

# Új generációs szekvenálási eljárások klinikai alkalmazása ritka neurológiai betegségek diagnosztikájában

Doktori tézisek

**Dr. Balicza Péter**

Semmelweis Egyetem  
Szentágothai 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., tud. munkatárs

Dr. Liptai Zoltán, Ph.D., főorvos

Budapest  
2018

## BEVEZETÉS

### **Paradigmaváltás a neurogenetikai betegségek diagnosztikájában és osztályozásában**

Jelenleg mintegy 8000 ritka betegség ismert, amelyeknek 80%-a genetikai eredetű, és jelentős arányban (>50%) neurológiai érintettséggel járnak. A neurogenetikai betegségek fenotípus tekintetében felölelik a teljes neurológiai tünettant. Többek között megjelenhetnek, mint dementia, izomdystrophia, mozgászavar, spasticus paresis, epilepsia, neuropathia, és magukba foglalják a gyakori betegségek ritka monogénes formáit is. Diagnosztikájukat megnehezíti, hogy az egyes fenotípusok háttérben számos gén hibája állhat (lókus heterogenitás), amelyeket klinikai alapon sok esetben nem lehet elkülöníteni. Ugyanakkor az egyes gének hibái eltérő fenotípussal jelentkezhetnek (pleiotropia). A diagnosztika nehézsége és költsége miatt, a neurogenetikai betegségben szenvedőknél így sok esetben nem tisztázódik a molekuláris háttér.

Az új generációs szekvenálás (NGS) alkalmazása az elmúlt években egyre inkább elterjedt a klinikai genetikai kutatásban és diagnosztikában, amely a ritka betegségek diagnosztikájában is paradigmaváltást hozott. Az új generációs szekvenálási eljárások lényege a masszív parallel szekvencia analízis, amely a korábbi Sanger technológiához képest, jelentősen gyorsabb és költséghatékonyabb bázis sorrend meghatározást tesz lehetővé. Az NGS alkalmazása során nagy mennyiségű adat keletkezik, amelynek bioinformatikai értékelése és interpretációja sok esetben több időt igényel, mint a laboratóriumi lépések. Exom szekvenálás során mintegy 20,000 variáns, míg panel szekvenálások esetében több száz variáns közül szükséges kiválasztani, azt az 1-2 eltérést, amely a betegséget okozza. Ennek érdekében az öröklésment, az evolúciós konzerváltság, a biokémiai struktúrára kifejtett hatás, gyakoriság alapján szűkítjük a variánsok listáját, illetve az adatbázisokban szereplő információkat használjuk fel. Emellett szoftverrel támogatott, fenotípus alapú variáns szűrési módszerek is rendelkezésre állnak. Az NGS vizsgálatok emellett lehetőséget teremtenek arra is, hogy korábban nem leírt gén-fenotípus összefüggéseket tárjunk fel.

Az elmúlt évek NGS vizsgálatainak köszönhetően, a neurogenetikai betegségek osztályozásáról alkotott képünk jelentősen megváltozott. Több, korábban külön entitásnak tekintett betegség esetében derült fény arra, hogy egyes gének kapcsolatot teremtenek ezek között. A diszkrét fenotípusok helyett, sok esetben spektrum betegségek körvonalazódtak. Egyre inkább egységes betegség csoportként tekintünk a spasticitas-ataxia spektrum betegségekre, illetve a különböző „axonopathiakra” (hereditaer spasticus paraparesis, ataxia, hereditaer neuropathiak). Ebben a modellben az egyes gének eltérései a különböző neuroanatómiai struktúrák eltérő fokú vulnerabilitásával járnak. A hereditaer spasticus paraparesisek esetében mintegy 70, az amyotrophias lateral sclerosis esetében 33, az ataxiák hátterében több mint 100 gén variációt hozták összefüggésbe a betegséggel, amelyek egyes gének esetében (pl. *SPG11*, *SETX*, *SPG7*, *BSCL2*) ismerten átfedést mutatnak. Így ezek vizsgálatára az NGS technológia kiválóan alkalmas.

### **Az NGS technológia alkalmazása révén felszínre kerülő etikai kérdések**

Az NGS technológia révén megnövekvő információmennyiség új etikai kihívásokat állított a klinikai genetikusok elé, amelyek közül kiemelendő az incidentális találatok és a bizonytalan szignifikanciájú találatok kérdése. A nagy áteresztő képességű vizsgálatnak köszönhetően számos olyan variánsra derülhet fény, amely a vizsgált fenotípushoz közvetlenül nem kapcsolódik, azonban jelentőséggel bírhat a vizsgált egyén számára. Jelenleg még nem alakult ki egységes nézet azzal kapcsolatban, hogy ezen találatokat milyen módon és milyen mértékben közöljük a beteggel. Nehézséget jelent, hogy az NGS vizsgálatok során számos, úgynevezett bizonytalan szignifikanciájú variációt detektálunk, amelyek interpretációja jelenleg nem egyértelmű, azonban potenciálisan információt hordozhatnak. További etikai kérdéseket vet fel a diagnosztikai vizsgálatok és a klinikai kutatások között elmosódó határ, valamint az NGS adatok megosztása. Ahhoz, hogy a fenti kérdésekben állásfoglalást lehessen megfogalmazni, meg kell ismernünk a magyar lakosság véleményét, azonban ilyen felmérések Magyarországon és Közép-Kelet Európában korlátozottan állnak rendelkezésre.

## 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) a 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.

## MÓDSZEREK

### A genetikai kutatás során vizsgált betegek

A hereditær spasticus paraparesis (HSP) kutatás keretében összesen 100 probandot vizsgáltunk (99 esetben HSP fenotípussal jelentkező beteg, míg egy esetben ataxia volt a prezentációs tünet). A *SPAST* gén Sanger szekvenálását 34 proband esetében végeztük el. Tizenegy esetben, ahol nem találtunk *SPAST* és *ATL1* variációt teljes exom szekvenálást végeztünk. Két esetben, az izombiopsziás mintában talált mitochondriális eltérések miatt, célzott *SPG7* szekvenálás történt. Panelvizsgálatot 44 probandnál végeztünk, akiknek korábban más HSP irányú genetikai vizsgálata nem volt. További 34 probandnál célzottan vizsgáltuk az *SPG7* p.Leu78\* variáns jelenlétét a második exon Sanger szekvenálásával. Egy 18 éves férfi beteg esetében, akinél cerebellaris ataxia tünetei jelentkeztek trio exom szekvenálást végeztünk.

További 14 motoneuron betegséggel diagnosztizált betegnél (13 amyotrophias lateral sclerosis, 1 primer lateral sclerosis) panel szekvenálást végeztünk.

További egy, komplex mitochondrialis fenotípussal jelentkező család esetében trio exom szekvenálást végeztünk.

### A genetikai kutatás során alkalmazott módszerek

A genetikai vizsgálatokhoz a DNS izolálás vérből történt „QIAmp DNA blood kit” segítségével. A Sanger szekvenálásokhoz ABI Prism 3500 DNS szekvenátort használtunk. A HSP panel vizsgálathoz egy általunk tervezett összetételű Agilent Haloplex, illetve Agilent Sureselect QXT könyvtárkészítő reagenst alkalmaztunk, a szekvenálás Illumina MiSeq platformon történt. A teljes exom szekvenálás a HSP betegek esetében Illumina HiSeq platformon, Agilent Sureselect Human All Exon V4 könyvtárkészítő kit segítségével történt. A komplex mitochondrialis fenotípussal vizsgált család esetében a könyvtárkészítési lépések NimbleGen SeqCap EZ Human Exome Library v3.0 Kit felhasználásával történtek, a szekvenálás Illumina HiScanSQ platformon történt. A cerebellaris ataxiával vizsgált beteg esetében az exom szekvenálást Nextera Rapid Capture kit felhasználásával, Illumina HiSeq2500 platformon végeztük. Az elemzési lépésekben az Agilent Surecall v2.1, a GEM.app, a

Samtools, az Illumina Basespace BWA Enrichment, az SnpEff, SnpSift, az Exomiser, a HSF3, az Alamut, valamint a VariantAnalyzer szoftvereket alkalmaztuk.

### **A kérdőíves vizsgálat módszertana**

A nagy áteresztő képességű genetikai vizsgálatok iránt mutatott attitűd vizsgálatára egy kérdőívet hoztunk létre. A kérdőív összesen 37 kérdésből épült fel, amelyet papír alapon illetve online formában terjesztettük. Neurogenetikai szakrendelésünkön papír alapú kérdőívet terjesztettünk a betegek, illetve a kísérő hozzátartozók között. A kérdőív web linkjét email-ben kiküldtük azon betegeinknek, akik korábban azt megadták Intézetünk számára, illetve a web linket szociális médián keresztül is elérhetővé tettük. További kérdőíveket gyűjtöttünk neurogenetikai kurzusunkon részt vevő medikus hallgatóktól, valamint az éves nyílt kurzusunkon megjelenő résztvevők között. Az elemzés során chi-négyzet próbát, bináris logisztikus regressziót, Kruskal-Wallis tesztet, Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk.

## EREDMÉNYEK

### **Az új generációs szekvenálás hatékonysága a spasticitás-ataxia spektrum betegségek diagnosztikájában**

Célzott *SPAST* szekvenálással 20,6%-ban tisztáztuk a betegség molekuláris hátterét. Exom szekvenálás révén a *SPAST* és *ATLI* negatív probandok 36,4%-ában azonosítottuk a betegség kialakulásáért felelős variációt. Panel szekvenálás révén (előzetes *SPAST* és *ATLI* Sanger szekvenálás nélkül) 29,5%-ban azonosítottuk a molekuláris hátteret. Az általunk alkalmazott NGS módszertan a nemzetközi vizsgálatok diagnosztikus rátájához (~30%) hasonló eredménnyel volt alkalmazható.

### **A HSP molekuláris epidemiológiája Magyarországon**

A teljes HSP kohort 26,3%-ában (26 proband) igazoltuk a betegség molekuláris hátterét. Leggyakoribbak a *SPAST* gén eltérései voltak (12 proband), amelyet az *SPG7* (6 proband), *SPG11* (2 proband), valamint az *ATLI* (1 proband) és *NIPA1* (1 proband) gének patogén variációi követték. 11 probandnál az irodalomban eddig nem ismert patogén vagy valószínűleg patogén variációt detektáltunk. Négy esetben az eredetileg HSP kohortba sorolt betegeknél fenokópiát igazoltunk. Két proband esetében adrenoleukodystrophiát (*ABCD1* variáció) diagnosztizáltunk, egy-egy beteg esetében Krabbe betegséget (*GALC* variáció), illetve FAHN betegséget (*FA2H* variáció) állapítottunk meg.

### **Genotípus-fenotípus összefüggések HSP-ben**

Vizsgálataink során az irodalomban elérhető genotípus-fenotípus összefüggéseket bővítettük a spasticitás-ataxia spektrumbetegségekben. Jelentős intra- és interfamiliáris variabilitást észleltünk a *SPAST* variációkhoz társuló klinikai tünetekben, egyes variációk cHSP-vel társultak. A *SPAST* p.Pro435Leu variációja mellett ataxia, microcephalia, fehérállományi laesio társult, a *SPAST* p.Ala 428Pro variációja mellett korai kezdetű depresszió jelentkezett. A *SPAST* p.Thr614Asnfs\*16 variáns mellett

ataxia volt jelen egyes családtagokban. A splice variánsokat hordozó betegeknél pHSP-t észleltünk, *SPAST* c.1536+1G>A variáció esetében inkomplett penetrancia lehetősége vetődött fel.

Hat esetben diagnosztizáltunk SPG7-et, öt esetben az azonosított variáció az *SPG7* p.Leu78\* volt (négy esetben homozigóta vagy compound heterozigóta variációk tagjaként). Az egyik esetben felmerült, hogy a variáns autoszomális domináns módon jelent meg. Komplikáló tünetek két proband esetében voltak jelen: egyik esetben distalis neuropathia, míg másik esetben opticus atrophia. Autoszomális domináns öröklődés lehetősége az *SPG7* p.Gly344Asp variáció mellett is felmerült. A p.Gly344Asp variáns compound heterozigóta variáció tagjaként hordozó betegben cHSP-t diagnosztizáltunk, ataxia, kognitív deficit társult.

További támogató adat keletkezett arra vonatkozóan, hogy a *SPAST* gén p.Ser44Leu, illetve az *SPG7* p.Ala510Val variációja modifikáló hatással bírhat.

SPG11-et összesen három proband esetében diagnosztizáltunk. Két proband esetében, akiket a HSP kohortban vizsgáltunk, a fenotípus az irodalomban közölteknek megfelelő volt. Egy esetben a cerebellaris ataxia háttérének tisztázására végzett teljes exom szekvenálás azonosított compound heterozigóta eltérést az *SPG11* génben.

A leukodystrophiák és a cHSP között fenotípusos átfedést észleltünk az *ABCD1*, *GALC*, *FA2H* gének variációi esetében. Az adrenomyeloneuropathiával diagnosztizált betegek (*ABCD1* variáció) esetében a koponya MR kezdetben nem mutatott eltérést, a fenotípus HSP-hez volt hasonló. A Krabbe beteg esetében (*GALC* variáció) a koponya MR leukodystrophiára utalt, de a fenotípus pHSP-nek felelt meg. A *FA2H* gén eltérései HSP-vel (SPG35) és leukodystrophiával (FAHN betegség) társulhatnak. Az általunk detektált variáció esetében kiterjedt fehérállományi laesiok, komplex neurológiai tünetek voltak jelen.

### **HSP panelvizsgálat amyotrophias lateral sclerosisban és primer lateral sclerosisban**

A vizsgált 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. Ritka heterozigóta variációkat azonosítottunk familiaris ALS-hez kötött génekben, a klasszikus HSP génekben, valamint a HSP differenciál diagnosztikájában felmerülő, nukleáris mitochondriális génekben egyaránt. Az észlelt eltérések az ALS oligogénes modelljébe illeszthetőek be. Három betegben azonosítottunk ritka, *POLG* génben elhelyezkedő variációkat. Egy betegben compound heterozigóta, ismertén pathogén eltérések voltak jelen a *POLG* génben. Egy beteg esetében seipinopathia (*BSCL2* variáció) lehetősége vetődött fel.

### **Az *MSTO1* gén azonosítása humán megbetegedés hátterében**

Egy komplex mitochondriális fenotípussal jelentkező család esetében exom szekvenálás révén azonosítottuk, a korábban emberi betegséghez nem kötött *MSTO1* gént. A probandnál myopathia, ataxia, pszichiátriai tünetek, minor malformatiok, endokrin tünetek voltak jelen. A proband gyermekeinél különböző súlyossággal pszichiátriai, endokrin tünetek, minor malformatiok, neurológiai tünetek jelentkeztek. A komplex fenotípus, a probandnál végzett izombiopsia, illetve laktát terheléses vizsgálat mitochondriális betegségre utalt, azonban mtDNS eltérést nem tudtunk igazolni. Az ezt követő exom szekvenálás heterozigóta variációt azonosított az *MSTO1* génben (p.Val8Met), amely a fenotípussal szegregált. Az *MSTO1* gén funkciója csak részben ismert, azonban a munkacsoportunk tagja (Dr. Gál Anikó) által elvégzett későbbi funkcionális vizsgálatok megerősítették, hogy a gén eltérései mitochondriális patológiával járhatnak.

### **A nagy áteresztő képességű genetikai vizsgálatok iránt mutatott attitűd Magyarországon**

Kérdőívünket 657 személy töltötte ki. A válaszadók érdeklődést mutattak az orvosi hasznú genetikai vizsgálatok, az incidentális és bizonytalan jelentőségű genetikai eredmények iránt. A magas genetikai meghatározottság pontszámmal rendelkező egyének nagyobb érdeklődést mutattak a teljes genetikai állomány meghatározása, és a rizikómódosító genetikai variációk meghatározása iránt. A magasabb önértékelő genetikai ismeret pontszámmal bíró egyének közt gyakrabban fordult elő magas

genetikai meghatározottság pontszám. A kétváltozós elemzések alapján a férfiak, a nem egészségügyi foglalkozásúak esetében, valamint az orvosi konzultáció lehetősége mellett nagyobb az érdeklődés egyes genetikai vizsgálatok iránt. A logisztikus regressziós elemzés alapján az életkor és a nem befolyásolta a közvetlenül a felhasználók által indikált genetikai vizsgálatok iránt mutatott attitűdöt.

## KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálataink alapján 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. Vizsgálatunk eredményeként ajánlásokat fogalmaztunk meg az egészségügyi ellátó rendszer számára a magyar HSP betegek költséghatékony diagnosztikájára vonatkozóan. Megállapítottuk, hogy az *SPG7* asszociált HSP sokkal gyakrabban fordul elő a HSP hátterében, mint azt korábban feltételeztük. A HSP asszociált *SPAST*, *SPG7*, *SPG11* gének egyes variációi esetében az irodalomban elérhető információkat bővítettük a genotípus-fenotípus összefüggésekről. Panel és exom szekvenálás 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, az önbevalláson alapuló genetikai ismeret, valamint az észlelt genetikai meghatározottság befolyásolta az attitűdöt, amely fontos információ a személyre szabott orvoslás megvalósítása, és a genetikai tanácsadás kapcsán.

## 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, Lévy 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, Hidasi E, Balogh I, Molnár MJ. Az LRRK2 gyakori G2019S-mutációjának hiánya 120, korai kezdetű magyar Parkinson-beteg esetében. (2012) Ideggyogy 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**