

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Amiotrófiás laterálszklerózisban szenvedő magyar betegek
átfogó genetikai vizsgálata

A Ph.D. értekezés tézisei

Dr. Nagy Zsófia Flóra

Témavezetők:
Prof. Dr. Széll Márta
Dr. Pál Margit

Szeged,
2024

1. Bevezetés

Az amiotrófiás laterálszklerózis (ALS) progresszív neurodegeneratív megbetegedés, ami az alsó és felső motoneuronok pusztulásával jár az agytörzsben és a gerincvelőben. Európai populációkban az ALS incidenciáját 2-3/100 000/év körülire becsülik, ezzel a leggyakrabban előforduló motoneuron betegség.

Az ALS mind az alsó- mind a felső motoneuronokat érinti, a főbb tünetek közé tartozik az izomgyengeség vagy izommerevség, izomfogyatkozás, valamint a fasciculatio. A betegség lefolyása során bulbáris tünetek is jelentkezhetnek, úgymint a dysphagia, dysarthria. Az ALS-ban szenvedő betegek halálát az esetek többségében légzési elégtelenség okozza, amennyiben a sorvadás eléri a légzési segédizmokat.

Jelenleg ALS indikációban két hatóanyag érhető el, a riluzole és az edaravone, ám bár ezek a gyógyszerek csupán mérsékelten hosszabbítják meg a betegek túlélését. 2024-ben egy antisense oligonukleotid alapú gyógyszert engedélyezett az Európai Gyógyszerügynökség *SOD1* mutációt hordozó betegek részére.

Minden terápiás próbálkozás ellenére az ALS betegek medián túlélése a diagnózistól számítva 1.5-4 év.

1.1 Az ALS genetikai háttere

Az ALS esetek mintegy 10%-ában pozitív a családi anamnézis (fALS), míg az esetek 90%-a sporadikus megbetegedés. Az első gént 1993-ban hozták kapcsolatba a betegség kialakulásával, ez a szuperoxid dizmutáz 1 (*SOD1*) gén. Azóta több, mint 130 gén eltéréseit írták le a betegség hátterében. A leggyakrabban azonosított genetikai eltérés a *C9orf72* gén promóter régiójában található GGGGCC hexanucleotid ismétlődés kóros mértékű megnövekedése. Az elmúlt 20 évben az újgenerációs szekvenálási eljárások fejlődésével egyre több gén eltéréseit hozták kapcsolatba az ALS kialakulásával. Az ALS-sal való összefüggésük alapján a géneket két csoportra oszthatjuk: kóroki és genetikai rizikófaktorok/fenotípus módosító gének.

2. Célkitűzés

Dolgozatomban a kutatócsoportunk által a magyar amiotrófiás laterálszklerózis populáció komplex genetikai architektúrájának feltárására, a genotípus-fenotípus összefüggések megértésére végzett genetikai vizsgálatokat foglaltam össze.

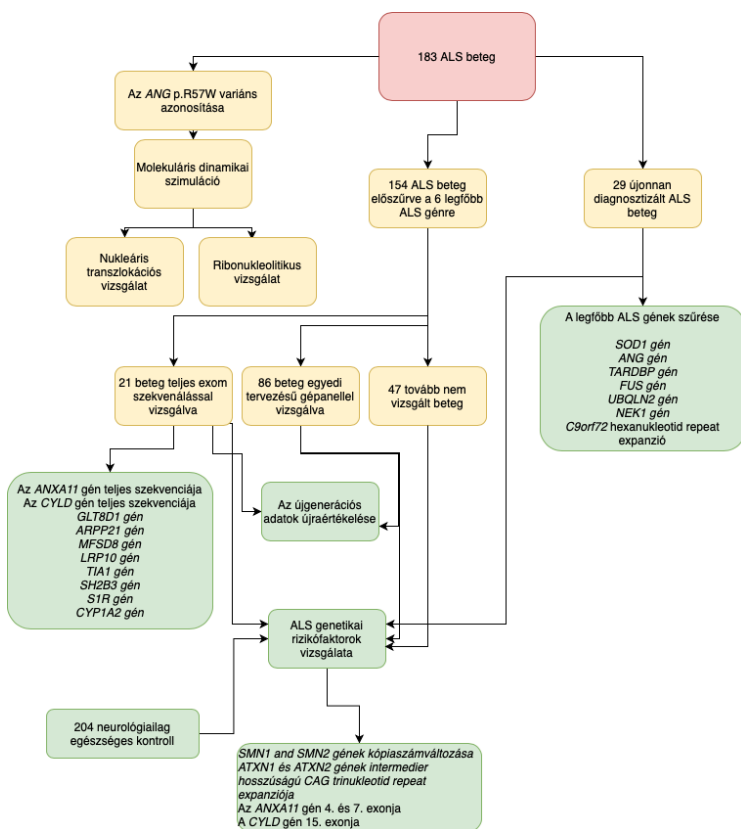
3. Betegek és módszerek

3.1 Betegek

Vizsgálatainkba 183 egymással rokon kapcsolatban nem álló, 2008 és 2021 között diagnosztizált magyar ALS beteg került bevonásra. Egy beteg számolt be pozitív családi anamnéziséből. Minden páciens megfelelt az El Escorial és Awaji-shima ALS diagnosztikus kritériumoknak, és a megfelelő tájékoztatás után írásos beleegyezését adta a kutatásban való részvételhez. Kutatásunkat a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottsága is jóváhagyta.

3.2 Módszerek

Vizsgálatainkat perifériás vérből izolált genomi DNS mintákon végeztük, melyet erre a célra fejlesztett DNS izoláló kit segítségével tisztítottunk a gyártó utasításainak megfelelően.



1. ábra. Az alkalmazott vizsgálati algoritmus

Az ALS-ben leggyakrabban mutációt hordozó génekre előszűrte 107 beteget újgenerációs szekvenálási technikát alkalmazva vizsgáltuk tovább. Huszonegy beteg esetében teljes exom szekvenálást végeztünk, 86 beteg esetében pedig egy 294 génből álló egyedi tervezésű génpantelt elemeztünk. Három

géncsoportot vizsgáltunk: „Major ALS gének” (35 gén), „Kandidáns vagy minor ALS gének” (99 gén) valamint „Egyéb neurodegeneratív/neuromuscularis betegségekkel kapcsolatba hozott gének” (160 gén). Az azonosított variánsok szerepének értelmezésekor az Amerikai Klinikai Genetikai Társaság (ACMG) 2015-ös irányelvét vettük alapul.

A hat, leggyakrabban mutációt hordozó major ALS gént (*SOD1*, *TARDBP*, *ANG*, *FUS*, *UBQLN2* és *NEK1*) Sanger szekvenálással vizsgáltuk. A *C9orf72* gén promóter régiójában elhelyezkedő G4C2 hexanukleotid repeat expansziót hosszú leolvasású repeat primed PCR technikával vizsgáltuk. Az *ATXN1* és *ATXN2* génben található trinukleotid repeat expanszió vizsgálatához fragmens hossz analízist alkalmaztunk. Az *SMN1* és *SMN2* gének kópiaszám eltéréseit *MLPA* (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) módszerrel analizáltuk.

A kutatócsoportunk által azonosított *ANG* p.R57W variáns patogén jellegének megerősítésére *in silico* modellezést és számítógépes szimulációs vizsgálatokat végeztünk. Ezekhez a vizsgálatokhoz az *in-silico* p.R57W mutánst a vad típusú másodlagos fehérjeszerkezet megtartása mellett hoztuk létre. A mutáns fehérje ribonukleolitikus aktivitásának vizsgálatához a

vad típusú és a p.R57W mutáns angiogenin fehérjék ribonukleolitikus aktivitását élesztő tRNS szubsztráton mértük. A fenti vizsgálatokból kapott eredmények kiegészítéseként nukleáris transzlokációs vizsgálatot végeztünk humán köldökvénás endotélsejtek (HUVEC) tenyészetein.

4. Eredmények

4.1 Legfőbb ALS gének

Kohortunkban a korábban már leírt *SOD1*: c.435G>C; p.L145F variáns a leggyakrabban azonosított kóroki variáns. három nöbeteg esetében került azonosításra.

A leggyakoribb kóroki eltérésként leírt túl hosszú *C9orf72* hexanukleotid ismétlődést a vizsgált betegek 9.56%-ában (13/136) azonosítottuk.

4.2 Újgenerációs szekvenálási (NGS) eredmények

A „Major ALS gének” génszettjében 25 releváns variánst azonosítottunk. Ezek közül egy variáns klasszifikálható patogénként, 3 vélhetően kóroki és 21 ismeretlen jelentőségű variáns (VUS). A kóroki variánst az

ALS2 génben, míg két vélhetően kóroki variánst a *SQSTM1* és az *UBQLN2* génben azonosítottuk.

Az elmúlt öt évben napvilágot látott kutatási eredményeket figyelembevételével újrakategorizáltuk a korábban detektált variánsokat. . Három esetben változott a variánsok besorolása a korábbiakhoz képest.

A „Kandidáns vagy minor ALS gének” közül 32 releváns variánst azonosítottunk 25 betegben. Egy variáns patogénként, egy másik variáns vélhetően kórokiént besorolható, míg 30 VUS.

Az „Egyéb neurodegeneratív/neuromuscularis betegségekkel kapcsolatba hozott gének” esetében 45 különböző variánst (2 patogén, 43 VUS) azonosítottunk 29 génben.

Az NGS eredmények újraanalizálásával olyan géneket is vizsgálni tudtunk, amelyeket az első értékelés óta hoztak kapcsolatba az ALS kialakulásával. Három VUS és egy vélhetően kóroki szekvenciaeltérést azonosítottunk. A vélhetően kóroki *MFSD8* c.910C>T, p.Q304X variáns a transláció korai terminációjához vezethet.

4.3 Az *ANG* c.169C>T p.R57W variáns funkcionális vizsgálata

Az *in silico* analízis során a fehérje 114. aminosav pozíciójában elhelyezkedő, a katalikus hely felépítésében résztvevő hisztidin konformációs változást mutatott, ami csökkent ribonukleolitikus aktivitásra utal.

Továbbá a vad típusú és a mutáns protein nukleáris transzlokációs aktivitása között szignifikáns különbséget tudtunk kimutatni, ami arra enged következtetni, hogy a p.R57W mutáció csökkenti a fehérje sejtmagi transzlokációs képességét.

4.4 Az ALS genetikai rizikófaktorainak vizsgálata

A vizsgált betegek csaknem 9%-a (8.79%, 16/182) hordozott egy intermedier hosszúságú CAG allélt az *ATXN1* génben, míg a kontrollcsoport 1.12%-ában (2/178) figyeltünk meg intermedier allélt.

Az *ATXN2* gén intermedier hosszúságú repeat expanzióját a betegcsoport 18.3%-ában (26/153), míg a kontrollcsoport 9.23%-ában (18/195) azonosítottuk.

Az *SMN1* gén duplikációt az ALS betegek 4.05%-ában és az a kontrollcsoport 4.73%-ában detektáltuk. Az *SMN2* pszeudogén homozigóta delécióit a betegcsoport 4.73%-a és az egészségesek 6.76%-a hordozta.

5. Megbeszélés

Vizsgálatunkban 183 magyar származású, 2008 és 2021 között diagnosztizált ALS beteg részletes genetikai vizsgálatát végeztük el. Vizsgálatainkhoz Sanger szekvenálást, újgenerációs szekvenálási módszereket, MLPA-t és fragmens analízist használtunk. Analizáltuk a major, a kandidáns ALS géneket, valamint vizsgáltunk más neurodegeneratív/neuromuscularis betegségekkel kapcsolatba hozott géneket is. Ezenkívül analízisünk kiterjedt az ALS genetikai rizikófaktoraira is.

5.1 A *C9orf72* repeat expansió és a *SOD1* gén mutációi a leggyakrabban azonosított genetikai eltérések a magyar ALS betegek körében

A *SOD1* c.435G>C, p.L145F variáns a magyar ALS betegek körében leggyakrabban azonosított genetikai eltérés. Szakirodalmi adatok szerint a variáns későbbi betegségkezdettel és lassabb betegséglefolyással hozható kapcsolatba. A 2021-ben diagnosztizált, *SOD1* c.435G>C, p.L145F variánst hordozó betegünk fenotípusa megfelel a szakirodalomban leírtaknak.

C9orf72 gén hexanukleotid repeat expanszióját a vizsgált betegek 9.56%-a (13/136) hordozta, ami magasabb arány más európai populációkhoz viszonyítva. A *C9orf72* pozitív betegek korábbi betegségkezdetet és gyakoribb bulbáris betegségindulást mutattak a *C9orf72* negatív betegekhez képest.

5.2 A panel szekvenálási adatok újraértékelése átsorolt egyes variánsokat és új, ALS-sal kapcsolatba hozható variánsokat tárt fel

A „Major ALS gének” között egy ismert patogén *ALS2* génvariáns (c.3529G>T, p.G1177Ter) került detektálásra heterozigóta formában. A variáns biállélikus jelenléte újszülöttkori kezdetű felszálló paralízist okoz, míg a heterozigóta formák felnőttkori kezdetű motoneuron betegséggel asszociálnak. Két vélhetően patogén variánst azonosítottunk a *SQSTM1* génben. Mindkét variáns az erősen konzervált ubiquitin kötő doménben helyezkedik el. Egy vélhetően kóroki variánst (c.1174A>G, p.M392V) detektáltunk az *UBQLN2* génben, amit korábban egy kínai kutatócsoport is leírt. Kohortunkban a betegek 5.61%-a hordozott több, mint egy releváns variánst major ALS génekben. Variánsok együttes előfordulását más kutatócsoportok is leírták már korábban.

A „Kandidáns vagy minor ALS gének” valamint „Egyéb neurodegeneratív/neuromuscularis betegségekkel kapcsolatba hozott gének” között összesen 77 releváns variánst azonosítottunk. Néhány esetben a betegség és a variánsok összefüggése kérdéses, mivel az öröklésmenet nem felel meg az azonosított variáns zigoztásának.

A korábban értékelt adatok újraelemzése során a nemrégiben ALS kialakulásával kapcsolatba hozott gének vizsgálatára is volt lehetőség. Egy vélhetően patogén *MFSD8* variánst (c.910C>T, p.Q304X) azonosítottunk, ami megrövidült fehérjetermék képződéséhez vezethet. Továbbá egy *GLT8D1* variánst (c.13A>G, p.K5E) azonosítottunk, ami a Golgi lokalizációs szignál egyik aminosavát változtatja meg, ezáltal úgy véljük, hogy megváltozik a fehérje sejten belüli eloszlása.

5.3 Egy újonnan detektált angiogenin variáns károsítja a fehérje ribonukleolitikus- és nukleáris transzlokációs aktivitását is

A detektált *ANG* c.169C>T, p.R57W variáns ribonukleolitikus aktivitásának vizsgálata alapján kijelenthető, hogy a variáns a vad típusú fehérjéhez képest alig több, mint 50%-nyi ribonukleolitikus aktivitással bír.

Az aminosavcsere következtében a mutáns fehérje zártabb struktúrát vesz fel, így a mutáns fehérje nukleáris transzlokációs aktivitása csökken.

Eredményeink támogatják az *ANG* c.169C>T, p.R57W variáns patogenitását.

5.4 Az *ATXN1* és *ATXN2* gének ALS kialakulására hajlamosító intermedier repeat expansziója gyakori a magyar populációban

ATXN1 intermedier hosszúságú allélokot a betegcsoport 8.79%-ában és a kontrollesoport 1.12%-ában azonosítottunk, ami magasabb, mint más európai populációban. A *C9orf72* és *ATXN1* gének repeat expansziói gyakran fordulnak elő egymás mellett. Kohortunkban egy agresszív, bulbáris kezdetű ALS beteg hordozta mindkét repeat expansziót.

Hasonlóképpen az *ATXN2* gén intermedier hosszúságú repeat expansziója is gyakoribb a magyar származású ALS betegek körében, mint más európai populációban. Ennek a jelenségnek az oka eddig ismeretlen.

Eredményeink alapján sem az *SMN1* gén duplikációi, sem az *SMN2* gén homozigóta deléciói nem jelentős genetikai rizikófaktorai az ALS kialakulásának a magyar populációban.

6. Konklúzió

A PhD disszertációm alapjául szolgáló közleményekben először írtuk le a magyar ALS betegek körében végzett vizsgálataink eredményét, aminek alapján új, vélhetően ALS asszociált genetikai eltérések kerültek detektálásra.

Munkánk során egy korábban le nem írt angiogénin mutációt azonosítottunk. Patogenitását funkcionális analízissel igazoltuk. Huszonegy ALS beteg esetén teljes exom szekvenálást követő analízist végeztünk, 86 beteg esetén egyedi tervezésű génpanel vizsgálatot alkalmaztunk. A teljes exom szekvenálások adatait újraelemeztük az elmúlt öt év szakirodalmi eredményeinek figyelembevételével. Ezenfelül ismert ALS kialakulására hajlamosító genetikai rizikófaktorokat is vizsgáltunk a magyar ALS betegek körében.

Vizsgálataink során a betegek mintegy 41%-ában sikerült releváns variánst azonosítanunk, valamint új genotípus-fenotípus összefüggéseket is fel tudtunk állítani. Munkánk az első, a magyar ALS populáció genetikai hátterét vizsgáló tanulmány. Ezekkel az adatokkal kívánunk hozzájárulni a betegség populációs-specifikus genetikai aspektusainak megértéséhez.