

**ÚJGENERÁCIÓS SZEKVENÁLÁS ALKALMAZÁSA A
KOMPLEX BETEGSÉGEK GENETIKAI
DIAGNOSZTIKÁJÁBAN**

PhD. értekezés tézisei

Kovács Gábor

Témavezetők:

Dr. Endreffy Emőke, Dr. Maróti Zoltán

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Gyermekgyógyászati Klinika

SZEGED

2016

Bevezetés

Ritka betegségeknek (RB) nevezzük azon kórképeket, melyek a populáció kis részét érintik és előfordulási gyakoriságuk nem több, mint 1/2000. Jelenleg kb. 6000 ritka betegséget írtak le, melyek klinikai manifesztációja széles skálán mozog. Legtöbbjük mentális retardációt okoz, 50-70%-a már gyermekkorban megjelenik és az érintettek 30%-a 5 éves kor alatt exitál. A legtöbb ritka betegség monogénes öröklődés menetet mutat, de ismerünk olyan komplex betegségeket melyek több génhez köthetők. Ezek klinikai tünetei sokszor átfednek, ezért un. „ernyő-betegségeknek” hívjuk őket (pl.: nephrosis szindróma, skizofrénia, Ectodermalis dysplasia (ECD), Chronic obstructive pulmonary disease, stb). A meglévő molekuláris diagnosztikai módszerek limitációinak és a betegségek széles klinikai spektrumának köszönhetően az RB-k diagnózisa komplikált és nagy részük hazánkban a mai napig megoldatlan. Ezek háttérében álló gének Sanger típusú szekvenálása az óriási munkaigény és a hozzá tartozó magas költségeknek köszönhetően ezen betegségcsoportokban nem alkalmazható. Az elmúlt években létrejöttek olyan ritka betegség szakértői centrumok, melyek arra hivatottak, hogy RB-k bizonyos típusának diagnosztikáját, kezelését rutinszerűen végezzék (leginkább monogénes betegségek).

A szegedi Gyermekgyógyászati Klinika egy ritka betegség központ, ahol eddig a több gént is érintő betegségeknel csak a leggyakoribb formák genetikai analízisét végeztük (az Alport szindróma leggyakoribb X-hez kötött, COL4A5 gént érintő és az ECD leggyakoribb, X-hez kötött EDA gént érintő formáját). Jelenleg kapcsolt markerekkel (linkage analysis/LA) lehetőség van a komplex betegségeket okozó gének szegregációjának nyomon követésére, azonban ehhez családi anamnézis, illetve több családtag érintettsége szükséges. LA azonban nem alkalmazható, ha a betegség először fordul elő egy családban, illetve a módszer csak indirekt utalást ad arra, hogy az adott génben esetlegesen kóroki mutáció van, de a konkrét mutációt nem azonosítja. A direkt szekvenálással COL4A gének által kódolt ~150 génszakaszt kellene PCR-al felszaporítani, tisztítani és szekvenálni), így kóroki eltérést megtalálni kihívást jelent.

Köszönhetően az újgenerációs szekvenáló technikák (NGS) megjelenésének lehetőség nyílt több gén/minta egy idejű vizsgálatára, ami lehetővé teszi a komplex betegségek költséghatékony genetikai analízisét.

Tézisemben két olyan komplex betegségcsoportot választottam, melyeknél az érintett gének számának, és a betegség előfordulási gyakoriságának köszönhetően a megoldatlan esetek száma nagy.

Alport szindróma és rokon betegségei

A COL IV nephropathiák (vékony bazális membrán nephropathia /VBMN/, Alport szindróma /AS/) genetikai hátterében a COL(IV) géncsalád eltérései állnak. Felnőttekben a glomeruláris bazális membrán IV-es kollagén láncát alkotó struktúr fehérjéket a COL4A3, A4, ill. A5 gének együttesen kódolják. A funkcionális fehérje komplex (tripla-hélix) mindegyik gén termékéből 1-1 kópiát tartalmaz. Ugyanazon génekben előforduló mutációk számától, ill. az érintett génektől függően a klinikai manifesztáció benignus familiáris hematuriót (COL4A3 vagy A4 láncok hibája), vagy súlyos tünetekkel járó Alport szindrómát is okozhat (X kromoszómához köthető XD-AS ~85%, autoszomális recesszív AR-AS ~14%). A végstádiumú vesebetegség (ESRD/CKD) kialakulásának, továbbá a betegség megelőzése/tovább öröklődésének elkerülése érdekében elengedhetetlen a korai diagnosztika. Habár a betegség progressziója különböző lehet egyénenként, a korán diagnosztizált eseteknél az időben megkezdett terápia (anti-hypertensive terápia, korlátozott protein bevitel, dohányzás elhagyása, stb) az ESRD kialakulását évekkel kitolhatja.

Ectodermalis dysplasia

Több mint 150 klinikailag különböző öröklődő betegségben van jelen Ectodermalis dysplasia. Arra a kérdésre, hogy mennyien vannak, akik hordozzák eme betegséget, nehéz választ adni. A legutóbbi felméréseket a *The Birth Defects Encyclopedia* 1990-es kiadása közli, miszerint 10000 gyermekből minden hetedik ED szindrómával születik. A klinikailag heterogén betegség csoport genetikai háttere nem homogén.

Az Ectodermalis dysplasia tünetei eltérő, szemmel látható tulajdonsággal jelentkeznek függően az érintett szövetek struktúrájától. Fenotípus jegyek nem mindig láthatók az újszülöttön, legtöbbször csak csecsemő, vagy gyermekkorban. Szervek, szövetek melyek érintettek lehetnek:

- szőrzet: a haj ritka, sokszor durva, meglehetősen törékeny, hullámos és csavarodott. A testszőrzet gyér, ritka és világos színű
- körmök: a kézen és a lábujjakon vastag, abnormálisan hegyes, elszíneződött, domborodott. Előfordul, hogy a körmök hiányoznak,
- fogak: abnormális fogfejlődés hiányos fogazatot, vagy hegyes ritkán elhelyezkedő fogakat eredményez. Fogzománc általában nincs. Szájsebészeti kezelés szükséges,
- verejtékmirigyek: verejtékmirigyek hiányoznak, vagy kevesebb van belőlük. Verejték funkció leromlásával a test nem képes a normál testhőmérséklet tartására, ezért ezek a betegek nem tolerálják a magas külső hőmérsékletet. Gyakori a lázas periódus, mely gyermekkorban diagnosztikai jel.

Genetikai vizsgálattal elősegíthetjük az Ectodermalis dysplasia különböző tüneteit mutató betegek prenatális diagnózisának felállítását, valamint pozitív családtervezését is.

A tézis céljai

1. Új generációs szekvenáló platformon történő mutáció szűrése 14 COL IV nephropathias családnak valamint 3 COL IV nephropathias egyedi esetnek, kiknek genetikai diagnózisa megoldatlan.
2. Jobb és érthetőbb leírása az Alport szindróma vitatott öröklődés menetének (AD, AR).
3. Három különböző tünetet mutató Ectodermalis dysplasias család klinikai exom szekvenálása genetikai diagnózisuk felállítása céljából.

Betegek és Módszer

Alport és rokon betegségei

Alport szindróma gyanús (haematurias/proteinurias/vese transzplantált/végstádiumú vesebeteg), vékony bazális membrán nephropathia gyanús betegek új generációs szekvenáló platformon (NGS) történő mutáció azonosítását végeztük el. A betegek beválogatási kritériuma a következő szempontokat követte:

VBMN: enyhe perzisztáló haematuria (25–30 vvt/látótér), enyhe (0,5–1,0 g/nap) proteinuria, első megjelenés 10 éves kor felett.

AS: perzisztáló haematuria (> 30, 50–100 vvt/látótér), perzisztáló proteinuria (0,5–5,0 g/nap),

A genetikai vizsgálathoz egy általunk tervezett (Ion AmpliSeq™ Designer version 4.2.1) Alport/TBMN panelt használtunk, amely tartalmazza a COL4A3-4-5 géekre specifikus primereket. Minták szekvenálása IonTorrent 316 chip-en történt. A kapott variánsok bioinformatikai kiértékelését CLC Bio, Torrent Suite 4.2 és Illumina VariantStudio programokkal végeztük. Kórokinak ítélt eltérések validálása, és az igazolt variánsok célzott vizsgálata az érintett családokban Sanger típusú szekvenálással történt. Összesen 17 (14 család + 3 egyedi eset) beteg került panelünkre, majd a talált variánsokat további 55 családtagban Sanger szekvenálással ellenőriztük.

Ectodermalis dysplasia

Három különböző tüneteket mutató ED-s beteg és családtagjainak vizsgálatát végeztük el Klinikai exom szekvenálással (CES).

1. család: 35 évvel ezelőtt egy éves korában ED-vel diagnosztizált férfi kérte ismételt kivizsgálását pozitív családtervezésének elősegítése céljából. Tünetei (gyakori lázas periódusok, fog fejlődési zavar, kopaszság) a Hypohidroticus ED-t valószínűsítették. A beteg férfin kívül megvizsgáltuk tünetes édesanyját, nagyanyját és 3 tünetmentes rokonát, valamint tünetmentes családtagokat is.

2. család: 4 évvel ezelőtt került gondozásunkba egy 14 éves fiú, akinek klinikai tünetei alapján felmerült az Ectodermalis dysplasia. Nála a betegség a fogak fejlődési zavarával, hiányos testszőrzettel és csökkent verejtékfunkcióval jelentkezett. A családi anamnézisében anyai nagyapa is hasonló tüneteket mutatott. A beteg fiú családjában több tünetest is találtunk, azonban enyhébb tünetekkel (csak fog fejlődési zavar). Azaz, a családban két eltérő fenotípus szegregálódik már három generáción át, melyből feltételezzük több gén érintettségét.

3. család: 5 éves indiai fiú aki harmad generációs rokonházasságból született. A fiúnak hiányos haja, szemöldöke, disztrófiás körmei és syndactiliája (kettes és hármas lábujjak között) megerősíteni látszik az Ectodermalis dysplasia-t. A fiún kívül megvizsgáltuk még tünetmentes édesanyját és édesapját.

Mindegyik családból egy- egy tünetes családtagot válaszottuk ki NGS-re. Mivel az ECD.141 génhez köthető, ezért ezen gének együttes vizsgálatához a klinikai exom szekvenálást választottuk. A minták szekvenálásához TruSight One Sequencing Panel-t (MiSeq, Illumina) használtuk. A panel lefedi az összes olyan gént (4813), melyek pathogen státusza adatbázisokban (HGMD, OMIM) már szerepel.

Validálás, konvencionális szekvenálással

A kapott variánsokat mind az AP/VBMN, mind az ECD betegeknél Sanger típusú szekvenálással validáltuk. Az igazolt eltéréseket ezek után célzottan vizsgáltuk az egyes családokban, az egészséges, illetve klinikai tüneteket hordozó családtagoknál, így a különböző variánsok patológiai státuszát a családon belüli geno-fenotípus korrelációval tudtuk igazolni.

Eredmények

Közel 80 mintában (20 proband /NGS/ + 60 db rokon /Sanger szekvenálás/) azonosítottuk az AS/VBMN valamint Ectodermalis dysplasia kialakulásában szerepet játszó mutációkat. Alport panelünkkel 14, míg CES panellel három eddig nem publikált kóroki eltérést azonosítottunk. A vizsgált 17 nephropathiás, valamint a 3 ECD-s család mindegyikénél sikerrel azonosítottuk a betegségükért felelős kóroki eltéréseket.

Összefoglalás és következtetések

1. Sikeresen beállítottunk egy költséghatékony (<500 EUR/minta) NGS módszert (Custom AmpliSeq panel, bioinformatikai kiértékelés) a COL4A3-A4-A5 gének szimultán vizsgálatára, amely alkalmas az SNP-k és kisebb INDEL-ek vizsgálatára.
2. A 17 kiválasztott Alportos eset mindegyikében megtaláltuk a tünetekért felelős mutációkat. Eredményeink alapján az NGS alapú mutációanalízis alkalmas lehet a COL4 nephropathiák genetikai analízisére.
3. Klinikai exom szekvenálással sikeresen azonosítottunk és validáltunk kóroki eltéréseket Ectodermalis dysplasia betegségekben (4 db irodalomban nem szereplő mutáció), melyek betegségük klinikai manifesztációját alátámasztották.
4. Genetikai eredményeinknek köszönhetően későbbiekben segítséget nyújthatunk, ezen családok számára a pozitív családtervezés elősegítésében.
5. Eredményeink alapján úgy véljük, hogy:
 - az Alport szindróma egy olyan spektrum betegség, melynek a fenotípusos megjelenése a COL4A3-A4-A5 fehérjék által létrejött tripla hélix mennyiségétől függ, ahol a spektrum egyik végpontja az FBH/VBMN, másik végpontja az Alport szindróma
 - AD Alport szindróma vélhetőleg technikai, vagy a klinikai diagnózis értelmezésbeli különbségeinek eredménye
 - a klinikailag jól meghatározható, néhány génhez köthető betegségeknél a célzott NGS megfelelő a genetikai diagnosztikához
 - komplex, több génhez köthető betegségeknél a klinikai exom szekvenálás eredményesnek bizonyult a genetikai diagnosztikában

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom **Dr. Endreffy Emőkének**, aki megismertette velem a klinikai genetika alapjait, tudományos diákköri éveim szakmai irányításával végig kísérte, majd PhD. témavezetőmként aktívan részt vett szakmai fejlődésemben.

Nagyon köszönöm **Dr. Maróti Zoltánnak** témavezetését, professzionális szakmai tanácsait, mellyel tudományos munkám irányította szakdolgozatom megírásától kezdve a mai napig.

Köszönetet mondok **Dr. Kalmár Tibornak**, aki doktori képzésem ideje alatt rendkívüli szakmai tanácsokkal látott el és mai napig témavezetőmként segíti munkám. Köszönöm és hálával tartozom Nektek, hogy rendíthetetlen bizalmatok volt felém, e mellett barátságokkal is megtiszteltetek.

Köszönettel tartozom Dr. Rázga Zsoltnak szakmai támogatásáért.

Köszönetet mondok minden társszerzőmnek és munkatársamnak, akik segítettek klinikai munkámat, különösen Dr. Haszon Ibolyának, Dr. Sinkó Máriának, Dr. Karg Eszternek, Dr. Baráth Ákosnak, valamint a genetikai diagnosztikai laboratórium munkatársainak a kiváló technikai segítségért, elsősorban Borzási Erzsébetnek, Dr. Wellinger Károlynénak, Tisóczkiné Mustoha Máriának és Vida-Szűcs Tündének.

Köszönöm, Prof. Dr. Túri Sándornak, hogy doktori képzésem elindítását mind anyagilag, mind szakmailag támogatta.

Köszönöm, Dr. Bereczki Csabának, a Gyermekklinika intézetvezetőjének támogatását munkám során.

A családom kitartó támogatása, türelme és segítsége nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.

Közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló eredeti közlemények

Gábor Kovács, Tibor Kalmár, Emőke Endreffy, Zoltán Ondrik, Béla Iványi, Csaba Rikker, Ibolya Haszon, Sándor Túri, Mária Sinkó, Csaba Bereczki, Zoltán Maróti. Efficient Targeted Next Generation Sequencing-based workflow for differential diagnosis of Alport-related disorders; *PlosOne*; 2016 DOI: 10.1371/journal.pone.0149241; [IF: 3,2]

Endreffy Emőke; **Kovács Gábor**; Horváth Emese; Karg Eszter; László Aranka; Túri Sándor. Ectodermalis Dysplasias férfi molekuláris genetikai vizsgálata. *Gyermekógyászat*; 2008; 2008/59. p. 85-88.

Az értekezés témájához kapcsolódó egyéb közlemények

Zsolt Razga, **Gabor Kovacs** et al. Upregulation of the L-type Calcium Channel in Renin-positive Smooth Muscle Cells of Arterioles in the Kidneys of Rats with STZ-induced Diabetes; *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*; 2015; 37(4):214-20. [IF: 0,5]

Zsolt Razga, **Gabor Kovacs**, Nikolett Bódi, Petra Talapka, and Jens Randel Nyengaard. Heterogeneous Downregulation of Angiotensin II AT1-A and AT1-B Receptors in Arterioles in STZ-Induced Diabetic Rat Kidneys. *BioMed Nephrology*; 2014; ID 947506. [IF:2,8]