genetikai tesztek (direct-to-consumer - DTC tesztek) a genetikai tanácsadáshoz kapcsolódó jogi tényezők újragondolását is megkívánják, illetve új típusú

problémákat gerjesztenek (például utólagos genetikai tanácsadás egy már kézhez kapott lelet birtokában). Tekintve, hogy a nagy áteresztő képességű genetikai vizsgálatok eredménye nem bontható le egyszerűen pozitív vagy negatív teszteredményekre, hanem a találatok egy bizonyossági szinthez köthető spektrumon helyezkednek el, a teszt elvégzése előtt is már szükséges felkészíteni a pácienszt a lehetséges kimenetekre. Így összességében egyes nézetek szerint az NGS technológiák elterjedése nem csupán kvantitatív, hanem kvalitatív változásokat is hozott a genetikai tanácsadás gyakorlatában [59]. Az új generációs szekvenálási eljárásokhoz kapcsolódó legfontosabb etikai kérdések közt említhetjük a véletlenszerű találatok [56] és a bizonytalan szignifikanciájú találatok kérdését [60]. További kérdéseket vet fel a klinikai vizsgálatok és klinikai kutatások közt elmosódó határ [61], valamint az eredmények időről időre történő felülvizsgálatának szükségessége [62]. Az eredmények megosztása általánosságban, illetve a családtagokkal, más kutató intézményekkel, laboratóriumokkal etikai és adatvédelmi szempontokból is kihívást jelent [63]. Gyermekek esetében végzett nagy áteresztő képességű genetikai vizsgálat a fentiekén túl további kérdések megfontolását is megköveteli [64]. Ahhoz, hogy a fenti kérdésekben megfelelő állásfoglalást lehessen megfogalmazni, a nemzetközi irányelveken túl szükséges ismereteket szereznünk a hazai attitűdről is, mivel Közép-Kelet Európában, illetve Magyarországon hasonló vizsgálatokról kevés információ áll rendelkezésre.

III. CÉLKITŰZÉSEK

Célkitűzéseinket az alábbi pontokban fogalmaztuk meg:

1. Az új generációs szekvenálás nyújtotta lehetőségek vizsgálata a klinikai diagnosztikában (Sanger vs. új generációs panel és teljes exom szekvenálási vizsgálatok eredményességének elemzése) spasticitás-ataxia spektrum betegségeiben.
2. Hereditaer spasticus paraparesissel diagnosztizált betegekben genetikai epidemiológiai vizsgálatok végzése.
3. Genotípus fenotípus összefüggések vizsgálata spasticitás-ataxia spektrum betegségeiben (HSP, ALS, ataxia fenokópiák azonosítása).
4. Komplex mitochondriális betegségben új gén azonosítása.
5. Magyar lakosok nagy áteresztő képességű genetikai vizsgálatok iránt mutatott attitűdjének elemzése, és az ehhez társuló etikai kérdések diszkussziója.

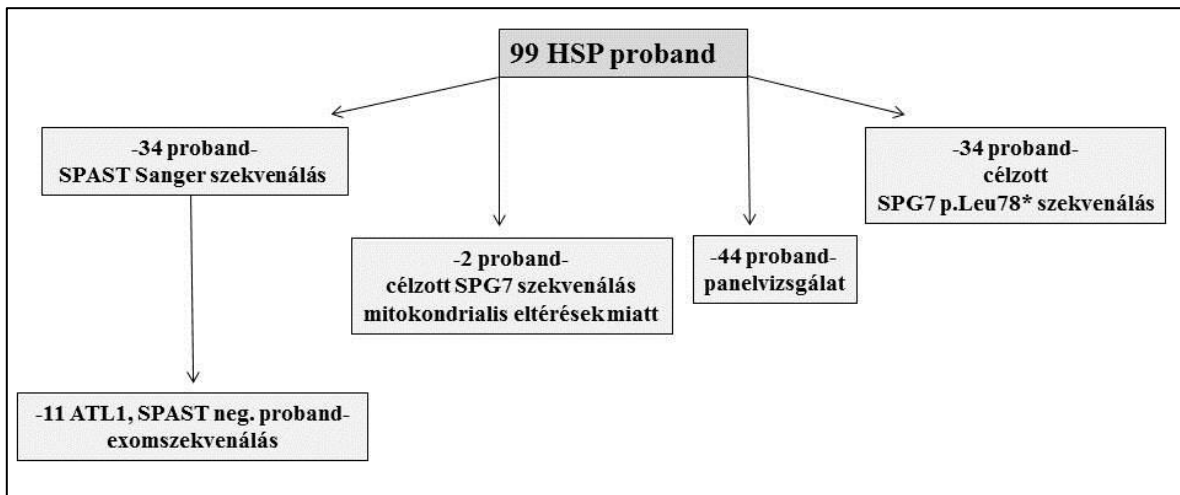
IV. MÓDSZEREK

IV/1. Genetikai kutatás során vizsgált betegek

A genetikai vizsgálatok során vizsgált betegek minden esetben írásos tájékozott beleegyezést adtak. A genetikai vizsgálatok részben diagnosztikus célúak voltak, a vizsgálatokra ETT TUKEB, vagy intézményi TUKEB etikai bizottsági engedéllyel rendelkezünk.

IV/1.1. Hereditaer spasticus paraparesissel diagnosztizált betegek

A hereditaer spasticus paraparesissel diagnosztizált betegek vizsgálati protokollját a **3. Ábra** mutatja be.



3. Ábra: A hereditaer spasticus paraparesis genetikai vizsgálati protokollja

Az ábra a HSP genetikai vizsgálatok protokollját mutatja be, az egyes vizsgálatok szerint megadva. A különböző vizsgálatokban részt vevő probandok számának összege a teljes kohortnál nagyobb számot ad ki, mivel egyes esetekben (elsősorban a SPAST gén szekvenálás és SPG7 p.Leu78* variáció vizsgálata esetében), egy probandnál több vizsgálat is történt, így a csoportok részben átfedőek.

A HSP vizsgálatba bevont betegeket részben a Semmelweis Egyetem Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetében vizsgáltuk, részben más neurológiai intézetek által megküldött mintákat vizsgáltunk a csatolt klinikai információk alapján. A vizsgálatba történő bevonás kritériumai a következők voltak: a fő prezentációs tünet lassan progrediáló spasticus paraparesis, valamint a diagnosztikus vizsgálatokkal a másodlagos okok kizárása.

Egyértelmű klinikai kép esetében (fiatal kezdet, családi halmozódás, típusos klinikum) elegendő volt a neurológiai vizsgálat, lehetőleg koponya MR lelettel. A teljes vizsgálati kohort 99 probandból (60 férfi, 39 nő, átlagéletkor $47,5 \pm 14,3$ év, familiaritás a kohort 41%-ában) állt, a vizsgált családtagokkal együtt 111 főnél (65 férfi, 46 nő, átlagéletkor $46,9 \pm 14,9$ év) történtek genetikai vizsgálatok. A *SPAST* gén Sanger szekvenálását 34 proband (20 férfi, 14 nő, átlagéletkor $48,1 \pm 13,1$ év, familiaritás 38%) esetében végeztük el. Tizenegy esetben, ahol nem találtunk *SPAST* és *ATL1* variációt teljes exom szekvenálást végeztünk (8 férfi, 3 nő, átlagéletkor $49,8 \pm 10,2$ év, familiaritás 55%). Két esetben, az izombiopsziás mintában talált mitochondriális eltérések miatt, célzott *SPG7* szekvenálás történt (sporadikus esetek, 62 éves férfi, 63 éves nő). Panelvizsgálatot 44 probandnál (27 férfi, 17 nő, átlagéletkor $46,8 \pm 14,6$ év, familiaritás 45%) végeztünk, akiknek korábban más HSP irányú genetikai vizsgálata nem volt. További 34 probandnál (19 férfi, 15 nő, átlagéletkor $46,0 \pm 13,5$ év, familiaritás 32%) célzottan vizsgáltuk az *SPG7* p.Leu78* variáns jelenlétét a második exon Sanger szekvenálásával.

IV/1.2. Ataxia prezentációs tünettől induló HSP esete

Egy 18 éves férfi beteg esetében, akinél cerebellaris ataxia tünetei jelentkeztek 11 éves korában, a molekuláris etiológia tisztázása érdekében, teljes exom szekvenálást végeztünk. A teljes exom szekvenálást megelőző célzott genetikai vizsgálatok negatívak voltak. A proband mellett a tünetmentes szülőket is szekvenáltuk, azaz trio vizsgálat történt.

IV/1.3. Amyotrophias lateral sclerissal diagnosztizált betegek

A hereditaer spasticus paraparesissel diagnosztizált betegeken kívül további 14 motoneuron betegséggel diagnosztizált beteg (9 nő, 5 férfi) panelvizsgálatát végeztük el. A 14 beteg közül 13 betegnél kevert motoneuron érintettség volt található, az El Escorial kritériumok szerint amyotrophias lateral sclerosis volt valószínűsíthető. Egy beteg feltételezhetően primer lateral sclerosisban szenved. A betegek átlagéletkora $50,8 \pm 11,8$ év volt, míg az átlagos betegségkezdés $47,8 \pm 11,4$ év.

IV/1.4. Komplex mitochondriális fenotípussal rendelkező család

Egy komplex mitochondriális fenotípussal (myopathia, ataxia, pszichiátriai, endokrin tünetek, minor malformatiok) jelentkező család esetében az 53 éves probandnál, annak

tüneteket mutató lányánál és a tünetmentes paternél teljes exom szekvenálást végeztünk a molekuláris etiológia tisztázására. A megelőző célzott genetikai vizsgálatok mtDNS mutációt vagy mtDNS deletiot nem igazoltak sem a vér-, sem az izomszöveti mintákban.

IV/2. Kérdőívet kitöltő egyének kiválasztásának módszertana:

Kérdőívünket papír alapon illetve online kérdőív formájában terjesztettük. Neurogenetikai szakrendelésünkön papír alapú kérdőívet terjesztettünk a betegek, illetve a kísérő hozzátartozók között. A megegyező felépítésű kérdőív online is elérhető volt, ennek web linkjét email-ben kiküldtük azon betegeinknek, akik korábban azt megadták Intézetünk számára. A web linket szociális médián keresztül is elérhetővé tettük. További kérdőíveket gyűjtöttünk neurogenetikai kurzusunkon részt vevő orvos hallgatóktól, valamint az éves nyílt kurzusunkon megjelenő résztvevők között. A kérdőív kitöltése önkéntes és névtelen volt. A kérdőív kitöltése előtt tájékoztató szerepelt, a vizsgálatban részt vevők a kérdőív kitöltésével adták beleegyezésüket. A vizsgálatához kutatás etikai bizottsági engedély állt rendelkezésünkre.

IV/3. Diagnosztikai vizsgálatok

A genetikai kutatásba részben saját ambulanciákról, részben Intézetünkkel kollaborációban álló intézetekből vontunk be betegeket. Minden beteget neurológus szakorvos vizsgált, szükség esetén további diagnosztikus vizsgálatok történtek, úgymint pszichiátriai, rutin laboratóriumi, immunszerológiai, általános liquor és liquor immunológiai vizsgálat, neuroradiológiai (CT, MRI), elektrofiziológiai (ENG, EMG, kiváltott válasz) vizsgálat, izom biopsia. A nem egyértelműen családi halmozódást mutató HSP betegek esetében kizárásra kerültek a metabolikus okok (B12, folsav hiány), autoimmun etiológia (primer progresszív sclerosis multiplex), strukturalis laesiók, illetve EMG vizsgálat történt az ALS kizárására.

IV/4. Genetikai laboratóriumi vizsgáló módszerek

A genetikai vizsgálatokhoz a DNS izolálás vérből történt „QIAamp DNA blood kit” segítségével, a gyártó utasításai szerint (QIAGEN, Hilden, Germany).

IV/4.1. Sanger szekvenálás

A HSP kohortban 15 probandnál a *SPAST* és *ATLI* gének konvencionális Sanger szekvenálását külföldi laboratórium végezte: CENTOGENE AG, Rostock, Németország. További 19 esetben a Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetében történt a *SPAST* gén szekvenálása. Két probandnál az *SPG7* gén teljes szekvenálását a CENTOGENE AG, Rostock, Németország végezte, míg 34 probandnál a második exon szekvenálásával a Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetében célzottan vizsgáltuk az *SPG7* p.Leu78* variáns jelenlétét. Sanger szekvenálást alkalmaztunk az új generációs szekvenálás által detektált variánsok konfirmálására, valamint a szegregációs vizsgálatok során. Az Intézetünkben végzett Sanger szekvenálások esetében a szekvenáláshoz ABI Prism 3500 DNS szekvenátort (Applied Biosystems, Foster City, USA) használtunk. A Sanger szekvenálás során alkalmazott primerek listája a <http://semmelweis.hu/genomikai-medicina/dokumentumok> linken érhető el. A szekvenciákat a humán referencia genomhoz hasonlítottuk az NCBI Blast programjával (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

IV/4.2. Hereditaer spasticus paraparesis panelvizsgálat Illumina MiSeq platformon

A HSP vizsgálatban 44 probandnál végeztünk panel szekvenálást. A szekvenálás egy általunk tervezett Agilent Haloplex, illetve Agilent Sureselect QXT könyvtárkészítő reagenssel történt, a gyártó előírásai szerint, Illumina MiSeq platformon a Semmelweis Egyetem Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetében. Az összeállított panel (**3. Táblázat**) jelentős számú HSP-asszociált gén mellett a differenciál diagnosztikában fontos egyes géneket is lefedti.

3. Táblázat: A HSP-ALS panelvizsgálat által lefedett gének listája fenotípus szerinti bontásban

Elsődlegesen HSP-hez kötött gének:	<i>AP4B1; AP5Z1; ATLI; BSCL2; CYP7B1; DDHD1; DDHD2; ERLIN2; FA2H; GJC2; HSPD1; KIAA0196; KIF1A; KIF5A; LICAM; NIP1; PLP1; PNPLA6; REEP1; RTN2; SLC16A2; SLC33A1; SPAST; SPG11; SPG20; SPG21; SPG7; ZFYVE26; ZFYVE27</i>
Elsődlegesen ALS-hez kötött gének:	<i>ALS2; ANG; C9ORF72; FUS; OPTN; SETX; SOD1; TARDBP; VAPB</i>
Differenciál diagnosztikailag szóba jövő gének:	
Nuklearisan kódolt mitochondriális gének	<i>POLG; COX15; NDUFS1; NDUFS7; NDUFS8; NDUFV1</i>

2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehidrogenáz hiány	<i>HSD17B10</i>
Adrenalis hyperplasia 1	<i>STAR</i>
Alpha-methylacyl-CoA racemáz hiány	<i>AMACR</i>
Alsó végtagi dominanciájó spinalis muscularis atrophia 2 (SMALED)	<i>BICD2</i>
Autoszomális domináns opticus atrophia 3 (OPA3)	<i>OPA3</i>
Familiáris Alzheimer kór 3	<i>PSEN1</i>
Friedreich ataxia	<i>FXN</i>
Hyperornithinaemia-hyperammonaemia-homocitrullinuria (HHH) syndroma	<i>SLC25A15</i>
Izolált szulfid oxidáz hiány (ISOD)	<i>SUOX</i>
Korai infantilis epilepsias encephalopathia 3 (EIEE3)	<i>SLC25A22</i>
Krabbe betegség	<i>GALC</i>
Spasticus ataxia Charlevoix-Saguenay (ARSACS)	<i>SACS</i>
Spinocerebellaris ataxia 3 (SCA3)	<i>ATXN3</i>
X-hez kötött adrenoleukodystrophia (X-ALD)/adrenomyeloneuropathia (AMN)	<i>ABCD1</i>
X-hez kötött sideroblastos anaemia és ataxia (XLSA/A)	<i>ABCB7</i>

IV/4.3. Az exomszekvenálás laboratóriumi módszerei

A HSP vizsgálat során 9 probandnál, akiknél az *ATL1* és *SPAST* szekvenálás negatív volt, teljes exom szekvenálás történt. A teljes exom szekvenálás ebben a kohortban Illumina HiSeq platformon, Agilent Sureselect Human All Exon V4 capture kit segítségével történt kollaborációban: Hussman Institute for Human Genomics, Miller School of Medicine, Miami, Florida, USA. A komplex mitochondriális fenotípussal rendelkező család esetében az exomszekvenálást a Debreceni Egyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetével kollaborációban végeztük. A könyvtárkészítési lépések NimbleGen SeqCap EZ Human Exome Library v3.0 Kit (Roche) capture kit felhasználásával történtek. A szekvenálás Illumina HiScanSQ platformon történt. A cerebellaris ataxiával vizsgált beteg esetében a Semmelweis Egyetem Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetében végeztük a

teljes exom szekvenálást Nextera Rapid Capture kit (Illumina) felhasználásával, Illumina HiSeq2500 platformon.

IV/5. Az új generáció szekvenálási eljárások során alkalmazott elemzési módszerek

IV/5.1. Használt szoftverek

A futásokból származó FASTQ file-ok minőségi ellenőrzésére a FastQC programot használtuk (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). A HSP és ALS panelvizsgálatok esetében a MiSeq futásból származó FASTQ fájlok illesztési és variánshívási lépéseit az Agilent Surecall v2.1 szoftverrel végeztük, gyári Haloplex beállítási paraméterekkel. A SureCall szoftverben a BAM file-ok vizualizálása is lehetséges, illetve a lefedettségi adatok is kinyerhetőek. A Hussmann intézetben történt exom vizsgálatok esetében az illesztési lépések BWA szoftverrel [65], a variánshívás lépései a GATK ajánlásai [66] szerint történtek, a lefedettségi adatok a GEM.app szoftverből [67] származnak. A komplex mitochondriális fenotípussal jelentkező család esetében az illesztési lépések a BWA szoftverrel, a variánshívás a Samtools szoftverrel történt [68,69]. A cerebellaris ataxiával vizsgált betegnél, a Genomikai Medicina Intézetben történt teljes exom szekvenálások esetében a FASTQ file-ok feldolgozása az Illumina Basespace 'BWA Enrichment' programjával (<https://basespace.illumina.com/apps/2906905/BWA-Enrichment?preferredversion>) történt, amely BWA-GATK pipelinet alkalmaz. A variáns file-ok (VCF) annotálására az SnpEff [70], SnpSift [71] szoftvert alkalmaztuk. A variánsok szűrésére a Gem.app, SureCall, valamint a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Méréstechnika és Információs Rendszerek Tanszékén fejlesztett 'VariantAnalyzer' szoftvereket alkalmaztuk. A fenotípus alapján a variánszűrést segítő Exomiser programot is alkalmaztuk [72]. A splice site mutációk elemzéséhez a 'Human Splicing Finder' (HSF3) szoftvert [73], valamint az Alamut programot (Interactive Biosoftware) használtuk.

IV/5.2. A variánsok szűrése során használt módszertan

A variánsok szűrése során a következő elveket követtük: 1.) Ismert patogén variánsokra történő szűrés. Ennek során a HGMD 2015.1 adatbázist [74], illetve a ClinVar adatbázisát

[75] használtuk. 2.) Nagy és közepes hatású variációk (stop variációk, frameshiftet okozó insertiók, deletiók, splice variációk, missense variációk) megtartása. 3.) 5% minor allél frekvenciával bíró variációk kizárása, illetve a belső adatbázisunkban többszörösen előforduló variációk kizárása. 4.) A proteinfunkciót megváltoztató variánsok megtartása. A nonsense mutációkat és kereteltolódást eredményező insertiókat, deletiókat, amennyiben a klinikumnak megfelelő génben, a feltételezett öröklésmenetnek megfelelően voltak megtalálhatóak pathogénnek tekintettük. A nem szinonim, aminosavcsereét eredményező variációkat a proteinpredikációs szoftverek (SIFT [76], Polyphen2 [77], GERP [78], MetaSVM [79]) által adott pontszámok alapján priorizáltuk. 4.) Az öröklésmenetnek megfelelően szegregáló variációkra történő szűrés. 5.) Az OMIM adatbázisban (McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), 2017. <https://omim.org/>) szereplő gének előnyben részesítése. 6.) További manuális szűrés fenotípus alapján, illetve Exomiserrel segített szűrés fenotípus alapján. A variánsok klinikai hatásának végső értékelése során az American College of Medical Genetics ajánlását [54] követtük.

IV/6. A felmérés alapját képező kérdőív felépítése:

Kérdőívünk magyar nyelven íródott. A kérdőív összesen 37 kérdésből (Q1-Q37) épült fel, amelyen belül összesen 72 alkérdést tartalmaz (42 egyszeres választás, 6 nyílt kérdés, 3 többszörös választási kérdés, 21 skála). Szerkezetét tekintve öt kérdéskört érintettünk. Az első rész a kitöltő szociodemográfiai jellemzőire kérdez rá. A második rész a kitöltő genetikai ismereteire, általános genetikai fogalmakra kérdez rá. A harmadik rész a genetikai tesztek kérésével kapcsolatos attitűdre fókuszál. A negyedik rész a genetikai tesztek eredményeivel, véletlenszerű találatokkal, az ötödik rész pedig genetikai eredmények, minták megosztásával kapcsolatos kérdéseket tartalmaz. A teljes kérdőív a <http://semmelweis.hu/genomikai-medicina/dokumentumok> linken található meg.

Két kérdéscsoportból (Q10, Q12) a további adatfeldolgozás céljára két összesítő pontszámot hoztunk létre. Az első kérdéscsoportban (Q10) kilenc fogalom pontozását kértük a kitöltőtől attól függően, hogy saját bevallása szerint mennyire érti meg az adott fogalmat (10-es pontszám, ha teljes mértékben érti, 1-es pontszám, ha egyáltalán nem érti

az adott fogalmat). A pontszámok összeadásával (komplett kitöltés esetén) egy 10 és 90 közötti számot kaptunk, amelyet „önértékelő genetikai ismeret” pontszámnak nevezünk. Az irodalomban fellelhető objektív illetve szubjektív genetikai ismeret pontszámokat [80–83] nem alkalmaztuk, mivel ezek heterogének, és magyar nyelven nem áll rendelkezésre validált genetikai tudást felmérő skála. Célunk ezekkel szemben az volt, hogy felmérjük, a kitöltő találkozott-e korábban a kérdőívben használt, illetve a genetikai tesztekkel kapcsolatban gyakran használt fogalmakkal.

A második kérdéscsoportban (Q12) 10 jelleg osztályozását kértük 1-4-ig terjedő skálán, annak megfelelően, hogy a kérdőívet kitöltő személy szerint milyen erős genetikai meghatározottsága van az adott jellegnek (1: nincs genetikai hatás, 2: kismértékű genetikai meghatározottság, 3: nagymértékű genetikai meghatározottság, 4: teljes mértékben genetikailag meghatározott jelleg). Egyes jellegek tudományos szempontból ismert genetikailag meghatározottak, vagy nagymértékben genetikailag meghatározottak, azonban a pontozásnál nem ezt vettük figyelembe. Ehelyett a pontszámok összegét számoltuk, amelyet „genetikai meghatározottság” pontszámnak nevezünk. Teljes kitöltés esetén ez 10-40 pont között változik. A válaszadók csoportját 30-as pontszám levágási határnál dichotomizáltuk, mivel a 30-as pontszám esetén a kitöltő minden jelleget erősen vagy teljesen genetikailag meghatározottnak vélt.

IV/7. Statisztikai módszerek:

A statisztikai számításokat IBM-SPSS 21.0 szoftver segítségével végeztük el. Azokat a személyeket, akik egyes kérdéseket nem válaszoltak meg, csak az adott kérdés elemzéséből zártuk ki. A prevalenciát százalékokban mértük. A bináris adatok elemzése során chi-négyzet próbát és bináris logisztikus regressziót (esélyhányados 95%-os konfidencia intervallum, $p < 0.05$ szignifikancia szint mellett) alkalmaztunk. Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk annak megítélésére, hogy a végzettség és az „önértékelő genetikai ismeret” pontszám között összefüggés fennáll-e. Az „önértékelő genetikai ismeret” pontszám valamint a foglalkozás (egészségügyi vagy nem egészségügyi) közötti összefüggés vizsgálatára Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk. Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk annak vizsgálatára, hogy az „önértékelő genetikai ismeret” pontszám megoszlása azonos-e

a 30 feletti illetve alatti „genetikai meghatározottság” pontszámmal rendelkező egyének között.

A közvetlenül a fogyasztók által indikált (DTC) vizsgálatok iránt mutatott pozitív attitűdöt meghatározó prediktorok vizsgálatára többváltozós bináris logisztikus regressziós modellt építettünk fel. Ennek során három kérdést választottunk ki a kérdőívből, amelyek leginkább összefüggésben vannak a DTC vizsgálatokkal: (1) Q16: Elfogadhatónak tartja-e genetikai tesztek kereskedelmi forgalomban történő megvételének lehetőségét? (2) Q18: Kérne-e Ön széles körű genetikai tesztet csupán kíváncsiságból? (3) Q19.4: Kérne-e genetikai vizsgálatot egészségesen, orvosi vizsgálat nélkül érdeklődésből, származása megismerésére?

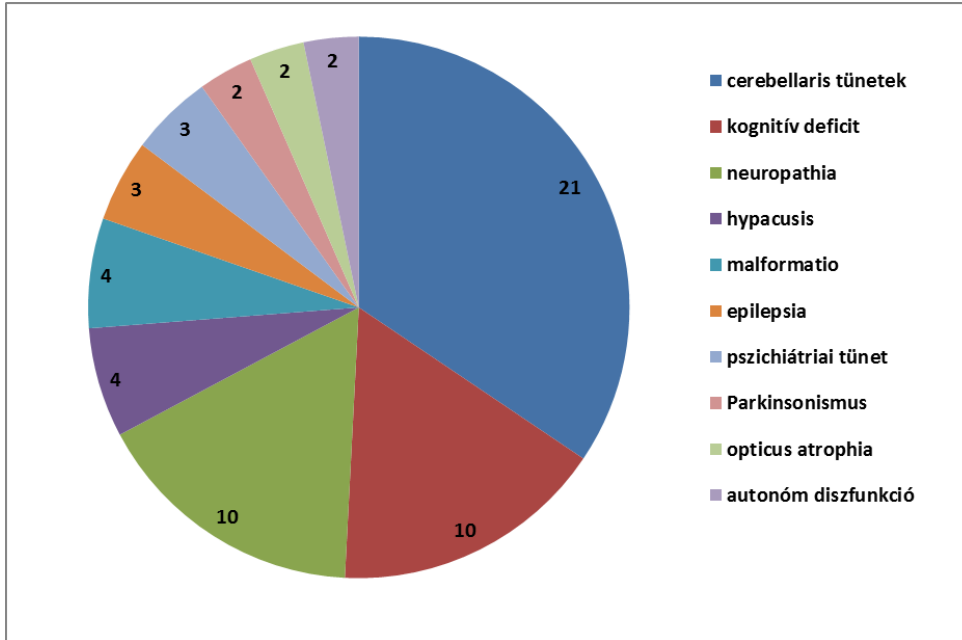
V. EREDMÉNYEK

V/1. A genetikai vizsgálatok eredményei örökletes neurodegeneratív betegségekben

V/1.1. A HSP betegek klinikai jellemzői

A 111 HSP beteg közül komplex hereditaer spasticus paraparesist (cHSP) 47 esetben diagnosztizáltunk. A komplikáló neurológiai tünetek gyakorisági megoszlását a **4. Ábra** mutatja be. A leggyakoribb komplikáló neurológiai tünetek cerebellaris érintettségre utaltak (ataxia, intentios tremor). Ezek 21 betegnél voltak jelen. Emellett gyakori társuló tünet volt a klinikai szintű kognitív hanyatlás, amely 10 betegnél fordult elő. Az enyhe fokú, ENG vizsgálattal detektált, axonalis neuropathia nem jelent komplikált HSP-t, azonban 10 beteg esetében a neuropathia klinikailag is jelentkezett (distalis paraesthesia, distalis izomatrophia formájában). Hypacusis 4 míg epilepsia 3 beteg esetében volt jelen. Két beteg esetében Parkinsonismus tünetei társultak. Major pszichiátriai zavar két beteg esetében komplikálta a klinikai képet, egy esetben dadogás társult. Két-két betegnél opticus atrophia, illetve autonóm diszfunkció volt jelen. Négy betegnél voltak jelen malformatiok: az egyik proband esetében dysmorphias arc, egy proband esetében macrocephalia, egy proband esetében elálló fülek és synophris, míg egy proband esetében Dandy Walker malformatio. A koponya MR-en a leggyakoribb eltérés a cerebellaris atrophia volt, amely 7 beteg esetében került leírásra. Enyhe, periventricularis fehérállományi jelzavart 3 beteg esetében írtak le, míg diffúzabb, illetve nem periventricularisan megjelenő jelzavar 6 beteg esetében került leírásra. Corpus callosum atrophia négy beteg esetében volt jelen. Két beteg esetében a pyramispálya hyperintensitása ábrázolódott. A betegségkezdet a neonatalis korban megjelenő tünetek és 65 év között változott, átlagosan $28,6 \pm 17,4$ év volt. Családi halmozódás 41 proband esetében volt jelen, 19 esetben autoszomális domináns öröklésmenet volt valószínűsíthető. Valószínűsíthetően autoszomális recesszív öröklésmenet három esetben volt jelen, míg további 19 esetben az öröklésmenet nem volt

egyértelmű (távoli rokon volt érintett, vagy a családi anamnesis alapján nem egyértelműen elődönthető az öröklésmenet, vagy a fenotípus nem volt egyértelmű a rokonnál).



4. Ábra: Az egyes klinikai tünetek előfordulási gyakorisága cHSP esetén

V/1.2. Hereditær spasticus paraparesisben azonosított genetikai eltérések megoszlása, az egyes vizsgálómódszerek találati aránya

Céltzott *SPAST* szekvenálás 34 probandnál történt. Ebben a kohortban hét esetben (20,6%) azonosítottunk pathogén variációt a *SPAST* génben. Két proband esetében az izombiopsziás mintában megjelenő mitochondriális eltérések miatt céltzott, teljes *SPG7* gén szekvenálás történt. Az egyik proband esetében igazolódott pathogén variáció az *SPG7* génben. Tizenegy proband esetében, akiknél mind a *SPAST*, mind az *ATL1* gén szekvenálása során pathogén variáció nem volt jelen, exomszekvenálás történt. Az exomszekvenálás során két proband esetében pathogén *SPG11* variációkat, egy proband esetében pathogén *SPG7* variációkat, és egy proband esetében adrenomyeloneuropathiat (*ABCD1* variáció) azonosítottunk. Exomszekvenálás révén tehát a *SPAST*, *ATL1* negatív probandok 36,4%-ában tudtuk tisztázni a genetikai hátteret. Panelszekvenálás (előzetes *SPAST* és *ATL1* szekvenálás nélkül) 44 probandnál történt. Ebben a kohortban 13 probandnál (29,5 %) azonosítottuk a genetikai hátteret. Az *SPG7* p.Leu78* variációjának céltzott vizsgálatát 34

probandnál végeztük el. Egy esetben (2,9%) homozigóta formában találtuk meg az eltérést. Összesítve a teljes HSP kohortban 26 probandnál (26,3%) tisztázódott a betegség genetikai háttere. Mutáció frekvenciára vonatkozó következtetéseket csak a panelszekvenálási kohortból lehet levonni, azonban összességében leggyakrabban a *SPAST* génben azonosítottunk pathogén variációt. A HSP génekben tizenegy, korábban az irodalomban nem leírt pathogén vagy valószínűleg pathogén variációt azonosítottunk. A pozitív találatok génenkénti megoszlását az **5. Ábra** mutatja, míg az azonosított variációkat és társuló fenotípust az **4. Táblázat** foglalja össze. Az **5. Táblázatban** az újonnan detektált pathogén vagy valószínűleg pathogén variációk kerülnek leírásra.

4. Táblázat: A HSP kohortban azonosított variációk összefoglaló táblázata

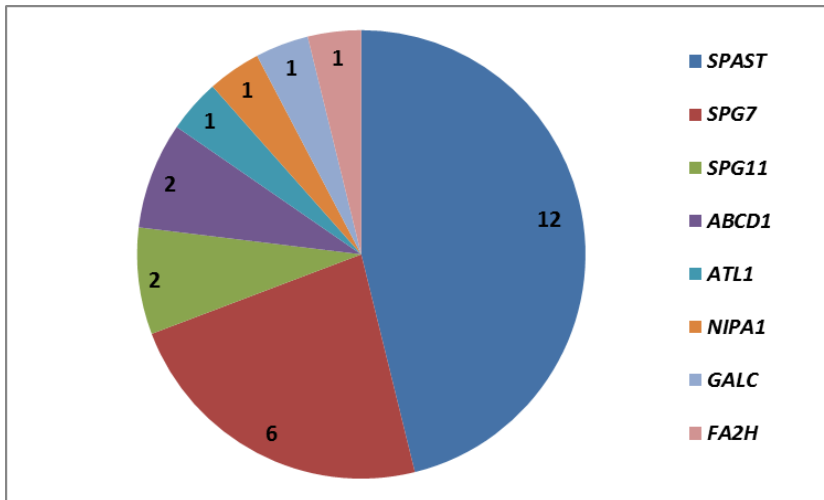
AD = autoszomális domináns, *AR* = autoszomális recesszív, *f*= férfi, *HEMI* = hemizigóta, *HET* = heterozigóta, *HOM* = homozigóta, *n*= nő

Proband (neme)	Gén	Transzkript NM_	Mutáció	Zigócia	dbSNP	Hivatkozás	Familiaritás	Fenotípus Kezdet: év
HSP-P1 (f)	<i>ATLI</i>	015915.4	c.715C>T (p.Arg239Cys)	HET	rs119476046	[84]	AD	pHSP Kezdet: 1.5
HSP-P2 (n)	<i>SPAST</i>	014946.3	c.1684C>T (p.Arg562*)	HET	N/A	[85]	AD	pHSP Kezdet: 43
HSP-P3 (n)	<i>SPAST</i>	014946.3	c.1684C>T (p.Arg562*)	HET	N/A	[85]	sporadikus	pHSP Kezdet: 2
HSP-P4 (f)	<i>SPAST</i>	014946.3	c.1684C>T (p.Arg562*)	HET	N/A	[85]	sporadikus	pHSP Kezdet: 52
HSP-P5 (n)	<i>SPAST</i>	014946.3	c.1841_1842delCC (p.Thr614Asnfs*16)	HET	N/A	Nincs	AD	cHSP Kezdet: 29
HSP-P6 (f)	<i>SPAST</i>	014946.3	c.1304C>T (p.Pro435Leu)	HET	N/A	[86]	AD	cHSP Kezdet:1.5
HSP-P7 (n)	<i>SPAST</i>	014946.3	c.1608_1615del (p.Leu537Asnfs*3)	HET	N/A	Nincs	AD	pHSP Kezdet: 3
HSP-P8 (f)	<i>SPAST</i>	014946.3	c.1291C>T (p.Arg431*)	HET	N/A	[86]	AD	pHSP Kezdet: 25
HSP-P9 (n)	<i>SPAST</i>	014946.3	c.1282G>C (p.Ala428Pro)	HET	N/A	Nincs	sporadikus	cHSP Kezdet: 16

Proband (neme)	Gén	Transzkript NM_	Mutáció	Zigócia	dbSNP	Hivatkozás	Familiaritás	Fenotípus Kezdet: év
HSP-P10 (n)	<i>SPAST</i>	014946.3	c.1536+1G>A (SPLICE)	HET	N/A	Nincs	AD	pHSP Kezdet: 10
HSP-P11 (f)	<i>SPAST</i>	014946.3	c.1459A>G (p.Asn487Asp)	HET	N/A	Nincs	sporadikus	pHSP Kezdet:1.5
HSP-P12 (f)	<i>SPAST</i>	014946.3	c.1494-2A>G (SPLICE)	HET	N/A	[87]	sporadikus	pHSP Kezdet: 6
HSP-P13 (n)	<i>SPAST</i>	014946.3	c.1004+1G>A (SPLICE)	HET	N/A	Nincs	AD	pHSP Kezdet: 44
HSP-P14 (f)	<i>NIPA1</i>	144599.4	c.731A>G (p.Gln244Arg)	HET	N/A	Nincs	AD	pHSP Kezdet: 1.5
HSP-P15 (n)	<i>SPG7</i>	003119.3	c.233T>A (p.Leu78*)	HET	rs121918358	[88] Domináns lehet [89]	sporadikus	pHSP Kezdet:38
HSP-P16 (f)	<i>SPG7</i>	003119.3	c.1529C>T (p.Ala510Val)	HET	rs61755320	[89]	Bizonytalan öröklésmenet	cHSP Kezdet: 46
	<i>SPG7</i>	003119.3	c.233T>A (p.Leu78*)	HET	rs121918358	[88]		
HSP-P17 (f)	<i>SPG7</i>	003119.3	c.233T>A (p.Leu78*)	HOM	rs121918358	[88]	sporadikus	pHSP Kezdet: 31
HSP-P18 (f)	<i>SPG7</i>	003119.3	c.233T>A (p.Leu78*)	HOM	rs121918358	[88]	sporadikus	pHSP Kezdet: 49

Proband (neme)	Gén	Transzkript NM_	Mutáció	Zigócia	dbSNP	Hivatkozás	Familiaritás	Fenotípus Kezdet: év
HSP-P19 (n)	<i>SPG7</i>	003119.3	c.233T>A (p.Leu78*)	HOM	rs121918358	[88]	AR	cHSP Kezdet:35
HSP-P20 (f)	<i>SPG7</i>	003119.3	c.1529C>T (p.Ala510Val)	HET	rs61755320	[89]	Bizonytalan öröklésmenet	cHSP Kezdet: 24
	<i>SPG7</i>	003119.3	c.1031G>A (p.Gly344Asp)	HET	N/A	[90]		
HSP-P21 (f)	<i>SPG11</i>	025137.3	c.4390_4427del (p.Lys1464Serfs*25)	HET	N/A	Nincs	sporadikus	cHSP Kezdet: 17
	<i>SPG11</i>	025137.3	c.3075_3076insA (p.Glu1026Argfs*4)	HET	rs312262752	[91]		
HSP-P22 (f)	<i>SPG11</i>	025137.3	c.663G>A (p.Trp221*)	HET	N/A	Nincs	AR	cHSP Kezdet: 9
	<i>SPG11</i>	025137.3	c.6832_6833delAG (p.Ser2278Leufs*61)	HET	rs312262784	[92]		
HSP-P23 (f)	<i>ABCD1</i>	000033.3	c.1553G>C (p.Arg518Pro)	HEMI	N/A	Nincs	sporadikus	cHSP Kezdet: 28
HSP-P24 (f)	<i>ABCD1</i>	000033.3	c.1211C>A (p.Ser404*)	HEMI	rs782567454	[93]	sporadikus	cHSP Kezdet:30

Proband (neme)	Gén	Transzkript NM_	Mutáció	Zigócia	dbSNP	Hivatkozás	Familiaritás	Fenotípus Kezdet: év
HSP-P25 (f)	<i>GALC</i>	001201402	c.1823T>C (p.Leu608Ser)	HOM	rs138577661	[94]	Bizonytalan öröklésmenet	cHSP Kezdet: 19
HSP-P26 (f)	<i>FA2H</i>	024306	c.721A>T (p.Lys241*)	HET	N/A	Nincs	Bizonytalan öröklésmenet	cHSP Kezdet:53
		024306	c.905C>T (p.Ala302Val)	HET	rs202048141	Nincs		



5. Ábra: Az azonosított genetikai okok gyakoriság szerinti megoszlása

5. Táblázat: Az újonnan azonosított pathogén vagy valószínűleg pathogén variációk

Gén	Variáció	SIFT pred	Polyphen2 HDIV_pred	GERP++ RS	ACMG Klasszifikáció
SPAST	NM_014946.3:c.1459A>G (p.Asn487Asp)	0 (D)	0.999 (D)	5.38	valószínű pathogén
SPAST	NM_014946.3:c.1282G>C (p.Ala428Pro)	0.05 (D)	0.995 (D)	5.62	valószínű pathogén
SPAST	NM_014946.3:c.1841_1842del (p.Thr614Asnfs*16)	N/A	N/A	N/A	pathogén
SPAST	NM_014946.3:c.1608_1615del (p.Leu537Asnfs*3)	N/A	N/A	N/A	pathogén
SPAST	NM_014946.3:c.1536+1G>A	N/A	N/A	5.13	pathogén
SPAST	NM_014946.3:c.1004+1G>A	N/A	N/A	5.31	pathogén
SPG11	NM_025137.3:c.4390_4427del (p.Lys1464Serfs*25)	N/A	N/A	N/A	pathogén
SPG11	NM_025137.3:c.663G>A (p.Trp221*)	N/A	N/A	5.93	pathogén
NIPA1	NM_144599.4:c.731A>G (p.Gln244Arg)	0 (D)	0.999 (D)	5.7	valószínű pathogén
ABCD1	NM_000033.3:c.1553G>C (p.Arg518Pro)	0 (D)	1 (D)	4.93	pathogén
FA2H	NM_024306:c.721A>T (p.Lys241*)	N/A	N/A	4.25	pathogén

V/1.3. Genotípus-fenotípus összefüggések HSP-ben

V/1.3.1. Pathogén *SPAST* variációval rendelkező betegek

Pathogén *SPAST* variációt 19 betegnél (12 proband) azonosítottunk. Az érintett betegek közül 15 esetben (79%) pHSP volt jelen, négy betegnél cHSP (21%). Nyolc proband esetében (66,7%) familiáris halmozódás (autoszomális domináns öröklésmenet) volt azonosítható. A komplex fenotípussal rendelkező betegek közül az egyik proband esetében (HSP-P6) ismerten pathogén p.Pro435Leu variációt [86] detektáltunk. Ennél a probandnál korai kezdetű HSP (1,5 éves korban) jelentkezett, amelyet ataxia illetve relatív macrocephalia kísért. Koponya MRI vizsgálata periventricularis, valamint insularis fehérállományi laesiokat detektált. Egy probandnál (HSP-P9) az irodalomban korábban nem közölt, *SPAST* Ala428Pro variáció mellett a HSP tüneteit megelőzően 16 éves korában hangulatzavar jelentkezett. Intrafamiális heterogenitás volt észlelhető a *SPAST* p.Thr614Asnfs*16 frameshift deletio mellett. A probandnál (HSP-P5) enyhe végtag- és járási ataxia volt jelen, míg két érintett családtag esetében pHSP. A *SPAST* variációval rendelkező betegek esetében az életkori kezdet szintén jelentős variációt mutatott. A betegség kezdet 1,5 éves és 52 éves kor között változott, átlagosan $17,86 \pm 17,11$ év volt. Összességében a *SPAST* variációkat hordozó érintettek között jelentős inter-, és intrafamiális heterogenitás volt megfigyelhető a klinikai tünetekben. Négy betegnél (három családból) az ismerten pathogén p.Arg562* variációt [85] azonosítottuk. A betegség kezdet 2, 29, 43 és 52 év volt az esetükben. Az egyik családban a p.Arg562* variáció mellett egy betegnél az ismert modifikáló variációt: p.Ser44Leu [95] is detektáltuk. Ebben a családban a modifikáló variációt nem hordozó nőbetegnél (HSP-P2) enyhe HSP tünetek voltak jelen, amelyek 43 éves korában jelentkeztek. A modifikáló variációt is hordozó lányánál a tünetek már születésekor jelen voltak, equinovarus lábállással született, és 29 éves korára súlyos spasticitás fejlődött ki, kontraktúrákkal. Három proband esetében splice variációkat detektáltunk. Az irodalomban korábban pathogénként közölt c.1494-2A>G variáció [87] esetében sporadikusan jelentkezett a betegség (HSP-P12). Az irodalomban korábban nem leírt *SPAST* c.1004+1G>A variáció esetében (HSP-P13) autoszomális domináns öröklésmenet volt jelen. A probandnál 44 éves korban kezdődött a betegség, míg érintett (genetikailag nem igazolt) édesanyjánál 35 éves korban, öccsénél 45 éves korban.

Az irodalomban nem ismert *SPAST* c.1536+1G>A variáció esetében (HSP-P10) a probandnál 10 éves korban jelentkeztek tünetek. A proband korábban exitált apai nagyapja szintén érintett volt, azonban édesapjánál nem voltak jelen tünetek. Szegregációs vizsgálatot csak a szülőknél tudtunk végezni, a proband édesapja hordozta a variációt. A Human Splicing Finder (HSF3) szoftverrel végzett elemzés a splice donor site károsodását mutatta, míg az Alamut szoftver a 13-as exon skippingjét prediktálta. Ezek alapján csökkent penetranciát valószínűsítünk a *SPAST* c.1536+1G>A variáció esetében.

V/1.3.2. Pathogén *ATL1* variációval rendelkező beteg

A kohortban egy betegnél (HSP-P1) azonosítottunk pathogén *ATL1* variánst. A családi halmozódás alapján autoszomális domináns öröklésmenet volt valószínűsíthető. A probandnál 1,5 éves korban indultak a tünetek, pHSP-nek feleltek meg. Az azonosított variáns (heterozigóta p.Arg239Cys) az irodalomban korábban közölt ismert pathogén variáns [84].

V/1.3.3. Pathogén *NIPAI* variációval rendelkező beteg

Egy esetben (HSP-P14) azonosítottunk *NIPAI* pathogén variánst a HSP háttérben. Egy autoszomális domináns családi halmozódású esetben korábban az irodalomban nem közölt heterozigóta p.Gln169Arg variációt azonosítottuk. A férfi proband tünetei 1,5 éves korában jelentkeztek, komplikáló neurológiai tünetei nem voltak. Három érintett gyermeke (20 és 17 éves fia, 15 éves lánya) heterozigóta statusban hordozza a detektált variánst. A gyermekeknél szintén korai életkorban jelentkeztek tünetek.

V/1.3.4. Pathogén *SPG7* variációval rendelkező betegek

A teljes kohortban összesen hat probandnál azonosítottunk pathogén *SPG7* variációt. COX negatív rostok esetén végzett célzott teljes *SPG7* szekvenálás két probandnál történt, egy probandnál (HSP-P15) heterozigóta *SPG7* (p.Leu78*) variáció igazolódott, míg a másik probandban nem azonosítottunk *SPG7* variánst. A teljes exom szekvenáláson átesett probandok (9 proband) közül egy esetben (HSP-P16) azonosítottunk pathogén *SPG7* variánst (compound heterozigóta p.Leu78* és p.Ala510Val variáns), míg a panelszekvenáláson átesett probandok (44 proband) közül 3 esetben (két esetben homozigóta p.Leu78* -HSP-P17, HSP-P18-, egy esetben -HSP-P20- compound

heterozigóta p.Gly344Asp + p.Ala510Val variáns). További 34 probandnál célzottan vizsgáltuk az *SPG7* p.Leu78* variációt, amelyet egy esetben (HSP-P19) detektáltunk homozigóta formában. Az ismert pathogén p.Leu78* variánst [88] tehát compound heterozigóta (egy proband), homozigóta (3 proband) és heterozigóta státuszban (egy proband) is detektáltuk, a hat *SPG7* proband közül 5 proband esetében volt jelen. Három esetben a betegség sporadikusan jelentkezett, egy esetben a családi anamnesis autoszomális recesszív öröklésmentre utalt, míg két esetben bizonytalan volt. A nagyobb exoni deletiokat, duplicatiokat a COX negatív rostokkal rendelkező p.Leu78* variációt hordozó proband esetében kizártuk (MLPA vizsgálat - CENTOGENE AG, Rostock, Németország), azonban a többi probandnál nem vizsgáltuk. A betegségkezdet az *SPG7* p.Leu78* variációt hordozó probandokban 31 és 49 év közé esett. Komplikáló neurológiai tünetek két proband esetében voltak jelen. Az egyik esetben (compound heterozigóta *SPG7* p.Leu78* + p.Ala510Val, HSP-P16) 46 éves korban jelentkeztek a tünetek, és a HSP tünetei mellett alsó végtagi distalis paraesthesiák jelentkeztek. A proband bátyja és apai nagybátyja szintén érintett volt, de a szegregációs vizsgálatot nem tudtuk elvégezni. A másik esetben (homozigóta p.Leu78* variáció, HSP-P19) a HSP tünetei mellett a probandnál opticus atrophia is ismert volt. A családi anamnesis (6 testvér közül 3 érintett) autoszomális recesszív öröklésmentre utalt. Egy proband (HSP-P20) esetében az ismert pathogén p.Ala510Val [89] és p.Gly344Asp [90] compound heterozigóta variációt detektáltuk. A proband esetében cHSP-t diagnosztizáltunk. A HSP tünetein kívül ataxia, és enyhe frontális kognitív deficit volt jelen, a betegség tünetei 24 éves életkorban kezdődtek. Koponya MR vizsgálata enyhe corticalis atrophiat mutatott. Az izombiopsiás mintában OXPHOS deficitet jelző szövettani eltérések nem voltak jelen. A családi anamnesis szerint édesanya szintén érintett, azonban a maternél csak genetikai vizsgálatot tudtuk végezni. A genetikai vizsgálat alapján heterozigóta formában hordozza az *SPG7* p.Gly344Asp variánst.

V/1.3.5. Pathogén SPG11 variációval rendelkező betegek

A HSP kohortban két proband esetében compound heterozigóta variációkat azonosítottunk az *SPG11* génben. Az első esetben (HSP-P21) egy ismert, korábban pathogénként közölt variáns p.Glu1026Argfs*4 [91] és egy korábban nem közölt variáns (p.Lys1464Serfs*25) volt jelen az *SPG11* génben. A betegnél végtag ataxia, axonalis polyneuropathia, kognitív

hanyatlás komplikálta a képet. A sporadikus betegség 17 éves korában jelentkezett. A koponya MR vizsgálat elvékonyodott corpus callosumot igazolt. A második esetben (HSP-P22) a korábban pathogénként közölt p.Ser2278Leufs*61 variánst [92] és egy korábban nem közölt STOP variánst (p.Trp221*) detektáltunk heterozigóta státuszban. A családi halmozódás a proband esetében autoszomális recesszív öröklésmenetre utalt. Kilenc éves korában kognitív hanyatlással jelentkeztek tünetei, később spasticus paraparesis társult, súlyos axonalis neuropathia is kialakult. A koponya MR vizsgálat cerebellaris atrophiát és elvékonyodott corpus callosumot igazolt.

V/1.4. Exomszekvenálással, illetve panelvizsgálattal azonosított fenokópiák HSP-ben

V/1.4.1. Adrenoleukodystrophia/Adrenomyeloneuropathia

A HSP kohortban két proband esetében azonosítottunk adrenomyeloneuropathiat (AMN). Az első, férfi proband esetében (HSP-P23) egy korábban irodalomban nem leírt, hemizigóta variációt azonosítottunk az *ABCD1* génben: p.Arg518Pro. A betegség sporadikusan jelentkezett a családban, 28 éves korában. Kezdetben vizelettartási nehézség, majd kifejezett spasticus járászavar jelentkezett. A koponya MRI kezdetben eltérést nem talált. A 32 és 34 éves korában készült nyaki gerinc MR CII-IV magasságban halvány elmosódó elváltozást írt le. A 36 éves korában készült nyaki gerinc MR ThV magasságában elvékonyodott myelont (5mm-es átmérő) írt le, de a myelonban jelzavar ekkor nem volt. A somatosensoros kiváltott válasz vizsgálat hátsó kötél laesiot, a motoros kiváltott válasz vizsgálat a pyramis pálya kétoldali működészavarát találta. A funicularis myelosist kizártuk, liquor vizsgálata eltérés nélküli volt. Státuszában myelon betegségre utalt a Th9 dermatomától distalisan jelzett szimmetrikus hypaesthesia, azonban egyéb tekintetben tünetei HSP-nek megfeleltek. Polyneuropathiája sem klinikailag, sem ENG vizsgálattal nem igazolódott, adrenalis alulműködésre utaló tünetei nem voltak. A genetikai vizsgálat eredményét az emelkedett VLCFA szintek igazolták. A klinikai követése folyamán fokozatosan kognitív érintettség is megjelent. A 44 éves korában végzett koponya MR vizsgálat (**6. Ábra/A**) már kiterjedt fehérállományi eltéréseket mutatott periventricularisan és a capsula interna hátsó szárát érintően a T2 és FLAIR méréseken, amely a betegség cerebralis transzformációjára utal. A második esetben (HSP-P24) szintén sporadikusan

jelentkezett a betegség. A férfi probandnál 30 éves életkorban jelentkeztek spasticus paraparesis tünetei, amelyek az évek alatt lassan progrediáltak, később zavaró mértékű végtag ataxia jelentkezett. Koponya és nyaki gerinc MR vizsgálata a tünetek jelentkezésekor kórosat nem mutatott. A motoros kiváltott válasz vizsgálat a corticospinalis pályarendszer működészavarát igazolta. A 43 éves korában készült kontroll koponya MR vizsgálat a FLAIR és T2 szekvenciákon a corticospinalis pályának megfelelően jelfokozódást mutatott (**6. Ábra/B**). A HSP panelvizsgálat egy korábban pathogénként közölt STOP variánst (hemizigóta p.Ser404*) [93] detektált az *ABCD1* génben. Az adrenomyeloneuropathia diagnózisát az emelkedett VLCFA szint megerősítette.

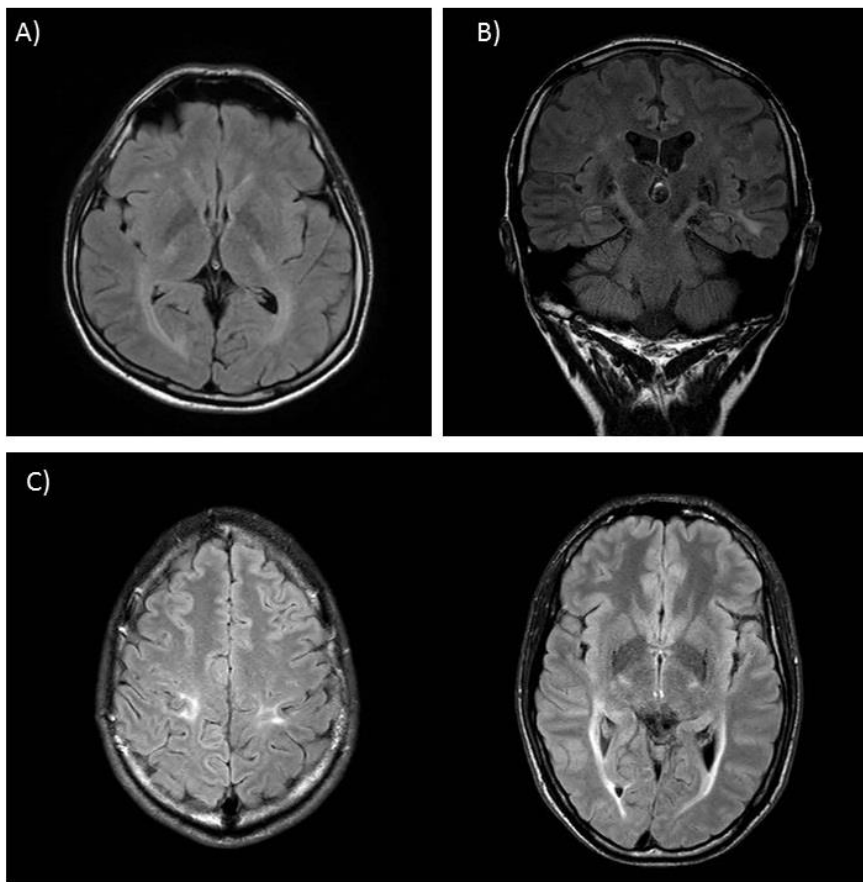
V/1.4.2. Krabbe betegség

Egy proband esetében (HSP-P25) homozigóta *GALC* pathogén variációt azonosítottunk a spasticus paraparesis háttérében. A férfi proband tünetei 19 éves korában jelentkeztek, a spasticus paraparesisen kívül neurológiai kórjele nem volt. Koponya MR vizsgálata (**6. Ábra/C**) a corticospinalis pályának megfelelően, illetve a parietooccipitalis lebeny fehérállományában hyperintensitást mutattott FLAIR és T2 súlyozott felvételeken. ENG vizsgálata sensomotoros demyelinisatios polyneuropathiát igazolt. A koponya MR alapján felmerült adrenoleukodystrophiát a VLCFA, a kortizol szint mérése, a genetikai vizsgálat nem erősítette meg. A panelvizsgálat a *GALC* génben egy ismert, korábban az irodalomban pathogénként leírt homozigóta variációt detektált: *GALC* p.Leu608Ser [94].

V/1.4.3. FAHN betegség

Egy beteg esetében (HSP-P26) compound heterozigóta variánsokat azonosítottunk a *FA2H* génben. A gén pathogén variációi a FAHN betegséggel (fatty acid hydroxylase-associated neurodegeneration), illetve SPG35-el asszociálnak. A férfi proband tünetei 52 éves korában kezdődtek kognitív hanyatlással, majd spasticus paraparesis, járásbizonytalanság jelentkezett. Koponya MR vizsgálata diffúz fehérállományi károsodást mutatott. Családi anamnesise nem volt egyértelmű. A maternél idős korban dementia, anyai nagyanyjánál idős korban pszichiátriai zavar jelentkezett. Három gyermeke közül az egyik lányát major depresszió miatt gondozzák. A *FA2H* génben korábban az irodalomban nem közölt variánsokat detektáltunk. A p.Lys241* variáns az ACMG kritériumok szerint pathogénnek tekinthető, azonban a második detektált variáns (p.Ala302Val) bizonytalan szignifikanciájú

variáns. A családi szegregációs vizsgálatokat nem tudtuk kivitelezni beleegyezés hiánya miatt.



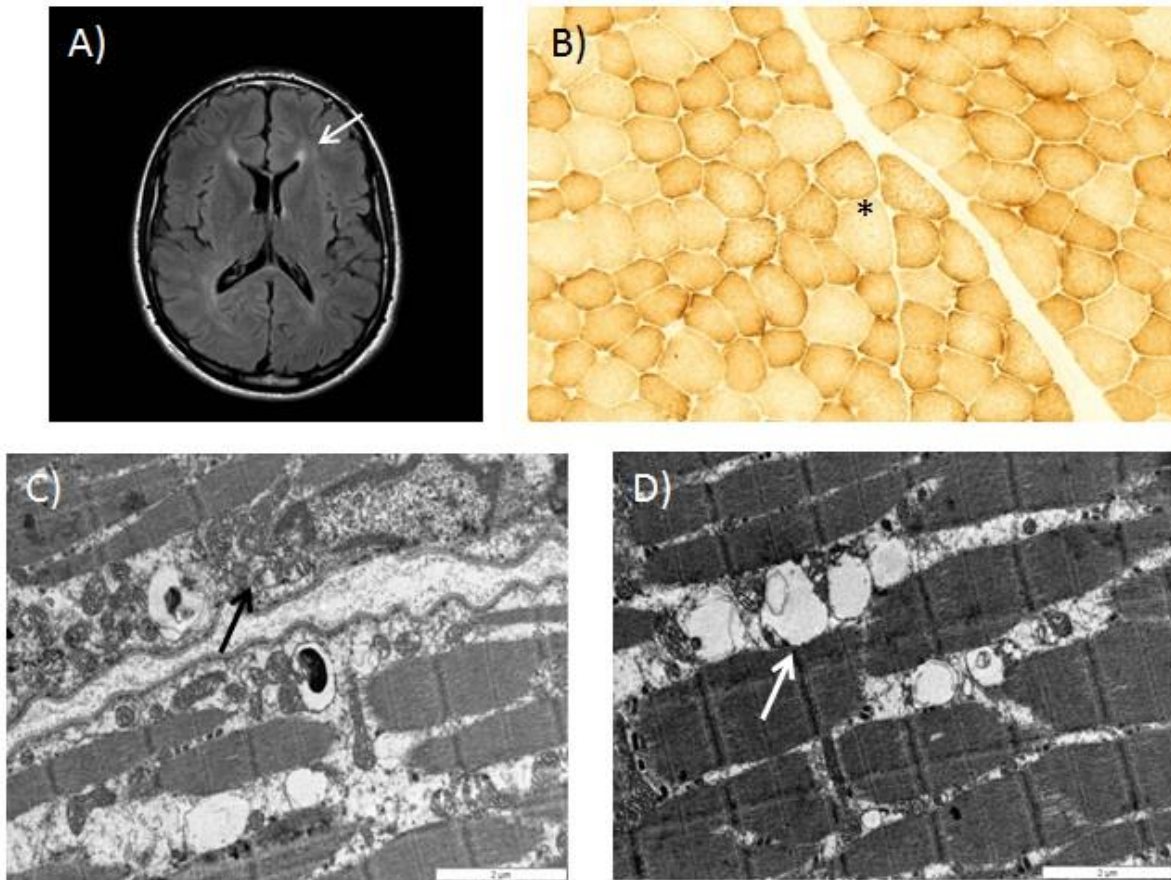
6. Ábra: A HSP-kohortban azonosított fenokópiákhoz társuló koponya MR képek

A) ABCD1 p.Arg518Pro variáns: axialis FLAIR súlyozott kép. B) ABCD1 p.Ser404 variáns: coronalis síkú T2 súlyozott felvétel. C) GALC p.Leu608Ser variáns: axialis T2 súlyozott képek.*

V/1.5. Exomszekvenálás nem tisztázott háttérű cerebellaris ataxiában

A 18 éves férfi beteg, 11 éves korában induló, vizsgálatkor már zavaró mértékű, progresszív kézremegés miatt jelentkezett járó beteg rendelésünkön. A kézremegésen kívül további panaszként feledékenységet, valamint nyelési nehezítettséget, beszédének megváltozását is említette. A heteroanamnesis szerint 15-16 éves kora óta észlelik a lábak „befelé fordulását”, amely a járásában zavarja. Távlabbi anamnesisében eseménytelen

perinatalis időszak, megfelelő ütemben zajló motoros fejlődés szerepelt. Az iskolát 8 évesen kezdte, iskolaérettségi vizsgálata kapcsán fáradékonyságot, beilleszkedési zavart, beszédzavara miatt logopédiai kezelést, hiányos általános tájékozottságot, jobb-bal tévesztést, figyelmi működés zavarát, térbeli orientációs nehézségeket említenek. A kézremegés jelentkezését megelőző iskolai években már észlelték fokozatosan romló írásképét, dyslexiát, dysgraphiát, dyscalculiát állapítottak meg. Több alkalommal történt koponya MR vizsgálata (15, 18, 19 éves korában). Ezeken az oldalkamrák pereme mentén – kitüntetetten a frontális kamraszarvak előtt – FLAIR hyperintens jelzavar ábrázolódt, amely az évek alatt jelentős progressziót nem mutatott (**7. Ábra**). Neurológiai vizsgálata során finom tekintés irányú horizontális nystagmust, enyhe fokú cerebellaris dysarthriát, kétoldali felső végtagi posturalis, intentiora kifejezetten fokozódó tremort, mindkét felső végtagban dysdiadochokinesist, a bokaízületekben enyhe fokú (Ashworth 2) spasticitást észleltünk. A betegnek paresise nem volt. A sajátreflexek testszerte közepesen élénkek voltak, pyramisjeleket nem észleltünk. A neuropszichológiai vizsgálat a beteg korához képest kifejezett memóriadeficitet, elsősorban előhívási zavart, valamint az absztrakciós képesség enyhe sérülését igazolta. Az általános laboratóriumi paraméterek, hasi ultrahang vizsgálat nem mutattak eltérést. A szérum caeruloplasmin és réz szint referenciatartományon belül volt. Szemészeti vizsgálata nem igazolt eltérést, Kayser-Fleischer gyűrű nem volt jelen. A Serum oxysterol vizsgálata Nieman-Pick-C betegség irányában nem igazolt eltérést. A felmerülő mitochondriális betegség miatt elvégzett izomszövettani vizsgálata (**7. Ábra**) során a fénymikroszkópos vizsgálat minor aspecifikus elváltozásokat igazolt. Az oxidatív enzimreakciók megoszlása több festéssel is egyenetlen volt, és több izomrostban apró vacuolák ábrázolódtak. Az elektronmikroszkópia néhány izomrostban a mitochondriumokat megnagyobbodottnak találta, bennük amorph illetve osmiophyl anyag felhalmozódását lehetett észlelni. Összességében az elváltozások felvetették mitochondriális betegség gyanúját, azonban a terheléses szérum laktát szintek vizsgálata nem igazolt oxidatív anyagcsere károsodást és a mitochondriális DNS-ben a hot spotok helyén (mtDNA deletio, A3243G, C8344T, G893T) mutációk nem igazolódtak.



7. Ábra: Cerebellaris ataxia miatt vizsgált proband vizsgálati eredményei

A) A coronalis síkú MR képen FLAIR szekvencián a frontalis kamraszarvak körül ábrázolódik hyperintensitas (nyíl). B) A COX festéssel készült keresztmetszeti fénymikroszkópos izommetszeteken (10x nagyítás) egyes izomrost festődése halványabb (csillag). C-D) Az elektronmikroszkópos felvételeken (20,000x nagyítás) helyenként megnagyobbodott, illetve subsarcolemmalisan degenerált szerkezetű mitochondriumok láthatóak (fekete nyíl) (C), valamint intermyofibrillarisan a kis mitochondriumok szomszédságában lipid vacuolák (fehér nyíl) figyelhetők meg (D).

Mivel az ataxia volt a legkifejezettebb prezentációs tünet az *SCA1,2,3,6,7, APTX, SETX, TTPE, FRDA* gének elemzését is elvégeztük és azokban eltérést nem találtunk. Az *APTX, SETX, TTPE, FRDA* gének vizsgálata a PTE Orvosgenetikai Intézetében történt. A fiatal korban jelentkező tremorra és a kognitív funkciózavarra való tekintettel az *FMRI* gén vizsgálatát is elvégeztük, bár a klinikai kép nem volt a Fragilis X syndromára jellegzetes. Ezt a gént is normálisnak találtuk. Mivel az extenzív vizsgálatok sem tudták tisztázni a

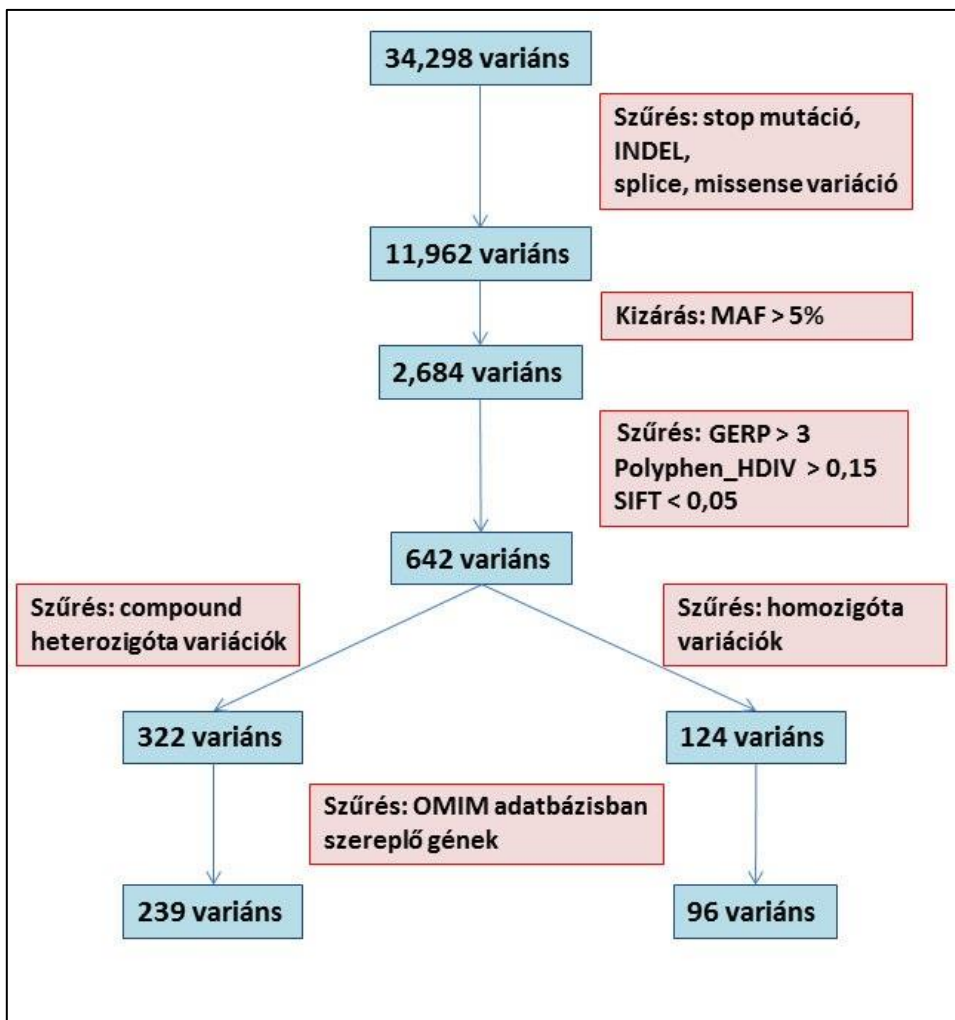
betegség molekuláris hátterét a beteg fiatal életkorára való tekintettel teljes exom szekvenálást végeztünk. Tízszeres lefedettség mellett az exomi régiók 88.2 (index), 88.8 (pater), 92.9%-a (mater), 20-szoros lefedettség mellett 64.3%, 73.6%, 83.0%-a került szekvenálásra. Az átlagos lefedettség 28.6X (index), 38.5X (pater), 51.7X (mater) volt. Az index páciens mintájában alapvető minőségi szűréseket követően 28,763 exoni variáció került azonosításra. Az Exomiser programban ataxia [HP:0001251], intenciós tremor [HP:0002080], alsó végtagi spasticitas [HP:0002061] kifejezéseket megadva, 1% alatti minor allél frekvencia határt szabva, PhenIX algoritmus használatával 5838 variáns maradt fent, amelyeket a program rangsorolt. A rangsor első 10 találatát a **6. Táblázatban** mutatjuk be, míg a manuális szűrés lépéseit a **8. Ábra** mutatja.

6. Táblázat: Az Exomiser szoftver első 10 gén találat

AD = autoszomális domináns, AR = autoszomális recesszív, XLD = X-hez kötött domináns

Gén	Exomiser pont	Asszociált betegségek	Öröklődés
<i>GJC2</i>	0,996	Hypomyelinisatioval járó leukodystrophia 2 (HLD2)	AR
		Spasticus paraparesis 44 (SPG44)	AR
<i>ITPR1</i>	0,957	Spinocerebellaris ataxia 29 (SCA29)	AD
		Spinocerebellaris ataxia 15 (SCA15)	AD
<i>ABCD1</i>	0,887	Adrenoleukodystrophia (ALD)	XLR
		Adrenomyeloneuropathia (AMN)	XLR
<i>KIF1A</i>	0,887	Spasticus paraparesis 30 (SPG30)	AR
		Hereditaer sensoros neuropathia IIC (HSN2C)	AR
		Autoszomális domináns mentális retardatio 9 (MRD9)	AD
		Hereditaer sensoros és autonóm neuropathia 2 (HSAN2)	AR
<i>SPG11</i>	0,865	Spasticus paraparesis 11 (SPG11)	AR
		Juvenilis amyotrophias lateral sclerosis (JALS)	AR
<i>AFG3L2</i>	0,814	Spinocerebellaris ataxia 28 (SCA28)	AD
		Spasticus ataxia 5 (SPAX5)	AR
<i>WDR45</i>	0,789	Agyi vastárolással járó neurodegeneráció 5 (NBIA5)	XLD
<i>POLG</i>	0,631	Progresszív külső szemizom bénulás (PEO)	AD
		Progresszív külső szemizom bénulás (PEO)	AR
		Mitochondriális DNS depletios syndroma 4A/4B (MTDPS4A/4B)	AR
		Sensoros ataxia, neuropathia, dysarthria, ophthalmoparesis (SANDO)	AR

Gén	Exomiser pont	Asszociált betegségek	Öröklődés
SETX	0,676	Amyotrophias lateral sclerosis 4 (ALS4)	AD
		Ataxia oculomotor apraxia 2 (AOA2)	AR
CHD7	0,584	CHARGE syndroma	AD
		Hypogonadotrop hypogonadismus 5 (HH5)	AD
		Kallman syndroma	AD



8. Ábra: A variánsok manuális szűrésének lépései

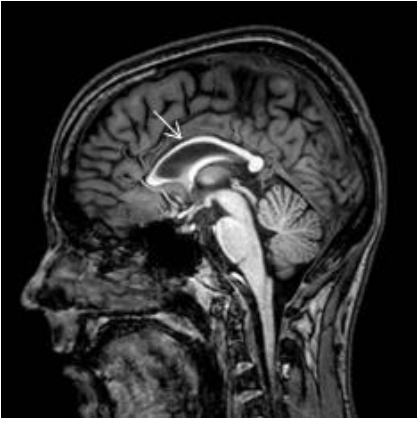
A manuális szűréssel 335 ritka, proteinszerkezetet potenciálisan megváltoztató variáció maradt fenn. A további lépésekben a compound heterozigóta öröklésmentnek nem ellentmondó variációkat tovább szűrtük. Előnyben részesítettük azokat a variánsokat, ahol

azonosítható volt, hogy az egyik heterozigóta variáns az egyik szülőtől, míg az egyazon génben elhelyezkedő másik heterozigóta variáns a másik szülőtől származik. Az ezután fennmaradó (valódi) compound heterozigóta és homozigóta variánsokat fenotípus szerint áttekintve azonosítottunk az *SPG11* génben két kereteltolódással járó INDEL-t (**7. Táblázat**).

7. Táblázat: Manuális szűréssel azonosított pathogén compound heterozigóta variációk az *SPG11* génben

Gén	Transzkript	Variáció (HGVS)	Aminosav változás	MAF	rs-szám
<i>SPG11</i>	NM_025137.3	c.5128_5129delCA	p.Q1710fs*9	.	.
<i>SPG11</i>	NM_025137.3	c.3075dupA	p.E1026fs*4	.	rs312262752

A találatok közül az elsődleges kandidáns az *SPG11* gén volt, amely az Exomiser által felállított kandidáns gén listában az ötödik helyen szerepelt. A két variáció egy-egy leolvasási kereteltolódással járó INDEL, amelynek egyik tagja (p.E1026fs*4) ismerten pathogén [96], a másik tagja az irodalomban eddig nem ismert eltérés. A Sanger szekvenálással történt szegregációs vizsgálat konfirmálta a variációk jelenlétét illetve, hogy a két allél transz pozícióban helyezkedik. A kiszűrt *SPG11* gén ismeretében, a koponya MR felvételeket ismételten megtekintve azonosítottuk az elvékonyodott corpus callosumot (**9. Ábra**), amely a feltételezett etiológiát tovább erősítette.



9. Ábra: Az index beteg sagittalis síkú MR felvétele

A sagittalis síkú, T1 súlyozott felvételen megtartott cerebellaris volumen mellett, kis mértékben elvékonyodott corpus callosum ábrázolódik (nyíl).

V/1.6. Hereditaer spasticus paraparesis gének vizsgálata ALS-ben és primer lateral sclerosisban

A motoneuron betegségekre, elsősorban hereditaer spasticus paraparesis és differenciál diagnosztikájában szóba jövő kórképek vizsgálatára kifejlesztett pannellel, a HSP-vel diagnosztizált betegeken kívül, további 14 motoneuron beteget vizsgáltunk meg. A betegek klinikai jellemzőit és a panelvizsgálat összesített eredményeit a **8. Táblázat** foglalja össze. A panelvizsgálat során a pontmutációkat valamint a kisebb deletiókat, insertiókat elemeztük, így a familiáris FTD-ALS spektrum hátterében álló *C9ORF72* gén G_4C_2 hexanukleotid repeat expansziót nem tudtuk ezzel a módszerrel vizsgálni. A *C9ORF72* repeat expanszió vizsgálata más kutatás részét képezte (dr. Nemes Csilla – saját közlés), egy betegben detektált emelkedett repeat számot (>30). A táblázatban azon gének szerepelnek, amelyekben az elemzés során ritka, feltehetően protein szerkezeti változást okozó eltérést azonosítottunk. Az ACMG klasszifikáció ezen gének esetében nem lehetséges (kivéve az *ALS2* és *SETX* génben talált variációkat), mivel a gén-fenotípus összefüggés ezekben az esetekben még nem egyértelmű. Emiatt ezek az eltérések az ACMG ajánlás szerint úgynevezett bizonytalan szignifikanciájú géneknek („genes of uncertain significance”, GUS) minősülnek [54]. Az eredmények heterogének, így az egyes pozitív találatokat külön-külön betegenként is bemutatom. A detektált mutációkat a fejezet végén az **9. Táblázatban** foglaltam össze.

V/1.6.1. *POLG, PNPLA6* variációk ALS-P3 betegben

A nőbeteg tünete 41 éves korában kezdődtek, a bal kéz izolált gyengeségével, ügyetlenségével, amely 2 év alatt mind a négy végtagra kiterjedt, kevert alsó és felső motoneuron laesio jelei alakultak ki. Koponya MR vizsgálata a pyramispálya volumencsökkenését mutatta. A beteg családjában hasonló megbetegedés nem fordult elő, másod unokatestvérénél myasthenia gravist gyanítottak. A beteg panelvizsgálata compound heterozigóta eltérést igazolt a *POLG* génben, amelyet a HSP-ALS kohortunkban más esetben nem detektáltunk. Az egyik eltérés egy, a protein szerkezetet feltehetően módosító egyszeres nukleotid variáció (*POLG* p.Gly268Ala), míg a másik eltérés egy non-frameshift deletio (*POLG* c.150_159del). A p.Gly268Ala variáció a HGMD adatbázisban szereplő ismert pathogén eltérés [97], a deletiot korábban irodalomban nem írták le. A *POLG* variációk mellett egy bizonytalan jelentőségű heterozigóta variációt detektáltunk a *PNPLA6* génben (p.Arg1284Trp), amely a protein szerkezetét nagy valószínűséggel érinti, ugyanakkor alacsony konzerváltságú nukleotid pozícióban helyezkedik el. Az ismert pathogén variációt korábban az autoszomális recesszíven öröklődő Gordon-Holmes syndromához kötötték, amelyben az ataxiához hypogonadotrop hypogonadismus társul [98].

V/1.6.2. *BSCL2* variáció ALS-P4 betegben

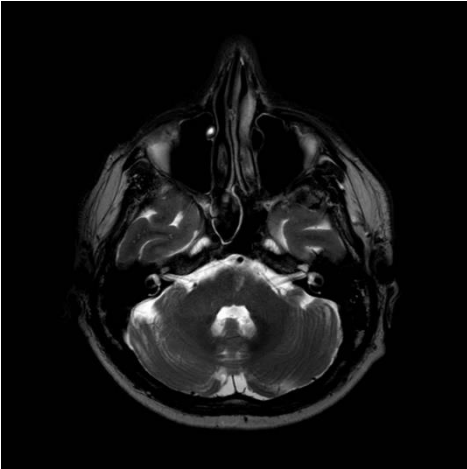
A nőbeteg tünete 46 éves korában kezdődtek bulbaris panaszokkal, majd egy éven belül végtagi izomgyengeség is jelentkezett, kevert alsó és felső motoneuron jelekkel. A betegség további gyors progressziót mutatott. Koponya MR vizsgálata eltérés nélküli volt. A maternél focalis izomsorvadás volt jelen, amely stagnáló jelleget mutatott. Panelvizsgálat során a *BSCL2* génben azonosítottunk egy heterozigóta variánst (p.Leu427Pro), amelynek protein predikációs pontszámai nem utalnak arra, hogy a variáció jelentős protein szerkezeti változást okozna, ugyanakkor a variáció saját kohortunkban nem fordult elő más HSP vagy ALS betegben, és populációs frekvenciája is alacsony. A *BSCL2* gén variációi autoszomális domináns öröklésmenettel, változó penetranciával felelősek a seipinopathiak különböző megjelenési formáiért [99]. A detektált variáció pathogenitása nem egyértelmű, a ClinVar adatbázisban bizonytalan szignifikanciával, illetve valószínűleg benignus vagy benignus kategóriával is szerepel.

V/1.6.3. SLC25A15, SPG7 variációk ALS-P6 betegben

A nőbeteg tünetei 45 éves korában kezdődtek felső végtagi gyengeséggel, majd 3 éves progresszió alatt felső végtagi kevert motoneuron lesio jelei alakultak ki, alsó végtagot érintő felső motoneuron jelekkel. A családban motoneuron betegség nem fordult elő, anyai ágon halmozódó major depresszió ismert a családi anamnézisből. A beteg panelvizsgálatával az *SLC25A15* génben egy ritka, predikciók alapján protein szerkezeti változást okozó heterozigóta variációt detektáltunk (p.Gly189Ser). A variációról irodalmi adatok nem állnak rendelkezésre, a ClinVar adatbázis bizonytalan szignifikanciával annotálja. Az *SLC25A15* gén pathogén variációi autoszomális recesszív öröklésmenettel a hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria (HHH) szindrómához asszociáltak [100]. A fenti eltérés mellett egy a proteinszerkezetet valószínűleg megváltoztató, ritka heterozigóta variációt detektáltunk az *SPG7* génben (p.Ala603Thr). A variációról irodalmi adatok nem elérhetőek, a ClinVar, HGMD adatbázisokban nem szerepelt.

V/1.6.4. SLC25A22, ALS2 variációk ALS-P7 betegben

A 48 éves beteget lassan progrediáló, jobb oldali, felső motoneuron laesionak megfelelő tünetek miatt láttuk, amelynek háttérében primer lateral sclerosis vetődött föl. A korábbi koponya MR felvételeken évek alatt enyhe progressziót mutató cerebellaris atrophia ábrázolódott. Friss koponya MR vizsgálatokor a pons bal oldalán ventromedialisan a basist és tegmentumot érintő T2 és FLAIR sorozatokon hyperintens laesio volt látható (**10. Ábra**). Itt diffúziós eltérés nem volt. A tünetek vascularis eredete ellen szólt a nonictalis kezdet, krónikus, kezdetben lassú lefolyás, illetve az MR kép vascularis laesiora nem teljesen típusos megjelenése.



10. Ábra: ALS-P7 beteg koponya MR felvétele

A híd metszetében készült coronalis síkú T2 felvételen látható a basis pontisban, bal oldalon elhelyezkedő hyperintens laesio.

A beteg panelvizsgálata során egy-egy ritka, a HSP-ALS kohortban más betegben nem előforduló, fehérjeszerkezetet nagy valószínűséggel befolyásoló, heterozigóta eltérést azonosítottunk az *ALS2* (p.Ile1373Met) illetve az *SLC25A22* (p.Gly185Ser) génben. Az *ALS2* gén homozigóta, vagy compound heterozigóta variációihoz három klinikai entitást kapcsoltak korábban: infantilis felszálló hereditaer spasticus paraparesis (infantile ascending hereditary spastic paraparesis: IAHSP), juvenilis primer lateral sclerosis (JPLS), autoszomális recesszív juvenilis amyotrophias lateral sclerosis (JALS) [101]. Az általunk azonosított variáció a HGMD adatbázisban is szerepelt, mint Ghani és mtsi. vizsgálata alapján [102] Parkinson-kórral lehetséges asszociációban lévő variáció. Az *SLC25A22* génben detektált variációról irodalmi adatok nem állnak rendelkezésre. A gén homozigóta vagy compound heterozigóta variációit korábban „supression burst” mintázattal járó neonatalis epilepsias encephalopathiahoz kötötték [103].

V/1.6.5. CYP7B1, KIAA0196, SETX, POLG variációk ALS-P9 betegben

A férfi beteg tünetei 52 éves korában kezdődtek. Kezdetben bulbaris tünetek (beszéd, nyelészavar) jelentkeztek, majd gyors progresszióval, mind a 4 végtagot érintő, alsó és felső motoneuron jelekkel társuló ALS fejlődött ki. A betegség indulásával párhuzamosan derült fény egy inguinalis terime kivizsgálása kapcsán a funiculus spermaticus

liposarcomájára. Évek óta emelkedett ferritin szintjeinek hátterében valószínűleg a tumor állhatott. Paraneoplasias markerek nem igazolódtak. A beteg családi anamnesisében ALS vagy dementia nem szerepelt, a matert idős korban Parkinson kór miatt kezelték. A betegnél és fiánál gynecomastia volt ismert. Panelvizsgálata során négy génben azonosítottunk heterozigóta, ritka, feltehetően proteinszerkezeti változást okozó variációt. Ezek közül a *SETX* génben talált variáció (p.Gln585Arg) hozható leginkább összefüggésbe ALS fenotípussal. A variációt a HGMD és ClinVar adatbázisokban nem leltük fel. A *SETX* gén pathogén variációival az úgynevezett ALS4 fenotípus társul (juvenilis kezdetű motoneuron betegség domináns öröklődéssel és bulbaris érintettség hiányával) [104]. Emellett a *SETX* gén pathogén variációi az autoszomális recesszíven öröklődő apraxia oculomotor ataxiával 2 (AOA2) is társulnak [105]. A *SETX* variáción túl heterozigóta variációt azonosítottunk a *CYP7B1* (c.1461_1461insTG), *KIAA0196* (p.Tyr1016Cys), valamint a *POLG* génben (p.Arg3Leu). A *POLG* génben detektált eltérés (homozigóta vagy compound heterozigóta mutáció tagjaként) ismerten pathogén, a HGMD adatbázisban PEO-hoz társítják [106]. A *CYP7B1* és *KIAA0196* génben azonosított variációkat az adatbázisokban nem leltük fel. A *CYP7B1* gén pathogén variációi irodalmi adatok alapján SPG5A-hoz (autoszomális recesszív), a *KIAA0196* gén pathogén variációi SPG8-hoz (autoszomális domináns) kötöttek [107].

V/1.6.6. RTN2 variáció ALS-P10 betegben

A vizsgálatokor 61 éves nőbeteg tünetei 60 éves korában kezdődtek a felső végtagi izmok sorvadásával, majd rapid progresszióval. Egy év alatt mind a négy végtagot, illetve a bulbaris izmokat érintő betegség alakult ki. A beteg családi anamnesisében bátyja lányánál motoneuron betegség volt ismert. Apai ágon halmozódó cataracta illetve glaucoma szerepelt a családi anamnesisben. A betegnél az ALS mellett hypothyreosis, valamint meningeoma szerepelt a kórtörténetben. A panel vizsgálat során egy kérdéses jelentőségű heterozigóta variációt azonosítottunk az *RTN2* génben (p.Gly317Ser). A protein predikciós pontszámok alapján a variáció megítélése nem egyértelmű. A variációt más HSP, vagy ALS betegben nem azonosítottuk, populációs adatbázisok alapján ritka variáció, azonban a ClinVar adatbázisban citáció nélkül, valószínű benignusként szerepel. A *RTN2* gén

pathogén variációit korábban az autoszomális dominánsan öröklődő, nem komplikált SPG12 –höz kötötték [107].

V/1.6.7. POLG variációk ALS-P13 betegn

A vizsgálatokor 65 éves férfi beteg tünetei 61 éves korában kezdődtek alsó végtagi gyengeséggel, testszerte jelentkező izomgörcsökkel. Négy év alatt testszerte jelentkező mérsékelt fokú paresis, a vállövi izmokban atrophia, fasciculatio, alsó végtagi spasticitas fejlődött ki. A beteg családi anamnesise motoneuron illetve egyéb neurodegeneratív megbetegedések irányában negatív volt, nővérénél depressio ismert. A beteg panelvizsgálatával a *POLG* génben compound heterozigóta variációkat azonosítottunk (p.Pro587Leu és p.Thr251Ile). A *POLG* génben detektált mindkét variáció ismert pathogén, az irodalomban progresszív külső szemizom bénuláshoz kötött [108,109].

8. Táblázat: A motoneuron panelvizsgálat eredménye ALS és PLS betegekben

A táblázat a vizsgált ALS és PLS betegek klinikai jellemzőit mutatja be, valamint azokat a géneket, amelyekben ritka variációt azonosítottunk. Az amyotrophias lateral sclerosissal diagnosztizált betegek esetében a módosított El Escorial kritériumok szerint osztályoztam a betegség valószínűségét. **Rövidítések:** AMN: alsó motoneuron lesio; AV: alsó végtag; Bulb: bulbaris; FMN: felső motoneuron lesio; FV: felső végtag; KVLT ALS = Klinikailag valószínű laboratóriumilag támogatott ALS; Neg. = negatív, PLS = primer lateral sclerosis, poz. = pozitív.

Beteg	Nem	Életkor	El Escorial	Megjegyzés	Betegség kezdet	Familiaritás	C9ORF72 repeat	Panel eredmény
ALS-P1	Férfi	30	Lehetséges ALS	Bulb: AMN, FV: AMN, AV:AMN	27	Nincs.	Neg.	Negatív.
ALS-P2	Férfi	31	Valószínű ALS	Bulb: AMN, FV: AMN+FMN, AV: AMN+FMN	27	Nincs.	Neg.	Negatív.
ALS-P3	Nő	43	Valószínű ALS	FV: AMN+FMN, AV: AMN+FMN	41	Nincs.	Neg.	<i>POLG, PNPLA6</i>
ALS-P4	Nő	43	Valószínű ALS	Bulb: AMN, FV:AMN+FMN, AV: AMN+FMN	46	Maternél focalis izomsorvadás.	Neg.	<i>BSCL2</i>
ALS-P5	Nő	46	Definitív ALS	Bulb: AMN, FV: AMN+FMN, AV: AMN+FMN	45	Nincs.	Neg.	Negatív.
ALS-P6	Nő	48	KVLT ALS	FV: AMN+FMN, AV: FMN. EMG: poz.	45	Nincs.	Neg.	<i>SLC25A15, SPG7</i>
ALS-P7	Férfi	49	PLS	Bal oldali végtagokban FMN.	44	Nincs.	Neg.	<i>SLC25A22, ALS2</i>

Beteg	Nem	Életkor	El Escorial	Megjegyzés	Betegség kezdete	Familiaritás	<i>C9ORF72</i> repeat	Panel eredmény
ALS- P8	Nő	54	KVLT ALS	Bulb: AMN, FV: AMN, AV: AMN + FMN. EMG: poz.	47	Nincs.	Neg.	Negatív.
ALS- P9	Férfi	54	Definitív ALS	Bulb: AMN, FV: AMN+ FMN, AV: FMN + AMN	52	Nincs.	Neg.	<i>CYP7B1, KIAA0196, SETX, POLG</i>
ALS- P10	Nő	61	Valószínű ALS	Bulb: AMN, FV: AMN+FMN, AV: AMN+FMN	60	Unokahúga érintett.	Neg.	<i>RTN2</i>
ALS- P11	Nő	61	KVLT ALS	Bulb: AMN, FV: AMN+FMN, AV: FMN, EMG: poz.	60	Nincs.	Neg.	Negatív.
ALS- P12	Nő	65	Valószínű ALS	Induláskor PLS. 65 évesen: Bulb: AMN, FV: AMN+FMN, AV: FMN	61	Nincs.	Neg.	Negatív.
ALS- P13	Férfi	65	Definitív ALS	FV: AMN+FMN, AV: AMN+FMN	61	Nincs.	Neg.	<i>POLG</i>
ALS- P14	Nő	68	Lehetséges ALS	Bulbaris indulás. FV: AMN, AV: AMN+FMN?	63	Érintett édesapa. Apai nagybátyjánál dementia.	Poz.	Negatív.

9. Táblázat: Az ALS kohortban azonosított ritka variációk összefoglaló táblázata

A táblázat az ALS-kohortban azonosított variációkat foglalja össze, az egyes variációkhoz tartozó annotációkkal. A HGMD adatbázis esetében a cellákban az adott variációhoz tartozó azonosító szerepel, majd a vessző után az asszociált betegség, zárójelben az összefüggés jellege. **Rövidítések:** DM = betegség okozó, DM? = valószínű/lehetséges betegség okozó, GHS: Gordon-Holmes-szindróma, Inkonkl. = inkonkluzív, PD: Parkinson kór, PEO: progresszív külső szemizombénulás, Zig. = zigócia.

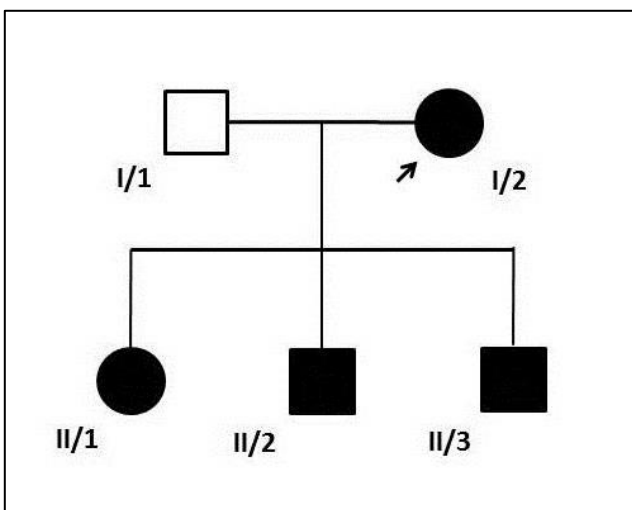
69

Beteg	Gén	Mutáció (HGVS)	Zig.	rs-szám	HGMD_ betegség asszociáció	ClinVar	SIF T	Polyphen 2_pred	ExAc	GERP
ALS- P3	<i>POLG</i>	NM_001126131: c.803G>C;p.Gly268Ala	HET	rs61752784	CM033442, PEO (DM)	Inkonkl.	0 (D)	0.999 (D)	0.0042	5.48
	<i>POLG</i>	NM_001126131: c.150_159del	HET	0.0047	.
	<i>PNPLA6</i>	NM_001166112: c.3850C>T;p.Arg1284Trp	HET	rs374434303	CM149434, GHS (DM)	.	0 (D)	0.999 (D)	0.0001	-1.05
ALS- P4	<i>BSCL2</i>	NM_001122955: c.1280T>C;p.Leu427Pro	HET	rs145649423	.	Inkonkl.	0.26 (T)	0.008 (B)	0.006	0.276
ALS- P6	<i>SLC25A15</i>	NM_014252.3: c.565G>A;p.Gly189Ser	HET	rs151239794	.	VUS	0.42 (T)	0.999 (D)	0.00042	4.51
	<i>SPG7</i>	NM_003119: c.1807G>A;p.Ala603Thr	HET	rs370852816	.	.	0 (D)	0.992 (D)	0	5.84
ALS- P7	<i>ALS2</i>	NM_020919: c.4119A>G;p.Ile1373Met	HET	rs61757691	CM150195, PD (DM?)	Inkonkl.	0.05 (D)	0.439 (B)	0.003	4.62
	<i>SLC25A22</i>	NM_024698: c.553G>A;p.Gly185Ser	HET	.	.	.	0.06 (T)	0.999 (D)	0.000029	3.49

Beteg	Gén	Mutáció (HGVS)	Zig.	rs-szám	HGMD_ betegség asszociáció	ClinVar	SIF T	Polyphen 2_pred	ExAc	GERP
ALS- P9	<i>CYP7B1</i>	NM_004820: c.1461_1461insTG	HET	0.000008	.
	<i>KIAA0196</i>	NM_014846: c.3047A>G;p.Tyr1016Cys	HET	.	.	.	0.03 (D)	0.996 (D)	0.0002	5.92
	<i>SETX</i>	NM_015046: c.1754A>G;p.Gln585Arg	HET	rs188247474	.	.	0 (D)	1.0 (D)	0.0001	5.92
	<i>POLG</i>	NM_001126131: c.8G>T;p.Arg3Leu	HET	rs146459055	CM012180, PEO (DM)	.	0 (D)	0.798 (P)	.	4.77
ALS- P10	<i>RTN2</i>	NM_206900: c.949G>A;p.Gly317Ser	HET	rs143937661	.	Valószínű benignus	0.11 (T)	0.971 (D)	0.0047	2.28
ALS- P13	<i>POLG</i>	NM_001126131: c.1760C>T;p.Pro587Leu	HET	rs113994096	CM031330, PEO (DM)	Inkonkl.	0 (D)	1.0 (D)	0.0029	4.04
	<i>POLG</i>	NM_001126131: c.752C>T;p.Thr25Ile	HET	rs113994094	CM021660, PEO (DM)	Inkonkl.	0.03 (D)	0.001 (B)	0.0029	3.61

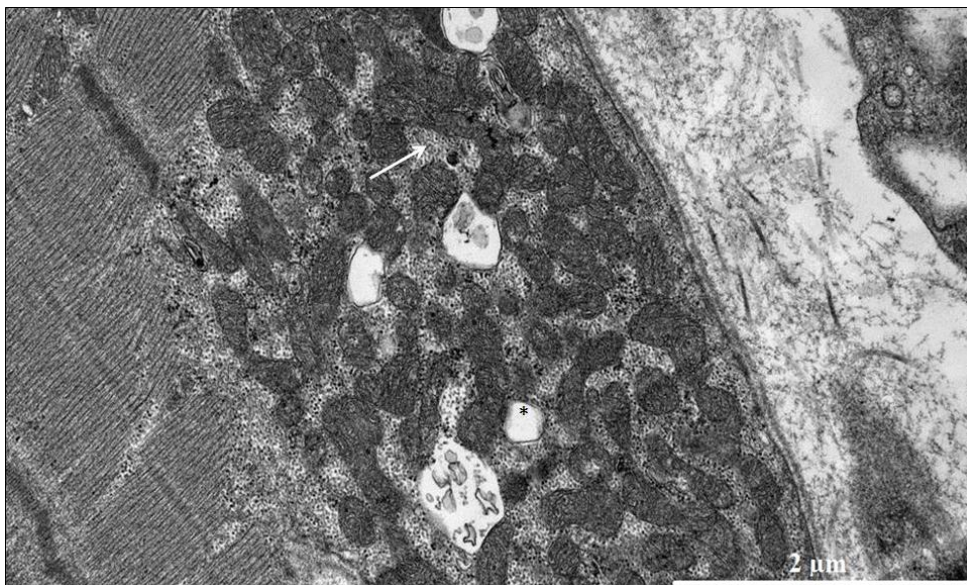
V/1.7. Exomszekvenálás egy komplex mitochondriális családban

Az intézetünkben vizsgált 53 éves index páciensnél (**11. Ábra I/2**) a prezentációs tünet a 38 éves korban jelentkező izomgyengeség volt. Kézujjait nehezebben mozgatta, valamint izomfájdalom jelentkezett, izmait nehéznek érezte, általános fáradékonyság, terhelési intolerancia lépett fel. Emellett anxietas, obszesszív tünetek (feszültség hatására önsértés, hajtépés) is jelentkeztek az izomgyengeséggel párhuzamosan. Perinatalis anamnesisében koraszülöttség, immaturitas, congenitalis végtagperc hiány szerepelt. Pszichomotoros fejlődése vontatott volt, gyermekkorban csontkora elmaradott volt. Felnőtt korában ízületi lazaság, chondropathia miatt térdműtetre került sor, valamint ismeretlen okú, egyoldali hallásvesztés alakult ki, többszörös lipomak, hyperthyreosis, mitralis és tricuspidalis insuffitientia jelentkeztek. Vizsgálatakor többszörös szomatikus malformatiókat észleltünk: alacsony termetet (150cm), micrognathiat, közel ülő szemeket, kétoldalt a lábujjpercek részleges kongenitális hiányát. Neurológiai vizsgálatokor distalis túlsúlyú perifériás gyengeséget észleltünk, enyhe kiskézizom atrophiaival, valamint enyhe fokú végtag- és törzsataxiát. Az alsó végtagok tekintetében distalis hypaesthesiat észleltünk. Emellett stressz incontinentia, anxietas, dysthymia emelendő ki státuszából. EMG vizsgálata myopathiara utalt. A koponya MR vizsgálat frontalis, interhemispherialis atrophiat írt le. A szérum kreatin-kináz érték nem volt emelkedett. A nyugalmi laktát szint nem mutatott eltérést, azonban a terheléses laktátszint vizsgálatakor az aerob anyagcsere zavarára utaló laktátprofil észleltünk. Emellett alacsonyabb szérum D3 vitamin szintet detektáltunk. A fénymikroszkópos izomszövetani eltérések minor aspecifikus eltéréseket mutattak, ragged blue vagy COX negatív rostok nem voltak jelen. Az elektronmikroszkópos vizsgálat megnövekedett számú, egyes helyeken abnormális alakú, kerekded mitochondriumokat detektált, valamint glycogen akkumuláció is jelen volt (**12. Ábra**). Az index páciensnek három gyermeke (1 lány, két fiú) különböző súlyossággal szintén érintett.



11. Ábra: Komplex mitochondriális fenotípussal jelentkező család családfája

Az index beteget nyíl jelöli a családfán.



12. Ábra: Az index páciens izomszöveti mintájának elektronmikroszkópos képe

Az elektronmikroszkópos képen (30,000x nagyítás), subsarcolemmalisan és intermyofibrillarisan a mitochondriumok számának felszaporodása, lipid cseppek (), glycogen akkumuláció (nyíl) látható.*

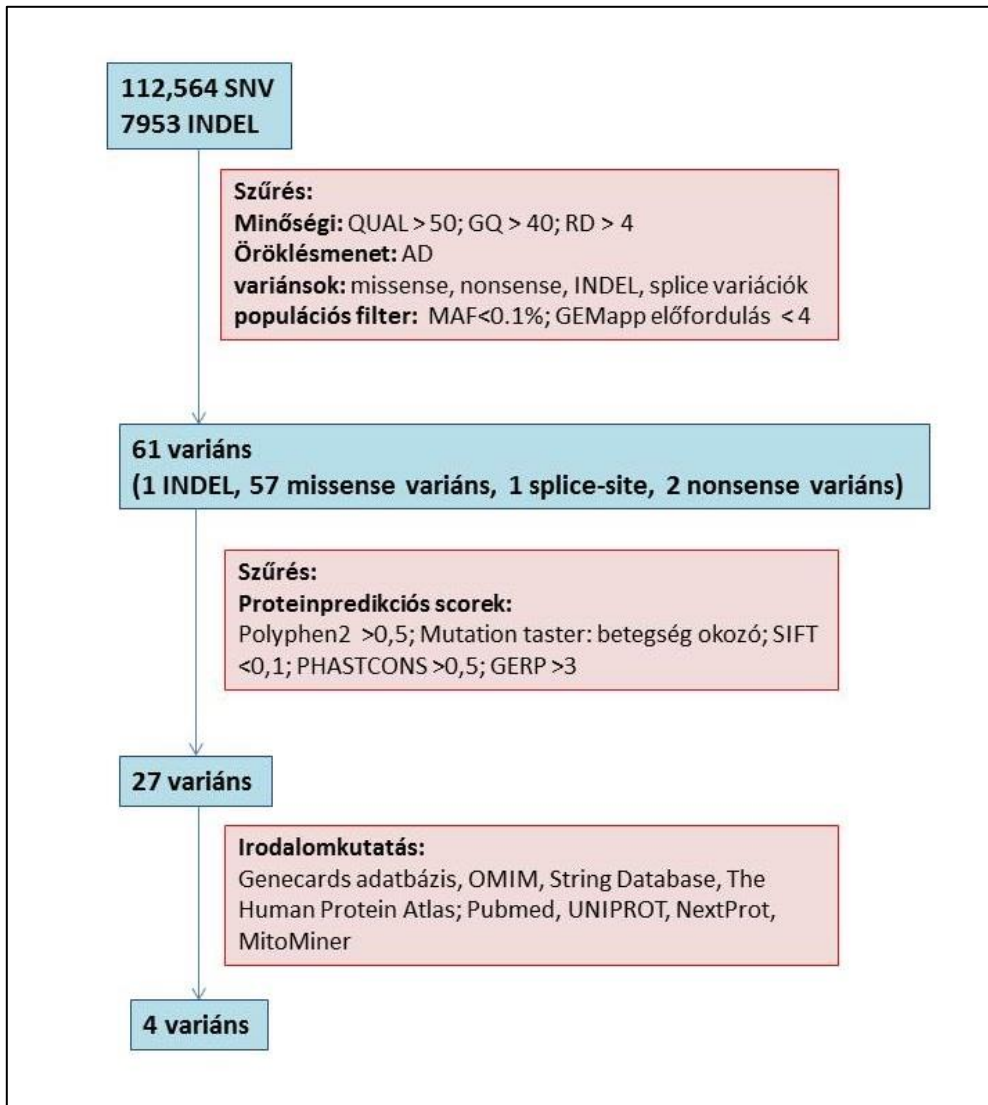
Az index páciens 30 éves lánya (**11. Ábra II/I**) perinatalis anamnesisében farfekvés, elhúzódozó szülés szerepelt. Megszületése után cyanotikus volt, resuscitatoria volt szükség. Pszichomotoros fejlődése megfelelő ütemben zajlott. Tizenegy éves korától a végtagokon és a törzsön epizodikusan csomók jelentek meg, amelyek szövettani vizsgálata a zsírszövetben gyulladást mutatott. Tizenhárom éves korában néhány ciklus menseset követően amenorrhoeássá vált. Tizenöt évesen jelentkeztek pszichiátriai tünetei, visuális hallucinációkkal, suicid ideációkkal, hangulatingadozással, somnambulizmussal. Ezt követően évente egy-két alkalommal jelentkeztek pszichotikus epizódok akusztikus hallucinációkkal. Serdülőkkora óta jelentkeztek migrénes fejfájással járó epizódok. Húsz éves korában irritabilis bél syndromát diagnosztizáltak. Huszonhárom éves kora után több alkalommal hospitalizálták neurológiai osztályon, egyensúlyzavar, száj körüli és nyelvzsibbadás, verticalis nystagmus miatt. Emellett myoclonusokat észleltek. Huszonhét éves korában jobb fülére súlyos fokú hallásvesztés alakult ki. Vizsgálatakor enyhe distalis izomgyengeséget, és distalis hypaesthesiat észleltünk, a kognitív funkciók hanyatlása mellett. Kreatin kináz és nyugalmi laktát szintje eltérést nem mutatott, a terheléses laktátvizsgálatot nem tudtuk elvégezni beleegyezés hiányában. Szérum D3-vitamin szintje alacsony tartományban volt (8,6 ng/mL). Koponya MR vizsgálata hypophysis adenomat és enyhe cerebellaris ectopiat detektált.

A proband 24 éves fia (**11. Ábra II/2**) komplikációmentes terhességből született. Mozgásfejlődése megfelelő ütemben zajlott. Gyermekkora óta anxietas, szociális fóbia jelentkezett. Csontfejlődése késést mutatott, D3-vitamin, calcium, foszfát, alkalikus foszfatáz értékei kóros tartományban voltak. Az általános iskola első osztályától tanulási zavart észleltek, dyslexiát, dyscalculiát, beszédészlelési elmaradást véleményeztek. Vizsgálatakor minor malformatiókat (micrognathia, pectus excavatum, kyphoscoliosis), enyhe végtag ataxiát, meglassult pszichomotoriumot észleltünk. A szérum kreatin-kináz normál tartományban volt, D3 vitamin szintje alacsony volt (12,5ng/mL). A proband 20 éves fia (**11. Ábra II/3**) postnatalisan hypotonias volt, mozgásfejlődése késett. Gyermekkora óta szociális szorongás, tanulási zavarok jelentkeztek, később autizmus spektrum zavart véleményeztek. Vizsgálatakor minor malformatiók (hosszúkás arc,

prognathia, térdízületi lazaság) észleltünk, neurológiai kórjele nem volt. Laborvizsgálata során alacsony D-vitamin szintet detektáltunk (10,8ng/mL).

A komplex mitochondriális fenotípussal jelentkező családban trio exom szekvenálást végeztünk. A proband mellett a proband lányát és a patert szekvenáltuk. A SeqCap EZ Exome v3 Kit alapján definiált target régió 95%-a minimum 10x-es lefedettséggel került szekvenálásra. A GEM.app szoftverrel végzett, autoszomális domináns modellt alkalmazó variáns elemzés lépéseit a **12. Ábra** mutatja be. Az elemzés során, a 27 azonosított kandidáns variáció közül 16-ot kizártunk a további elemzésből, mivel az érintett gének funkciója nem volt ismert. Ezt követően további hét variációt zártunk ki, mivel az irodalomkutatás alapján nem volt valószínű pathogén szerepük. A fennmaradó 4 variáns (**10. Táblázat**) pathogén szerepét valószínűsítettük, ezek Sanger validálását, illetve szegregációs vizsgálatát elvégeztük. Az autoszomális domináns variációkra történő szűrés mellett, megvizsgáltuk más öröklésment lehetőségét is. A probandnál, az irodalom alapján szelektált 1015 mitochondriális génen belül, nem azonosítottunk pathogén compound heterozigóta vagy homozigóta variációt.

Az autoszomális domináns modell melletti elemzés során azonosított 4 variáció közül csupán egy variáció szegregált a fenotípussal: *MSTO1* c.22 G>A (p.Val8Met). Ezt a variációt korábban húgyúti és colorectalis tumorokban szomatikus mutációként azonosították (COSM3930426) (<http://cancer.sanger.ac.uk>). Az Exome Aggregation Consortium (ExAc) adatbázisa alapján minor allél frekvenciája 0,003% (rs762798018), és nem szerepelt az 1000 Genome (<http://www.1000genomes.org>), NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>), dbGAP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gap>), és EGA (<http://www.ebi.ac.uk/ega>) adatbázisaiban. Korábban nem írták le emberi megbetegedéssel kapcsolatban. Az *MSTO1* protein variáció által érintett régiója emlősekben erősen konzervált.



12. Ábra: A variációk szűrésének lépései

10. Táblázat: A szűrés során azonosított, Sanger szekvenálással validált variánsok

AR = autoszomális recesszív; ASD = autizmus spektrum zavar; KO = „knock-out”, RD = „read depth” (leolvasási mélység)

Gén (protein) Variáció	Variáció típusa/Pontszám/Leolvasási mélység	Funkció/Betegség asszociáció/OMIM betegség/Egér KO modell	Expresszió
RELN (reelin) p.Ile3374Val	Missense/ Polyphen2: 0,976; Mutatio taster: D; SIFT: 0,02; PHASTCONS: 1,0; GERP: 5,79/ RD: 63, 54, 49	Extracellularis matrix protein. A központi idegrendszer fejlődése során a neuronális sejtmigrációt irányítja./ Asszociáció schizophreniával, ASD-vel, bipoláris zavarral, major depresszióval, temporális lebeny epilepsiával./ OMIM: (AR) lissencephalia cerebellaris hypoplasiával./ Egér KO: cerebellaris, hippocampalis fejlődési zavarok; egyes mutációk esetén pre/postnatalis letalitás, csökkent testméret, retina-, bulbus olfactorius rendellenesség.	Központi idegrendszer, gyengén máshol is.
MSTO1 (protein misato homolog 1) p.Val8Met	Missense/ Polyphen2: 1,0; Mutatio taster: D; SIFT: 0,002; PHASTCONS: 1,0; GERP: 3,31/ RD: 56; 38; 28	A mitochondriumok eloszlásában, morfológiájában regulátor szerep./ Nem ismert betegség asszociáció. / OMIM:-/ Egér KO:-/	Ubiquitaer.
COL5A1 (kollagén V) p.Glu98Lys	Missense/ Polyphen2: 0,996; Mutatio taster: D; SIFT: 0,1; PHASTCONS: 0,951; GERP: 4,81/ RD 37; 18; 18	Fibrillaris kollagén szerveződése./ Asszociáció keratoconusszal, Crohn betegséggel./ OMIM: (AD) Ehlers-Danlos syndroma./ Egér KO: homozigóta variáció mellett korai letalítás cardiovascularis betegség miatt. Heterozigóta variáció mellett bőr kötőszöveti eltérések.	Ubiquitaer.

Gén (protein) Variáció	Variáció típusa/Pontszám/Leolvasási mélység	Funkció/Betegség asszociáció/OMIM betegség/Egér KO modell	Expresszió
RYR2 (ryanodin receptor 2) p.Cys501Gly	Missense/ Polyphen2: 0,81; Mutatio taster: D; SIFT: 0,002; PASTCONS: 0,976; GERP: 4,56/ RD 16; 7; 9	Cardialis ryanodin receptor. CACNA1C Ca-csatorna regulációja./ Egy GWAS vizsgálatban asszociáció schizophreniával. A CACNA1C több pszichiátriai zavarral asszociál, legerősebben bipoláris zavarral./ OMIM: (AD) polymorph catecholaminerg ventricularis tachycardia 1, (AD) arrhythmogen jobb kamrai dysplasia 2./ Egér KO: szívfejlődési rendellenesség.	Szív, Központi idegrendszer: hippocampus, prefrontalis, temporalis cortex.

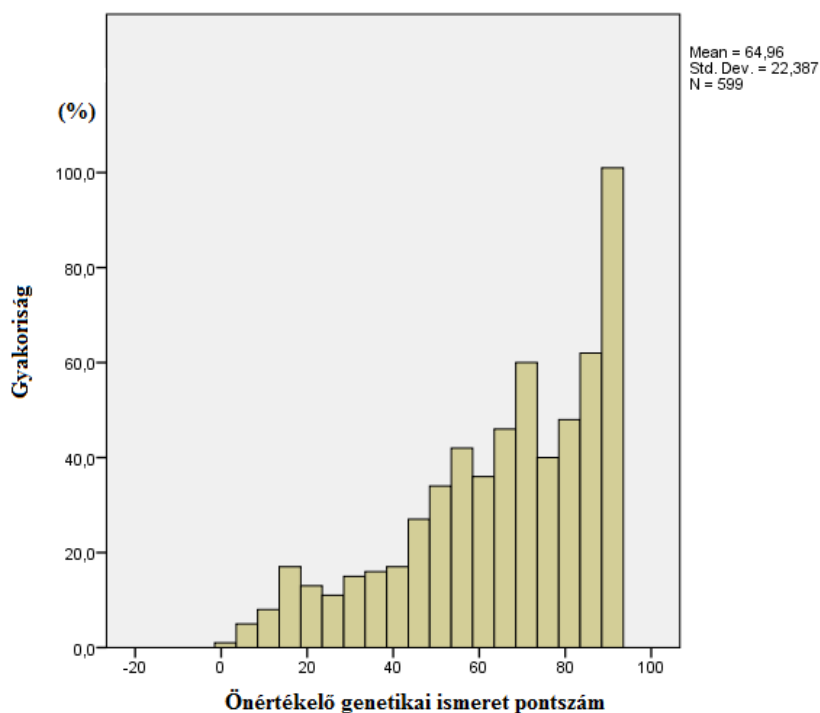
V/2. A nagy áteresztő képességű genetikai vizsgálatok által felvetett etikai kérdések nagy populációt érintő elemzése

V/2.1. A kérdőívet kitöltő személyek adatai

Összesen 657 személy töltötte ki kérdőívünket (463 nő, 177 férfi, 17 személy nem válaszolta meg a nemre vonatkozó kérdést). Teljes válaszadás 559 személy esetében volt elérhető. A válaszadók átlagos életkora 41 ± 14.6 év volt (férfiak esetében 41.6 ± 14.8 év, női válaszadók esetében 40.89 ± 14.49 év). A válaszadók 49.2% felsőfokú végzettséggel rendelkezett. Egészségügyben 72 válaszadó dolgozik, és 14 válaszadó egészségügyi tanuló volt. A válaszadók 47%-a budapesti lakos.

V/2.2. Az önértékelő genetikai ismeret pontszám

Az önértékelő genetikai pontszám megoszlását a **13. Ábra** mutatja be. Az átlagpontszám 64.96 ± 22.38 volt. Az egészségügyi dolgozók, illetve tanulók pontszáma szignifikánsan (Mann-Whitney U $p < 0.01$) magasabb volt, a nem egészségügyi dolgozókhoz, illetve tanulókhöz képest. A magasabb végzettséggel rendelkező kitöltők szignifikánsan magasabb pontszámmal bírtak (Kruskal-Wallis $p < 0.01$) (**11. Táblázat**), azonban a pontszám nem mutatott korrelációt az életkorral (Spearman's rho: -0.040).



13. Ábra: Az önértékelő genetikai pontszám megoszlása

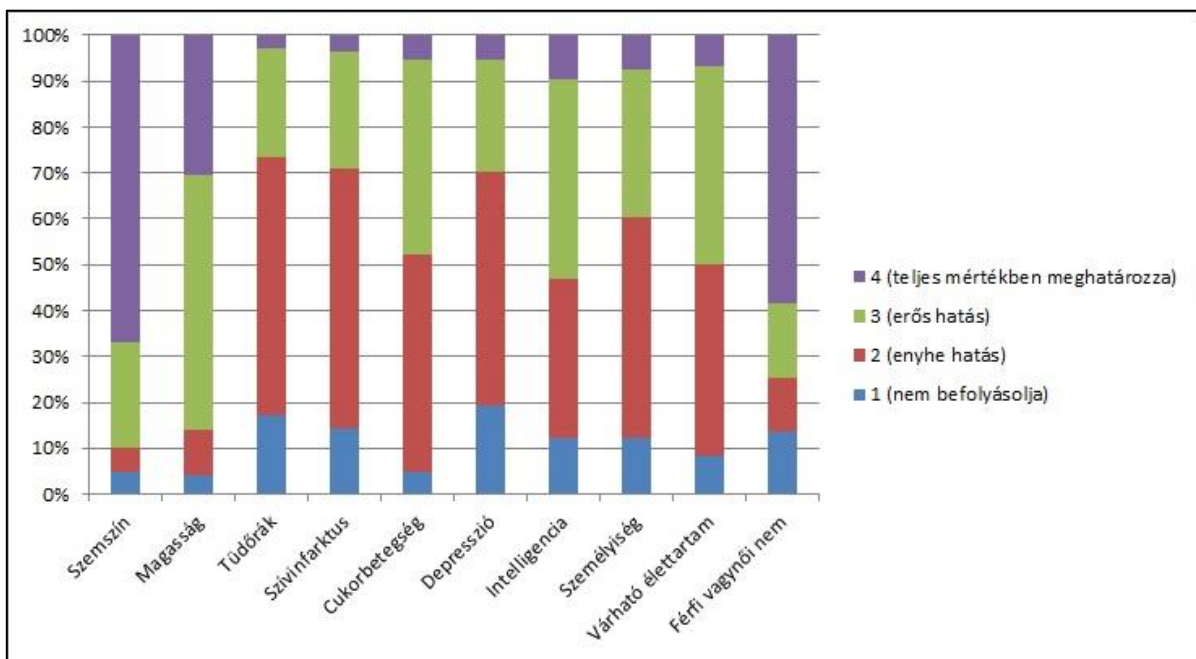
A hisztogram 5 pontonkénti beosztásban mutatja az önértékelő genetikai pontszám gyakorisági megoszlását.

11. Táblázat: Az önértékelő genetikai ismeret pontszám megoszlása végzettség szerint

Végzettség	Gyakoriság	Átlag pontszám	95% CI
Szakmunkásképző	20	45,35	32,78-57,92
Általános iskola	26	50,04	40,84-59,24
Szakközépiskola	51	61,69	56,10-67,28
Gimnázium	141	63,57	59,81-67,32
Főiskola	100	64,65	60,43-68,87
Egyetem	197	70,21	67,15-73,26
OKJ képzés	10	70,80	59,01-82,59
Összesen	599	64,96	63,17-66,76

V/2.3. A genetikai meghatározottság pontszám

A genetikai meghatározottság kérdésekre adott válaszok megoszlását a **14. Ábra** mutatja be. Az összpontszám 1-40 között változott, teljes válaszok esetén 10-40-ig terjedt. Levágási pontszámként 30-at meghatározva (3-as vagy 4-es válasz minden alkérdésre), 109 válaszadó (18.5%) rendelkezett magas genetikai meghatározottság pontszámmal (≥ 30 pont). A magasabb önértékelő genetikai ismeret pontszámmal bíró egyének közt gyakrabban fordult elő magas genetikai meghatározottság pontszám (Mann Whitney U $p=0.007$). A magas genetikai meghatározottság pontszámmal rendelkező egyének gyakrabban kérték volna a teljes genetikai állomány vizsgálatát (orvosi konzultáció nélkül vagy amellelt) későbbi használat céljából, mint az alacsony genetikai meghatározottság pontszámmal rendelkező kitöltők [49 (48.5%) vs. 172 (37.7%) $p=0.056$ illetve 63 (63.6%) vs. 231 (50.9%) $p= 0.026$]. Emellett a magas genetikai meghatározottság pontszámmal rendelkezők gyakrabban kérték volna genetikai tesztet orvosi konzultáció nélkül gyakori rizikómódosító genetikai variációk meghatározása céljából [87 (87.0%) vs. 335 (73.1%) $p=0.003$], illetve genetikai tesztet olyan esetben, ha súlyos, de kezelhető genetikai megbetegedésre derülhet fény a vizsgálattal [99 (97.1%) vs. 396 (85.9%) $p = 0.001$].



14. Ábra: A genetikai meghatározottság pontszámok megoszlása

V/2.4. A genetikai vizsgálatok iránt mutatott attitűdöt befolyásoló tényezők

V/2.4.1. Kétváltozós elemzések

Kétváltozós elemzéseket végeztünk a különböző demográfiai paraméterek genetikai vizsgálatok, incidentális találatok, eredmények megosztása iránt mutatott attitűdre gyakorolt hatásának vizsgálatára. A válaszadó neme, foglalkozása, az önértékelő genetikai ismeret pontszám, a genetikai meghatározottság pontszám több kérdésre adott válasz esetében szignifikánsan befolyásolta az adott kérdésre adott választ. Emellett az orvossal történő konzultáció lehetősége, illetve a korábbi genetikai vizsgálat egyes kérdések esetében szintén befolyásoló tényezőként mutatkozott. Az önértékelő genetikai pontszám illetve a genetikai meghatározottság pontszámmal kapcsolatos elemzéseket a megfelelő alfejezetben mutattam be.

V/2.4.1.1. A válaszadó neme

A férfi válaszadók egyes esetekben nagyobb érdeklődést mutattak a genetikai vizsgálatok iránt függetlenül az orvosi konzultáció lehetőségétől (**12. Táblázat**). Ugyanakkor több női, mint férfi kitöltő rendelkezett magas genetikai meghatározottság pontszámmal (21.9 vs. 11.4% $p=0.003$).

12. Táblázat: Különbségek a férfi és női válaszadók között egyes genetikai vizsgálatok iránt mutatott attitűd tekintetében

A táblázat az egyes genetikai vizsgálati szituációk iránt mutatott érdeklődést (igen válasz) mutatja nemek szerinti felbontásban. A táblázat celláiban a válaszadók száma, zárójelben az adott nem arányaként megadva, illetve a p-értékek találhatóak. A táblázatban csak a szignifikáns különbséget mutató kérdések kerültek feltüntetésre.

	Férfi válaszadók	Női válaszadók	p-érték
Kérne-e genetikai vizsgálatot egészségesen, orvosi konzultáció nélkül a következő esetekben			
Érdeklődésből származásának megismerésére	84 (51.5%)	149 (38.9%)	0.008
Érdeklődésből egyes testi jelek meghatározására	60 (36.8%)	69 (18.2%)	<0.001
Teljes genetikai állomány (az összes ismert emberi gén) meghatározására későbbi felhasználás céljából	85 (51.2%)	135 (35.0%)	<0.001

Kérne-e genetikai vizsgálatot egészségesen, orvosi konzultáció mellett a következő esetekben

Gyakori betegségek esélyét kismértékben fokozó génelterések kiszűrésére	131 (81.2%)	282 (73.2%)	0.051
Érdeklődésből származásának megismerésére	90 (54.5%)	145 (38.4%)	0.001
Érdeklődésből egyes testi jellegek meghatározására	63 (38.2%)	81 (21.5%)	<0.001
Teljes genetikai állomány (az összes ismert emberi gén) meghatározására későbbi felhasználás céljából	105 (63.6%)	186 (48.8%)	0.002

V/2.4.1.2. Egészségügyi foglalkozás

Az egészségügyben dolgozó vagy tanuló válaszadók egyes genetikai vizsgálatokkal szemben mutatott attitűdje eltért a nem egészségügyi dolgozókéétól. Különbség elsősorban akkor jelent meg, ha a kérdésben orvosi konzultáció lehetősége jelen volt (**13. Táblázat**).

13.Táblázat: Genetikai vizsgálatokkal szemben mutatott attitűd megoszlása foglalkozás szerint

	Egészségügyi válaszadók	Nem egészségügyi válaszadók	p-érték
Kérne-e genetikai vizsgálatot egészségesen, orvosi konzultáció nélkül a következő esetekben			
Egyes ritka betegségek veszélyének megállapítására	30 (41.1%)	213 (48.4%)	0.257
Súlyos betegségeket okozó génelterések kiszűrésére	33 (45.2%)	242 (55.0%)	0.13
Gyakori betegségek esélyét kismértékben fokozó génelterések kiszűrésére	35 (47.3%)	237 (54.0%)	0.315
Érdeklődésből származásának megismerésére	31 (41.9%)	185 (43.0%)	0.899
Érdeklődésből egyes testi jellegek meghatározására	16 (21.6%)	110 (25.7%)	0.561
Teljes genetikai állomány (az összes ismert emberi gén) meghatározására későbbi felhasználás céljából	22 (30.1%)	178 (40.7%)	0.093
Kérne-e genetikai vizsgálatot egészségesen, orvosi konzultáció mellett a következő esetekben			
Egyes ritka betegségek veszélyének megállapítására	46 (61.3%)	351 (80.1%)	0.001
Súlyos betegségeket okozó génelterések kiszűrésére	54 (72.0%)	372 (85.1%)	0.007
Gyakori betegségek esélyét kismértékben fokozó génelterések kiszűrésére	46 (62.2%)	339 (78.3%)	0.005

	Egészségügyi válaszadók	Nem egészségügyi válaszadók	p-érték
Érdeklődésből származásának megismerésére	30 (41.1%)	188 (43.7%)	0.703
Érdeklődésből egyes testi jellegek meghatározására	18 (24.3%)	121 (28.3%)	0.574
Teljes genetikai állomány (az összes ismert emberi gén) meghatározására későbbi felhasználás céljából	31 (41.9%)	234 (54.4%)	0.058

V/2.4.1.3. Korábbi genetikai vizsgálat

A korábbi genetikai vizsgálaton átesett válaszadók egyes kérdésekben eltérő attitűdöt mutattak. Azon válaszadók, akiknél történt korábban genetikai vizsgálat, kisebb érdeklődést mutattak egyes testi jellegek meghatározása iránt, azokhoz a válaszadókhoz képest, akiknél korábban genetikai vizsgálat nem történt [32 (18,6%) vs. 99 (26,4%) $p=0,052$]. A korábban genetikai vizsgálaton átesett válaszadók emellett nagyobb hajlandóságot mutattak genetikai adataik, vagy genetikai mintájuk kutatási célú megosztása iránt [144 (85,7%) vs. 270 (74,2%) $p=0,003$; 145 (86,3%) vs. 281 (78,1%) $p=0,025$].

V/2.4.1.4. Orvossal történő konzultáció lehetősége

Az orvossal történő konzultáció lehetősége mellett több esetben is nagyobb érdeklődést mutattak a válaszadók a genetikai vizsgálatok iránt (**14. Táblázat**). Szignifikáns különbséget észleltünk a ritka betegségek szűrése, súlyos betegséget okozó genetikai eltérések szűrése, gyakori betegségek fellépésének esélyét befolyásoló genetikai variációk szűrése esetében, illetve a teljes genomvizsgálat esetében. A származás megismerésére, illetve egyes testi jellegek meghatározására irányuló genetikai vizsgálatok iránt mutatott érdeklődés alacsony maradt függetlenül az orvosi konzultáció lehetőségétől.

14. Táblázat: Genetikai vizsgálatok iránt mutatott érdeklődés az orvosi konzultáció lehetősége szerint

	Orvosi konzultáció nélkül		Orvosi konzultáció mellett		OR (95% CI)	p-érték
	Igen	Nem	Igen	Nem		
Kérne-e genetikai vizsgálatot egészségesen a következő esetekben:						
Egyes ritka betegségek veszélyének megállapítására	277 (48.3)	296 (51.7)	446 (78)	126 (22)	3.78 (2.92-4.89)	<0.001
Súlyos betegségeket okozó géntérések kiszűrésére	313 (54.7)	259 (45.3)	483 (84.3)	90 (15.7)	4.4 (3.36-5.86)	<0.001
Gyakori betegségek esélyét kismértékben fokozó géntérések kiszűrésére	308 (53.8)	264 (46.2)	429 (75.8)	137 (24.2)	2.7 (2.08-3.45)	<0.001
Érdeklődésből származásának megismerésére	242 (43)	320 (57)	240 (42.9)	319 (57.1)	1 (0.78-1.26)	1
Érdeklődésből egyes testi jelek meghatározására	134 (24)	425 (76)	147 (26.4)	410 (73.6)	1.1 (0.86-1.49)	0.35
Teljes genetikai állomány meghatározására későbbi felhasználás céljából	224 (39.5)	343 (60.5)	299 (53.2)	263 (46.8)	1.7 (1.37-2.2)	<0.001

V/2.4.2. A közvetlenül a fogyasztók által indikált genetikai vizsgálatok iránt mutatott attitűdöt befolyásoló tényezők

A bináris logisztikus regresszió eredményét az **15. Táblázat** mutatja be. Az életkor és a nem konzekvens módon befolyásolta az elemzésben involvált kérdéseket. A férfi válaszadók nagyobb érdeklődést mutattak a nem orvosi motivációjú genetikai vizsgálatok iránt (érdeklődésből, származás megismerésére). A fiatalabb korú válaszadók nagyobb érdeklődést mutattak az elemzésben szereplő genetikai vizsgálatok iránt, és nagyobb mértékben tartották elfogadhatónak genetikai tesztek kereskedelemben történő megvásárlásának lehetőségét. Emellett a képzettség, valamint a vallásosság is befolyásoló faktorként szerepelt, azonban nem konzekvens módon. A magukat vallásosnak valló válaszadók borderline szignifikancia mellett kevésbé tartották elfogadhatónak genetikai tesztek kereskedelemben történő megvételét. Összességében a modell a teljes variancia 8-11%-át tudta magyarázni.

15. Táblázat: A közvetlenül a fogyasztók által indikált genetikai vizsgálatok iránt mutatott pozitív attitűd prediktorai

A táblázat a modellben szereplő három kérdésre mutatja be a pozitív attitűd prediktorait az esélyhányadossal (OR), 95%-os konfidencia intervallummal (CI), és szignifikancia szinttel (p). A szignifikáns p-értékeket félkövér betűtípussal emeltem ki.

Prediktorok		Kérne-e Ön széles körű genetikai tesztet csupán kíváncsiságból?		Kérne-e genetikai vizsgálatot egészségesen, orvosi konzultáció nélkül, érdeklődésből, származása megismerésére?		Elfogadhatónak tartja-e genetikai tesztek kereskedelemben történő megvételének lehetőségét?	
		OR (CI ₉₅)	p-érték	OR (CI ₉₅)	p-érték	OR (CI ₉₅)	p-érték
Végzettség (ref: egyetem)	Általános iskola	0.931 (0.325-2.665)	0.894	0.884 (0.299- 2.606)	0.822	0.326 (0.107-0.989)	0.048
	Szakképzés-képző	5.953 (1.231- 28.788)	0.027	0.469 (0.129- 1.712)	0.252	1.61 (0.379-4.193)	0.705
	Szakközép-iskola	0.921 (0.450- 1.885)	0.821	0.598 (0.278- 1.289)	0.189	0.585 (0.286-1.198)	0.143
	Gimnázium	1.392 (0.811-2.390)	0.230	0.883 (0.508- 1.535)	0.660	0.489 (0.284-0.844)	0.010
	OKJ	2.137 (0.516-8.839)	0.295	0.761 (0.199- 2.913)	0.690	1.603 (0.387-6.641)	0.515
	Főiskola	2.240 (1.232-4.072)	0.008	1.156 (0.641- 2.087)	0.630	0.963 (0.541-1.714)	0.899
Nem (ref: nők)		1.761 (1.112-2,788)	0.016	1.761 (1.125- 2.758)	0.013	1.358 (0.869-2.124)	0.180
Életkor		0.981 (0.964-0.999)	0.035	0.980 (0.962- 0.998)	0.029	0.979 (0.962-0.997)	0.021

Van gyermeke (ref: igen)	1.302 (0.762-2.223)	0.334	1.210 (0.712- 2.057)	0.481	0.866 (0.510-1.471)	0.596
Foglalkozás (ref: egészségügy)	1.547 (0.876-2.732)	0.133	1.147 (0.644- 2.043)	0.642	1.173 (0.668-2.059)	0.579
Vallásosság (ref: vallásos)	1.143 (0.758-1.724)	0.524	0.888 (0.586- 1.345)	0.575	0.703 (0.468-1.056)	0.090
Önértékelő genetikai ismeret pontszám	0.999 (0.990-1.009)	0.919	0.994 (0.984- 1.004)	0.241	1.002 (0.992-1.012)	0.677
Genetikai meghatározottság pontszám (ref: pontszám \geq 30)	0.799 (0.467-1.368)	0.413	0.908 (0.527- 1.567)	0.729	0.993 (0.583-1.693)	0.980
Lakóhely (ref: fővároson kívüli)	0.903 (0.587-1.387)	0.640	1.171 (0.759- 1.807)	0.474	1.147 (0,751-1,752)	0.525
Nagelkerke R^2 (%)	11.0		8.1		8.0	

VI. MEGBESZÉLÉS

VI/1. A HSP epidemiológiája Magyarországon

A Hereditaer Spasticus Paraparesis kohortban elvégzett genetikai vizsgálatok alapján a leggyakrabban érintett gén a *SPAST* (összes proband 12%-a, a genetikailag azonosított esetek 46%-a). Ezt követi gyakoriságban az *SPG7* (a genetikailag azonosított esetek 23%-a), majd az *SPG11* (7,5%). A leggyakrabban detektált variáns az *SPG7* p.Leu78* variációja volt, amelyet öt proband esetében detektáltunk. *ATLI* variáció, *NIPAI* variáció egy-egy probandnál volt a betegség oka. Emellett négy betegnél primeren nem HSP-hez kötött gén variációját azonosítottuk (két probandnál *ABCDI* variáció, egy probandnál *GALC*, egy probandnál *FA2H* variáció). *REEPI* variánst nem detektáltunk a kohortban. Az irodalmi adatok alapján az autoszomális domináns esetek 50%-ában a molekuláris diagnózis a három leggyakrabban érintett gén (*SPAST*, *ATLI*, *REEPI*) genetikai vizsgálatával felállítható [107]. A *SPAST* variációk az autoszomális domináns esetek 40-45%-áért felelősek az irodalom szerint [110], míg a az *ATLI* variációk körülbelül 10%-ért [111], a *REEPI* variációk 5%-ért [112], a *KIF5A* variációk 3%-ért [113]. Autoszomális recesszív öröklésment esetén a leggyakrabban az *SPG11* gén érintett, különösen, ha a tüneteket mentális retardatio, vagy elvékonyodott corpus callosum kíséri [107]. A *SPAST* variációk sporadikus HSP esetében is gyakran jelen vannak (6-15%-ban) [87]. Az általunk vizsgált kohortban jelentős arányban sporadikus esetek fordultak elő, bár szükséges megjegyezni, hogy a családtagok esetében szubklinikus érintettség nem zárható ki. Az általunk vizsgált kohortban a leggyakoribb eltérés a *SPAST* variáció volt, amely egybehangzó egy kisebb, nem általunk végzett magyarországi HSP kohort vizsgálatával [114]. Ebben a vizsgálatban 11 proband közül 5 probandnál *SPAST* variációt detektáltak (4 probandnál autoszomális domináns öröklésment mellett, míg egy probandnál sporadikus megjelenés mellett). Az **16. Táblázat** a *SPAST* variánsok gyakoriságát mutatja különböző vizsgált populációkban. Ebben a táblázatban azokat a probandokat nem vettük számításba, akiknél csak célzott *SPG7* p.Leu78* vizsgálat történt (20 proband), mivel az ő esetükben a *SPAST* gént nem

vizsgáltuk. Ez alapján, a Magyarországon detektált frekvencia relatíve alacsony, azonban a sporadikus esetek relatíve nagy hányadot képviselnek.

16. Táblázat: Az SPG4 esetek aránya különböző vizsgálatokban

**Ezekben a vizsgálatokban csak familiáris, illetve sporadikus eseteket elemeztek.*

Vizsgálat	A kohort mérete	Összes SPG4 eset (az összes eset százalékában)	Domináns SPG4 esetek (Az SPG4 esetek százalékában)	Sporadikus SPG4 esetek
Németország [85]	161	27 (17%)	27 (100%)	Nem értelmezhető*
Spanyolország [87]	370	54 (15%)	44 (81%)	10 (19%)
Olaszország [115]	60	13 (22%)	5 (38%)	8 (62%)
Több európai ország [116]	146	18 (12%)	Nem értelmezhető *	18 (100%)
Japán [117]	129	32 (25%)	28 (88%)	4 (12%)
Bulgária [118]	36	6 (17%)	6 (100%)	0 (0%)
Korea [119]	27	11 (41%)	10 (91%)	1 (9%)
Kína [120]	36	5 (14%)	3 (60%)	2 (40%)
Több európai ország [121]	120	33 (28%)	33 (100%)	0 (0%)
Románia [122]	30	16 (53%)	16 (100%)	0 (0%)
Nagy-Britannia [123]	41	9 (22%)	9 (100%)	0 (0%)
Ausztrália [124]	30	16 (53%)	14(88%)	2 (12%)
Korea [125]	206	49 (24%)	37 (76%)	12 (24%)
Magyarország (saját vizsgálatunk)	79	12 (15%)	7 (58%)	5 (42%)

VI/2. HSP gének variációinak genotípus-fenotípus összefüggései

VI/2.1. A *SPAST* gén genotípus-fenotípus összefüggései

A vizsgált HSP kohortunkban 12 proband esetében azonosítottunk *SPAST* variációkat, 6 esetben korábban irodalomban nem közölt variációt detektáltunk. Az azonosított *SPAST* variációk mellett inter- és intrafamiális variabilitást tapasztaltunk. Ugyanazon mutáció jelenléte mellett előfordult komplikált, és tiszta HSP is, így egyértelmű genotípus-fenotípus összefüggések nem állapíthatók meg a gén szintjén. A variációk típusával (missense, frameshift, stop) nem volt összefüggés, mivel pHSP és cHSP egyaránt előfordult mind missense, stop és frameshift variáció típus mellett. Sporadikusan megjelenő betegség esetén is előfordult mind STOP, mind missense, mind splice variáns. A splice variációval rendelkező betegek esetében (3 proband) csak pHSP volt jelen, azonban itt is a betegség kezdet széles határok között mozgott (6-44 év). Bár korábban a *SPAST* variációkat egyértelműen pHSP-hez kötötték, mára egyértelművé vált az SPG4 változékony fenotípus prezentációja. Polyneuropathia, epilepsia, tremor, ataxia, kognitív hanyatlás társulhat a spasticus paraparesishez [107]. A klinikai variabilitás oka ma még nem ismert. Ismert jelenség az SPG4 nemhez kötött penetranciája. Epidemiológiai vizsgálatok alapján a férfiakban nagyobb a betegség penetranciája [126]. Saját kohortunkban a férfi/nő arány kiegyenlített (10/9) volt. Chelban és mtsi. vizsgálata alapján a *SPAST* trunkáló variációi gyakran társulnak pszichiátriai tünetekkel [127]. Az általunk vizsgált betegek közül egy SPG4 betegnél társult depresszió, nála missense variációt detektáltunk. Jelentősége lehet a *SPAST* génben elhelyezkedő modifikáló variációknak. Az egyik vizsgált családban a *SPAST* p.Arg562* variációt detektáltuk az érintett női probandban és lányánál. Az érintett lány a *SPAST* p.Arg562* variáció mellett heterozigóta p.Ser44Leu variációt is hordozott, és fenotípusa jelentősen súlyosabb volt. Egy férfi probandnál heterozigóta formában egyedüli eltérésként detektáltuk a p.Ser44Leu variációt. A proband enyhe tünetei 45 éves korban kezdődtek. A megfigyeléseink összességében támogatják a hipotézist, mely szerint az *SPAST* gén p.Ser44Leu variánsa modifikáló [95], vagy enyhe patogén variáció [128] lehet. Ugyanakkor a variáció pontos szerepét még tisztázni szükséges, mivel a kontroll

populációban is gyakori [129]. McDermott és mtsi. EMG vizsgálatai alapján felvetődött, hogy a variáció alsó motoneuron károsodásra hajlamosító genetikai faktor szerepét is betöltheti [130]. Tovább erősítette ezt a hipotézist Munch és mtsi. közlése, amelyben a *SPAST* p.Se44Leu variációt egy rapidan progrediáló ALS betegben azonosították [129]. A *SPAST* gén patogén variációi leggyakrabban a gén konzervált, AAA domént (342-599. aminosav) kódoló régiójában helyezkednek el [85]. Felvetődött, hogy ezt a régiót érintő patogén variációk esetén korábbi a betegségkezdés [131]. Saját kohortunkban egy variánst leszámítva (p.Thr614Asnfs*16), valamennyi detektált variáns az evolúciósan konzervált AAA domént érintette.

VI/2.2. Az *SPG7* gén genotípus fenotípus összefüggései

SPG7-et hat proband esetében diagnosztizáltunk. Az autoszomális recesszíven öröklődő betegség irodalmi adatok alapján pHSP és cHSP formájában is jelentkezhet. Opticus atrophia, dysarthria, dysphagia, ataxia, nystagmus, strabismus, hypacusis, distalis izomatrophia társulhat a betegséghez [107]. Saját kohortunkban hat proband közül ötnél, a korábban patogénként közölt, p.Leu78* variációt detektáltuk homozigóta, compound heterozigóta vagy heterozigóta formában. A variáció sporadikus esetekben és autoszomális recesszív öröklés mellett is jelen volt. Egyes irodalmi adatok alapján felvetődik, hogy a variáció domináns öröklés mellett is megjelenhet [89]. Saját kohortunkban egy sporadikus pHSP probandnál bizonyítottan heterozigóta státuszú volt a variáció, mivel ennél a probandnál deletio és duplicatio szűrés is történt. Az izomszöveti vizsgálat mitochondriális funkciózavart jelzett, amely támogatja a felvetést, miszerint a betegség megjelenéséhez elég lehet egy mutált allél. Három HSP proband esetében a variáns homozigóta státuszban igazolódott, míg egy proband esetében compound heterozigóta státuszban (p.Ala510Val variáns mellett), ahol a családi anamnesis alapján az öröklés mellett bizonytalan volt. Összességében tehát az eddig összegyűlt információk birtokában felvetődik, de nem lehet egyértelműen állást foglalni arról, hogy megjelenhet-e a betegség domináns módon p.Leu78*variáció mellett. Az egyik vizsgált probandunk esetében detektált p.Gly344Asp variáns mellett is felvetődött domináns öröklődés lehetősége. Az index beteg mintájában compound heterozigóta variációt azonosítottunk: heterozigóta p.Ala510Val és heterozigóta p.Gly433Asp. A p.Ala510Val variánst korábban az

irodalomban lehetséges patogén variánsként közölték [132], amelynek egyértelmű szignifikanciája még nem tisztázott. Roxburgh és mtsi. közlése alapján a variáció az *SPG7* gén leggyakoribb eltérése [133]. A p.Gly344Asp variációt korábban szintén patogénként közölték [90]. Az index betegünk édesanyja szintén érintett volt, azonban a mater mintájában csak a p.Gly344Asp variációt detektáltuk. Ennek az esetnek kapcsán, illetve a p.Leu78* variánssal compound heterozigóta státuszban detektált variáns kapcsán felmerül, hogy a p.Ala510Val variáns egy modifikáló faktor lehetett, a domináns öröklésmentel megjelenő p.Leu78* illetve p.Gly344Asp variáció mellett. Ennek bizonyítása azonban még további vizsgálatokat igényelne. A p.Leu78* variációt eredetileg Arnoldi és mtsi. közölték [88], és felvetették, hogy gyakori előfordulása a vizsgált olasz HSP kohortban alapító hatás következménye lehet. Később más populációban is gyakori előfordulást észleltek [89,134–136]. Saját kohortunkban a variációt hordozó probandok Magyarország eltérő részeiről származtak, és nincs arról tudomásunk, hogy etnikai kisebbség tagjai volnának. Összességében tehát a variáns relatív gyakori előfordulását mutációs hotspot hatásnak tulajdonítjuk.

VI/2.3. Pleiotropia az *SPG11* gén variációk klinikai megjelenésében

SPG11-et összesen három proband esetében diagnosztizáltunk. Két proband esetében, akiket a HSP kohortban vizsgáltunk, a fenotípus az irodalomban közölteknek megfelelő volt. Egy proband esetében a cerebellaris ataxia hátterének tisztázására végzett teljes exom szekvenálás azonosított compound heterozigóta eltérést az *SPG11* génben. Az *SPG11* gén variációi széles fenotípusos spektrummal jelentkezhetnek. Egyaránt okozhatnak autoszomális recesszív öröklésmentel komplikált hereditaer spasticus paraparesist, perifériás neuropathiát, valamint juvenilis amyotrophias lateral sclerosist. Az *SPG11* asszociált komplikált HSP-re jellemző a fiatal felnőttkori kezdet, kognitív hanyatlás, kis kézizom atrophia, cerebellaris ataxia [137]. Az *SPG11* okozta HSP esetében az ataxia nem konzisztensen jelentkezik, és általában enyhe, azonban egy korábbi esetközlést ismerünk az irodalomból, ahol akciós tremor volt a prezentációs tünet [138]. Egyes esetekben Parkinsonismus [139], illetve centrális retina degeneratio [96] kísérheti a spasticus paraparesist. Az *SPG11* gén okozta hereditaer spasticus paraparesisre jellemző radiológiai eltérés, az elvékonyodott corpus callosum mellett, a már preklinikai stádiumban észlelhető

„hiúzfül jel”, amely a frontalis kamraszarvak csúcsán jelentkező, jellegzetes alakú, kóros szignálintenzitás [140]. Az *SPG11* asszociált Charcot-Marie-Tooth betegség lassú progressziót mutató, döntően distalis, senso-motoros axonális neuropathia képében jelentkezik, fiatal felnőttkori kezdettel, amelyet egyes esetekben mentális retardatio, vékony corpus callosum kísér [141]. Az amyotrophias lateral sclerosissal jelentkező betegek esetében korai kezdet (átlag 16 év) és hosszú lefolyás (átlag 34 év) jellemző [142]. Esetünk további bizonyítékul szolgál arra, hogy elsődlegesen ataxiával jelentkező betegnél az *SPG11* lehetőségét figyelembe kell venni, és célzottan kell keresni az MR-en a corpus callosum vékonyodást.

Az *SPG11* által kódolt spatacsin diszfunkciója nem teljes mértékben tisztázott módon vezet axonális károsodáshoz. A fehérje károsodása kóros cytoskeleton stabilitással és axonális transzporttal jár [143], emellett a lysosomal rendszer is diszfunkcionális, lysosomal lipid akkumuláció alakul ki [144]. A HSP pathomechanizmusában egyes gének mutációja esetén (*SPG13*, *REEP1*, *SPG7*, *C12ORF65*, *MT-ATP6*) mitochondriális diszfunkció áll a betegség hátterében [17], azonban az *SPG11* esetében ezt korábban nem írták le. Izombiopsias minták szisztematikus vizsgálatáról nincs tudomásunk *SPG11* gén mutációval bíró betegekben, esetközlésekben azonban eddig nem írtak le mitochondriális diszfunkcióra utaló eltéréseket [139,145,146]. További vizsgálatokat igényel, hogy az esetünkönél észlelt mitochondriális eltérések összefüggenek-e az *SPG11* variációkkal.

VI/2.4. További azonosított SPG gének genotípus-fenotípus összefüggései

NIPAI és *ATL1* variációt egy-egy proband esetében detektáltunk. A genotípus illetve fenotípus jellemzők az irodalomban közölteknek megfeleltek [107]. A ritka előfordulás miatt genotípus fenotípus összehasonlítások végzése nem volt lehetséges.

VI/3. A HSP vizsgálata során azonosított fenokópiák

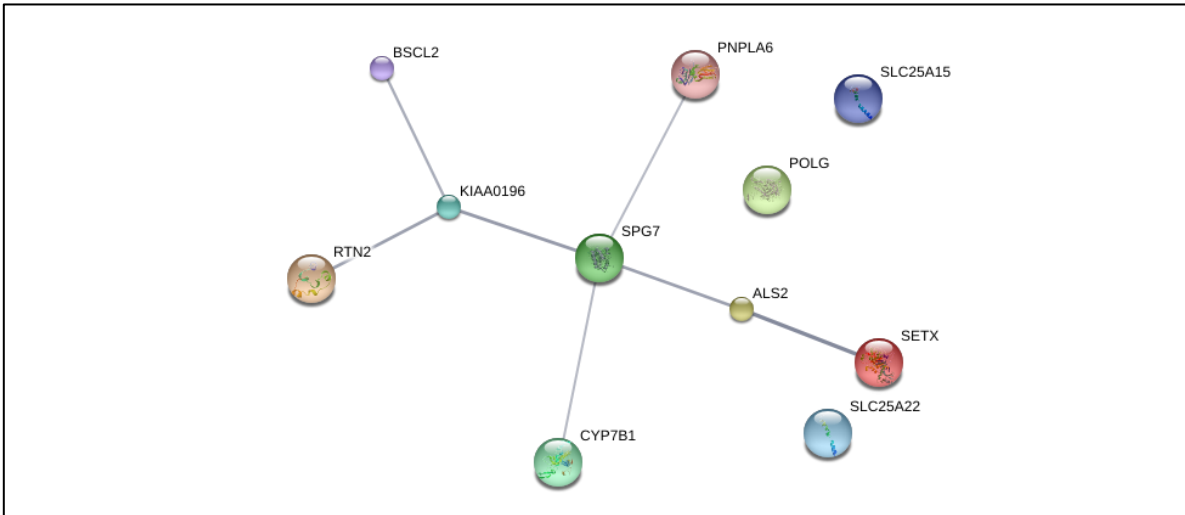
Ismert, hogy egyes metabolikus betegségek felnőttkori kezdetű, illetve enyhébb megjelenési formái kezdetben a HSP fenotípusát utánozhatják [19]. Saját kohortunkban két proband esetében X-hez kötött adrenoleukodystrophia- adrenomyeloneuropathia igazolódott, egy proband esetében Krabbe betegséget, egy proband esetében FAHN betegséget diagnosztizáltunk. Az elmúlt években több esetet közöltek, ahol a kezdetben HSP-nek

tartott fenotípus háttérében végül *ABCDI* patogén variáció igazolódott [147,148]. Saját kohortunkban az egyik probandnál észlelt szintes érzészavar felvetette a myelopathia lehetőségét, azonban ez az elvégzett vizsgálatokkal nem nyert megerősítést, elsősorban HSP merült fel. Koponya MR vizsgálata kezdetben leukodystrophiát nem mutatott, egyedüli eltérés a vékonyabb myelon volt. A gerincvelő elvékonyodása HSP-vel is asszociálható, azonban jellemző lehet AMN-re is [149]. A második AMN eset fenotípusa ataxiával komplikált HSP-re utalt, MR vizsgálata nem mutatott kórosat. Az évekkel később elvégzett kontroll MR vizsgálat már felvetette leukodystrophia lehetőségét, azonban megjegyzendő, hogy számos HSP esetében is előfordulhat nem specifikus fehérállományi jelzavar [150]. A Krabbe-betegséggel diagnosztizált proband esetében a klinikai tünetek megfeleltek HSP-nek, azonban a koponya MR vizsgálat a corticospinalis pályarendszer mentén jelzavart mutatott. Az eltérés felvetette AMN lehetőségét, amelyet a vizsgálatok nem igazoltak. Végül panelvizsgálattal sikerült azonosítani a *GALC* gén patogén variációit. A corticospinalis pályarendszer szelektív érintettsége utalhat Krabbe betegségre [151], azonban a pályarendszer más betegségekben is lehet preferenciálisan érintett [152]. A beteg ENG vizsgálattal detektált demyelinisációs polyneuropathiaja ugyanakkor nem jellemző HSP-re. A FAHN betegséggel diagnosztizált proband esetében a gyors progresszió, diffúz fehérállományi eltérések, komplex fenotípus cHSP, vagy leukodystrophia lehetőségét vetették fel. A *FA2H* gén variációi megjelenhetnek cHSP-ként (SPG35), amelyre az anarthria korai kifejlődése lehet jellemző [153], illetve dysmyelinisációs leukodystrophiát okozhatnak [154], azonban a különböző klinikai megjelenési formákra a jelentős átfedés miatt spektrumbetegségként tekinthetünk. Összességében tehát elmondható, hogy a leukodystrophiák és cHSP sok esetben átfedő klinikai megjelenéssel bírnak, így a panel-, illetve exomvizsgálatok jelentős segítséget jelentenek a diagnosztikában.

VI/4. Ritka variációk vizsgálata ALS-ben

Az ALS kohortban 50%-ban (7/14 proband) azonosítottunk ritka, proteinszerkezetet feltehetően módosító variációt neurodegenerációval járó betegségekhez köthető génekben. Négy esetben (28,5%) több génben volt jelen ritka variáció egyazon betegben. Az érintett

géneket a **15. Ábrán** összegzem. Ritka variációkat azonosítottunk familiáris ALS-hez kötött génekben, a klasszikus HSP génekben, valamint a HSP differenciál diagnosztikájában felmerülő, nukleáris mitochondriális génekben egyránt (*POLG*, *SLC25A15*, *SLC25A22*). A HSP gének egyik tagja (*SPG7*), mint nukleáris mitochondriális gén is definiálható.



15. Ábra: Az ALS kohortban azonosított ritka variációkat hordozó gének

Az ábra azon géneket mutatja, amelyekben ritka, feltehetően proteinszerkezetet módosító variációkat azonosítottunk. Az ábra a STRINGv10-el készült (<http://string-db.org/>) [155]. Az összekötő vonalak vastagsága az evidencia erősségét jelzi.

A hereditaer spasticus paraparesis panelen 9 familiáris ALS-hez köthető gén volt reprezentálva. Ezen gének közül, a vizsgált 14 ALS beteg vizsgálatával, két esetben azonosítottunk ritka, feltehetően proteinszerkezeti változást okozó variációt. Az egyik esetben heterozigóta variációt azonosítottunk az *ALS2* génben, míg a másik esetben heterozigóta variációt detektáltunk a *SETX* génben. Mind a *SETX*, mind az *ALS2* gén variációihoz kötött amyotrophias lateral sclerosis autoszomális recesszíven öröklődik, így a detektált variációk önmagukban nagy valószínűséggel nem felelősek a betegségért az adott betegben. Ezek alapján a vizsgált 14 ALS beteg esetében familiáris ALS formát nem azonosítottunk.

Hét beteg esetében, beleértve a két ALS gén variációt hordozó beteget is, egy vagy több heterozigóta státuszú ritka variációt azonosítottunk korábban elsősorban HSP-hez asszociált génekben, vagy nukleárisan kódolt mitochondriális génekben. Két esetben egy-egy gén variációját találtuk, míg öt esetben kettő vagy több génben azonosítottunk ritka variációt egyazon betegben. Három betegben azonosítottunk ritka, *POLG* génben elhelyezkedő variációkat. Egy betegben compound heterozigóta variációt azonosítottunk, heterozigóta *PNPLA6* ritka variáns mellett. Egy betegben heterozigóta *POLG* variáció volt jelen *CYP7B1*, *KIAA0196*, *SETX* variációk mellett. További egy betegben compound heterozigóta, korábban pathogénként közölt variációk voltak jelen a *POLG* génben. Összességében tehát az ALS betegekben végzett panel vizsgálat eredményei heterogének, a talált eltérések az ALS oligogénes modelljébe illeszthetők be.

VI/4.1. Az ALS oligogénes modellje

Az elmúlt években több olyan exom- illetve panelvizsgálat eredményét közölték, amelyek arra utalnak, hogy a ritka variációknak fontos szerepe van mind a familiáris mind a sporadikus amyotrophias lateral sclerosisban, és számos esetben egyazon betegben több génben elhelyezkedő ritka variációk is azonosíthatóak. Steinberg és mtsi. vizsgálatában [156] 44 ALS triónál végeztek exom szekvenálást. Ritka potenciálisan deletáns compound heterozigóta variációt 27%-ban, homozigóta recesszív variánst 14%-ban, kódoló de novo variánst 27%-ban azonosítottak. A betegek 20%-ában a fenti eltérésekből egynél több volt egyazon betegben. Négy betegnél volt jelen familiáris ALS-hez köthető variáció. A talált eltérések a transzkripció reguláció, sejtciklus útvonalon mutattak feldúsulást, saját eredményeinkkel nem fednek át. Cady és mtsi. vizsgálatában [157] 391 ALS beteget szekvenáltak 17 ismert ALS génre. A familiáris esetek 64,3%-ban, a sporadikus esetek 27,8%-ában azonosítottak ritka, deletáns variációt. Az esetek 3,8%-ában több mint egy pathogén variáns volt jelen, és ezekben a betegekben a betegségkezdet 10 évvel korábbi volt, mint az egy pathogén variánst hordozó betegekben. Kenna és mtsi. vizsgálatában [158] 444 ír nemzetiségű ALS beteget vizsgáltak, 33 ALS-hez köthető génre. A familiáris esetek 38%-ában, míg a sporadikus esetek 14,5%-ában azonosítottak pathogén variánst. A

beteg 1,6%-ánál több mint egy patogén variáns volt jelen. Egy német vizsgálatban [159] 80 ALS betegnél végeztek panel vizsgálatot. A panel 39 ALS-hez kötött génen kívül lefedett 238 további gént, amelyeket különböző neurodegeneratív betegségekkel asszociálnak. A betegek 60%-ában azonosítottak ritka, deletáns variációt, 18,8%-ban több mint egyet. Tizenkét beteg (15%) esetében más neurodegeneratív betegséghez köthető génekben volt eltérés. Ezek közül kiemelendő, hogy 4 betegben heterozigóta variáns volt jelen az *SPG7* génben. Saját vizsgálatunkban egy betegben volt jelen heterozigóta *SPG7* variáns, amelyeket a közelmúltban primer lateral sclerosis is összefüggésbe hoztak [160]. A fenti vizsgálatok találati aránya, illetve az oligogénes eltérések előfordulása tehát összhangban van saját vizsgálatunkkal. Ugyanakkor saját vizsgálatunkban nem azonosítottunk familiáris ALS-hez kötött génben ritka variációt, amelyet az alacsony mintaszám magyarázhat. A más vizsgálat (dr. Nemes Csilla saját közlése) részét képező *C9ORF72* repeat expanzio vizsgálata egy betegben azonosított emelkedett repeat számot. Ebben az esetben ritka variációt nem azonosítottunk a panelen szereplő génekben, bár kiemelendő, hogy a fenti vizsgálatokban is jelentős arányban a *C9ORF72* repeat expanzio mellett voltak jelen a detektált ritka variánsok [157–159].

VI/4.2. *BSCL2* variáció azonosítása ALS-ben

Egy ALS-betegben (ALS-P4) heterozigóta, bizonytalan szignifikanciájú *BSCL2* variációt (p.L427) detektáltunk. A *BSCL2* gén variációi a seipinopathiak heterogén fenotípusához köthetőek, amelynek megjelenési formái hereditaer spasticus paraparesis (Silver syndroma), Charcot-Marie-Tooth betegség, kongenitális generalizált lipodystrophia 2-es típusa, hereditaer motoros neuropathia V-ös típusa [107]. A Silver syndroma esetében komplex, a felső és alsó végtagi distalis izomzat atrophiajával járó spasticus paresis alakul ki, amely autoszomális domináns módon öröklődik. A talált eltérés kiemelendő, mivel egy 2017-ben kiadott közlemény szerint a *BSCL2* mutációk egyes esetekben ALS-t és multifokális motoros neuropathiát utánzó fenotípussal jelentkezhetnek [99], és sporadikusan is megjelenhetnek. Betegünknel az édesanya érintettsége alapján (focalis, stagnáló izomsorvadás), autoszomális domináns vagy maternális öröklésment elképzelhető, illetve a gyors lefolyású ALS-szerű megjelenés, családon belül változó penetrancia a Musacchio és mtsi. által leírt fenotípussal összeegyeztethető. A betegünknel

észlelt bulbaris érintettség ugyanakkor az eddig közölt esetekben nem szerepelt. A variáció pathogenitásának megítélésére tehát további funkcionális, valamint szegregációs vizsgálatok volnának indokoltak, tekintettel a variáció bizonytalan megítélésére.

VI/4.3. Nukleárisan kódolt mitochondriális génekben azonosított ritka variációk lehetséges szerepe ALS-ben

Ismert, hogy az amyotrophias lateral sclerosis pathogenezisében mitochondriális diszfunkció is szerepet játszik. A mitochondriális eltérések megjelennek strukturálisan is (mitochondriális morfológia, fúzió/fisszió zavara), illetve érintik az oxidatív foszforiláció folyamatát is - fokozott ROS képződéssel -, valamint a kalcium homeosztázist [161]. Nem ismert azonban, hogy a fenti észlelt eltérések primer vagy szekunder módon jelentkeznek. Mitochondriális betegségek esetében tisztán motoneuron érintettséggel járó fenotípus eddig nem került leírásra, bár ritka motoneuron patológiával is járó eltérések szerepelnek az irodalomban [162]. A közelmúltban leírt *CHCHD10* gén mutáció okozta amyotrophias lateral sclerosis ugyanakkor közvetlen kapcsolatra utal, tehát egyes esetekben feltételezhető, hogy primer mitochondriális eltérés lehet a betegség oka [163]. A *CHCHD10* gén egy nukleárisan kódolt mitochondriális membrán protein, amelynek pontos funkciója még nem ismert. Bannwarth és mtsi. közleményében egy francia család vizsgálata során azonosították a *CHCHD10* gén pathogén variációját. A fenotípus családon belül változatos volt, motoneuron betegség tünetei bulbaris érintettséggel, ataxia, kognitív hanyatlás, ptosis jelentkezett különböző módon az érintett családtagokban. Közös jellemzőként, az izombiopsiás mintában típusos mitochondriális myopathia jelei voltak láthatóak, COX negatív rostokkal, ragged red rostokkal. A mitochondriális genomban multiplex deletiók igazolódtak, tehát a gén mutációja mitochondriális DNS instabilitással is jár. Emellett korábban más intergenomialis mitochondriális gének pathogén variációját [164], illetve általánosságban multiplex deletiók jelenlétét [165], is összefüggésbe hozták motoneuron betegségekkel.

Saját ALS kohortunkban három esetben azonosítottunk ritka *POLG* gén variációt. Két betegben compound heterozigóta eltérés volt jelen, míg egy betegben simplex heterozigóta variációt azonosítottunk. Az azonosított öt variáció közül négy ismert, feltételezetten

pathogén, PEO-val asszociált eltérés. Két betegben a *POLG* gén variációi mellett további ritka variációkat is azonosítottunk. Az egyik betegben (ALS-P3) heterozigóta *PNPLA6* variáció volt jelen a *POLG* gén compound heterozigóta variáció mellett, míg a másik betegben (ALS-P9) a heterozigóta simplex *POLG* variáció mellett heterozigóta *CYP7B1*, *KIAA0196*, *SETX* ritka variációt azonosítottunk. A harmadik betegben (ALS-P13) a compound heterozigóta *POLG* variációk mellett nem azonosítottunk más génben ritka, deletáns variációt. A detektált variációk jelentősége kérdéses. A *POLG* gén egy nukleárisan kódolt fehérje, a polimeráz γ , amely fontos szerepet tölt be a mitochondriális DNS replikációjában. A *POLG* gén pathogén variáció változatos klinikai képpel jelentkezhetnek, úgy mint (1) myocerebrohepatopathia spektrum (MCHS), (2) Alpers-Huttenlocher syndroma (AHS), (3) myoclonusos epilepsia myopathia sensoros ataxia (MEMSA), (4) ataxia neuropathia spektrum, (5) progresszív külső szemizom bénulás (PEO) [166]. A saját kohortunkban vizsgált betegek fenotípusa mitochondriális betegségekre nem utalt, ptosis, ataxia nem került leírásra, izombiopsziás minta nem érhető el a betegektől. A *POLG* gén pathogén variációja által okozott tiszta motoneuron megbetegedés eddig nem került leírásra. Ugyanakkor más intergenomialis mitochondriális gének pathogén variációja ismertén okozhat komplex motoneuron betegséget, illetve a multiplex deletiok előfordulását is leírták a betegségben, így további vizsgálatok (szegregációs vizsgálat, izombiopszia) indokoltak a pathogenitás tisztázására.

A *POLG* variáció mellett heterozigóta variációt azonosítottunk az *SLC25A15* és *SLC25A22* génekben, amelyek mitochondriális carrier fehérjéket kódolnak (ornitin, illetve glutamát carrier) [167]. Az *SLC25A15* gén pathogén variációi, autoszomális recesszív öröklésmentel, a HHH (hyperornithinemia hyperammonaemia homocitrullinuria) szindrómával asszociáltak, azonban felnőttkori kezdetű metabolikus betegséggént spasticus paraparesis formájában is jelentkezhetnek [19]. Az *SLC25A22* gén pathogén variációi neonatalis myoclonusos epilepsiával társulnak, motoneuron betegség különböző formáival eddig nem társították.

A nukleárisan kódolt mitochondriális gének közt szükséges megemlíteni az *SPG7* gént is. Az elmúlt években derült arra fény, hogy az *SPG7* pathogén variációi PEO-val illetve

ptosissal komplikált spasticus ataxiával társulhatnak, amelyet multiplex deletiok felhalmozódása, a mitochondriális biogenesis fokozódása és mitochondriális hyperfusio kísér [136]. A tüneteket dysphagia és proximalis myopathia is gyakran kíséri. Későbbi vizsgálatok alapján, a jelenleg ismert leggyakrabban érintett nukleáris gén mitochondriális betegség hátterében az *SPG7* [168]. Más nukleáris mitochondriális génekhez hasonlóan, az *SPG7* variációi mind autoszomális domináns, mind autoszomális recesszív módon okozhatnak betegséget [9]. 2016-ban Yang és mtsi. familiáris PLS hátterében azonosítottak compound heterozigóta *SPG7* variációt [169], míg Krüger és mtsi. egy német ALS kohortban azonosítottak heterozigóta variánsokat a génben [159]. Saját vizsgálatunkban HSP-vel asszociáltan hat probandnál detektáltunk *SPG7* variánsokat, míg ALS-ben egy probandnál.

VI/5. Az *MSTO1* gén azonosítása komplex mitochondriális betegség hátterében

Az *MSTO1* génnel korábban emberi betegséget nem társítottak, így a talált p.Val8Met variáns az ACMG kritériumai alapján bizonytalan szignifikanciájú génben („gene of uncertain significance”) helyezkedik el. A fehérje funkciójáról kevés irodalmi adat áll rendelkezésre. *D. melanogaster* és *S. cerevisiae* modellekben a Misato gén null mutációi irregularis kromoszómális szegregációt eredményeztek [170–172]. HeLa sejtekben az *MSTO1* siRNS-el történő deplécióna a mitokondriumok fragmentálódásához és sejtpusztuláshoz vezetett, míg az EGFP-Misato overexpresszió a perinukleáris régióban a mitokondriumok aggregációját eredményezte [173]. A fentiek alapján a talált eltérés a családban előforduló multiszisztémás tüneteket magyarázhatja. A feltételezett pathogén eltérés és az *MSTO1* szerepének vizsgálatára a Thomas Jefferson Egyetem Mitocare Centrumával közös kollaboráció keretében, lehetőségünk nyílt, amelynek eredményeként feltételezésünk beigazolódott.

A család két érintett tagjától (II/1, I/2) származó, valamint egészséges kontroll primer fibroblast sejteken, valamint *MSTO1* siRNS-el való géncsendesítést követően HeLa sejteken további vizsgálatok történtek [37]. Az elvégzett in vitro vizsgálatok igazolták, hogy (1) a betegek fibroblast sejtjeiben az *MSTO1* mRNS és protein szint szignifikánsan csökkent; (2) az *MSTO1* variációt hordozó fibroblastokban a fragmentált és perinukleárisan

aggregált mitochondriumok aránya nagyobb; (3) az észlelt mitochondriális dinamika változása, a fúziós aktivitás csökkenése, független a mitochondriális fúzió-fisszió irányításában kulcsszereppel bíró proteinek (MFN1, MFN2, OPA1 és DRP1) expressziójának változásától. A mitochondriális dinamikában tapasztalt változások az *MSTO1* beteg fibroblastokban tranziens mtDsRed-T2A-MSTO1 plazmid transzfekcióit követően szignifikánsan javultak, megközelítve a kontroll fibroblastoknál tapasztalt értékeket. A mitochondriális dinamikában tapasztalt változásokat HeLa sejteken *MSTO1* siRNS géncsendesítést követően is tudtuk igazolni. *MSTO1* depléciónak hatására HeLa sejteken a mitochondriális membránpotenciál, respiráció, és Ca^{2+} akkumuláció szignifikáns változást nem eredményezett, amely alapján a mitochondriális fúzió csökkenése nem egy bioenergetikai változás másodlagos következménye. Az *MSTO1*, annak ellenére hogy a protein mitochondriális külső membránban való lokalizációját írták le [173], az általunk végzett kísérletek során mind a primer fibroblast, mind az endogén és a plazmid bevitt követő overexpresszált HeLa sejteken, a cytoplasmában diffúz eloszlást mutatott. Az *MSTO1* lokalizációjának tisztázására külső mitochondrium membrán targetált GFP (OMP25-GFP) és *MSTO1*-cMyc plazmidokkal történő kotranszfekciót követően, intakt és permeabilizált sejteken vizsgáltuk az *MSTO1* mitochondriumokkal való asszociációját. Az intakt sejteken, mind az *MSTO1*, mind a tag specifikus cMyc protein főként cytoplasmikus lokalizációt eredményezett, a két vektor kolokalizációja ~30% volt, míg a permeabilizált sejteken ez 50%-nak bizonyult. Ezt az értéket megerősíti, hogy HeLa sejteken az *MSTO1* Western blot vizsgálattal, az intakt sejtekhez viszonyítva az izolált mitochondriumokban a fehérje ~35%-ban van jelen. Plazma membrán permeabilizációt követően az *MSTO1* protein gyorsan és szinte teljesen a cytoplasmába áramlik. Összehasonlítva más ismert lokalizációjú proteinekkel, a hexokináz II, amely ismertén a mitochondriális külső membránhoz gyengén asszociált protein [174], az *MSTO1*-hez viszonyítva időben lassabban és kevésbé áramlott ki a cytoplasmikus frakcióba. Az ismert cytoplasmikus protein, az α -tubulin és az *MSTO1* hasonló mintázatot mutatott, mind HeLa, mind primer fibroblast sejteken. Végül, a permeabilizált sejteket tripszinnel limitált proteolízisnek tettük ki, amely során az *MSTO1*, hasonlóan a hexokináz II-höz és az α -tubulinhoz, mind a cytoplasma, mind a membrán frakcióból eltűnt, amely szintén azt támasztja alá, hogy az

MSTO1 a mitochondriumon kívül lokalizálódik és gyengén kötődhet a mitochondriális külső membránhoz. A fentiek alapján feltételezzük, hogy az MSTO1 fehérje főként solubilis formában a cytoplasmában lokalizálódik, részlegesen kötődik a mitochondriális külső membránhoz, amely alapján a mitochondriális szabályozásban játszhat szerepet.

A komplex mitochondriális fenotípussal jelentkező család esetében feltételeztük, hogy a klinikai tünetekért, a vérből izolált DNS szekvenálásával (teljes exom és Sanger szekvenálás) azonosított *MSTO1* gén p.Val8Met heterozigóta variációja felelős. A cDNS szekvenálás megerősítette a heterozigóta p.Val8Met variációt, míg a genomi DNS vizsgálatával az exoni deletiókat, duplicációkat kizártuk. Ennek alapján a vizsgált betegek egy károsodott, és egy normál *MSTO1* alléllal rendelkeznek, amely az MSTO1 mRNS és protein részleges hiányához vezet. Bár a szűrési kritériumaink alapján más patogén variáció nem szegregált a családban, azonban nem zárható ki teljes bizonyossággal, hogy az MSTO1 részleges hiánya további faktorokkal párosulva okozza a klinikai képet. Párhuzamosan vizsgálatunkkal egy olasz munkacsoport is közölt további két esetet, ahol az észlelt fenotípus háttérében az *MSTO1* recesszív variációi álltak [175]. A Nasca és mtsi. által közölt fenotípus részben átfedő volt az általunk közölt fenotípussal, és a funkcionális vizsgálatok a fehérje mitochondriális fúzióban betöltött szerepét is megerősítették. Az olasz munkacsoport által közölt esetekben a multiszisztémás érintettség mellett a fő prezentációs tünet myopathia és cerebellaris ataxia volt. Az általunk leírt családban az enyhe distalis myopathia és ataxia mellett tanulási zavarok, illetve pszichiátriai zavarok voltak jelen, amelyeket Nasca és mtsi. által leírt betegekben nem figyeltek meg. Ezek alapján tehát az *MSTO1* asszociált betegségek esetében mind autoszomális domináns, mind autoszomális recesszív öröklésment elképzelhető. Megjegyzendő, hogy számos nukleáris mitochondriális génhez (*POLG1*, *RRM2B*, *OPA1*, *MFN2*) társított betegség esetében mind autoszomális domináns, mind autoszomális recesszív öröklődést leírtak. A korábbi megfigyelések alapján az autoszomális recesszív formák általában súlyosabb, korai kezdetű fenotípussal járnak, míg az autoszomális domináns formák enyhébb, felnőttkori kezdetű manifesztációval társulnak [176]. A funkcióvesztéssel járó mutációk általában alacsonyabb protein expresszióval járnak, de a

gén mono- vagy biallelikus tulajdonságától függően fennmaradó proteinszint különböző lehet. Az *OPAI* esetében például, az autoszomális domináns variációk csökkent *OPAI* expresszióval járnak [177], míg a recesszív formák esetében csaknem hiányzó protein expressziót találtak [178].

VI/6. Exom- és panelszekvenálási vizsgálatok klinikai alkalmazása

Az új generációs szekvenálási eljárások alkalmazása egyre inkább elterjed a klinikai neurogenetikában is. Elsősorban az NGS alapú panel vizsgálatok és a teljes exom vizsgálatok kerültek alkalmazásra a klinikumban, míg a teljes genom vizsgálatok egyelőre kísérleti fázisban vannak. Az NGS alapú diagnosztika sikerrátája mára meghaladja a hagyományos Sanger szekvenálását, és költséghatékonyabbnak is bizonyult [179]. A diagnosztikus siker ráta klinikai exomszekvenálás esetében átlagosan 20-30% [180], amelyhez hasonló eredményt mutatott saját HSP panel vizsgálatunk is [181]. A Sanger szekvenálás klinikai ára, a vizsgált gének számától függően 1,000-30,000\$ között változhat, míg az exom szekvenálás ára \$5000 körül mozog [179]. A diagnosztikus sikerrátát több tényező is befolyásolhatja. A jól karakterizálható, korai kezdetű, recesszív betegségek esetén magasabb a sikerráta [180]. Egyes tünetek esetén, pl. ataxia esetében, alacsonyabb a diagnosztikus ráta [180], míg a szemészeti genetikai betegségekben általában magasabb [182]. Ennek egyik oka az lehet, hogy a szemészeti genetikai betegségek molekuláris háttere jobban ismert. További tényező lehet, hogy az NGS technológia rutin alkalmazásban a repeat expansziók diagnosztizálására kevésbé alkalmas. A trio exom vizsgálatok esetében is magasabb a molekuláris diagnosztikai ráta, mint ha csak a probandnál történik WES [182,183]. A targetált megközelítés (NGS panelvizsgálat) előnye, hogy a vizsgált gének lefedettsége uniformabb és könnyebben lehet biztosítani a megfelelő leolvasási mélységet. Ezzel szemben a teljes exom szekvenálás során nehezebb megfelelő lefedettséget elérni, az egyes vizsgálatokban átlagosan az exom 10%-a nincs megfelelően lefedve [184]. Emiatt a targetált megközelítések esetében a fals negatív vizsgálat előfordulása ritkább. Emellett az elemzési lépések panelvizsgálat esetében kevesebb időt vesznek igénybe. Van Egmond és mtsi. vizsgálatában egy dystonia génpanel hatékonyságát vizsgálták kontroll csoporttal szemben [185]. A kontroll csoport esetében Sanger szekvenálásra választottak ki géneket. Ehhez a betegek klinikai paramétereit figyelembe

véve, a független szakértők által meghatározott, diagnosztikus algoritmust követték. A génpanel alapú vizsgálat esetében a költségek alacsonyabbak voltak (1822€/eset vs. 2660€/eset), valamint a panel időhatékonyabbnak is bizonyult (átlagosan 28 vs. 102 nap). Az exom szekvenálás esetében számolnunk kell az összetettebb adatelemzéssel, valamint az incidentális találatokkal. Exom szekvenálást a fenti problémák miatt ezért akkor érdemes indítani, ha a klinikai kép összetett, nem áll rendelkezésre megfelelő panel, vagy az elvégzett panel vizsgálat negatív eredményű. Az irodalmi adatok alapján a panelvizsgálatok diagnosztikus rátája a WES vizsgálatokéhoz hasonló [184]. Az exom szekvenálási vizsgálatok esetében előnyt jelent a fenokópiák felismerésének lehetősége. Azt is számításba kell vennünk, hogy a neurogenetika jelen fejlődési üteme mellett az egyes fenotípusokra megalkotott panelvizsgálatok hamar elavulhatnak, míg az exom adatok későbbiekben is újra elemezhetőek. Az exom szekvenálási vizsgálatok esetében megnövekszik a VUS találatok száma, azonban ez lehetőséget teremt új gén-betegség összefüggések felismerésére is. Egy 1000 exom szekvenálás eredményét értékelő vizsgálat alapján, ha a kandidáns gének pathogenitása bebizonyosodna az exom szekvenálás diagnosztikus rátája 83% lenne [186], azaz az exom szekvenálás esetében a negatív eredmény elsősorban interpretációs küszöb miatt lép fel. Az exom szekvenálási vizsgálatok vezettek el arra felismerésre is, hogy több neurodegeneratív betegség genetikai háttere részben közös lehet [20]. Összefoglalva tehát a különböző vizsgálatok megállapításait, illetve az ajánlásokat [179,180,184]: Sanger szekvenálás továbbra is ajánlható egyes esetekben, ahol a fenotípus-genotípus kapcsolata szoros, és az egy-gén vizsgálat diagnosztikus sikerrátája magas. Egyes jól karakterizálható esetekben targetált megközelítéseket érdemes választani, míg nem specifikus neurogenetikai betegségekben elsőként választható a teljes exom szekvenálás is. Teljes exom szekvenálás esetében az új találatok esetében fellépő interpretációs nehézségek áthidalására javasolt az adatok szoftveresen támogatott megosztása. Erre különböző platformok állnak rendelkezésre úgy, mint a Matchmaker Exchange [187] vagy a GENESIS applikáció [188].

VI/7. Exom és panel szekvenálási vizsgálatok leletezése

Az új generációs szekvenálás metodikai és interpretációs komplexitása miatt az NGS vizsgálatok leletezése is összetett. Egyrészt tartalmaznia kell a vizsgálatmal kapcsolatban

felmerülő bizonytalanságokat, ugyanakkor kellően rövidnek, és a leletet kézhez kapó személy, vagy klinikus számára is értelmezhetőnek kell lennie. Az ACMG ajánlása szerint [189], a klinikai leletnek minimálisan tartalmaznia kell: 1.) A variánsok listáját HGVS nomenklatúra szerint, és klinikailag klasszifikálva az ACMG ajánlásai szerint. 2.) A pozíció leírásakor a transzkript variáns azonosítóját. 3.) Szöveges összefoglalásként a fő találatok leírását, összefoglalásként a klinikai teszt eredményét (pozitív, negatív, inkonkluzív). 4.) A variánsok klasszifikációjának szempontjait. 5.) Targetált vizsgálat esetén a vizsgált gének leírását. 6.) A lefedettségi mutatókat. 7.) Negatív teszteredmény esetén az empirikus vagy prediktált diagnosztikus sikerrátát. 8.) A vizsgálat limitáló tényezőit (pl. CNV detektálás hiánya.). 9.) Exom- vagy genomszekvenálás esetén a variánszűrési algoritmust. Saját gyakorlatunkban a fentiek mellett, a folyamatosan fejlődő bioinformatikai háttér miatt, fontosnak tartottuk az alkalmazott szoftverek (verziószámmal) és adatbázisok leírását, illetve a frekvenciaadatok, és predikciós szoftverek eredményének megadását.

VI/8. A nagy áteresztő képességű genetikai vizsgálatok és a közvetlenül a felhasználó által indikált genetikai vizsgálatok iránt mutatott attitűd Magyarországon

VI/8.1. A genetikai vizsgálatok iránt mutatott attitűd egészséges személyek esetében
 Számos motivációs tényező merülhet fel nagy áteresztő képességű genetikai vizsgálat végzésére egészséges személyekben is [190]. Az egészségi állapottal összefüggő motivációk lehetnek például a korai beavatkozás, megelőzés, monitorozás lehetősége [191], míg adoptált személyek esetében a genetikai vizsgálat a hiányzó családi anamnesztikus adatokat pótolhatja [192]. Nem az egészségi állapottal összefüggő motiváció eredhet kíváncsiságból, a származás iránti érdeklődésből, vagy kutatási projektben történő részvételből [190].

Válaszadóink egészséges személyben történő genetikai vizsgálata iránt mutatott attitűdje kevert volt. Az egészségi állapottal összefüggő vizsgálatok iránt nagyobb érdeklődést mutattak, különösen, ha az orvossal történő konzultáció lehetősége adott volt. A válaszadók 73,5% kérne genetikai vizsgálatot egészségesen súlyos betegséget okozó géneltérések

szűrésére, és 65,3%-uk kérne genetikai vizsgálatot gyakori rizikótényezőt jelentő génelterések szűrésére orvosi konzultáció mellett. Orvosi konzultáció nélkül a válaszadók 47,6 illetve 46,9%-a kérné ezeket a vizsgálatokat. A származási információkat nyújtó genetikai vizsgálatok, illetve az úgynevezett rekreációs jellegű genetikai vizsgálatok (úgy, mint szemszín meghatározása, atletikus képességek vizsgálata) iránt mutatott érdeklődés általánosságban alacsonyabb volt, függetlenül attól, hogy orvosi konzultáció lehetősége adott-e. A válaszadók 36,8% illetve 36,5%-a kérne származási információkat nyújtó genetikai vizsgálatot, 22,4-22,4%-a kérne genetikai vizsgálatot egyes testi jellegek meghatározására orvosi konzultáció mellett, illetve a nélkül. Baptista és munkatársai által az USA-ban végzett vizsgálat ezzel szemben magasabb érdeklődést mutatott a származási genetikai vizsgálatok iránt [192]. Baptista és mtsi. vizsgálatában 80 adoptált és 1527 nem adoptált egyén vett részt. A nem adoptált egyének 73%-a, míg az adoptált egyének 83% „nagyon érdeklődött” származási információk iránt. Bár ennek hátterét nem ismerjük, feltételezni lehet, hogy a különbség oka a jelentős bevándorlás miatt, az USA lakosságának diverz összetétele.

Szintén kevert attitűdöt észleltünk abban a hipotetikus esetben, ha az egészséges személy családjában genetikai betegség fordulna elő. A válaszadók 51,9%-a minden esetben szeretne genetikai vizsgálatot annak kiderítésére, hogy hordozza-e az adott genetikai eltérést, míg 9%-uk csak akkor, ha az adott betegség gyógyítható, és 15,5%-uk csak akkor, ha gyermekvállalás előtt állna. Egy további pontban arra kérdeztünk rá, hogy a válaszadó kérné-e, hogy értesítsék, ha egy kutatási vizsgálatban évekkel később találnak valamilyen genetikai eltérést. Csupán 4,9%-uk nem kérne értesítést, míg 61,9% minden esetben, 18,1% azokban az esetekben, ha van beavatkozási lehetőség. A fenti különbségek összhangban vannak az irodalmi adatokkal, miszerint egy adott betegség súlyossága valamint kezelhetősége befolyásolja a vizsgálattal szemben mutatott attitűdöt [193], ugyanakkor a válaszadóink ettől függetlenül is nagy érdeklődést mutattak. Shahmirzadi és mtsi. [194] által exom szekvenáláson átesett egyének vizsgálatakor is hasonlóan magas érdeklődést találtak az incidentalis találatok közlése iránt.

A közvetlenül a fogyasztók által indikált (DTC) genetikai vizsgálatok fogalma az utóbbi években változásokon esett át. Míg korábban a genetikai vizsgálatok rendelésében és az eredmények átvételében az orvos teljes hiányát jelentette, addig ma inkább egy spektrumot jelent, amelyben az orvos különböző mértékben vehet részt [195]. Kérdőívünkben direkt módon is rákérdeztünk a DTC genetikai vizsgálatok iránti érdeklődésre, emellett egyes kérdések indirekt módon kapcsolódtak ahhoz. Válaszadóink 44,7%-a elfogadhatónak tartotta genetikai vizsgálatok kereskedelmi forgalomban történő megvételének lehetőségét, és 48,9%-uk válaszolt úgy, hogy ilyet igénybe is venne. Az USA-ban végzett korábbi vizsgálatok hasonlóan magas érdeklődést mutattak [196]. Európában kevés olyan vizsgálat történt, amely direkt összehasonlításra adna. Saját vizsgálatunk alapján feltételezhetjük, hogy a DTC genetikai vizsgálatok iránti érdeklődés ebben az esetben is elsősorban egészségi állapottal függ össze.

VI/8.2. A genetikai vizsgálatok iránt mutatott attitűdöt befolyásoló tényezők

A kétváltozós elemzések alapján a nem, valamint a foglalkozás, míg a logisztikus regresszió alapján a nem és a kor volt a legjelentősebb befolyásoló faktor. Emellett az elemzések alapján a képzettségnek és vallásosságnak is lehet hatása. A férfi válaszadók az orvosi konzultáció lehetőségétől függetlenül nagyobb érdeklődést mutattak származási genetikai információk, egyes testi jellegek vizsgálata iránt, valamint teljes genomvizsgálat iránt; míg orvosi konzultáció lehetősége mellett a gyakori betegségek esélyét növelő rizikótényezők megismerése iránt is. Ugyanakkor kevesebb férfi, mint női válaszadónak volt magas genetikai meghatározottság pontszáma (11.4 vs. 21.9% $p=0.003$). Az egészségügyben dolgozók vagy tanulók általánosságban szkeptikusabbak voltak a genetikai vizsgálatokkal szemben. A legtöbb esetben szignifikánsan kisebb érdeklődést mutattak abban az esetben, ha az orvosi konzultáció lehetősége adott volt. Nagy valószínűséggel ez nem azzal van összefüggésben, hogy ezeket a vizsgálatokat ők orvosi konzultáció nélkül kérnék. Az orvosi konzultáció lehetősége mellett ebben a csoportban is megnövekedett az érdeklődés a vizsgálatok iránt, de nem olyan mértékben, mint a nem egészségügyi dolgozók esetében. Így a jelenségre valószínű magyarázattal az szolgálhat, hogy az orvosi konzultáció lehetősége a „laikus” válaszadókban jelentős mértékben megnöveli az érdeklődést. Az egészségügyi, azon belül genetikával foglalkozó válaszadók szkeptikusabb

hozzaállását Middleton és mtsi. vizsgálata is mutatta [193]. További vizsgálatok is azt az eredményt mutatták, hogy nagyobb genetikai tudás mellett a genetikai vizsgálatok észlelt haszna kisebb [197], amely a genetikai vizsgálatok hasznának realisabb megítélését tükrözheti.

Az életkor genetikai vizsgálatok iránt mutatott attitűdre gyakorolt hatása az irodalmi adatok alapján összetett. Általánosságban a fiatalabb egyének nagyobb érdeklődést mutatnak a genetikai vizsgálatok iránt [197], amely egyezik saját eredményeinkkel is. Ugyanakkor irodalmi adatok alapján az is ismert, hogy a magasabb életkor nagyobb tudatossággal társulhat [198], míg a fiatalabb életkorban gyakrabban merülhetnek fel aggodalmak a vizsgálattal kapcsolatban [199].

A genetikai meghatározottság pontszám szintén befolyással volt a vizsgálatokkal szemben mutatott attitűdre, amely leginkább azokban az esetekben volt észlelhető, ahol a vizsgálat orvosi haszna kérdéses. Azok a válaszadók, akiknek magas (≥ 30) genetikai meghatározottság pontszámuk volt, nagyobb érdeklődést mutattak a teljes genom vizsgálat, valamint a gyakori betegségeket befolyásoló genetikai variációk meghatározása iránt. Több női, mint férfi válaszadó rendelkezett magas genetikai meghatározottság pontszámmal (21.9 vs. 11.4% $p=0.003$), ugyanakkor több férfi, mint nő mutatott érdeklődést származási és rekreációs genetikai vizsgálatok, valamint teljes genomvizsgálat iránt. Erre lehetséges magyarázat, hogy általánosságban a nők szkeptikusabbak a bizonytalan orvosi hasznú genetikai vizsgálatokkal kapcsolatban, de a női válaszadók egy része, akiknek magas genetikai meghatározottság pontszáma van, nagyobb valószínűséggel kéri ezeket a vizsgálatokat. Összességében vizsgálatunk összhangban van az irodalommal. Az irodalmi adatok alapján a férfiak általánosságban nagyobb érdeklődést mutatnak a genetikai vizsgálatokkal szemben, ugyanakkor a nők nagyobb genetikai tudással rendelkezhetnek [197]. Szintén kiemelendő, hogy a magasabb önbevallás genetikai ismeret pontszámmal rendelkező válaszadóknak gyakrabban volt magas genetikai meghatározottság pontszámuk. Az egészségügyi dolgozóknak gyakrabban volt magas genetikai ismeret pontszámuk, ugyanakkor a válaszadók ezen csoportja szkeptikusabb volt a genetikai vizsgálatokkal szemben, amely arra mutat rá, hogy eltérően láthatják a genetikai vizsgálatok hasznát.

Az irodalomban elérhetőek különböző objektív és észlelt genetikai ismeretet, illetve genetikai ismeret önértékelését mérő skálák [80,83,200–202]. Ugyanakkor ezek a skálák heterogének, különböző célpopulációk vizsgálatára alkalmazták azokat, és magyar nyelven nincsen elérhető validált skála a genetikai tudás mérésére. Így saját vizsgálatunkban az önbevalláson alapuló genetikai ismeretet mértük, amely nem azonos a tudással, azonban lehetővé teszi annak becslését, hogy a kérdőívet kitöltő személy találkozott-e már korábban a kérdőívben felmerülő kérdésekkel. Az önbevallós genetikai ismeret pontszám nagyobb volt a magasabb iskolai végzettséggel rendelkezőkben, hasonlóan a genetikai ismeretet, illetve műveltséget mérő, irodalomban elérhető kérdőívekhez [80,82,83]. Emellett saját vizsgálatunkban az egészségügyi dolgozók szintén magasabb önbevallós genetikai ismeret pontszámmal rendelkeztek. Az irodalmi adatok alapján a nagyobb genetikai tudás nagyobb érdeklődéssel társulhat, ugyanakkor több kritikával is asszociálhat [83]. Szükséges kiemelni ugyanakkor, hogy a téma ismerőssége, nem jelent feltétlenül magasabb objektív tudást [82]. Az észlelt tudás a tényleges genetikai vizsgálat hatására változhat is, ahogy azt Carere és mtsi. [80] vizsgálata mutatta, amelyben a DTC genetikai vizsgálatot követően az észlelt genetikai tudás csökkent.

A kérdőíves vizsgálatunk egyik korlátját az jelenti, hogy a válaszadók többségében magasan képzett, budapesti lakosok voltak, amely nem reprezentálja a magyar lakosság egészét. Emellett a válaszadók jelentős része személyesen is érintett, mivel ő maga vagy hozzátartozója genetikai betegséggel él, vagy érdeklődést mutat a téma iránt. Ugyanakkor az irodalmi adatok alapján a genetikai hajlamot vizsgáló tesztek iránt elsősorban magasan edukált személyek [203], illetve magas genetikai tudással rendelkező személyek [80] érdeklődnek. Az is valószínűsíthető, hogy a genetika iránt érdeklődő személyek, vagy olyan egyének, akiknek a családjában genetikai betegség előfordul, nagyobb valószínűséggel vesznek igénybe ilyen vizsgálatot [204]. Az egészségügyben dolgozó válaszadók nagyobb arányú reprezentáltsága lehetővé tette az egészségügyi és nem egészségügyi válaszadók nézőpontjának összehasonlítását. A válaszadási arányt nem tudtuk mérni, mivel nincs arról információnk, hogy a szociális médián keresztül hány személyhez jutott el a kérdőívünk.

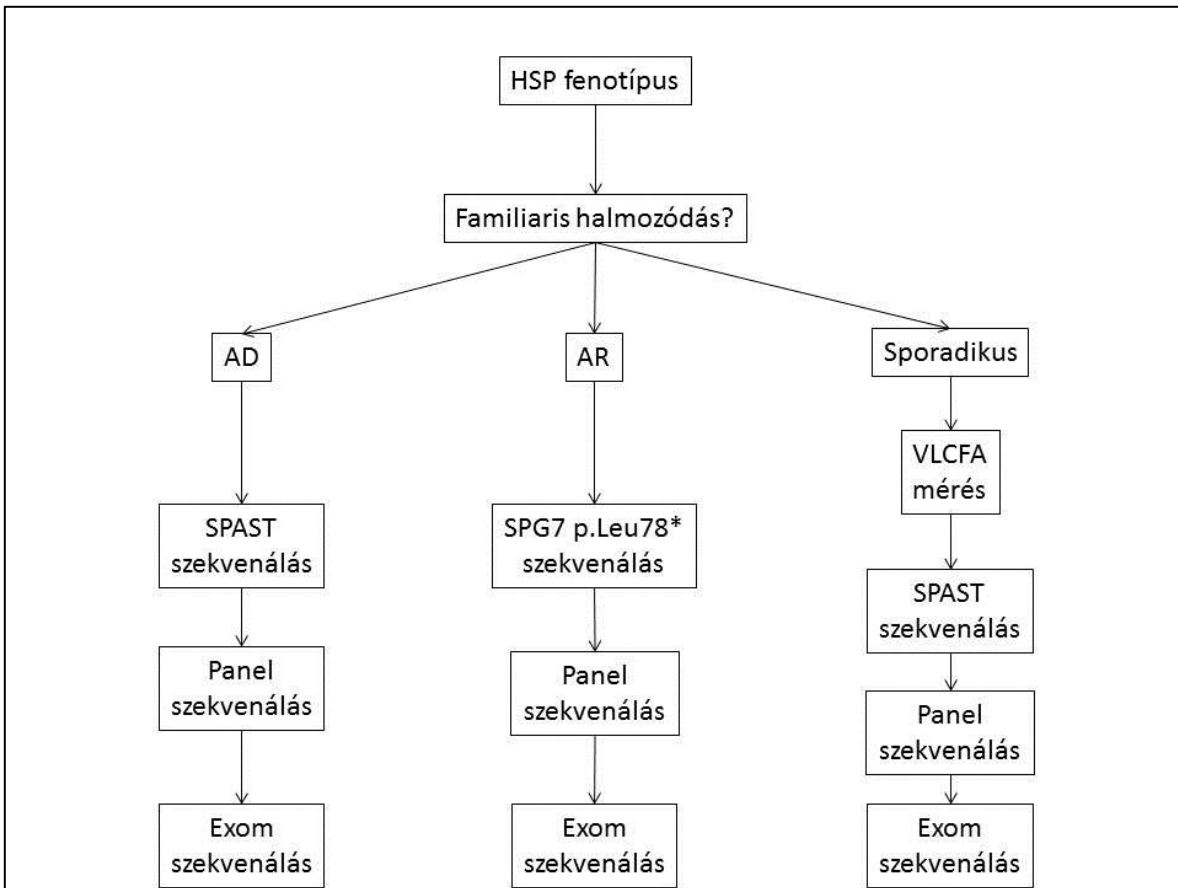
Az objektív genetikai tudást nem mértük ebben a vizsgálatban, így nem volt arra lehetőségünk, hogy ezt összehasonlítsuk az önbevallásos genetikai ismeret pontszámmal.

VII. KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálataink során az alábbi új információkat állapítottuk meg:

1.) A magyar populációban elsőként vizsgáltuk a panel- és exomszekvenálás hatékonyságát a spasticitas-ataxia spektrum betegségek diagnosztikájában. Megállapítottuk, hogy az NGS panelvizsgálat hatékony, és a nemzetközi vizsgálatok diagnosztikus rátájához (~30%) hasonló eredménnyel alkalmazható. Az exom szekvenálás Magyarországon dedikált esetekben javasolt, ha a panelvizsgálat negatív, vagy a fenotípus összetett.

2.) Magyarországon elsőként végeztünk komprehenzív genetikai vizsgálatot HSP-ben. A teljes HSP kohort 26,3%-ában igazoltuk a betegség molekuláris hátterét. Megállapítottuk, hogy Magyarországon leggyakoribbak a *SPAST* gén eltérései voltak, amelyet az *SPG7*, *SPG11*, valamint az *ATL1* és *NIPA1* gének pathogén variációi követtek. 11 probandnál az irodalomban eddig nem ismert pathogén vagy valószínűleg pathogén variációt detektáltunk. Négy esetben az eredetileg HSP kohortba sorolt betegeknél fenokópiát igazoltunk. Vizsgálataink alapján a magyar HSP betegek esetében az alábbi diagnosztikus algoritmust javasoljuk (**16. Ábra**).



16. Ábra: Javaslat a magyar HSP betegek molekuláris diagnosztikájára

3.) Vizsgálataink során az irodalomban elérhető genotípus-fenotípus összefüggéseket bővítettük a spasticitas-ataxia spektrumbetegségeken. Jelentős intra- és interfamiliáris variabilitást észleltünk a *SPAST* variációkhoz társuló klinikai tünetekben, egyes variációk cHSP-vel társultak. További támogató adat keletkezett arra vonatkozóan, hogy a *SPAST* gén p.Ser44Leu, illetve az *SPG7* p.Ala510Val variációja modifikáló hatással bírhat. Az *SPG7* p.Leu78*, valamint p.Gly344Asp variációja esetében autoszomális domináns öröklődés lehetőségét vetettük fel. Az *SPG11* esetében leírtuk, hogy egyes variációk mellett cerebellaris tremor lehet a prezentációs tünet. A leukodystrophiák és a cHSP között fenotípusos átfedést észleltünk az *ABCD1*, *GALC*, *FA2H* gének variációi esetében, amely a gondos panel tervezésre, illetve az exom szekvenálások hasznára hívja fel a figyelmet. A

vizsgált ALS kohortban heterozigóta ritka variánsokat detektáltunk HSP-asszociált génekben, valamint felmerült a *POLG* gén variációinak összefüggése motoneuron betegségekkel. További adat keletkezett arra vonatkozóan, hogy a seipinopathiak egyes esetekben motoneuron betegséget utánozhatnak.

4.) A világon elsőként társítottuk, a korábban emberi betegséggel összefüggésben nem leírt, *MSTO1* gént humán megbetegedéshez. Megállapítottuk, hogy az *MSTO1* gén pathogén variációi komplex mitochondriális fenotípussal jelentkező betegséget okozhatnak.

5.) Elsőként vizsgáltuk magyar populációban a nagy áteresztő képességű genetikai vizsgálatok iránt mutatott attitűdöt. A 657 személy által kitöltött kérdőív alapján megállapítottuk, hogy a magyar populációban a nagy áteresztő képességű genetikai vizsgálatok iránt érdeklődést mutatnak, és a genetikai vizsgálatokat kérő személyek genetikai tanácsadást is igényelnek. A foglalkozás, az életkor, a nemi hovatartozás, valamint az észlelt genetikai tudás befolyásolta az attitűdöt, amely fontos információ a genetikai tanácsadás, illetve a személyre szabott orvoslás megvalósítása kapcsán.

VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

Az új generációs szekvenálást az elmúlt években egyre gyakrabban alkalmazzák a klinikai genetikai kutatásban. Kutatásaink során az NGS klinikai implementációjának lehetőségeit vizsgáltuk neurogenetikai betegségekben. Célkitűzésünk volt saját tervezésű HSP panelünk és a teljes exom szekvenálás hatékonyságának vizsgálata spasticitas-ataxia spektrum betegségekben. A HSP-ben genetikai epidemiológiai vizsgálatokat végeztünk, vizsgáltuk a genotípus-fenotípus összefüggéseket. Egy komplex mitochondriális fenotípussal jelentkező család esetében a molekuláris etiológia tisztázására teljes exom szekvenálást végeztünk. Mivel Magyarországon (és Közép-Kelet Európában) az NGS alkalmazásával kapcsolatos etikai kérdések iránt mutatott attitűdről kevés információ érhető el, magyar populációban kérdőíves vizsgálatot végeztünk. Megállapítottuk, hogy mind az általunk tervezett NGS alapú HSP panel, mind az exom szekvenálás hatékony módszer a spasticitas-ataxia spektrum betegségek molekuláris diagnosztikájában. A teljes HSP kohortunk 26,3%-ában igazoltuk a betegség molekuláris hátterét, Magyarországon elsőként végeztünk HSP-ben átfogó genetikai vizsgálatokat. A HSP asszociált *SPAST*, *SPG7*, *SPG11* gének egyes variációi esetében az irodalomban elérhető információkat bővítettük a genotípus-fenotípus összefüggésekről. Panel- és exomszekvenálás révén több HSP fenokópiát azonosítottunk kohortunkban, illetve cerebellaris ataxia hátterében HSP asszociált gént (*SPG11*) azonosítottunk. ALS betegekben heterozigóta, ritka variánsokat azonosítottunk HSP génekben, valamint a *POLG* génben, és a *BSCL2* génben. Egy komplex mitochondriális fenotípussal jelentkező család esetében a tünetek hátterében, korábban emberi betegséghez nem társított, új gént (*MSTO1*) azonosítottunk. Kérdőíves vizsgálatunk alapján megállapítottuk, hogy Magyarországon igény van a nagy áteresztő képességű genetikai vizsgálatokra, ugyanakkor ehhez társulóan genetikai tanácsadásra van szükség. A foglalkozás, a kor, a nemi hovatartozás, valamint az észlelt genetikai tudás befolyásolta az attitűdöt, amely fontos információ a személyre szabott orvoslás megvalósítása, valamint a genetikai tanácsadás kapcsán.

IX. SUMMARY

Next generation sequencing methodology is increasingly used last years in clinical genetic studies. In our research we examined the clinical implementation of NGS based genetic tests in neurogenetic diseases. Our objective was to study the utility of our custom HSP NGS panel, and the whole exome sequencing in spasticity-ataxia spectrum diseases. We performed genetic epidemiologic study, and examined the genotype-phenotype correlations in HSP. In a family with a complex mitochondrial phenotype we performed exome sequencing for clarification of the genetic background of the disease. Since the attitude in Hungary (and Central-Eastern Europe) regarding questions raised by high throughput sequencing is not well known, we performed a questionnaire study in a Hungarian population. Our research concluded that both our custom NGS panel, and whole exome sequencing is effective in the molecular diagnostics of spasticity-ataxia spectrum diseases. In 26,3% of the whole HSP cohort we determined the molecular background of the disease, and performed comprehensive genetic testing in a HSP cohort first in Hungary. We have broadened the available genotype-phenotype correlations in the literature on variations in the *SPAST*, *SPG7*, and *SPG11* genes. With the panel, and exome sequencing we identified phenocopies in our HSP cohort, and detected HSP associated gene (*SPG11*) variation as a cause of cerebellar tremor in a patient. We have detected heterozygous rare variants in HSP-associated genes, and in the *POLG* and *BSCL2* gene in ALS patients. In a family with a complex mitochondrial phenotype, we identified a new gene (*MSTO1*), which was previously not linked to human disease. Based on our questionnaire we concluded, that in Hungary there is a need for high throughput genetic tests, but also for counseling. Profession, age, sex, and perceived genetic knowledge affect the attitude, which is important information regarding realization of personalized medicine, and genetic counseling.

X. IRODALOMJEGYZÉK

1. Szegedi M, Molnár MJ, Boncz I, Kosztolányi G. (2014) Focus shifts in the Hungarian reimbursement system. Funding of orphan medicinal products for rare disease patients in Hungary: Financing of orphan medicines. *Orv Hetil*, 155: 1735–1741.
2. Szakszon K, Balogh E, Ujfalusi A, Bessenyei B, P. Szabó G, Balogh I, Oláh É. (2014) Results of clinical and genetic diagnosis of rare diseases in the Eastern region of Hungary (2007–2013). *Orv Hetil*, 155: 348–357.
3. Baldovino S, Moliner AM, Taruscio D, Daina E, Roccatello D. (2016) Rare Diseases in Europe: from a Wide to a Local Perspective. *Isr Med Assoc J*, 18: 359–363.
4. Baynam G, Pachter N, McKenzie F, Townshend S, Slee J, Kiraly-Borri C, Vasudevan A, Hawkins A, Broley S, Schofield L, Verhoef H, Walker CE, Molster C, Blackwell JM, Jamieson S, Tang D, Lassmann T, Mina K, Beilby J, Davis M, Laing N, Murphy L, Weeramanthri T, Dawkins H, Goldblatt J. (2016) The rare and undiagnosed diseases diagnostic service – application of massively parallel sequencing in a state-wide clinical service. *Orphanet J Rare Dis*, 11: 77.
5. Robinson PN. (2012) Deep phenotyping for precision medicine. *Hum Mutat*, 33: 777–780.
6. Özçelik T, Onat OE. (2016) Genomic landscape of the Greater Middle East. *Nat Genet*, 48: 978–979.
7. Federico A. (2013) Rare neurological diseases: A Pandora’s box for neurology (an European and Italian perspective). *Rev Neurol (Paris)*, 169: S12–S17.
8. Bargiela D, Yu-Wai-Man P, Keogh M, Horvath R, Chinnery PF. (2015) Prevalence of neurogenetic disorders in the North of England. *Neurology*, 85: 1195–1201.

9. Fink JK. (2013) Hereditary spastic paraplegia: Clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms. *Acta Neuropathol*, 126: 307–328.
10. Harding AE. (1983) Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet*, 321: 1151–1155.
11. de Souza PVS, de Rezende Pinto WBV, de Rezende Batistella GN, Bortholin T, Oliveira ASB. (2016) Hereditary Spastic Paraplegia: Clinical and Genetic Hallmarks. *The Cerebellum*, 16: 525-551.
12. Patel H, Cross H, Proukakis C, Hershberger R, Bork P, Ciccarelli FD, Patton MA, McKusick VA, Crosby AH. (2002) SPG20 is mutated in Troyer syndrome, an hereditary spastic paraplegia. *Nat Genet*, 31:347-348.
13. Simpson MA, Cross H, Proukakis C, Pryde A, Hershberger R, Chatonnet A, Patton MA, Crosby AH. (2003) Maspardin Is Mutated in Mast Syndrome, a Complicated Form of Hereditary Spastic Paraplegia Associated with Dementia. *Am J Hum Genet*, 73: 1147–1156.
14. Hanein S, Martin E, Boukhris A, Byrne P, Goizet C, Hamri A, Benomar A, Lossos A, Denora P, Fernandez J, Elleuch N, Forlani S, Durr A, Feki I, Hutchinson M, Santorelli FM, Mhiri C, Brice A, Stevanin G. (2008) Identification of the SPG15 Gene, Encoding Spastizin, as a Frequent Cause of Complicated Autosomal-Recessive Spastic Paraplegia, Including Kjellin Syndrome. *Am J Hum Genet*, 82: 992–1002.
15. Garcia-Martin E, Bambo MP, Gazulla J, Larrosa JM, Polo V, Fuertes MI, Fuentes JL, Ferreras A, Pablo LE. (2013) Finding of retinal nerve fiber layer hypertrophy in ataxia of Charlevoix-Saguenay patients. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 89: 207-211.

16. Windpassinger C, Auer-Grumbach M, Irobi J, Patel H, Petek E, Hörl G, Malli R, Reed JA, Dierick I, Verpoorten N, Warner TT, Proukakis C, Van den Bergh P, Verellen C, Van Maldergem L, Merlini L, De Jonghe P, Timmerman V, Crosby AH, Wagner K. (2004) Heterozygous missense mutations in BSCL2 are associated with distal hereditary motor neuropathy and Silver syndrome. *Nat Genet*, 36: 271–276.
17. Lo Giudice T, Lombardi F, Santorelli FM, Kawarai T, Orlacchio A. (2014) Hereditary spastic paraplegia: Clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms. *Exp Neurol*, 261: 518–539.
18. Salinas S, Proukakis C, Crosby A, Warner TT. (2008) Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *Lancet Neurol*, 7: 1127–1138.
19. Sedel F, Fontaine B, Saudubray JM, Lyon-Caen O. (2007) Hereditary spastic paraparesis in adults associated with inborn errors of metabolism: a diagnostic approach. *J Inher Metab Dis*, 30: 855–864.
20. Novarino G, Fenstermaker AG, Zaki MS, Hofree M, Silhavy JL, Heiberg AD, Abdellateef M, Rosti B, Scott E, Mansour L, Masri A, Kayserili H, Al-Aama JY, Abdel-Salam GMH, Karminejad A, Kara M, Kara B, Bozorgmehri B, Ben-Omran T, Mojahedi F, El Din Mahmoud IG, Bouslam N, Bouhouche A, Benomar A, Hanein S, Raymond L, Forlani S, Mascaro M, Selim L, Shehata N, Al-Allawi N, Bindu PS, Azam M, Gunel M, Caglayan A, Bilguvar K, Tolun A, Issa MY, Schroth J, Spencer EG, Rosti RO, Akizu N, Vaux KK, Johansen A, Koh AA, Megahed H, Durr A, Brice A, Stevanin G, Gabriel SB, Ideker T, Gleeson JG. (2014) Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders. *Science*, 343: 506–511.
21. van Gaalen J, van de Warrenburg BPC. (2012) A practical approach to late-onset cerebellar ataxia: putting the disorder with lack of order into order. *Pract Neurol*, 12: 14–24.

22. Hersheson J, Haworth A, Houlden H. (2012) The inherited ataxias: genetic heterogeneity, mutation databases, and future directions in research and clinical diagnostics. *Hum Mutat*, 33: 1324–1332.
23. Anheim M, Tranchant C, Koenig M. (2012) The autosomal recessive cerebellar ataxias. *N Engl J Med*, 366: 636–646.
24. De Bot ST, Willemsen MAAP, Vermeer S, Kremer HPH, Van De BPC, Warrenburg. (2012) Reviewing the genetic causes of spastic-ataxias. *Neurology*, 79: 1507–1514.
25. Synofzik M, Schüle R. (2017) Overcoming the divide between ataxias and spastic paraplegias: Shared phenotypes, genes, and pathways. *Mov Disord*, 32: 332–345.
26. Harms MB, Baloh RH. (2013) Clinical Neurogenetics: Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Clin*, 31: 929–950.
27. Saberi S, Stauffer JE, Schulte DJ, Ravits J. (2015) Neuropathology of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Its Variants. *Neurol Clin*, 33: 855–876.
28. Robberecht W, Philips T. (2013) The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci*, 14: 248–264.
29. Marangi G, Traynor BJ. (2015) Genetic causes of amyotrophic lateral sclerosis: New genetic analysis methodologies entailing new opportunities and challenges. *Brain Res*, 1607: 75–93.
30. Keller MF, Ferrucci L, Singleton AB, Tienari PJ, Laaksovirta H, Restagno G, Chiò A, Traynor BJ, Nalls MA. (2014) Genome-wide analysis of the heritability of amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurol*, 71: 1123–1134.
31. Al-Chalabi A, Fang F, Hanby MF, Leigh PN, Shaw CE, Ye W, Rijdsdijk F. (2010) An estimate of amyotrophic lateral sclerosis heritability using twin data. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 81: 1324–1326.

32. Al-Chalabi A, Jones A, Troakes C, King A, Al-Sarraj S, van den Berg LH. (2012) The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*, 124: 339–352.
33. Swinnen B, Robberecht W. (2014) The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol*, 10: 661-670.
34. Agosta F, Al-Chalabi A, Filippi M, Hardiman O, Kaji R, Meininger V, Nakano I, Shaw P, Shefner J, van den Berg LH, Ludolph A. (2014) The El Escorial criteria: Strengths and weaknesses. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 8421: 1–7.
35. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R, Suomalainen A, Thorburn DR, Zeviani M, Turnbull DM. (2016) Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Prim*, 2: 16080.
36. Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, Gomez N, Blakely EL, Alston CL, Feeney C, Horvath R, Yu-Wai-Man P, Chinnery PF, Taylor RW, Turnbull DM, McFarland R. (2015) Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol*, 77: 753–759.
37. Gal A, Balicza P, Weaver D, Naghdi S, Joseph SK, Várnai P, Gyuris T, Horváth A, Nagy L, Seifert EL, Molnar MJ, Hajnóczky G. (2017) MSTO1 is a cytoplasmic pro-mitochondrial fusion protein, whose mutation induces myopathy and ataxia in humans. *EMBO Mol Med*, 9: 967-984.
38. DiMauro S, Schon EA, Carelli V, Hirano M. (2013) The clinical maze of mitochondrial neurology. *Nat Rev Neurol*, 9: 429–444.
39. Milone M, Benarroch EE. (2012) Mitochondrial dynamics: general concepts and clinical implications. *Neurology*, 78: 1612–1619.
40. Burté F, Carelli V, Chinnery PF, Yu-Wai-Man P. (2014) Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol*, 11: 11–24.

41. Goodwin S, Mcpherson JD, McCombie WR. (2016) Coming of age : ten years of next- generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*, 17: 333–351.
42. van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Thermes C. (2014) Library preparation methods for next-generation sequencing: Tone down the bias. *Exp Cell Res*, 322: 12–20.
43. Mamanova L, Coffey AJ, Scott CE, Kozarewa I, Turner EH, Kumar A, Howard E, Shendure J, Turner DJ. (2010) Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nat Methods*, 7: 111–118.
44. Lu Y, Shen Y, Warren W, Walter R. Next Generation Sequencing in Aquatic Models. In: Kulski JK (szerk.), *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges*. InTech, Rijeka, 2016: 66.
45. Oliver GR, Hart SN, Klee EW. (2015) Bioinformatics for clinical next generation sequencing. *Clin Chem*, 61: 124–135.
46. Pabinger S, Dander A, Fischer M, Snajder R, Sperk M, Efremova M, Krabichler B, Speicher MR, Zschocke J, Trajanoski Z. (2014) A survey of tools for variant analysis of next-generation genome sequencing data. *Brief Bioinform*, 15: 256-278.
47. Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, Shendure J. (2011) Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet*, 12: 745–755.
48. Eccles DM, Mitchell G, Monteiro ANA, Schmutzler R, Couch FJ, Spurdle AB, Gómez-García EB, ENIGMA Clinical Working Group. (2015) BRCA1 and BRCA2 genetic testing-pitfalls and recommendations for managing variants of uncertain clinical significance. *Ann Oncol*, 26: 2057–2065.
49. Li MX, Gui HS, Kwan JSH, Bao SY, Sham PC. (2012) A comprehensive framework for prioritizing variants in exome sequencing studies of Mendelian diseases. *Nucleic Acids Res*, 40: e53.

50. Wu J, Jiang R. (2013) Prediction of deleterious nonsynonymous single-nucleotide polymorphism for human diseases. *Sci World J*, 2013: 675851.
51. Peterson TA, Doughty E, Kann MG. (2013) Towards precision medicine: advances in computational approaches for the analysis of human variants. *J Mol Biol*, 425: 4047–4063.
52. Johnston JJ, Biesecker LG. (2013) Databases of genomic variation and phenotypes : Existing resources and future needs. *Hum Mol Genet*, 22: 27-31.
53. Smedley D, Robinson PN. (2015) Phenotype-driven strategies for exome prioritization of human Mendelian disease genes. *Genome Med*, 7: 81.
54. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL, ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. (2015) Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*, 17: 405–423.
55. Ku CS, Cooper DN, Polychronakos C, Naidoo N, Wu M, Soong R. (2012) Exome sequencing: Dual role as a discovery and diagnostic tool. *Ann Neurol*, 71: 5-14.
56. Blackburn HL, Schroeder B, Turner C, Shriver CD, Ellsworth DL, Ellsworth RE. (2015) Management of Incidental Findings in the Era of Next-generation Sequencing. *Curr Genomics*, 16: 159–174.

57. Sawyer SL, Hartley T, Dymont DA, Beaulieu CL, Schwartzentruber J, Smith A, Bedford HM, Bernard G, Bernier FP, Brais B, Bulman DE, Warman Chardon J, Chitayat D, Deladoëy J, Fernandez BA, Frosk P, Geraghty MT, Gerull B, Gibson W, Gow RM, Graham GE, Green JS, Heon E, Horvath G, Innes AM, Jabado N, Kim RH, Koenekoop RK, Khan A, Lehmann OJ, Mendoza-Londono R, Michaud JL, Nikkel SM, Penney LS, Polychronakos C, Richer J, Rouleau GA, Samuels ME, Siu VM, Suchowersky O, Tarnopolsky MA, Yoon G, Zahir FR; FORGE Canada Consortium; Care4Rare Canada Consortium, Majewski J, Boycott KM. (2016) Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey: time to address gaps in care. *Clin Genet*, 89: 275–284.
58. Roche MI, Jonathan Berg BS. (2015) Incidental Findings with Genomic Testing: Implications for Genetic Counseling Practice. *Curr Genet Med Rep*, 3: 166-176.
59. Bertolotti M. (2015) Opportunities, Risks, and Limitations of Genetic Testing: Looking to the Future From Patients' Point of View. *Mayo Clin Proc*, 90: 1311–1313.
60. Khan CM, Rini C, Bernhardt BA, Roberts JS, Christensen KD, Evans JP, Brothers KB, Roche MI, Berg JS, Henderson GE. (2015) How Can Psychological Science Inform Research About Genetic Counseling for Clinical Genomic Sequencing? *J Genet Couns*, 24: 193-204.
61. Egalite N, Groisman IJ, Godard B. (2014) Genetic counseling practice in next generation sequencing research: Implications for the ethical oversight of the informed consent process. *J Genet Couns*, 23: 661-670.
62. Facio FM, Lee K, O'Daniel JM. (2014) A Genetic Counselor's Guide to Using Next-Generation Sequencing in Clinical Practice. *J Genet Couns*, 23: 455–462.
63. Clarke AJ. (2014) Managing the ethical challenges of nextgeneration sequencing in genomic medicine. *Br Med Bull*, 111: 17–30.

64. Bredenoord AL, de Vries MC, M van Delden JJ. (2013) Next-generation sequencing: does the next generation still have a right to an open future? *Nat Rev Genet*, 14: 306.
65. Li H, Durbin R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25: 1754–1760.
66. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, del Angel G, Levy-Moonshine A, Jordan T, Shakir K, Roazen D, Thibault J, Banks E, Garimella K V., Altshuler D, Gabriel S, DePristo MA. (2013) From fastQ data to high-confidence variant calls: The genome analysis toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics*, 43: 1-33.
67. Gonzalez MA, Lebrigio RFA, Van Booven D, Ulloa RH, Powell E, Speziani F, Tekin M, Schüle R, Züchner S. (2013) GENomes Management Application (GEM.app): A New Software Tool for Large-Scale Collaborative Genome Analysis. *Hum Mutat*, 34: 842–846.
68. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25: 2078–2079.
69. Li H. (2011) A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*, 27: 2987–2993.
70. Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, Land SJ, Lu X, Ruden DM. (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w 1118; iso-2; iso-3. *Fly*, 6: 80–92.
71. Cingolani P, Patel VM, Coon M, Nguyen T, Land SJ, Ruden DM, Lu X. (2012) Using *Drosophila melanogaster* as a model for genotoxic chemical mutational studies with a new program, SnpSift. *Front Genet*, 3: 35.

72. Smedley D, Jacobsen JOB, Jäger M, Köhler S, Holtgrewe M, Schubach M, Siragusa E, Zemojtel T, Buske OJ, Washington NL, Bone WP, Haendel M a, Robinson PN. (2015) Next-generation diagnostics and disease-gene discovery with the Exomiser. *Nat Protoc*, 10: 2004–2015.
73. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. (2009) Human Splicing Finder: An online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*, 37: e67.
74. Stenson PD, Ball E V., Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomas NST, Abeyasinghe S, Krawczak M, Cooper DN. (2003) Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 Update. *Hum Mutat*, 21: 577–581.
75. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM, Maglott DR. (2014) ClinVar: Public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res*, 42: 980-985.
76. Ng PC, Henikoff S. (2003) SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*, 31: 3812–3814.
77. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. (2013) Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*, 7: 7.20.
78. Pollard KS, Hubisz MJ, Rosenbloom KR, Siepel A. (2010) Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome Res*, 20: 110–121.
79. Dong C, Wei P, Jian X, Gibbs R, Boerwinkle E, Wang K, Liu X. (2015) Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies. *Hum Mol Genet*, 24: 2125–2137.
80. Carere DA, Kraft P, Kaphingst KA, Roberts JS, Green RC. (2016) Consumers report lower confidence in their genetics knowledge following direct-to-consumer personal genomic testing. *Genet Med*, 18: 65–72.

81. Fitzgerald-Butt SM, Bodine A, Fry KM, Ash J, Zaidi AN, Garg V, Gerhardt CA, McBride KL. (2016) Measuring genetic knowledge: a brief survey instrument for adolescents and adults. *Clin Genet*, 89: 235–243.
82. Haga SB, Barry WT, Mills R, Ginsburg GS, Svetkey L, Sullivan J, Willard HF. (2013) Public knowledge of and attitudes toward genetics and genetic testing. *Genet Test Mol Biomarkers*, 17: 327–335.
83. Morren M, Rijken M, Baanders AN, Bensing J. (2007) Perceived genetic knowledge, attitudes towards genetic testing, and the relationship between these among patients with a chronic disease. *Patient Educ Couns*, 65: 197–204.
84. Abel A, Fonknechten N, Hofer A, Durr A, Cruaud C, Voit T, Weissenbach J, Brice A, Klimpe S, Auburger G, Hazan J. (2004) Early onset autosomal dominant spastic paraplegia caused by novel mutations in SPG3A. *Neurogenetics*, 5: 239–243.
85. Sauter S, Mitterski B, Klimpe S, Bönsch D, Schöls L, Visbeck A, Papke T, Hopf HC, Engel W, Deufel T, Epplen JT, Neesen J. (2002) Mutation analysis of the Spastin gene (SPG4) in patients in Germany with autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Hum Mutat*, 20: 127–132.
86. Magariello A, Muglia M, Patitucci A, Mazzei R, Conforti FL, Gabriele AL, Sprovieri T, Ungaro C, Gambardella A, Mancuso M, Siciliano G, Branca D, Aguglia U, de Angelis MV, Longo K, Quattrone A. (2006) Novel spastin (SPG4) mutations in Italian patients with hereditary spastic paraplegia. *Neuromuscul Disord*, 16: 387–390.
87. Alvarez V, Sánchez-Ferrero E, Beetz C, Díaz M, Alonso B, Corao AI, Gámez J, Esteban J, Gonzalo JF, Pascual-Pascual SI, López de Munain A, Moris G, Ribacoba R, Márquez C, Rosell J, Marín R, García-Barcina MJ, Del Castillo E, Benito C, Coto E; Group for the Study of the Genetics of Spastic Paraplegia. (2010) Mutational spectrum of the SPG4 (SPAST) and SPG3A (ATL1) genes in Spanish patients with hereditary spastic paraplegia. *BMC Neurol*, 10: 89.

88. Arnoldi A, Tonelli A, Crippa F, Villani G, Pacelli C, Sironi M, Pozzoli U, D'Angelo MG, Meola G, Martinuzzi A, Crimella C, Redaelli F, Panzeri C, Renieri A, Comi G Pietro, Turconi AC, Bresolin N, Bassi MT. (2008) A clinical, genetic, and biochemical characterization of SPG7 mutations in a large cohort of patients with hereditary spastic paraplegia. *Hum Mutat*, 29: 522–531.
89. Sánchez-Ferrero E, Coto E, Beetz C, Gámez J, Corao A, Díaz M, Esteban J, del Castillo E, Moris G, Infante J, Menéndez M, Pascual-Pascual S, López de Munain A, Garcia-Barcina M, Alvarez V. (2013) SPG7 mutational screening in spastic paraplegia patients supports a dominant effect for some mutations and a pathogenic role for p.A510V. *Clin Genet*, 83: 257–262.
90. Schlipf N, Schüle R, Klimpe S, Karle K, Synofzik M, Schicks J, Riess O, Schöls L, Bauer P. (2011) Amplicon-based high-throughput pooled sequencing identifies mutations in CYP7B1 and SPG7 in sporadic spastic paraplegia patients. *Clin Genet*, 80: 148–160.
91. Hehr U, Bauer P, Winner B, Schule R, Olmez A, Koehler W, Uyanik G, Engel A, Lenz D, Seibel A, Hehr A, Ploetz S, Gamez J, Rolfs A, Weis J, Ringer TM, Bonin M, Schuierer G, Marienhagen J, Bogdahn U, Weber BH, Topaloglu H, Schols L, Riess O, Winkler J. (2007) Long-term course and mutational spectrum of spatacsin-linked spastic paraplegia. *Ann Neurol*, 62: 656–665.
92. Stevanin G, Azzedine H, Denora P, Boukhris A, Tazir M, Lossos A, Rosa AL, Lerer I, Hamri A, Alegria P, Loureiro J, Tada M, Hannequin D, Anheim M, Goizet C, Gonzalez-Martinez V, Le Ber I, Forlani S, Iwabuchi K, Meiner V, Uyanik G, Erichsen AK, Feki I, Pasquier F, Belarbi S, Cruz VT, Depienne C, Truchetto J, Garrigues G, Tallaksen C, Tranchant C, Nishizawa M, Vale J, Coutinho P, Santorelli FM, Mhiri C, Brice A, Durr A; SPATAX consortium. (2008) Mutations in SPG11 are frequent in autosomal recessive spastic paraplegia with thin corpus callosum, cognitive decline and lower motor neuron degeneration. *Brain*, 131: 772–784.

93. Salsano E, Tabano S, Sirchia SM, Colapietro P, Castellotti B, Gellera C, Rimoldi M, Pensato V, Mariotti C, Pareyson D, Miozzo M, Uziel G. (2012) Preferential expression of mutant ABCD1 allele is common in adrenoleukodystrophy female carriers but unrelated to clinical symptoms. *Orphanet J Rare Dis*, 7: 10.
94. Furuya H, Kukita YJ, Nagano S, Sakai Y, Yamashita Y, Fukuyama H, Inatomi Y, Saito Y, Koike R, Tsuji S, Fukumaki Y, Hayashi K, Kobayashi T. (1997) Adult onset globoid cell leukodystrophy (Krabbe disease): Analysis of galactosylceramidase cDNA from four Japanese patients. *Hum Genet*, 100: 450–456.
95. Svenson IK, Kloos MT, Gaskell PC, Nance MA, Garbern JY, Hisanaga SI, Pericak-Vance MA, Ashley-Koch AE, Marchuk DA. (2004) Intragenic modifiers of hereditary spastic paraplegia due to spastin gene mutations. *Neurogenetics*, 5: 157–164.
96. Örlén H, Melberg A, Raininko R, Kumlien E, Entesarian M, Söderberg P, Pählman M, Darin N, Kyllerman M, Holmberg E, Engler H, Eriksson U, Dahl N. (2009) SPG11 mutations cause Kjellin syndrome, a hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum and central retinal degeneration. *Am J Med Genet*, 150: 984–992.
97. 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.
98. Topaloglu AK, Lomniczi A, Kretzschmar D, Dissen GA, Kotan LD, McArdle CA, Koc AF, Hamel BC, Guclu M, Papatya ED, Eren E, Mengen E, Gurbuz F, Cook M, Castellano JM, Kekil MB, Mungan NO, Yuksel B, Ojeda SR. (2014) Loss-of-function mutations in PNPLA6 encoding neuropathy target esterase underlie pubertal failure and neurological deficits in Gordon Holmes syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 99: E2067-75.

99. Musacchio T, Zaum A-K, Üçeyler N, Sommer C, Pfeifroth N, Reiners K, Kunstmann E, Volkmann J, Rost S, Klebe S. (2017) ALS and MMN mimics in patients with BSCL2 mutations: the expanding clinical spectrum of SPG17 hereditary spastic paraplegia. *J Neurol*, 264: 11–20.
100. Martinelli D, Diodato D, Ponzi E, Monné M, Boenzi S, Bertini E, Fiermonte G, Dionisi-Vici C. (2015) The hyperornithinemia–hyperammonemia–homocitrullinuria syndrome. *Orphanet J Rare Dis*, 10: 29.
101. Flor-de-Lima F, Sampaio M, Nahavandi N, Fernandes S, Leão M. (2014) Alsin related disorders: literature review and case study with novel mutations. *Case Rep Genet*, 2014: 691515.
102. Ghani M, Lang AE, Zinman L, Nacmias B, Sorbi S, Bessi V, Tedde A, Tartaglia MC, Surace EI, Sato C, Moreno D, Xi Z, Hung R, Nalls MA, Singleton A, St George-Hyslop P, Rogaeva E. (2015) Mutation analysis of patients with neurodegenerative disorders using NeuroX array. *Neurobiol Aging*, 36: 545.e9-14.
103. Molinari F, Kaminska A, Fiermonte G, Boddaert N, Raas-Rothschild A, Plouin P, Palmieri L, Brunelle F, Palmieri F, Dulac O, Munnich A, Colleaux L. (2009) Mutations in the mitochondrial glutamate carrier *SLC25A22* in neonatal epileptic encephalopathy with suppression bursts. *Clin Genet*, 76: 188–194.
104. Rabin BA, Griffin JW, Crain BJ, Scavina M, Chance PF, Cornblath DR. (1999) Autosomal dominant juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 1539–1550.
105. Nanetti L, Cavalieri S, Pensato V, Erbetta A, Pareyson D, Panzeri M, Zorzi G, Antozzi C, Moroni I, Gellera C, Brusco A, Mariotti C. (2013) SETX mutations are a frequent genetic cause of juvenile and adult onset cerebellar ataxia with neuropathy and elevated serum alpha-fetoprotein. *Orphanet J Rare Dis*, 8: 123.

106. 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.
107. Finsterer J, Löscher W, Quasthoff S, Wanschitz J, Auer-Grumbach M, Stevanin G. (2012) Hereditary spastic paraplegias with autosomal dominant, recessive, X-linked, or maternal trait of inheritance. *J Neurol Sci*, 318: 1–18.
108. Van Goethem G, Schwartz M, Löfgren A, Dermaut B, Van Broeckhoven C, Vissing J. (2003) Novel POLG mutations in progressive external ophthalmoplegia mimicking mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Eur J Hum Genet*, 11: 547–549.
109. Lamantea E, Tiranti V, Bordoni A, Toscano A, Bono F, Servidei S, Papadimitriou A, Spelbrink H, Silvestri L, Casari G, Comi GP, Zeviani M. (2002) Mutations of mitochondrial DNA polymerase gammaA are a frequent cause of autosomal dominant or recessive progressive external ophthalmoplegia. *Ann Neurol*, 52: 211–219.
110. Beetz C, Nygren AOH, Schickel J, Auer-Grumbach M, Bürk K, Heide G, Kassubek J, Klimpe S, Klopstock T, Kreuz F, Otto S, Schüle R, Schöls L, Sperfeld AD, Witte OW, Deufel T. (2006) High frequency of partial SPAST deletions in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Neurology*, 67: 1926–1930.
111. Kwon MJ, Lee ST, Kim JW, Sung DH, Ki CS. (2010) Clinical and genetic analysis of a Korean family with hereditary spastic paraplegia type 3. *Ann Clin Lab Sci*, 40: 375–379.

112. Goizet C, Depienne C, Benard G, Boukhris A, Mundwiller E, Sol G, Couptry I, Pilliod J, Martin-Ngrier ML, Fedirko E, Forlani S, Cazeneuve C, Hannequin D, Charles P, Feki I, Pinel JF, Ouvrard-Hernandez AM, Lyonnet S, Ollagnon-Roman E, et al. (2011) REEP1 mutations in SPG31: Frequency, mutational spectrum, and potential association with mitochondrial morpho-functional dysfunction. *Hum Mutat*, 32: 1118–1127.
113. Schule R, Kremer BPH, Kassubek J, Auer-Grumbach M, Kostic V, Klopstock T, Klimpe S, Otto S, Boesch S, van de Warrenburg BP, Schols L. (2008) SPG10 is a rare cause of spastic paraplegia in European families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79: 584–587.
114. Hadzsiev K, Baliko L, Komlosi K, Locsei-Fekete A, Csabi G, Bene J, Kisfali P, Meleg B. (2015) Genetic testing of hereditary spastic paraplegia. *Orv Hetil*, 156: 113–117.
115. Crippa F, Panzeri C, Martinuzzi A, Arnoldi A, Redaelli F, Tonelli A, Baschiroto C, Vazza G, Mostacciuolo ML, Daga A, Orso G, Profice P, Trabacca A, D'Angelo MG, Comi G Pietro, Galbiati S, Lamperti C, Bonato S, Pandolfo M, et al. (2006) Eight novel mutations in SPG4 in a large sample of patients with hereditary spastic paraplegia. *Arch Neurol*, 63: 750–755.
116. Depienne C, Tallaksen C, Lephay JY, Bricka B, Poëa-Guyon S, Fontaine B, Labauge P, Brice A. (2006) Spastin mutations are frequent in sporadic spastic paraparesis and their spectrum is different from that observed in familial cases. *J Med Genet*, 43: 259–265.
117. Ishiura H, Takahashi Y, Hayashi T, Saito K, Furuya H, Watanabe M, Murata M, Suzuki M, Sugiura A, Sawai S, Shibuya K, Ueda N, Ichikawa Y, Kanazawa I, Goto J, Tsuji S. (2014) Molecular epidemiology and clinical spectrum of hereditary spastic paraplegia in the Japanese population based on comprehensive mutational analyses. *J Hum Genet*, 59: 163–172.

118. Ivanova N, Löfgren a, Tournev I, Rousev R, Andreeva a, Jordanova a, Georgieva V, Deconinck T, Timmerman V, Kremensky I, De Jonghe P, Mitev V. (2006) Spastin gene mutations in Bulgarian patients with hereditary spastic paraplegia. *Clin Genet*, 70: 490–495.
119. Kim TH, Lee JH, Park YE, Shin JH, Nam TS, Kim HS, Jang HJ, Semenov A, Kim SJ, Kim DS. (2014) Mutation analysis of SPAST, ATL1, and REEP1 in Korean Patients with Hereditary Spastic Paraplegia. *J Clin Neurol*, 10: 257–261.
120. Lu X, Cen Z, Xie F, Ouyang Z, Zhang B, Zhao G, Luo W. (2014) Genetic analysis of SPG4 and SPG3A genes in a cohort of Chinese patients with hereditary spastic paraplegia. *J Neurol Sci*, 347: 368–371.
121. Mccorquodale DS, Ozomaro U, Huang J, Montenegro G, Kushman A, Citrigno L, Price J, Speziani F, Pericak-Vance MA, Züchner S. (2011) Mutation screening of spastin, atlastin, and REEP1 in hereditary spastic paraplegia. *Clin Genet*, 79: 523–530.
122. Orlacchio A, Patrono C, Borreca A, Babalini C, Bernardi G, Kawarai T. (2008) Spastic paraplegia in Romania: high prevalence of SPG4 mutations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79: 606–607.
123. Proukakis C, Auer-Grumbach M, Wagner K, Wilkinson PA, Reid E, Patton MA, Warner TT, Crosby AH. (2003) Screening of patients with hereditary spastic paraplegia reveals seven novel mutations in the SPG4 (Spastin) gene. *Hum Mutat*, 21: 170.
124. Vandebona H, Kerr NP, Liang C, Sue CM. (2012) SPAST mutations in Australian patients with hereditary spastic paraplegia. *Intern Med J*, 42: 1342–1347.

125. Park H, Kang SH, Park S, Kim SY, Seo SH, Lee SJ, Lee JA, Cho SI, Sung JJ, Lee KW, Kim JY, Park SS, Seong MW. (2015) Mutational spectrum of the SPAST and ATL1 genes in Korean patients with hereditary spastic paraplegia. *J Neurol Sci*, 357: 167–172.
126. Proukakis C, Moore D, Labrum R, Wood NW, Houlden H. (2011) Detection of novel mutations and review of published data suggests that hereditary spastic paraplegia caused by spastin (SPAST) mutations is found more often in males. *J Neurol Sci*, 306: 62–65.
127. Chelban V, Tucci A, Lynch DS, Polke JM, Santos L, Jonvik H, Groppa S, Wood NW, Houlden H. (2017) Truncating mutations in SPAST patients are associated with a high rate of psychiatric comorbidities in hereditary spastic paraplegia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 88: 681-687.
128. Chinnery PF, Keers SM, Holden MJ, Ramesh V, Dalton A. (2004) Infantile hereditary spastic paraparesis due to codominant mutations in the spastin gene. *Neurology*, 63: 710–712.
129. Münch C, Rolfs A, Meyer T. (2008) Heterozygous S44L missense change of the spastin gene in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler*, 9: 251–253.
130. McDermott CJ, Burness CE, Kirby J, Cox LE, Rao DG, Hewamadduma C, Sharrack B, Hadjivassiliou M, Chinnery PF, Dalton A, Shaw PJ. (2006) Clinical features of hereditary spastic paraplegia due to spastin mutation. *Neurology*, 67: 45–51.
131. Lan MY, Chang YY, Yeh TH, Lai SC, Liou CW, Kuo HC, Wu YR, Lyu RK, Hung JW, Chang YC, Lu CS. (2014) High frequency of SPG4 in Taiwanese families with autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *BMC Neurol*, 14: 216.
132. Brugman F, Scheffer H, Wokke JHJ, Nillesen WM, De Visser M, Aronica E, Veldink JH, Van Den Berg LH. (2008) Paraplegin mutations in sporadic adult-onset upper motor neuron syndromes. *Neurology*, 71: 1500–1505.

133. Roxburgh RH, Marquis-Nicholson R, Ashton F, George AM, Lea RA, Eccles D, Mossman S, Bird T, Van Gassen KL, Kamsteeg EJ, Love DR. (2013) The p.Ala510Val mutation in the SPG7 (paraplegin) gene is the most common mutation causing adult onset neurogenetic disease in patients of British ancestry. *J Neurol*, 260: 1286–1294.
134. Choquet K, Tétreault M, Yang S, La Piana R, Dicaire M-J, Vanstone MR, Mathieu J, Bouchard J-P, Rioux M-F, Rouleau GA, Boycott KM, Majewski J, Brais B. (2016) SPG7 mutations explain a significant proportion of French Canadian spastic ataxia cases. *Eur J Hum Genet*, 24: 1016–1021.
135. Pfeffer G, Pyle A, Griffin H, Miller J, Wilson V, Turnbull L, Fawcett K, Sims D, Eglon G, Hadjivassiliou M, Horvath R, Németh A, Chinnery PF. (2015) SPG7 mutations are a common cause of undiagnosed ataxia. *Neurology*, 84: 1174–1177.
136. Pfeffer G, Gorman GS, Griffin H, Kurzawa-Akanbi M, Blakely EL, Wilson I, Sitarz K, Moore D, Murphy JL, Alston CL, Pyle A, Coxhead J, Payne B, Gorrie GH, Longman C, Hadjivassiliou M, McConville J, Dick D, Imam I, et al. (2014) Mutations in the SPG7 gene cause chronic progressive external ophthalmoplegia through disordered mitochondrial DNA maintenance. *Brain*, 137: 1323–1336.
137. Schüle R, Schlipf N, Synofzik M, Klebe S, Klimpe S, Hehr U, Winner B, Lindig T, Dotzer A, Riess O, Winkler J, Schöls L, Bauer P. (2009) Frequency and phenotype of SPG11 and SPG15 in complicated hereditary spastic paraplegia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 80: 1402–1404.
138. Schneider SA, Mummery CJ, Mehrabian M, Houlden H, Bain PG, Neurogenetics M, Kingdom U, Cross C, Campus H. (2012) SPG11 Presenting with Tremor. *Tremor Other Hyperkinetic Movements*, 2: tre-02-104-666-1.
139. Anheim M, Lagier-Tourenne C, Stevanin G, Fleury M, Durr A, Namer IJ, Denora P, Brice A, Mandel JL, Koenig M, Tranchant C. (2009) SPG11 spastic paraplegia: A new cause of juvenile parkinsonism. *J Neurol*, 256: 104–108.

140. Riverol M, Samaranch L, Pascual B, Pastor P, Irigoyen J, Pastor MA, De Castro P, Masdeu JC. (2009) Forceps minor region signal abnormality ‘ears of the lynx’: An early MRI finding in spastic paraparesis with thin corpus callosum and mutations in the spatacsin gene (SPG11) on chromosome 15. *J Neuroimaging*, 19: 52–60.
141. Montecchiani C, Pedace L, Lo Giudice T, Casella A, Mearini M, Gaudiello F, Pedroso JL, Terracciano C, Caltagirone C, Massa R, St. George-Hyslop PHS, Barsottini OGP, Kawarai T, Orlacchio A. (2016) ALS5/SPG11/KIAA1840 mutations cause autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain*, 139: 73–85.
142. Su XW, Broach JR, Connor JR, Gerhard GS, Simmons Z. (2014) Genetic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: Implications for clinical practice and research. *Muscle Nerve*, 49: 786–803.
143. Pérez-Brangulí F, Mishra HK, Prots I, Havlicek S, Kohl Z, Saul D, Rummel C, Dorca-Arevalo J, Regensburger M, Graef D, Sock E, Blasi J, Groemer TW, Schlötzer-Schrehardt U, Winkler J, Winner B. (2014) Dysfunction of spatacsin leads to axonal pathology in SPG11-linked hereditary spastic paraplegia. *Hum Mol Genet*, 23: 4859–4874.
144. Branchu J, Boutry M, Sourd L, Depp M, Leone C, Corriger A, Vallucci M, Esteves T, Matusiak R, Dumont M, Muriel M-P, Santorelli FM, Brice A, El Hachimi KH, Stevanin G, Darios F. (2017) Loss of spatacsin function alters lysosomal lipid clearance leading to upper and lower motor neuron degeneration. *Neurobiol Dis*, 102: 21–37.
145. Samaranch L, Riverol M, Masdeu JC, Lorenzo E, Vidal-Taboada JM, Irigoyen J, Pastor MA, De Castro P, Pastor P. (2008) SPG11 compound mutations in spastic paraparesis with thin corpus callosum. *Neurology*, 71: 332–336.

146. Paisan-ruiz C, Dogu O, Yilmaz A, Houlden H. (2009) SPG11 mutations are common in familial cases of complicated hereditary spastic paraplegia. *Neurology*, 70: 1384–1389.
147. Koutsis G, Lynch DS, Tucci A, Houlden H, Karadima G, Panas M. (2015) A novel ABCD1 mutation detected by next generation sequencing in presumed hereditary spastic paraplegia: A 30-year diagnostic delay caused by misleading biochemical findings. *J Neurol Sci*, 355: 199–201.
148. Zhan ZX, Liao XX, Du J, Luo YY, Hu ZT, Wang JL, Yan XX, Zhang JG, Dai MZ, Zhang P, Xia K, Tang BS, Shen L. (2013) Exome sequencing released a case of X-linked adrenoleukodystrophy mimicking recessive hereditary spastic paraplegia. *Eur J Med Genet*, 56: 375–378.
149. Israel H, Ostendorf F, Stiepani H, Ploner CJ. (2005) Spinal Cord Atrophy in Adrenomyeloneuropathy. *Arch Neurol*, 62: 1157.
150. Aghakhanyan G, Martinuzzi A, Frijia F, Vavla M, Hlavata H, Baratto A, Martino N, Paparella G, Montanaro D. (2014) Brain white matter involvement in hereditary spastic paraplegias: analysis with multiple diffusion tensor indices. *AJNR Am J Neuroradiol*, 35: 1533–1538.
151. Sehgal R, Sharma S, Sankhyan N, Kumar A, Gulati S. (2011) Teaching NeuroImages: Selective corticospinal tract involvement in late-onset Krabbe disease. *Neurology*, 77: e20–e20.
152. Leite CC, Lucato LT, Santos GT, Kok F, Brandão AR, Castillo M. (2014) Imaging of adult leukodystrophies. *Arq Neuropsiquiatr*, 72: 625–632.

153. Kara E, Tucci A, Manzoni C, Lynch DS, Elpidorou M, Bettencourt C, Chelban V, Manole A, Hamed SA, Haridy NA, Federoff M, Preza E, Hughes D, Pittman A, Jaunmuktane Z, Brandner S, Xiromerisiou G, Wiethoff S, Schottlaender L, Proukakis C, Morris H, Warner T, Bhatia KP, Korlipara LV, Singleton AB, Hardy J, Wood NW, Lewis PA, Houlden H. (2016) Genetic and phenotypic characterization of complex hereditary spastic paraplegia. *Brain*, 139: 1904–1918.
154. Dick KJ, Eckhardt M, Paisán-Ruiz C, Alshehhi AA, Proukakis C, Sibtain NA, Maier H, Sharifi R, Patton MA, Bashir W, Koul R, Raeburn S, Gieselmann V, Houlden H, Crosby AH. (2010) Mutation of FA2H underlies a complicated form of hereditary spastic paraplegia (SPG35). *Hum Mutat*, 31: E1251-1260.
155. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, Von Mering C. (2015) STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*, 43: D447–D452.
156. Steinberg KM, Yu B, Koboldt DC, Mardis ER, Pamphlett R. (2015) Exome sequencing of case-unaffected-parents trios reveals recessive and de novo genetic variants in sporadic ALS. *Sci Rep*, 5: 9124.
157. Cady J, Allred P, Bali T, Pestronk A, Goate A, Miller TM, Mitra RD, Ravits J, Harms MB, Baloh RH. (2015) Amyotrophic lateral sclerosis onset is influenced by the burden of rare variants in known amyotrophic lateral sclerosis genes. *Ann Neurol*, 77: 100–113.
158. Kenna KP, McLaughlin RL, Byrne S, Elamin M, Heverin M, Kenny EM, Cormican P, Morris DW, Donaghy CG, Bradley DG, Hardiman O. (2013) Delineating the genetic heterogeneity of ALS using targeted high-throughput sequencing. *J Med Genet*, 50: 776–783.

159. Krüger S, Battke F, Sprecher A, Munz M, Synofzik M, Schöls L, Gasser T, Grehl T, Prudlo J, Biskup S. (2016) Rare Variants in Neurodegeneration Associated Genes Revealed by Targeted Panel Sequencing in a German ALS Cohort. *Front Mol Neurosci*, 9: 92.
160. Mitsumoto H, Nagy PL, Gennings C, Murphy J, Andrews H, Goetz R, Floeter MK, Hupf J, Singleton J, Barohn RJ, Nations S, Shoesmith C, Kasarskis E, Factor-Litvak P. (2015) Phenotypic and molecular analyses of primary lateral sclerosis. *Neurol Genet*, 1: e3.
161. Muyderman H, Chen T. (2014) Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis - A valid pharmacological target? *Br J Pharmacol*, 171: 2191–2205.
162. Sabatelli M, Marangi G, Conte A, Tasca G, Zollino M, Lattante S. (2016) New ALS-related genes expand the spectrum paradigm of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol*, 26: 266-275.
163. Bannwarth S, Ait-El-Mkadem S, Chausseot A, Genin EC, Lacas-Gervais S, Fragaki K, Berg-Alonso L, Kageyama Y, Serre V, Moore DG, Verschueren A, Rouzier C, Le Ber I, Augé G, Cochaud C, Lespinasse F, N'Guyen K, de Septenville A, Brice A, Yu-Wai-Man P, Sesaki H, Pouget J, Paquis-Flucklinger V (2014) A mitochondrial origin for frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis through CHCHD10 involvement. *Brain*, 137: 2329–2345.
164. Ronchi D, Garone C, Bordoni A, Gutierrez Rios P, Calvo SE, Ripolone M, Ranieri M, Rizzuti M, Villa L, Magri F, Corti S, Bresolin N, Mootha VK, Moggio M, Dimauro S, Comi GP, Sciacco M. (2012) Next-generation sequencing reveals DDUOX1 mutations in adult patients with mitochondrial DNA multiple deletions. *Brain*, 135: 3404–3415.

165. Artuso L, Zoccolella S, Favia P, Amati A, Capozzo R, Logroscino G, Serlenga L, Simone I, Gasparre G, Petruzzella V. (2013) Mitochondrial genome aberrations in skeletal muscle of patients with motor neuron disease. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, 14: 261–266.
166. Stumpf JD, Saneto RP, Copeland WC. (2013) Clinical and Molecular Features of POLG-Related Mitochondrial Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5: a011395–a011395.
167. Palmieri F. (2008) Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: A review. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*, 1777: 564–578.
168. Chinnery PF. (2015) Mitochondrial disease in adults: what's old and what's new? *EMBO Mol Med*, 7: 1503–1512.
169. Yang Y, Zhang L, Lynch DR, Lukas T, Ahmeti K, Sleiman PMA, Ryan E, Schadt KA, Newman JH, Deng H-X, Siddique N, Siddique T. (2016) Compound heterozygote mutations in SPG7 in a family with adult-onset primary lateral sclerosis. *Neurol Genet*, 2: e60.
170. Gurvitz A, Hartig A, Ruis H, Hamilton B, de Couet HG. (2002) Preliminary characterisation of DML1, an essential *Saccharomyces cerevisiae* gene related to misato of *Drosophila melanogaster*. *FEMS Yeast Res*, 2: 123–135.
171. Miklos GL, Yamamoto M, Burns RG, Maleszka R. (1997) An essential cell division gene of *Drosophila*, absent from *Saccharomyces*, encodes an unusual protein with tubulin-like and myosin-like peptide motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 5189–5194.
172. Mottier-Pavie V, Cenci G, Verni F, Gatti M, Bonaccorsi S. (2011) Phenotypic analysis of misato function reveals roles of noncentrosomal microtubules in *Drosophila* spindle formation. *J Cell Sci*, 124: 706–717.

173. Kimura M, Okano Y. (2007) Human Misato regulates mitochondrial distribution and morphology. *Exp Cell Res*, 313: 1393–1404.
174. Chiara F, Castellaro D, Marin O, Petronilli V, Brusilow WS, Juhaszova M, Sollott SJ, Forte M, Bernardi P, Rasola A. (2008) Hexokinase II Detachment from Mitochondria Triggers Apoptosis through the Permeability Transition Pore Independent of Voltage-Dependent Anion Channels. *PLoS One*, 3: e1852.
175. Nasca A, Scotton C, Zaharieva I, Neri M, Selvatici R, Magnusson OT, Gal A, Weaver D, Rossi R, Armaroli A, Pane M, Phadke R, Sarkozy A, Muntoni F, Hughes I, Cecconi A, Hajnóczky G, Donati A, Mercuri E, et al. (2017) Recessive mutations in *MSTO1* cause mitochondrial dynamics impairment, leading to myopathy and ataxia. *Hum Mutat*, 38: 970–977.
176. Tyynismaa H, Ylikallio E, Patel M, Molnar MJ, Haller RG, Suomalainen A. (2009) A Heterozygous Truncating Mutation in *RRM2B* Causes Autosomal-Dominant Progressive External Ophthalmoplegia with Multiple mtDNA Deletions. *Am J Hum Genet*, 85: 290–295.
177. Bonifert T, Karle KN, Tonagel F, Batra M, Wilhelm C, Theurer Y, Schoenfeld C, Kluba T, Kamenisch Y, Carelli V, Wolf J, Gonzalez MA, Speziani F, Schule R, Zuchner S, Schols L, Wissinger B, Synofzik M. (2014) Pure and syndromic optic atrophy explained by deep intronic *OPA1* mutations and an intralocus modifier. *Brain*, 137: 2164–2177.
178. Spiegel R, Saada A, Flannery PJ, Burté F, Soiferman D, Khayat M, Eisner V, Vladovski E, Taylor RW, Bindoff LA, Shaag A, Mandel H, Schuler-Furman O, Shalev SA, Elpeleg O, Yu-Wai-Man P. (2016) Fatal infantile mitochondrial encephalomyopathy, hypertrophic cardiomyopathy and optic atrophy associated with a homozygous *OPA1* mutation. *J Med Genet*, 53: 127–131.

179. Fogel BL, Satya-Murti S, Cohen BH. (2016) Clinical exome sequencing in neurologic disease. *Neurol Clin Pract*, 6: 164–176.
180. Warman Chardon J, Beaulieu C, Hartley T, Boycott KM, Dymment DA. (2015) Axons to Exons: the Molecular Diagnosis of Rare Neurological Diseases by Next-Generation Sequencing. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 15: 64.
181. Balicza P, Grosz Z, Gonzalez MA, Bencsik R, Pentelenyi K, Gal A, Varga E, Klivenyi P, Koller J, Züchner S, Molnar JM. (2016) Genetic background of the hereditary spastic paraplegia phenotypes in Hungary - An analysis of 58 probands. *J Neurol Sci*, 364: 116-121.
182. Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F, Das K, Toy T, Harry B, Yourshaw M, Fox M, Fogel BL, Martinez-Agosto JA, Wong DA, Chang VY, Shieh PB, Palmer CG, Dipple KM, Grody WW, Vilain E, Nelson SF. (2014) Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *JAMA*, 312: 1880–1887.
183. Ghaoui R, Cooper ST, Lek M, Jones K, Corbett A, Reddel SW, Needham M, Liang C, Waddell LB, Nicholson G, O’Grady G, Kaur S, Ong R, Davis M, Sue CM, Laing NG, North KN, MacArthur DG, Clarke NF. (2015) Use of Whole-Exome Sequencing for Diagnosis of Limb-Girdle Muscular Dystrophy. *JAMA Neurol*, 72: 1424.
184. Klein CJ, Foroud TM, Lanier WL, Jopke TL, Sankey KD, Smith NM. (2017) Neurology Individualized Medicine: When to Use Next-Generation Sequencing Panels. *Mayo Clin Proc*, 92: 292-305.
185. van Egmond ME, Lugtenberg CHA, Brouwer OF, Contarino MF, Fung VSC, Heiner-Fokkema MR, van Hilten JJ, van der Hout AH, Peall KJ, Sinke RJ, Roze E, Verschuuren-Bemelmans CC, Willemsen MA, Wolf NI, Tijssen MA, de Koning TJ. (2017) A post hoc study on gene panel analysis for the diagnosis of dystonia. *Mov Disord*, 32: 569–575.

186. Monies D, Abouelhoda M, AlSayed M, Alhassnan Z, Alotaibi M, Kayyali H, Al-Owain M, Shah A, Rahbeeni Z, Al-Muhaizea MA, Alzaidan HI, Cupler E, Bohlega S, Faqeih E, Faden M, Alyounes B, Jaroudi D, Goljan E, Elbardisy H, Akilan A, Albar R, Aldhalaan H, Gulab S, Chedrawi A, Al Saud BK, Kurdi W, Makhseed N, Alqasim T, El Khashab HY, Al-Mousa H, Alhashem A, Kanaan I, Algoufi T, Alsaleem K, Basha TA, Al-Murshedi F, Khan S, Al-Kindy A, Alnemer M, Al-Hajjar S, Alyamani S, Aldhekri H, Al-Mehaidib A, Arnaout R, Dabbagh O, Shagrani M, Broering D, Tulbah M, Alqassmi A, Almugbel M, AlQuaiz M, Alsaman A, Al-Thihli K, Sulaiman RA, Al-Dekhail W, Alsaegh A, Bashiri FA, Qari A, Alhomadi S, Alkuraya H, Alsebayel M, Hamad MH, Szonyi L, Abaalkhail F, Al-Mayouf SM, Almojalli H, Alqadi KS, Elsiesy H, Shuaib TM, Seidahmed MZ, Abosoudah I, Akleh H, AlGhonaïum A, Alkharfy TM, Al Mutairi F, Eyaid W, Alshanbary A, Sheikh FR, Alsohaibani FI, Alsonbul A, Al Tala S, Balkhy S, Bassiouni R, Alenizi AS, Hussein MH, Hassan S, Khalil M, Tabarki B, Alshahwan S, Oshi A, Sabr Y, Alsaadoun S, Salih MA, Mohamed S, Sultana H, Tamim A, El-Haj M, Alshahrani S, Bubshait DK, Alfadhel M, Faquih T, El-Kalioby M, Subhani S, Shah Z, Moghrabi N, Meyer BF, Alkuraya FS. (2017) The landscape of genetic diseases in Saudi Arabia based on the first 1000 diagnostic panels and exomes. *Hum Genet*, 136: 921–939.
187. Philippakis AA, Azzariti DR, Beltran S, Brookes AJ, Brownstein CA, Brudno M, Brunner HG, Buske OJ, Carey K, Doll C, Dumitriu S, Dyke SO, den Dunnen JT, Firth HV, Gibbs RA, Girdea M, Gonzalez M, Haendel MA, Hamosh A, Holm IA, Huang L, Hurles ME, Hutton B, Krier JB, Misyura A, Mungall CJ, Paschall J, Paten B, Robinson PN, Schiettecatte F, Sobreira NL, Swaminathan GJ, Taschner PE, Terry SF, Washington NL, Züchner S, Boycott KM, Rehm HL. (2015) The Matchmaker Exchange: A Platform for Rare Disease Gene Discovery. *Hum Mutat*, 36: 915–921.
188. Gonzalez M, Falk MJ, Gai X, Postrel R, Schüle R, Zuchner S. (2015) Innovative Genomic Collaboration Using the GENESIS (GEM.app) Platform. *Hum Mutat*, 36: 950–956.

189. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P, Berg JS, Brown KK, Deignan JL, Friez MJ, Funke BH, Hegde MR, Lyon E, Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics Laboratory Quality Assurance Committee the WG of the AC of MG and GLQA. (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med*, 15: 733–747.
190. Su Y, Howard HC, Borry P. (2011) Users' motivations to purchase direct-to-consumer genome-wide testing: An exploratory study of personal stories. *J Community Genet*, 2: 135–146.
191. Nicholls SG, Wilson BJ, Craigie SM, Etchegary H, Castle D, Carroll JC, Potter BK, Lemyre L, Little J, Scherer S. (2013) Public attitudes towards genomic risk profiling as a component of routine population screening. *Genome*, 56: 626–633.
192. Baptista NM, Christensen KD, Alexis Carere D, Broadley SA, Scott Roberts J, Green RC. (2016) Adopting genetics: motivations and outcomes of personal genomic testing in adult adoptees. *Genet Med*, 18: 924-932.
193. Middleton A, Morley KI, Bragin E, Firth H V, Hurles ME, Wright CF, Parker M. (2015) Attitudes of nearly 7000 health professionals, genomic researchers and publics toward the return of incidental results from sequencing research. *Eur J Hum Genet*, 24: 21–29.
194. Shahmirzadi L, Chao EC, Palmaer E, Parra MC, Tang S, Gonzalez KDF. (2014) Patient decisions for disclosure of secondary findings among the first 200 individuals undergoing clinical diagnostic exome sequencing. *Genet Med*, 16: 395–399.
195. Carere DA, Couper MP, Crawford SD, Kalia SS, Duggan JR, Moreno TA, Mountain JL, Roberts JS, Green RC. (2014) Design, methods, and participant characteristics of the Impact of Personal Genomics (PGen) Study, a prospective cohort study of direct-to-consumer personal genomic testing customers. *Genome Med*, 6: 96.

196. Bloss CS, Darst BF, Topol EJ, Schork NJ. (2011) Direct-to-consumer personalized genomic testing. *Hum Mol Genet*, 20: R132–R141.
197. Henneman L, Vermeulen E, Van El CG, Claassen L, Timmermans DR, Cornel MC. (2012) Public attitudes towards genetic testing revisited: comparing opinions between 2002 and 2010. *Eur J Hum Genet*, 21: 793-799.
198. Kolor K, Duquette D, Zlot A, Foland J, Anderson B, Giles R, Wrathall J, Khoury MJ. (2012) Public awareness and use of direct-to-consumer personal genomic tests from four state population-based surveys, and implications for clinical and public health practice. *Genet Med*, 14: 860–867.
199. Bloss CS, Ornowski L, Silver E, Cargill M, Vanier V, Schork NJ, Topol EJ. (2010) Consumer perceptions of direct-to-consumer personalized genomic risk assessments. *Genet Med*, 12: 556–566.
200. Bowling B V., Acra EE, Wang L, Myers MF, Dean GE, Markle GC, Moskalik CL, Huether CA. (2008) Development and Evaluation of a Genetics Literacy Assessment Instrument for Undergraduates. *Genetics*, 178: 15–22.
201. Furr LA, Kelly SE. (1999) The Genetic Knowledge Index: Developing a Standard Measure of Genetic Knowledge. *Genet Test*, 3: 193–199.
202. Ostergren JE, Gornick MC, Carere DA, Kalia SS, Uhlmann WR, Ruffin MT, Mountain JL, Green RC, Roberts JS. (2015) How Well Do Customers of Direct-to-Consumer Personal Genomic Testing Services Comprehend Genetic Test Results? Findings from the Impact of Personal Genomics Study. *Public Health Genomics*, 18: 216–224.
203. Christensen KD, Roberts JS, Uhlmann WR, Green RC. (2011) Changes to perceptions of the pros and cons of genetic susceptibility testing after APOE genotyping for Alzheimer disease risk. *Genet Med*, 13: 409–414.

204. Meisel SF, Carere DA, Wardle J, Kalia SS, Moreno TA, Mountain JL, Roberts JS, Green RC. (2015) Explaining, not just predicting, drives interest in personal genomics. *Genome Med*, 7: 74.

XI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

1.) Balicza P, Grosz Z, Gonzalez MA, Bencsik R, Pentelenyi K, Gal A, Varga E, Klivenyi P, Koller J, Züchner S, Molnar MJ. (2016) Genetic background of the hereditary spastic paraparesis phenotypes in Hungary - An analysis of 58 probands. J Neurol Sci, 364:116-121. IF: **2,295**

2.) Gal A, Balicza P, Weaver D, Naghdi S, Joseph SK, Várnai P, Gyuris T, Horváth A, Nagy L, Seifert EL, Molnar MJ, Hajnóczky G. (2017) MSTO1 is a cytoplasmic pro-mitochondrial fusion protein, whose mutation induces myopathy and ataxia in humans. EMBO Mol Med, 9: 967-984. IF: **9,249**

A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk

1.) Bock I, Németh K, Pentelényi K, Balicza P, Balázs A, Molnár MJ, Román V, Nagy J, Lévay G, Kobolák J, Dinnyés A. (2016) Targeted next generation sequencing of a panel of autism-related genes identifies an EHMT1 mutation in a Kleefstra syndrome patient with autism and normal intellectual performance. Gene, 595: 131-141. IF: **2,415**

2.) Szatmari B, Balicza P, Nemeth G, Molnár MJ. (2017) The Panomics Approach in Neurodegenerative Disorders. Curr Med Chem, epub ahead of print. IF: -

3.) Balicza P, Bereznai B, Takáts A, Klivényi P, Dibó G, Hidas E, Balogh I, Molnár MJ. Az LRRK2 gyakori G2019S-mutációjának hiánya 120, korai kezdetű magyar Parkinson-beteg esetében. (2012) Idegyogy Sz, 65: 239-242. IF: **0,348**

4.) Györfi O, Moarcas M, Balicza P, Macerollo A, Struhal W, Sellner J. (2016) European junior neurologists perceive various shortcomings in current residency curricula. Acta Neurol Scand, 134:232-237. IF: **3,087**

XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni legelőször témavezetőmnek, Prof. Dr. Molnár Mária Juditnak, aki kezdetektől támogatót és motivált munkámban, és akihez minden helyzetben segítségért fordulhattam. Köszönettel tartozom a Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetében minden munkatársamnak, akikkel együtt dolgozhattam az évek során, és akik nélkül nem valósultak volna meg ezek a vizsgálatok: a biológus, laboros kollégáknak, az orvos kollégáknak, valamint az Intézet életét szervező valamennyi kollégának egyaránt. Külön köszönöm Dr. Gál Anikónak, hogy az évek folyamán mindvégig kitartóan terelgetett, valamint Dr. Pentelényi Klárának, Bencsik Renátának, Hársfalvi Viviennek, Illés Anettnek az NGS vizsgálatokhoz kapcsolódó munkájukat. Köszönöm dr. Grosz Zoltánnak és dr. Lengyel Andrásnak, hogy klinikai tudásukkal segítettek. Köszönöm Stephan Züchnernek, hogy lehetőséget biztosított arra, hogy a Hussman Institute for Human Genomics-nál tanuljak három hónapot. Köszönöm Michael J Gonzaleznek, valamint dr. Koller Júliának az informatikai elemzésben nyújtott segítségüket, valamint dr. Terebessy Andrásnak a kérdőíves vizsgálat kiértékelésében nyújtott segítségét. Köszönöm továbbá valamennyi neurológus kollégának, aki beteget delegált a vizsgálatokba, és nem utolsó sorban a betegeknek és a kérdőívet kitöltőknek a bizalmat. Köszönöm feleségemnek, Balicza-Ripka Eszternek, és gyermekeimnek, Rózának és Gáspárnak a megtartó szeretetüket.

Kutatásomhoz anyagi támogatást nyújtott a KTIA_13_NAP-A-III/6 Nemzeti Agykutatási Program.