

# Az autizmus spektrum zavar genetikai hátterének vizsgálata egy magyar betegpopulációban

PhD Tézisek

**Dr. Varga Noémi Ágnes**

Semmelweis Egyetem  
Szentágothai János Idegtudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Molnár Mária Judit, DSc, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Szuromi Bálint, PhD, egyetemi adjunktus  
Vellainé Dr. Takács Krisztina, PhD, egyetemi  
docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Farkas Viktor, PhD, tudományos  
főmunkatárs

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sipos Ildikó, PhD, egyetemi docens  
Dr. Liptai Zoltán, PhD, főorvos

Budapest  
2020

# BEVEZETÉS

## **Az autizmus spektrum zavar genetika háttere**

Az autizmus spektrum zavar (ASD) az idegrendszer fejlődési zavarának tekinthető, mely két kardinális funkció minőségi zavarával határozható meg, ezek: a társas kapcsolatokban és kommunikációban tartósan fennálló elmaradás, illetve a szűk körű, sztereotip, repetitív érdeklődési és cselekvési mintázatok. A fenotípus heterogenitása mellett, etiológiai háttere is nagyon komplex és heterogén. Magas heritabilitása (64-91%) erős genetikai háttér jelenlétére utal. ASD-vel összefüggésben leírt genetikai elváltozások között kromoszóma rendellenességek, kópiaszám elváltozások (CNV) és szekvencia eltérések is kimutathatóak. Genetikai háttérét tekintve a gyakori és ritka genetikai eltérések szerepe egyaránt felvethető. A SFARI adatbázis szerint, eddig több mint 1000, különböző celluláris jelátviteli úton funkcionáló, gént asszociáltak ASD-vel. Genetikai tényezőit több más pszichiátriai betegség hátterében is kimutatták, ezért feltételezhető egy közös genetikai hajlam jelenléte.

Régóta áhított cél, hogy a nagyon heterogén és változatos tünetekben megnyilvánuló betegségeken belül fenotípusos alcsoportokat azonosítsanak, melyekhez genetikai szinten bizonyos tünetekért felelős variánsokat lehet kapcsolni. A klinikai és genetikai alapon történő alcsoportra bontásának fontos szerepe van a patomechanizmus és a személyreszabott kezelési lehetőségek megismerésében. Génenkénti alcsoportképzés lehetséges, de a monogénes formák külön-külön csak az esetek elenyésző hányadát képesek magyarázni. Klasszikus definíció szerint szindrómás ASD formáról beszélünk abban az esetben, ha egy klinikailag jól meghatározható szindróma társtüneteként jelentkezik ASD, ez az össz-ASD esetek kb. 10%-ban áll fenn. A szindrómás és monogénes formák együttesen is csak az esetek 25%-át magyarázzák.

A mitochondriális diszfunkció egy régóta észlelt biokémiai elváltozást ASD esetén. Ennek ellenére primer mitochondriális betegség csak az esetek elenyésző hányadában detektálható. ASD-ben a gyakran észlelt mitochondriális diszfunkció eredete kérdéses. Primer mitochondriális betegség (MD) akkor alakul ki, ha a

mitochondriális DNS (mtDNS), illetve a sejtmagi DNS mitochondriális fehérjéket kódoló része károsodik. Mitochondriális diszfunkció azonban észlelhető olyan gének mutációja következtében, melyek közvetlenül nem kapcsolhatóak a mitochondriális funkcióhoz, illetve létrejöhetnek környezeti hatások következményeképpen is. Ez utóbbi esetben szekunder mitochondriális diszfunkcióról beszélünk. Mitochondriális diszfunkció mind szindrómás és nem-szindrómás ASD forma részjelenségeként leírásra került.

## CÉLKITŰZÉSEK

Célkitűzéseinket az alábbi pontokban fogalmaztuk meg:

1. Az ASD-vel korábban asszociált gének eltéréseinek és a társuló fenotípusnak az elemzése, genetikai háttér stratifikációja a magyar ASD gyermekekben.
2. A ritka monogénes formák gyakoriságának elemzése.
3. A kohorsz szintjén detekált ritka variánsok jelentőségének megítélése, génenkénti szignifikanciaszint meghatározása.
4. Ritka variáns terheltség meghatározása és korreláltatása ASD súlyosságával.
5. Fenotípusos klaszterek detektálása és ezek genetikai hátterének meghatározása a detektált ritka variánsok függvényében.
6. Az mtDNS eltérések gyakoriságának meghatározása ASD-ben, illetve ezek etiológiai hátterének vizsgálata.

## MÓDSZEREK

### **Genetikai kutatásunk során vizsgálat betegek**

Betegeinket a Vadaskert Gyermek- és Ifjúságpszichiátriai Kórház és Szakambulancia betegei közül válogattuk. Összesen 174 ASD beteg került beválasztásra sikeres vérvétel után. A betegbeválasztás során a belgyógyászati és neurológiai státuszfelmérés mellett, Méhes skála alapján rögzítettük a minor fizikális anomáliák (MPA) jelenlétét. Klinikai és önkitöltős kérdőívek segítségével az addig kapott adatokat, anamnesztikus adatokkal egészítettük ki. Az ASD diagnózisát a vizsgálatban közreműködő szakambulancia állította fel standard diagnosztikus eszközök segítségével, (ADI-R = Autism Diagnostic Interview-Revised) és ADOS = Autism Diagnostic Observation Schedule).

A mitochondriális diszfunkció ASD-ben betöltött szerepének vizsgálatához 60 ASD gyermek és 60 idősebb, egészséges kontroll személy mtDNS deléció és hotspotok szűrésének eredményét hasonlítottuk össze. Az ASD-ben detektált mtDNS deléció háttérének feltérképezéséhez, a primer okok kizárására,

intergenomiális kommunikációban szerepet játszó génpanelt alkalmaztunk. A deléció jelentőségének meghatározása céljából 3 különböző kontroll csoportot alkalmaztunk: egészséges kontrollt, mitochondriális betegséggel diagnosztizált ASD-vel nem rendelkező kontrollt, illetve mtDNS delécióval nem rendelkező ASD kontrollt.

### **Genetikai vizsgálatokhoz alkalmazott módszerek**

A genetikai vizsgálatokhoz a DNS izolálás vérből történt QIAmp DNA blood kit segítségével. A Fragilis-X-szindróma szűrésére Amplidex FMR1 PCR kit-et használtunk. 101 ASD-vel asszociált gént vizsgáltunk Illumina MiSeq NGS platformon, TruSight Autism Rapid Capture Kit alkalmazásával, illetve SureSelect QTX Kittal. Futásonként 24 minta került vizsgálatra, 135x-ös átlaglefedettségel, így a target szekvenciák 90%-ban legalább 20x lefedettséget értünk el. A patogén (P) és valószínűleg patogén (LP) mutációk esetében Sanger szekvenálással validálás és elérhető felmenők esetén szegregációs vizsgálat készült. Az mtDNS deléció meghatározás long range PCR-el történt.

## **Bioinformatikai és statisztikai analízisünk módszerei**

A szignifikanciaszint meghatározására Yates korrelációs  $\chi^2$  próbát végeztünk. A nyers szekvencia adatokat Picard parancssori alkalmazás lépéseivel szűrtük. A kapott FASTQ fájlok már tartalmazzák a szekvenciák minőségi mutatóit is, ezek hg19 referencia genomhoz való illesztése utána BAM fájlokat nyertünk. Az illesztéshez BWA-mem szoftvert használtunk. A variáns hívás 3 lépésben a GATK HaplotypeCaller szoftver alkalmazásával történt. A VCF fájl (variant calling file) által tartalmazott variánsok értékeléséhez annotációra van szükség, melyhez a SnpEff szoftvert használtuk. Csak a gén kanonikus transzkriptjében szereplő variánsok kerültek elemzésre, ezek közül is azokat melyeket a bioinformatikai elemzés megfeleltként (PASS) jelölt (RD>10, Mapping quality>40, Quality by depth>2). Variant Analyzer saját szoftverünket használva (Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Dr. Gézsi András) egyéenként szűrtünk a HGMD és ClinVar adatbázisokban patogénnek jelentett variánsokra, majd a nagy és közepes hatású variánsok közül, a szoftver által nyújtott annotációk alapján rangsoroltuk a



variánsokat minor allél frekvencia (MAF <5%), konzervációs GERP score, és különböző reziduális fehérje funkciót prediktáló scoreok alapján. Ritka variánsnak tekintettük, azokat a variánsokat melyek egyetlen homo-, vagy két különböző egyénben heterozigóta formában voltak jelen és a MAF értékük, amennyiben ismert volt, 5% alatti volt az 1000Genom adatbázisban. Káros vagy Loss of Function (LoF) variánsnak tekintettük az exoni frameshiftet, nonsense mutációkat és kanonikus splice mutációkat. A missense mutációk hatását több predikciós annotációval mértük fel. A variánsok klinikai interpretációjában az ACMG irányelveket követtük.

A kohorsz szintjén azonosított ritka variánsok szerepét a „ritka variáns-gyakori betegség” multifaktoriális hipotézis keretrendszerében vizsgáltuk. Először megvizsgáltuk, hogy a ritka variánsok és LoF mutációk száma, génenkénti besorolásban, nagyobb-e az elvárhatónál. A szignifikancia szinthez a SORVA szoftver által számolt P-értéket használtuk. Ezt követően a kohorszunkat meghatározó ritka variáns terheltség

vizsgálata céljából, a géneket rangsoroltuk genetikai intolerancia értékül alapján. Egészen pontosan egy súlyszámot rendeltünk a génekhez a következő képlet használatával:  $[1 - (\text{RVIS percentile} \div 100)]$ . Majd a variáns terheltség meghatározását a  $[\Sigma(\text{variáns} \times \text{gén súlyszáma})]$  képlet alapján végeztük. A ritka variáns terheltség és az ASD súlyossága közötti korreláció megítélésére lineáris regresszió analízist végeztünk, hasonló képpen a ritka variáns terheltség és MPA terheltség korrelációjához is. Az ASD súlyosságának számszerűsítéséhez össz-ADOS pontszámot és kalibrált súlyossági pontszámot (ADOS CSS) használtunk, ehhez 47 ADOS kérdőív állt rendelkezésünkre. A nemek közötti ritka variáns terheltség és szindrómás és nem-szindrómás formák közötti MPA terheltség összehasonlításához kétmintás T-próbát használtunk. A fenotípus kalszter vizsgálatához klinikai és ADI-R kérdőívekből kaptunk adatot. Tekintettel a kohorsz méretére és a várható alacsony klaszterszámra kernel főkomponens analízis (PCA) és spektrális klaszterezés került elvégzésre. Megvizsgáltuk az egyes klaszterekre jellemző változókat is olyan módon, hogy kiszámoltuk az egyes tulajdonságok

jelenlétének relatív gyakoriságát (minden egyes klaszter esetében). A kernel PCA-val az adatot egy három dimenziós térbe képeztük le azért, hogy ábrázolni tudjuk a transzformált mintákat és azt, hogy melyik minta melyik klaszterbe sorolódik. Felvetődött a kérdés, hogy van-e korreláció fenotípusklaszterek és a detektált ritka variánsok között. Ezért a fenotípusok altípusai és a genetika háttér közötti korreláció értékelésére megvizsgáltuk, hogy egy adott gén megfigyelt ritka variánsai megnövekedett gyakorisággal fordulnak-e elő valamelyik klaszterben. Vizsgálatunkhoz ANOVA-t és páros t-próbát használtunk Bonferroni korrekcióval a többszörös hipotézis-vizsgálat miatt.

## EREDMÉNYEK

### **Vizsgálatunk során igazolódott szindrómás ASD formák**

Monogénes hátteret 13 esetben tudtunk vizsgálatunk során igazolni, mely korreláltható a beteg tüneteivel és ezáltal szindrómás ASD forma fennállását igazolja. Négy esetben FXS igazolódott, melyből egy nő nemű. Bár a kislány fenotípusos jegyei alapján felvethető volt FXS, tekintettel két egészséges fiú testvérére előzetesen nem vetődött fel X-hez kötött öröklésmenet. ACMG irányelvek alapján nyolc mutációt értékeltünk patogénnek, hármát valószínűleg patogénnek (LP) és kettőt VUS-nak. Mind a nyolc patogén mutáció esetén a fenotípus jól illeszkedett a detekált genetikai háttérrel, így 4 esetben FXS, egy esetben Dravet-szindróma, egy esetben CHARGE-szindróma, egy esetben Duchenne izomdystrophia és egy atípusos Rett-szindróma igazolódott. Ezen formák legerősebb indikátorai az ASD mellé társuló komorbiditások (IKZ, epilepszia), illetve a MPA-k specifikus konstellációi voltak. A *PTPN11* génben a ClinVar adatbázisban patogénnek minősített,

Noonan szindrómával asszociált missense eltérés igazolódott. A beteg néhány tünete korrelál Noonan szindróma tüneteivel, viszont magassága, nyaki vastagságnak a hiánya és hypertelorismus hiánya nem támasszák alá a diagnózist. Komplet szegregációs vizsgálat végzésére nem volt lehetőségünk, annak ellenére, hogy autoszómális domináns öröklődésment nem volt kizárható. Két esetben különböző fenotípussal LP *RELN* mutációt detektáltunk. Az egyik esetben egy epilepsziával és többszörös MPA-val rendelkező kislány esetében igazolódott *RELN* heterozigóta missense variáns, mely magyarázhatja az autoszómális domináns laterális temporalis lebeny epilepszia (ADLTE) fenotípusát. A domináns öröklődésment igazolt volt, mivel az édesapa szintén hordozta a variánst, epilepszia fenotípusa nélkül, melyet magyarázhat ADLTE esetében ismert csökkent penetrancia. A másik esetben egy *de novo RELN* variánst detektáltunk egy lissencephaliával diagnosztizált ASD tüneteket mutató kislány esetében. A *RELN*-el asszociált lissencephalia fenotípus autoszómális recesszív öröklődésmenttel ismert, mi mégis VUS helyett LP-nek interpretáltuk a variánst igazolt, *de novo*

státusza miatt és mivel a kislány kiegészítő lissencephalia panel vizsgálatán ugyan ez a variáns került megerősítésre. Egy *SPAST* és egy *AUTS2* variánst VUS-nak interpretáltunk. A *SPAST* esetében azért, mert bár LP-ként ismert variánsról van szó, sem a hordozó kislány, sem a kislány, szintén hordozó édesanyja nem rendelkezett a génnel asszociált hereditér spasticus paraparesis tüneteivel. Az *AUTS2* esetében egy eddig ismeretlen, különleges konstellációjú genetikai variáns véltünk összefüggésbe hozni a beteg tüneteivel. Bár az *AUTS2*-vel asszociált epilepsziával és morfológiai elváltozásokkal járó szindróma viszonylag újkeletű, a betegben észlelt két egymás melletti cisz helyzetben jelenlévő mutáció felveti a patogénitás lehetőségét. Komplet szegregációs vizsgálat elvégzésére ebben az esetben sem volt lehetőségünk. A beteget epilepsziás roham következtében elvesztettük.

MPA jelenléte a kohorsz 84%-ban igazolódott, de az igazolt monogénes háttérű ASD-k nem rendelkeztek több MPA-val mint a nem szindrómás formák (4,9 vs. 5,03/fő). Több esetben észleltünk pozitív családi

anamnézist neurológiai és pszichiátriai betegségek tekintetében első- és másodfokú rokonok kapcsolatok szintjén. Az elsőfokú rokonok között ASD 8%-ban, a másodfokúak között 9,7%-ban volt észlelhető.

### **Ritka variánsok kohorsz szintű elemzése**

Összesen 370 szűrési kritériumainkat teljesítő ritka variánst detektáltunk. A 101 vizsgált, kandidáns gén közül 80 esetben észleltünk ritka variánst, melyek közül 44 esetben patogénnek prediktált (CADD  $\geq$  20 vagy SVM = damaging) variáns volt jelen. LoF variánst az *AUTS2*, *CHD7*, *DHCR7*, *DMD*, *GNA14*, *MECP2*, *SHANK2* és *SHANK3* génekben észleltünk, melyek közül az *AUTS2*, *CHD7*, *SHANK2* és *SHANK3* az RVIS értékek alapján intoleránsak a funkcionális variánsokkal szemben, ami a ritka variánsok patogenitását erősíti. A SORVA szoftvert alkalmazva választ kaptunk arra, hogy melyek azok a gének melyekben a ritka variánsok száma, illetve a LoF variánsok száma nagyobb az elvárhatónál. Kohorszunk szintjén az *AUTS2*, *NHS*, *NSD1*, *SLC9A9* és *VPS13B* gének esetében igazolódott szignifikáns összefüggés ASD-vel a variánsszám alapján. Ritka variáns

terheltségben nem észleltünk különbséget a nemek között. 67 beteg esetében (38,5%) nem észleltünk szűrésünknek megfelelő ritka variánst.

### **Ritka variáns terheltség és az ASD súlyosságának korrelációja**

Az nyers ADOS és ADOS-CSS értékek közül, eloszlása miatt a nyers ADOS érték volt alkalmas a regresszió analízisre, mivel a CSS esetén a legtöbb beteg a legsúlyosabb kategóriába sorolódott (8-10 p.). Vizsgálatunk során sem a nyers ADOS érték, sem a MPA terheltség nem mutatott pozitív korrelációt a ritka variáns terheltséggel.

### **Klaszteranalízis és a gének dúsulása a különböző fenotípusklaszterekben**

Spektrális klaszterezési technikát alkalmazva négy fenotípus klasztert azonosítottunk, melyek tüneti szempontból nem teljesen különültek el egymástól, de trendek észlelhetőek voltak, pl. a súlyos beszédhibával társuló ASD, illetve az ADHD-val társuló ASD külön klaszterhez tartozott. A 22 fenotípusjegyből 10 kettő vagy



annál több klasztert jellemzett, így megállapítottuk, hogy jelentős átfedés mutatkozik a detektált klaszterek között. A fenotípusklasztereken belül egyik klaszter esetében sem igazoltunk elkülönülő genetikai hátteret. Szindrómás ASD formáink sem egy klaszterbe csoportosultak.

### **Mitochondriális diszfunkció jelenléte ASD-ben**

Az ASD eseteink 16,6%-ban (10/60) mtDNS deléció jelenléte volt igazolható (mtdel-ASD kohorsz). Az mtDNS deléciót hordozó ASD esetek fenotípusosan jól elkülönültek a fejlődésbeli regresszió és a társuló multiszipstémás érintettség tekintetében az mtDNS deléciót nem hordozó ASD csoporttól. Az mtdel-ASD esetek 80%-ban hordoztak ritka variánst az ASD-vel asszociált génekben. Primér mitochondriális betegséget az IG panel eredményei azonban nem igazoltak. Szindrómás ASD-ben és nem-szindrómás formában is észleltünk mitochondriális diszfunkciót. Mivel primer ok nem volt igazolható, ezt másodlagos eredetűnek tartottuk, melynek hátterében olyan faktorok igazolódtak, mint a CMV fertőzés, illetve nem OXPHOS génekbe eső mutáció.



## KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálatunk során átfogó genetikai vizsgálatot végeztünk 174 magyar ASD beteg esetében, a genetikai háttéren alapuló stratifikáció érdekében. Az NGS panel vizsgálat költséghatékony és alkalmas módszernek bizonyult az olyan komplex és heterogén genetikai hátterű betegségek vizsgálatára, mint az ASD. Az NGS panel szűrés alkalmassága klinikailag nem stratifikált betegpopuláción továbbra is kérdéses a variánsok klinikai interpretációja és nehézkes kockázatbecslés miatt. A vizsgálat ASD kohorsz 10,34%-ban igazolódott monogénes, szindrómás forma, mely megfeleltethető a nemzetközi eredményeknek. Szindrómás ASD formák elemzése során igazoltuk, hogy a tünetek megjelenését több diverz jelátviteli út károsodása eredményezheti, melyek nagyrésze a szinaptikus jelátvitel diszfunkciójával asszociálható. A vizsgált kohorsz 61,5%-ban legalább egy, de általában több ritka genetikai variáns jelenlétét igazoltuk. Ez alapján valószínűsítjük, hogy a végső fenotípus a gén-gén interakciók, a ritka és gyakori variánsok együttes hatásának köszönhetően alakul ki.

Spektrális klaszterezési technikát alkalmazva négy fenotípus klasztert azonosítottunk, melyek tüneti szempontból nem teljesen különültek el egymástól, de trendek észlelhetőek voltak. A ritka variánsok fenotípusjegyek meghatározásában játszott szerepenék megítélése, lehetőséget teremt a molekuláris alcsoportok megismerésére, mely közelebb visz minket a személyre szabott kezelési stratégia kiválasztásához, mindehhez azonban nagyobb esetszámra volna szükség.

Az mtDNS deléció egyike az ASD-val társuló leggyakoribb eltéréseknek, mely általában nem izolált eltérés, hanem egyéb genetikai rendellenességekkel együttesen észlelhető. A mitochondriális diszfunkció mind szindrómás és nem-szindrómás ASD forma részjelenségeként előfordul. A mitochondriális deléció az ASD-val diagnosztizált betegek esetén nem feltétlenül primer intergenomiális kommunikációzavar következménye, háttérben indirekt, szekunder okok is állhatnak, melyet nem az OXPHOS gének károsodása, hanem egyéb káros környezeti faktorok jelenléte magyaráz.

## SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

Balicza P\*, Varga NA\*, Bolgar B, Pentelenyi K, Bencsik R, Gal A, Gezsi A, Prekop Cs, Molnar V, Molnar MJ. (2019) Comprehensive analysis of rare variants of 101 autism-linked genes in a Hungarian cohort of autism spectrum disorder patients. *Front. Genet.* 10:434-15. **IF: 3,517**

Varga NA, Pentelényi K, Balicza P, Gézsi A, Reményi V, Hársfalvi V, Bencsik R, Illés A, Prekop C, Molnár MJ. (2018) Mitochondrial dysfunction and autism: Comprehensive genetic analyses of children with autism and mtDNA deletion. *Behav Brain Funct.* 14:4-14. **IF: 2,457**

Kékesi A\*, Varga NÁ\*, Molnár MJ. (2014) Az autizmus spektrum betegség genetikája *Gyermekgyógyászat.* 65:327-332.

### **A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk**

Varga NÁ, Barsi P, Molnár MJ. (2015) A Leigh-szindróma a genetikailag legheterogénebb mitokondriális betegség. *Gyermekgy. Tov. Szeml.* 20:75-77,3p.

Buza K., Varga NÁ (2016) ParkinsonNET: Estimation of UPDRS Score Using Hubness-Aware Feedforward Neural Networks. *App. Art. Intell.*, 30(6), 541–555. **IF: 0,652**

Tamás G, Kovács N, Varga NÁ, Barsi P, Eröss L, Molnár MJ, Balás I. (2016) Deep brain stimulation or thalamotomy in fragile X-assiciate tremor/ataxia syndrome? Case report. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, 50(4), 303–308. **IF:0,857**

Balicza P, Terebessy A, Grosz Z, Varga NA, Gal A, Fekete BA, Molnar MJ. (2018) Implementation of personalized medicine in Central-Eastern Europe: pitfalls and potentials based on citizen's attitude. *EPMA Journal*, 9(1), 103–112. **IF:3,900**