

# A korai kezdetű demencia genetikai architektúrájának elemzése

Doktori tézisek

**Csabán Dóra**

Semmelweis Egyetem  
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Gunda Bence Barna, Ph.D., egyetemi adjunktus  
Dr. Valikovics Attila, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Kovalszky Ilona, D.Sc., professor emerita

Tagok: Dr. Pikó Henriett, Ph.D., biológus

Dr. Vastagh Ildikó, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest  
2023

## **Bevezetés**

A demencia a neurodegeneráció következtében kialakuló klinikai állapot, egy tünetegyüttes, amely magába foglalhatja többek között a kognitív funkciók, a térbeli tájékozódás, a problémamegoldás és a nyelvi képességek romlását is. A demencia világszerte 55 millió embert érint és évente 1 millió új esetet regisztrálnak, emiatt egyre nagyobb hangsúlyt kap a demencia háttérében álló patomechanizmusok és genetikai eltérések vizsgálata. Bár az esetek csak kis százalékát teszik ki a mendeli öröklésmentű, familiáris korai kezdetű demenciák (fEOD), ezen kórképek vizsgálatai már eddig is kulcsfontosságú szerepet töltek be a demencia háttérében álló patológiai folyamatok megértésében, majd az állatmodellek és a kísérleti terápiák fejlesztésében.

A korai kezdetű demencia (EOD) kifejezés a progresszív neurodegeneratív betegségek egy igen heterogén csoportját foglalja magába az Alzheimer-kórtól (AD) a frontotemporalis demencián (FTD) át a Lewy testes demenciáig (Lewy body dementia - LBD). Az EOD prevalenciáját 119/100.000-re becsülik, és az összes

demencia körülbelül 5-7%-át teszi ki. Tovább árnyalja a képet, hogy a demenciát mint tünetet számos további neurodegeneratív kórkép (Neurodegenerative disorder - NDD) esetén leírták, többek között a Huntington-kór (HD), a Parkinson-kór (PD), az amyotrophias lateralis sclerosis (ALS), és a Creutzfeldt–Jakob-szindróma (CJD) esetében is. A két leggyakoribb EOD az AD és az FTD, melyek egyes fenotípus jegyei nem csak egymással átfedőek, de más NDD-kkel is klinikai és patológiai hasonlóságokat mutatnak. Ez pedig szignifikánsan megnehezíti a korai és pontos diagnózis felállítását.

Az Alzheimer-kór a demenciák 50-75%-át teszi ki, a tünetek megjelenések ideje (AOO) szerint beszélhetünk korai (EOAD) és késői kezdetű Alzheimer-kórról (LOAD: AOO  $\geq$  65 év). A LOAD egy komplex, heterogén genetikai etiológiájú betegség 70-80%-os heritabilitással, míg az EOAD esetén az örökletesség hatása jelentősen magasabb (92-100%). Az EOAD-val eddig asszociált leggyakoribb gének (*APP*, *PSEN1*, *PSEN2*) azonban csak az esetek 5-10%-ában magyarázzák a betegség genetikai hátterét, így további kutatások szükségesek a területen.

A második leggyakoribb korai kezdetű demencia az FTD, melynél szintén jelentős családi halmozódásról beszélhetünk és az esetek 10-30%-ában autoszomális domináns öröklésment figyelhető meg. A familiáris FTD esetén a kialakult tünetegyüttest jelentősen magasabb arányban (30-75%) magyarázza a kórképpel asszociált leggyakoribb gének (*C9ORF72*, *GRN*, *MAPT*) egyikének eltérése.

Az EOD betegeknél megfigyelhető komplex klinikai kép és az egyes demenciával járó kórképek közötti átfedések komoly diagnosztikai kihívást jelentenek. Ebből adódoan kiemelten fontos a lehető legtöbb, különböző demencia formával asszociált gén együttes vizsgálata -főként az atípusos tünetekkel rendelkező betegeknél- a diagnózis gyorsabb felállítása, valamint a tünetek hátterében álló patológiai folyamatok mélyebb megértése az esetleges új terápiás célpontok azonosítása érdekében.

## Célkitűzés

A doktori munkám célkitűzéseit az alábbi pontokban foglalhatjuk össze:

1. A korai kezdetű demencia genetikai hátterének elemzése a magyar betegek körében. Ajánlás kidolgozása a monogénes demencia formák genetikai diagnosztikai útvonalára.
2. Az azonosított genetikai variánsok klasszifikációja, a kórképpel való asszociáció mértékének megállapítása és előfordulási gyakoriságuk analízise.
3. A magyar EOD betegek genotípus-fenotípus korrelációjának elemzése.
4. A demencia és más neurodegeneratív kórképek közötti átfedő patomechanizmus vizsgálata.
5. Az EOD betegek regiszterének kiépítése, *trial-ready* kohort kialakítása.

## **Módszerek**

### A vizsgált betegek

Vizsgálatunkba a 2009 és 2020 közötti időszakból 120 EOD beteg került beválasztásra a Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetének betegségspecifikus biobankjából (NEPSYBANK). A tünetek megjelenésekor a betegek átlagéletkora  $56,05 \pm 6,95$  év volt. Az EOD kohorton belül megkülönböztettünk EOAD (n=49), FTD (n=49) és atípusos demencia (n=22) alcsoportokat. Az alcsoportokba való besorolást a klinikai kép, a rendelkezésre álló képalkotók és kognitív tesztek eredményei alapján végeztük.

Az  $\alpha$ KGDH ( $\alpha$ -ketoglutarát dehidrogenáz) komplex három alegységét 46 beteg esetén vizsgáltuk. Kutatásunk során 35 AD betegeknél perifériás vérből izolált DNS-t és 11 AD páciens esetében post mortem agyszövetből izolált DNS-t vizsgáltunk.

### A kutatás során alkalmazott módszerek

A vizsgálatokhoz a DNS izolálása vérminta esetén a QIAamp DNA Blood kit segítségével történt, az agyszövetek esetén pedig a QIAamp DNA tissue kittel.

Az *APOE* gén alléljainak meghatározása restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (RFLP) módszerrel történt. A *C9ORF72* hexanukleotid repeat expansziójának vizsgálatát repeat-primed PCR-t (RP-PCR) követően fragment analízissel végeztük. A szakirodalom alapján pozitív eredménynek a 30 ismétlődést meghaladó repeat szám minősült. Az intézetünkbe érkezett EOD minták esetében az AD-vel és FTD-vel asszociált leggyakoribb gének vizsgálatát 2009 és 2019 között Sanger szekvenálással végeztük. Ezt követően a *PSEN1*, *PSEN2*, *APP*, *MAPT* és *GRN* gének analízise is újgenerációs szekvenálással (NGS) történt. A Sanger szekvenálás az Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer készülék segítségével történt. NGS esetén a könyvtárkészítéshez a QIAseq Targeted DNA Custom Panels kitet használtuk, a szekvenálást pedig Illumina MiSeq platformon végeztük. Az  $\alpha$ KGDH komplex alegységeit kódoló gének (*DLD* -, *OGDH*, *DLST*) esetén az agyszöveteknél minden betegnél több agyi régióból származó mintából is elvégeztük a vizsgálatot.

Újgenerációs szekvenálással 54 beteg és 137 kontroll egyén genetikai vizsgálatát végeztük el. A vizsgált beteg

kohorton belül 38 beteg esetén volt lehetőségünk célzott panel szekvenálására. Valamint további 16 betegnél volt lehetőségünk teljes exom szekvenálást (WES) végezni. A könyvtákkészítés a célzott panel esetén a SureSelectQXT Target Enrichment for the Illumina Platform reagenssel, a WES vizsgálat esetén pedig az Agilent SureSelectQXT Human All Exon v5 reagenssel készült. A célzott panel szekvenálása MiSeq készüléken, míg a teljes exom szekvenálás az Illumina HiSeq 2500 platformon történt.

Az NGS adatok elemzéséhez a BWA-MEM, a GATK HaplotypeCaller és az SnpEff szoftvert, ClinVar adatbázist, populációs adatbázisokat és saját adatbázist használtuk. A detektált új, még nem leírt variánsok klasszifikálását az ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) által kiadott ajánlás alapján végeztük el.

Az esélyhányados (odds ratio - OR) és a 95%-os konfidencia intervallum (CI) számítását a MedCalc szoftverrel végeztük. Megvizsgáltuk az egyes ritka károsító variánsok (rare damaging variant - RDV) hatását a tünetek megjelenésének idejére. Az alcsoportok AOO-jait ANOVA teszt segítségével hasonlítottuk össze.



## Eredmények

Vizsgálataink során az EOD kohortban a Sanger és újgenerációs szekvenálások eredményeinek elemzése során 15 génben összesen 25 ritka károsító variánst (RDV) azonosítottunk. Ezen variánsok közül patogén eltérésként 10-et, valószínűleg patogénként 6-ot, ismeretlen jelentőségű variánsként (VUS) 8-at és benignusként 1 variánst klasszifikáltunk az ACMG ajánlása szerint. A detektált RDV-k alapján 13 beteg (10,8%) esetében azonosítottunk monogénes demencia formát. További 10 páciensnél (8,3%) azonosítottunk olyan RDV-ket, amelyek rizikófaktorként (RDV-RF) szerepet játszhattak a betegnél kialakult tünetek megjelenésében. A *C9ORF72* génben 8 páciensnél (6,7%) találtunk kóros hexanukleotid ismétlődést. A teljes EOD kohortból így összesen 21 beteg (17,5%) sorolható a monogénes demencia alcsoportba. Az  $\alpha$ KGDH alegységeit kódoló gének (*OGDH*, *DLST*, *DLG*) esetén összesen három heterozigóta ritka misszensz variánst azonosítottunk.

### A ritka károsító variánsok AD-vel vagy FTD-vel asszociált autoszomális domináns öröklésmentel járó génekben

Az AD-vel vagy FTD-vel asszociált autoszomális domináns öröklésmentel génekben szekvenálás során 10 betegnél találtunk ritka kóros eltérést. A tünetek megjelenésekor az átlagéletkor  $49,31 \pm 9,1$  év volt. A családi anamnézisben 6 betegnél szerepelt demencia az elsőfokú rokonoknál. A variánsok közül 5 a ClinVar adatbázisban is szerepelt mint patogén eltérés (*APP* p.V717F; *PSEN2* p.N141I; *GRN* c.708+1G>A; *GRN* p.S226WfsTer28; *GRN* p.R198Gfs\*19). További 4 eltérés a ClinVar adatbázisban ugyan nem szerepelt, de az ACMG kritériumok szerint patogén vagy valószínűleg patogén (*GRN* c.264+2T>C; *PSEN1* p.V89L; *PSEN1* p.G206S; *PSEN1* p.L166R).

### A C9ORF72 hexanukleotid repeat expánzió szerepe az egyes EOD csoportokban

Az EOD kohortunkban 6,7%-ban, 8/120 esetben volt detektálható kóros hexanukleotid repeat expánzió. A pozitív betegeknel 7 esetben az FTD-re jellemző tünetek mellett többek között parkinsonizmus (P45), hallucináció

(P3, P24, P45) és motoneuron betegség tünetei is jelen voltak.

Az egyéb neurodegeneratív kórképekkel asszociált gének károsító variánsai mint a monogénes demencia okai

A célzott panel vizsgálatok során az EOD kohortunkban több olyan génben (*TREM2*, *CSF1R*, *PRNP*) is találtunk eltérést, melyeket elsődlegesen monogénes formában más neurodegeneratív kórképek hátterében írtak le.

A *TREM2* gén heterozigóta RDV-it ugyan, mint lehetséges AD és FTD rizikófaktorokat is számontartják, de elsőként a Nasu-Hakola betegséggel (NHD) asszociálták. A P14-es páciensünkben a *TREM2* gén két ritka variánsát (p.A105Rfs\*, p.R47C) azonosítottuk összetett heterozigóta formában. Az irodalmi adatok és a detektált variánsok klasszifikációja alapján feltételezzük, hogy a *TREM2* génnel összefüggő monogénes betegség áll a páciens tüneteinek hátterében.

A P56-os beteg klinikai diagnózisa FTD volt, melynek hátterében ismert gyakori gének elemzésének negatív eredménye után a célzott panel vizsgálat során a *CSF1R* génben a c.2646\_2654+6del ritka variánst detektáltuk. A betegnél leírt tünetek és a képalkotó revidált eredménye

megfelel az irodalomban korábban leírt *CSF1R* asszociált leukoencephalopathiának.

A CJD-vel asszociált *PRNP* génben egy 7-oktapeptidből álló repeat inszerciót azonosítottunk a P112-es betegben. A proband tünetei 29 évesen kezdődtek lassú progresszió volt megfigyelhető, az EEG pedig nem detektált prion betegségre specifikus eltérést. A páciensnél és családtagjainál leírt tünetek és a betegség-lefolyás megegyeznek a *PRNP* 168 bázispáros inszerciója esetén korábban riportáltakkal.

#### Az AD-val asszociált genetikai rizikófaktorok gyakoriságának vizsgálata

Kutatásunk során elemeztük az EOD kohortunkban az AD legerősebb rizikófaktoraként ismert *APOE*  $\epsilon 4$  allél gyakoriságát és a GWAS vizsgálatok által a betegséggel asszociált további gének (*ABCA7*, *SORL1*, *TREM2*) ritka variánsainak szerepét a korai kezdetű demenciában.

Az *APOE* elemzése során azt találtuk, hogy mind a heterozigóta  $\epsilon 4$  allél mind a  $\epsilon 4/\epsilon 4$  genotípus dúsul a beteg populációban a kontroll csoporthoz képest. Az esélyhányados a teljes EOD kohortot tekintve egyetlen  $\epsilon 4$  allél esetén 3,16 (95%CI=1,44-6,92; p=0,004), míg  $\epsilon 4/\epsilon 4$

genotípus esetén OR:7,90 (95%CI=1,74-35,84; p=0,0074).

Az *ABCA7*, *SORL1*, *TREM2* génekből 5 lehetséges RDV-t azonosítottunk, ezeket az eltéréseket a kontroll csoportban nem detektáltuk. A variánsokat hordozó 6 beteg átlagéletkora a tünetek megjelenésekor  $61,00 \pm 4,24$ , és az esetek felében a családi anamnézis pozitív volt. Az *ABCA7* génben 2 ritka heterozigóta misszensz (p.R1228C –P26, p.D1957Y – P35) és egy ritka nonszensz (p.Y750\* - P75) variánst azonosítottunk. A P33-as páciensben a *SORL1* p.K2044R szubsztitúciót detektáltuk, amely nem szerepel a gnomAD adatbázisban és a saját kontroll csoportunk genetikai analízise során sem detektáltuk. Kevés információ áll rendelkezésre az azonosított *ABCA7* és *SORL1* variánsokról, azonban ezek alapján az eltérések hozzájárulhatnak az AD kialakulásának kockázatához. A *TREM2* p.R47H régóta ismert mint demencia rizikófaktor. A magyar kohortban két betegben azonosítottuk (P45, P71), a P45 betegnél a későbbi fragment analízis során kóros *C9ORF72* repeat expansziót is detektáltunk. A *PSEN2* misszensz eltérései a *PSEN1* variánsai után a leggyakoribb kóros eltérések

monogénes EOAD-ban. Azonban a kohortunkban detektált *PSEN2* p.S130L szubsztitúció VUS besorolású és az eddigi adatok alapján inkább a lehetséges rizikófaktorok közé sorolhatjuk.

Neurodegeneratív kórképekkel asszociált autoszomális recesszív öröklésű génekben detektált heterozigóta károsító variánsok elemzése

Az újgenerációs vizsgálatok során számos olyan génben azonosítottunk lehetséges RDV-eket, amelyek az irodalmi adatok szerint más neurodegeneratív kórképekkel asszociáltan ismertek. A teljes beteg kohort 3,3%-ában, azaz 4 páciens (P35, P50, P52, P81) esetében detektáltunk PD-hez, NBIA-hoz (neurodegeneráció agyi vasfelhalmozódással), ALS-hez vagy MLD-hez (metachromasiás leukodystrophia) társított recesszív öröklésű génekben heterozigóta eltérést. Ezeket a variánsokat nem azonosítottuk a kontroll csoportban valamint a *PRKN* p.T240M, *SPG11* p.V2053M, *PSAP* p.E108V variánsok kivételével nem szerepeltek a gnomAD adatbázisban sem. Azoknál a betegeknél, ahol PD génben találtunk lehetséges kóroki variánst a PD-re jellemző tünetek is szerepeltek a klinikai képen a

kognitív hanyatlás, a viselkedésváltozás vagy a depresszió mellett. Két páciens esetében több heterozigóta lehetséges RDV-t is azonosítottunk. A P50-es beteg tünetei 60 éves korában kezdődtek, a családi anamnézise pozitív és a genetikai analízis során a *C19ORF12* és a *PARK7* génben is találtunk egy-egy ritka variánst (*C19ORF12* p.P60A; *PARK7* p.Ile91\_Leu92fs). A P35 páciensnél egy AD rizikófaktort (*ABCA7*), egy PD-asszociált (*LRRK2*) és egy ALS-asszociált (*SPG11*) RDV-t detektáltunk.

Az  $\alpha$ KGDH alegységeit kódoló gének vizsgálata során összesen 5 misszensz variánst azonosítottunk, melyek közül kettőt minősítettünk lehetséges rizikófaktornak. Az *OGDH* p.P471H eltérés az ACMG szerint valószínűleg patogén, a populációs adatbázisokban nem szerepel, valamint a kontroll csoportban sem detektáltuk. A *DLD* p.R263H VUS eltérés allél gyakorisága a populációs adatbázisokban nagyon alacsony, a kontroll csoportban nem azonosítottuk. Az irodalomban pedig eddig egy súlyos primer mitochondriális betegnél (*CLA* - congenitalis lactic acidosis) írták le.

## Következtetések

Magyarországon elsőként térképeztük fel a korai kezdetű demencia genetikai hátterét. Monogénes etiológiát a kohort 17,5%-ában azonosítottunk, a leggyakoribb örökletes demencia formák (*C9ORF72*; *GRN*, *PSEN1*; *PSEN2*; *APP* asszociált) ennek 85,7%-át tették ki. Kiemelendő, hogy az esetek 33,3%-ában a klinikai tünetek és képalkotók alapján született diagnózis szerint elvégzett targetált, egy génre fókuszáló szekvenálás nem vezetett eredményre. Ezt a jelenséget magyarázhatja, hogy bár az egyes demencia típusokat különféle klinikai megjelenési formák jellemzik, mégis számos fenotípusos átfedés és patológiai hasonlóság figyelhető meg közöttük. Vizsgálatunk során azonosított eltéréseket összevetve a klinikai kép alapján feltételezett diagnózisokkal szintén azt tapasztaltuk, hogy számos esetben más demenciával járó kórképpel asszociált génben detektáltunk kóroki variánst vagy erős genetikai rizikófaktort. Fontos megjegyezni, hogy tovább nehezíti a megfelelő genetikai teszt kiválasztását a pleiotrópia jelensége, mely szerint egy adott gén hibái számos különféle, egymástól nagymértékben eltérő klinikai megjelenéshez is



vezethetnek. A fent említett nehézségek mindegyikére találhatunk példát a magyar kohortban.

Igazoltuk, hogy a magyar EOD betegeknél a nemzetközi irodalomnak megfelelően magas a kóros *C9ORF72* hexanukleotid repeat expanszió előfordulási gyakorisága. A teljes kohort 6,7%-ában azonosítottunk kóros repeat expansziót, ami az összes azonosított monogénes eset 38,1%-át adta. Kiemelendő, hogy nem csak FTD-vel diagnosztizált betegeknél detektáltuk patogén repeat expansziót. Ezek az eredmények felhívták a figyelmet a gén jelentőségére nemcsak az FTD, de a teljes korai kezdetű demencia kohort esetén.

Több olyan eltérést is azonosítottunk, melyek monogénes betegség kialakulásához vezetnek, azonban más neurodegeneratív kórképpel asszociáltak. A *CSF1R*, *TREM2* és *PRNP* génekben detektált RDV-k kiemelik, hogy ezeket a klinikai és patológiai átfedéseket mutató neurodegeneratív kóképeket csupán csak a klinikai kép alapján nehéz differenciálni.

Eredményeink alapján új molekuláris diagnosztikai ajánlást dolgoztunk ki az EOD betegek differenciáldiagnosztikájához.

## **Saját publikációk jegyzéke**

### **A disszertáció alapjául szolgáló publikációk**

Csaban D, Illes A, Renata TB, Balicza P, Pentelenyi K, Molnar V, Gezsi A, Grosz Z, Gal A, Kovacs T, Klivenyi P, Molnar MJ. Genetic landscape of early-onset dementia in Hungary. *Neurol Sci.* 2022 Sep 25;43(9):5289–5300.

Csaban D, Pentelenyi K, Toth-Bencsik R, Illes A, Grosz Z, Gezsi A, Molnar MJ. The Role of the Rare Variants in the Genes Encoding the Alpha-Ketoglutarate Dehydrogenase in Alzheimer’s Disease. *Life.* 2021 Apr 6;11(4):321.

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

Molnár E, Kovács G, Varga L, Tasnády S, Bors A, Tankó L, Csabán D, Kapócs K, Nemes-Nagy Z, Andrikovics H. Nem malignus, nem infectiosus lymphoproliferatio: kihívások az autoimmun lymphoproliferatív szindróma diagnosztikájában és kezelésében. *Orv Hetil.* 2022 Jan 23;163(4):123–131.

Melicher D, Illés A, Littvay L, Domonkos Tárnoki Á, László Tárnoki D, Bikov A, Kunos L, Csabán D, Buzás EI, Molnár MJ, Falus A. Positive association and future perspectives of mitochondrial DNA copy number and

telomere length – a pilot twin study. Arch Med Sci. 2019;17(5):1191–1199.

Nagy Á, Andrikovics H, Kajtár B, Ujfalusi A, László Z, Kotmayer L, Csabán D, Bors A, Makkos-Weisz A, Kapitány E, Sulák A, Bödör C. Az IGHV-mutációs státusz vizsgálata a Magyar Hematológiai és Transzfuziológiai Társaság Molekuláris Diagnosztika Munkacsoportjának laboratóriumaiban. Hematológia–Transzfuziológia. 2021 Jun 30;54(2):75–80.

Balicza P, Bencsik R, Lengyel A, Gal A, Grosz Z, Csaban D, Rudas G, Danics K, Kovacs GG, Molnar MJ. Novel dominant MPAN family with a complex genetic architecture as a basis for phenotypic variability. Neurol Genet. 2020 Oct 5;6(5):e515.

Illés A, Balicza P, Gál A, Pentelényi K, Csabán D, Gézsi A, Molnár V, Molnár MJ. Az örökletes Parkinson-kór mint a POLG-gén károsodásának új klinikai megjelenési formája. Orv Hetil. 2020 May;161(20):821–828.

Stengl R, Bors A, Ágg B, Pólos M, Matyas G, Molnár MJ, Fekete B, Csabán D, Andrikovics H, Merkely B, Radovits T, Szabolcs Z, Benke K. Optimising the mutation screening strategy in Marfan syndrome and

identifying genotypes with more severe aortic involvement. *Orphanet J Rare Dis.* 2020 Dec 15;15(1):290.

Andrikovics H, Kövy P, Bors A, Csabán D, Meggyesi N, Őrfi Z, Borsy A, Kozma A, Dolgos J, Harasztdombi J, Mikala G, Reményi P, Vályi-Nagy I. Importance of next generation sequencing in precision oncology approach of acute myeloid leukemia. *Magy Onkol.* 2019 Dec 9;63(4):282–287.

Illés A, Csabán D, Grosz Z, Balicza P, Gézsi A, Molnár V, Bencsik R, Gál A, Klivényi P, Molnar MJ. The role of genetic testing in the clinical practice and research of early-onset parkinsonian disorders in a Hungarian cohort: Increasing challenge in genetic counselling, improving chances in stratification for clinical trials. *Front Genet.* 2019;10(OCT).

Balicza P, Grosz Z, Molnár V, Illés A, Csabán D, Gézsi A, Dézsi L, Zádori D, Vécsei L, Molnár MJ. NKX2-1 New Mutation Associated With Myoclonus, Dystonia, and Pituitary Involvement. *Front Genet.* 2018 Aug 22;9(AUG):1–5.