

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola, Klinikai Orvostudományok, Szemészeti program
Iskolavezető: Tulassay Zsolt egyetemi tanár
Programvezető: Süveges Ildikó

Elektrofiziológiai és képalkotó vizsgálatok jelentősége az öröklődő retinabetegségek diagnosztikájában: Genotípus-fenotípus korrelációk

Doktori tézis

Dr. Zobor Annamária Ditta

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola, Klinikai Orvostudományok,
Szemészeti program



Tübingen, 2014

Bevezetés

Az öröklődő retinabetegségek klinikailag és genetikailag egy igen heterogén csoportot alkotnak. A genetikai heterogenitást jól jellemzi, hogy a disztrófiák háttérében eddig már több, mint 200 kóros gén szerepe vált ismertté. Becslések szerint minden 80. ember hordoz magában egy olyan kedvezőtlen genetikai mutációt, mely degeneratív retinabetegség okozója lehet és az adott személyben vagy annak leszármazottaiban a kór manifesztálódásához vezethet.

Előfordulásuk alapján a ritka betegségek („rare disease“, „orphan disease“) csoportját alkotják: míg a legismertebb formájuk, a retinitis pigmentosa 1:4000 prevalenciával jellemezhető, addig bizonyos speciális retinabetegségek csak világszerte néhány esetben kerülnek leírásra. Mindezek ellenére a társadalomra igen jelentős szocioökonómiai hatást gyakorolnak, hiszen a középkorú populációban a vakság egyik leggyakoribb okozói, de hatásos terápiás lehetőség még a mai napig nem áll rendelkezésre.

A kórképek klinikai diagnózisában, vagyis a fenotípus megállapításában a pszichofizikai vizsgálatok (látóélesség, látótér, sötétadaptáció, színlátás,) mellett az objektív elektrofiziológiai módszerek és a modern képalkotó eljárások ma már nélkülözhetetlenek. A genotípus egyértelmű igazolására a molekuláris genetikai vizsgálatok elvégzése minden beteg számára ajánlott, hiszen ismereteink folyamatos bővülésével egyre több betegség genetikai okát lehet igazolni. A világszerte folyó, intenzív kutatások eredményeként mára már megteremtődtek a jövőbeli terápiás lehetőségek feltételei, ezért a szoros interdiszciplináris együttműködés genetikusok és klinikusok között elkerülhetetlen. A diagnózis korai klinikai felismerése és a genetikai háttér tisztázása a betegek számára lehetővé teheti a ma még csak klinikai tanulmányok kereteiben elérhető új terápiás módszerek kipróbálását.

Célkitűzések

A doktori értekezés célja az öröklődő retinabetegségek részletes klinikai vizsgálata, az elektrofiziológia módszerek és a modern képalkotó vizsgálatok jelentőségének bemutatása a diagnózis felállításában, valamint a fenotípus és a genotípus közötti összefüggések vizsgálata.

Elektrofiziológiai módszerek jelentőségének és lehetőségeinek vizsgálata retinabetegségekben

A retina elektrofiziológiai vizsgálata jelenleg is az egyetlen objektív, non-invazív módszer, amely a retina funkcionális állapotáról ad felvilágosítást. Alkalmas a pálcika- és a csaprendszer működésének, a retina diffúz és lokális, öröklött és szerzett betegségeinek, valamint a retina és a látóideg károsodással járó kórképeinek elkülönítésére és a betegségek lefolyásának követésére.

- Célunk az elektrofiziológia nyújtotta lehetőségek ismertetése az öröklődő retinabetegségek sokszínűségének feltárásában és a korrekt klinikai diagnózis felállításában. Mindezt a módszerek technikai tanulmányozásával, valamint egy bizonyos betegcsoportok részletes klinikai vizsgálatán keresztül kívánjuk bemutatni.

Modern képalkotó eljárások jelentősége öröklött retinabetegségekben: genotípus-fenotípus korrelációk

Az OCT és FAF vizsgálatok ma már nélkülözhetetlen vizsgálatok a retinabetegségek diagnosztizálásában, sok esetben specifikusabban mutatják meg az adott betegségre jellemző tüneteket, mint a funkciót vizsgáló módszerek.

- Célunk különböző örökletes retinabetegségek morfológiai heterogenitásának bemutatása nemcsak az elektrofiziológia, hanem az OCT és az FAF technikák alkalmazásán keresztül is.

A retinabetegségek klinikai képe valamint genetikai heterogenitása közismert. Még azonos genotípus esetén is igen jelentős morfológiai és funkcionális különbségek jelentkezhetnek, akár egyetlen érintett családon belül is.

- Célunk ismert genotípusú betegcsoportok klinikai megjelenésének (fenotípusának) alapos vizsgálata és a genotípus-fenotípus közötti korrelációk megállapítása. Ezt különböző genetikai eredetű csap-pálcika disztrófiás családok részletes klinikai vizsgálatával szemléltetjük.
- Egy igen ritka betegséggel, a KCNV2 retinopátiával részletesen foglalkozunk és mutatjuk be a pszichofizikai, elektrofiziológiai és morfológiai sajátosságokat.
- Egy másik extrém ritka betegség, a Jalili szindróma is bemutatásra kerül egy eseten keresztül, melyben sajnálatos módon szindrómához tartozó csap-pálcika disztrófia és fogfejlődési rendellenesség (amelogenesis imperfecta) 1-es típusú neurofibromatózissal kombinálódott. A helyes diagnózis felállításához ebben az esetben a genetikai szegregációs analízis nélkülözhetetlen volt.

Módszerek

Elektrofiziológiai módszerek jelentőségének és lehetőségeinek vizsgálata retinabetegségekben

A hagyományos, Ganzfeld módszerrel végzett elektroretinográfia (ERG), mely a retina szummált elektromos aktivitását jellemzi, sajnos nem alkalmas előrehaladott retinitis pigmentosa esetén a betegség lefolyásának nyomonkövetésére, hiszen a kórkép súlyosbodásával fokozatosan csökken a fotoreceptorok funkciója és előrehaladott stádiumban ezzel a módszerrel a retina funkcióját már nem tudjuk reprodukálni. Az 1992 óta alkalmazott multifokális elektroretinográfia (mfERG) segítségével azonban lehetőség nyílik a megmaradt centrális funkció objektív kimutatására, így előrehaladott stádiumú betegségekben is kontrollálhatjuk a reziduális funkciót.

Modern képalkotó eljárások

Az optikai koherencia tomográfia (OCT) lehetővé teszi a biológiai szövetek nagy felbontású in vivo vizsgálatát, mely az örökletes retinabetegségekben különleges szerepet játszik. A retina autofluoreszcenciájának (FAF) vizsgálata ezekben a kórképekben szintén egyre nagyobb jelentőséget kap, hiszen fontos kiegészítő információt szolgáltat a retina pigmentepithel sejtrétegének állapotáról. Ezen eljárások alkalmazása forradalmasította a retinadisztrófiák diagnosztikáját.

Genotípus-fenotípus korrelációk

A genetikai heterogenitás nemcsak a különböző retinabetegségekre jellemző, adott genotípus esetén is igen jelentős – akár családon belüli – variabilitással is találkozhatunk. Számos klinikai kórképben az is előfordul, hogy egy adott betegséghez különböző okokból, de mégis hasonló patomechanizmussal igen sokféle genetikai kóros mutáció vezethet. Ilyen betegség például a retinitis pigmentosa, vagy csap-pálcika disztrófiák. Más betegségek háttérben viszont csak egyetlen genetikai variáns ismeretes. Ezzel a témával számos esetben foglalkoztunk, részben kapcsolódóan az elektrofiziológia és az OCT/FAF nyújtotta klinikai vizsgálómódszerek nyújtotta lehetőségeknél.

Eredmények és következtetések

Elektrofiziológiai módszerek jelentőségének és lehetőségeinek vizsgálata retinabetegségekben

Multifokális ERG technikák összehasonlítása:

Egy új technikai megoldás került bemutatásra, mely lehetővé teszi a mérés alatt a szemfenék monitorozását, így téve még pontosabbá a fixáció kontrollálását. Ezen túl az új technika lehetővé teszi excentrikus fixáció esetében (pl. makuladisztrófiás betegeknel) a vizsgálati még pontosabb kivitelezését, valamint a kamera által készített fényképek felhasználásával a morfológiai és funkcionális adatok egyidejű megjelenítését.

Ezt az új technikát egészséges felnőtteken végzett mérésekben két másik mfERG géppel is összehasonlítottuk, melyek eltérő monitorral, illetve szoftverrel dolgoznak. A három mfERG gép összehasonlításán keresztül bemutattuk, milyen nagy eltérések mutatkozhatnak, ha különböző elven működő monitorokkal, filterbeállításokkal, vagy szoftverrel végezzük a méréseket. Bár mindegyik gép megfelel az ISCEV által előírt követelményeknek és eredményeik összehasonlíthatóak, mégis fontos tudnunk, hogy a különböző mérési adatok közvetlen összehasonlítása nem lehetséges és nem kívánatos. A centrális válaszok még ugyanazon rendszer esetében is jelentős variabilitást mutathatnak. Ezeket főként multicentrikus klinikai tanulmányok esetén kell figyelembe venni, hogy a mérési eredmények feldolgozásába ne csússzon hiba.

A multifokális ERG jelentősége retinitis pigmentosa hosszútávú követésében:

A következő tanulmány 23 retinitis pigmentosás beteg (9 férfi, 14 nő, átlag életkor 36 év) retrospektív elemzését mutatja be. A betegség progresszióját 10 évig követtük nyomon pszichofizikai tesztek (látásélesség, látótér, sötétadaptáció, színlátás,) és elektrofiziológiai módszerek (Ganzfeld-ERG, mfERG) segítségével. A tanulmány kimutatta, hogy retinitis pigmentosa esetén a látótér mérete évente 14,5%-kal exponenciálisan csökken. Ugyanazon statisztikai modell alkalmazásával a betegség progressziója az objektív mfERG vizsgálatokban évi 6-10%-nak mutatkozott. Fontos megemlíteni, hogy számos esetben még akkor is mérhető eredményeket találtunk mfERG segítségével, amikor a Ganzfeld ERG vizsgálat már kioltott válaszokat mutatott. Ez igen jelentős szereppel bír nemcsak a betegség előrehaladott stádiumának követésében, de a közeljövőben rendelkezésre álló terápiák eredményességének monitorozásában is.

Modern képkötő eljárások jelentősége öröklött retinabetegségekben: genotípus-fenotípus korrelációk

A genetika és a klinika sokszínűségét számos klinikai tanulmányon keresztül, alapos fenotípus elemzéssel és genotípus-fenotípus korrelációkkal szemléltetjük.

Autoszomális domináns csap-pálcika disztrófiák:

Az első klinikai tanulmányban ismert *GUCY2D* és *GUCA1A* mutációval rendelkező csap-pálcika disztrófiában szenvedő családokat hasonlítottunk össze. Mindkét genetikai mutáció a fototranszdukció szinte azonos lépésében okoz zavart,

így kíváncsiak voltunk, vajon klinikailag hasonló kórképek jelennek-e meg, vagy fellelhető-e valamilyen különbség a két betegcsoport megjelenésében. Ennek kiderítésére pszichofizikai tesztek (látásélesség, látótér, sötétadaptáció, színlátás,), elektrofiziológiai módszerek (Ganzfeld-ERG, mfERG) valamint a modern képalkotó eljárások (OCT, FAF) segítségével összehasonlító vizsgálatokat végeztünk. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy *GUCAIA* mutációk esetében a pálcikák érintettsége enyhébb, így enyhébb klinikai manifesztációval számolhatunk. Ennek feltételezett magyarázata a gének expressziójának és dominanciájának eltérése csapokban és pálcikákban.

A második tanulmányban szintén egy autoszomális domináns csap-pálcika disztrófiában szenvedő családot mutattunk be, melyben a betegség okozója a *CRX* gén új mutációja volt. Míg ugyanazon mutáció a család egyik részében inkább tiszta csapdisztrófiát eredményezett, addig a másik részben a csapok mellett a pálcikák érintettsége is jelentős volt. A súlyosabban érintett családtagok esetében egy további *CRX* polimorfizmus is fellelhető volt, mely feltételezhetően a klinikai megjelenésben szerepet játszik. Az ún. negatív ERG megjelenése karakterisztikusnak vélhető *CRX* mutáció okozta autoszomális domináns csap-pálcika disztrófiák esetén.

KCNV2 retinopátia:

Alapos klinikai tanulmányaink során rámutattunk a *KCNV2* retinopátia funkcionális, elektrofiziológiai és morfológiai sajátosságaira. A *KCNV2* gén egy, a retinális sejtekben jelenlévő Kv2.1. káliumcsatorna alegységét, a Kv8.2 proteint kódolja. A *KCNV2* gén kóros mutációi esetén egy igen sajátos, külön elektrofiziológiai entitással bíró stacioner retinabetegség alakul ki, melynek hátterében más genetikai okot még nem sikerült felfedezni. Az elektrofiziológiai vizsgálatok segítségével bizonyítottuk, hogy a fototranszdukció nem érintett,

viszont a posztreceptorális válaszok szignifikáns késéssel jellemezhetőek, ami az ún. V-logI funkció jellegzetes kinetikáját adja ebben a betegségben. A morfológia ebben a betegcsoportban is mutatott variabilitást, de összességében minden esetben makulaelváltozás (atrófia) volt kimutatható. Ennek kialakulását a megbomlott K⁺ homeosztázissal és a fovea csapjainak érzékenysége magyarázhatja, hiszen a foveában nem találhatóak Müller-sejtek, melyek a K⁺ háztartást regulálják.

Jalili szindróma:

Egy másik érdekes eset, a Jalili szindróma kapcsán pedig szemléltettük, hogy az interdiszciplináris együttműködés bizonyos extrém ritka genetikai kórképekben megkerülhetetlen. Itt a szegregációs analízis segítségével sikerült a helyes diagnózist felállítani: a bemutatott esetben a neurofibromatózist okozó *NFI* és a Jalili szindrómát okozó *CNNM4* gének mutációit sikerült igazolni.

Klinikai jelentőség

A doktori értekezés mélyrehatóan foglalkozik az öröklődő retinabetegségek klinikai és genetikai sajátosságaival, mely segít jobban megérteni a genotípus és fenotípus közötti összefüggéseket. Ezen információk segítségével érthetőbbé válik bizonyos kórképek patomechanizmusa, a klinikai vizsgálatok alkalmazhatósága és külön hangsúlyt kapnak a genetikai vizsgálatok, melyek együttesen eredményezik a megfelelő diagnózis felállítását.

A doktori tézis mindezeneken túl bemutatja az elektrofiziológia és a modern képalkotó eljárások jelentőségét öröklött retinabetegségekben.

- Rámutattunk, hogy a klinikai vizsgálatokban alkalmazott eltérő mfERG berendezések mérési eredményeit csak óvatosan szabad összehasonlítani egymással és figyelembe kell venni, hogy a centrális válaszok még ugyanazon rendszer esetében is jelentős variabilitást mutathatnak.
- Munkacsoportunk elsőként mutatott be retinitis pigmentosa esetében multifokális ERG-vel mért hosszútávú (10 éves) eredményeket. Ez a módszer igen jelentős szereppel bír nemcsak a betegség előrehaladott stádiumának követésében, de a közeljövőben rendelkezésre álló terápiák eredményességének monitorozásában is.
- Egy klinikai tanulmányban ismert *GUCY2D* és *GUCA1A* mutációval rendelkező csap-pálcika disztrófiában szenvedő családokat hasonlítottunk össze. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy *GUCA1A* mutációk esetében a pálcikák érintettsége enyhébb, így enyhébb klinikai manifesztációval számolhatunk.
- Bemutattunk egy másik autoszomális domináns csap-pálcika disztrófiában

szenvedő családot, melyben a betegség okozója a *CRX* gén új mutációja volt. A súlyosabban érintett családtagok esetében egy további *CRX* polimorfizmus is fellelhető volt, mely feltételezhetően a klinikai megjelenésben szerepet játszik.

- A *KCNV2*-retinopátiával nemcsak genetikai jelentősége, de klinikai egyedi megjelenése miatt intenzíven foglalkoztunk. Új mutációk ismertetésén túl elsőként és a legalaposabban tanulmányoztuk a betegséget klinikailag, mely hasznos információival segíti a diagnózis egyszerű felállítását.
- Bemutattunk egy igen ritka betegséget, a Jalili szindrómát, valamint annak egyedüllálló kombinációját 1-es típusú neurofibromatózissal.

A világszerte folyó, intenzív kutatások eredményeként mára már megteremtődtek a jövőbeli terápiás lehetőségek feltételei, ezért a szoros interdiszciplináris együttműködés genetikusok és klinikusok között elkerülhetetlen. A diagnózis korai klinikai felismerése és a genetikai háttér tisztázása a betegek számára lehetővé teheti a ma még csak klinikai tanulmányok kereteiben elérhető új terápiás módszerek kipróbálását.

Publikációk

Doktori tézishez közvetlenül kapcsolódó publikációk:

Nagy D, Schönfisch B, Zrenner E, Jägle H. Long-term follow-up in retinitis pigmentosa using the multifocal ERG. IOVS 2008 Oct;49(10):4664-71.

Zobor D, Zrenner E. [Retinitis pigmentosa - a review. Pathogenesis, guidelines for diagnostics and perspectives]. Ophthalmologe. 2012 May;109(5):501-14;quiz 515. German. PubMed PMID: 22581051.

Zobor D, Zrenner E, Wissinger B, Kohl S, Jägle H. *GUCY2D*- or *GUCA1A*-related autosomal dominant cone-rod dystrophy: is there a phenotypic difference? Retina. 2014 May 28. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24875811.

Kitiratschky VB, **Nagy D**, Zabel T, Zrenner E, Wissinger B, Kohl S, Jägle H. Cone and cone-rod dystrophy segregating in the same pedigree due to the same novel CRX gene mutation. Br J Ophthalmol. 2008 Aug; 92(8):1086-91. doi: 10.1136/bjo.2007.133231. PubMed PMID: 18653602.

Zobor D, Kohl S, Wissinger B, Zrenner E, Jägle H: Rod and cone function in patients with KCNV2 retinopathy. PLoS One. 2012;7(10):e46762. doi: 10.1371/journal.pone.0046762. Epub 2012 Oct 15. PubMed PMID: 23077521; PubMed Central PMCID: PMC3471896.

Wissinger B, Schaich S, Baumann B, Bonin M, Jägle H, Friedburg C, Varsányi B, Hoyng CB, Dollfus H, Heckenlively JR, Rosenberg T, Rudolph G, Kellner U, Salati R, Plomp A, De Baere E, Andrassi-Darida M, Sauer A, Wolf C, **Zobor D**, Bernd A, Leroy BP, Enyedi P, Cremers FP, Lorenz B, Zrenner E, Kohl S. Large deletions of the KCNV2 gene are common in patients with cone dystrophy with supernormal rod response. Hum Mutat. 2011 Aug 31. doi: 10.1002/humu.21580. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21882291.

Zobor D, Kaufmann DH, Weckerle P, Sauer A, Wissinger B, Wilhelm H, Kohl S. Cone-rod dystrophy associated with amelogenesis imperfecta in a child with neurofibromatosis type 1. Ophthalmic Genet. 2011 Jul 5. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21728811.

Doktori tézishez közvetlenül nem kapcsolódó egyéb publikációk:

Zobor D, Balousha G, Baumann B, Wissinger B. Homozygosity mapping reveals new nonsense mutation in the FAM161A gene causing autosomal recessive retinitis pigmentosa in a Palestinian family. *Mol Vis.* 2014 Feb 7;20:178-82. eCollection 2014. PubMed PMID: 24520187; PubMed Central PMCID: PMC3919667

Leitritz MA, Ziemssen F, Voykov B, Dimopoulos S, **Zobor D**, Bartz-Schmidt KU, Gelissen F. Early postoperative changes of the foveal surface in epiretinal membranes: comparison of 23-gauge macular surgery with air vs. balanced salt solution. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2014 Feb 4. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24492933.

Shao Y, Keliris GA, Papanikolaou A, Fischer MD, **Zobor D**, Jägle H, Logothetis NK, Smirnakis SM. Visual cortex organisation in a macaque monkey with macular degeneration. *Eur J Neurosci.* 2013 Nov;38(10):3456-64. doi: 10.1111/ejn.12349. Epub 2013 Aug 23. PubMed PMID: 24033706; PubMed Central PMCID: PMC3834013.

Perrault, A. Estrada-Cuzcano, I. Lopez, S. Kohl, S. Li, F. Testa, R. Zekveld, X. Wang, E. Pomares, J. Andorf, N. Aboussair, S. Banfi, N. Delphin, A. den Hollander, C. Edelson, R. Florijn, M. JeanPierre, C. Leowski, A. Megarbane, C. Villanueva, B. Flores, A. Munnich, H. Ren, **D. Zobor**, A. Bergen, R. Chen, F. Cremers, R. Gonzales-Duarte, R. K. Koenekoop, F. Simonelli, E. Stone, B. Wissinger, Q. Zhang, J. Kaplan, JM. Rozet: Union Makes Strength: A worldwide collaborative genetic and clinical study to provide a comprehensive survey of RD3 mutations and delineate the associated phenotype. *PLoS One.* 2013;8(1):e51622. doi: 10.1371/journal.pone.0051622. Epub 2013 Jan 7. PubMed PMID: 23308101; PubMed Central PMCID: PMC3538699.

Pach J, Kohl S, Gekeler F, **Zobor D**. Identification of a novel mutation in the PRCD gene causing autosomal recessive retinitis pigmentosa in a Turkish family. *MolVis* 2013 Jun 13;19:1350-5. Print 2013.

Fischer MD*, **Zobor D***, Keliris GA, Shao Y, Jägle H, Logothetis NK, Smirnakis SS. Juvenile macular degeneration in a rhesus macaque: structural and functional description. *Doc Ophthalmol* 2012 Aug 26. [Epub ahead of print] PubMed PMID:

22923360.

Jäggle H, **Zobor D**, Brauns T: Accomodation limits induced optical defocus in defocus experiments. *Doc Ophthalmol* 2010 Oct;121(2):103-9. doi: 10.1007/s10633-010-9237-y. Epub 2010 Jun 11. PMID: 20544259

Becirovic E, Ebermann I, **Nagy D**, Zrenner E, Seeliger MW, Bolz HJ: Usher syndrome type 1 due to missense mutations on both CDH23 alleles: investigation of mRNA splicing. *Hum Mutat.* 2008 Mar;29(3):452.

Horsch, Wanka: Das Usher-Syndrom – eine erworbene Hörsehbehinderung. Kapitel: Das subretinale elektronische Implantat zur Wiederherstellung von Seheindrücken: künftig Einsatz auch beim Usher Syndrom möglich? Old.70-81. Ernst Reinhardt Verlag München Basel, 2012 (könyvfejezet)