

Genetikai vizsgálatok amiotrófiás laterális szklerózisban szenvedő magyar betegekben

A Ph.D. értekezés tézisei

Tripolszki Kornélia



Szeged

2017

**Genetikai vizsgálatok amiotrófiás laterális szklerózisban
szenvedő magyar betegekben**

A Ph.D. értekezés tézisei

Tripolszki Kornélia

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Témavezető:

Dr. Nagy Nikoletta Ph.D.

Orvosi Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2017

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapját képező közlemények

- I. **Tripolszki K**, Csányi B, Nagy D, Ratti A, Tiloca C, Silani V, Kereszty É, Török N, Vécsei L, Engelhardt IJ, Klivényi P, Széll M, Nagy N. Genetic analysis of the SOD1 and C9orf72 genes in Hungarian patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging* 2017. Published online: 2017.01.29. **IF: 5,153**
- II. **Tripolszki K**, Török D, Goudenege D, Farkas K, Sulák A, Török N, Engelhardt J, Klivényi P, Procaccio V, Nagy N, Széll M. High-throughput sequencing revealed a novel SETX mutation in a Hungarian ALS patient. *Brain Behav* 2017. Accepted manuscript **IF: 2,128**
- III. **Tripolszki K**, Nagy ZsF, Nagy D, Török N, Klivényi P, Engelhardt IJ, Vécsei L, Nagy N, Széll M. *ANG* and *TARDBP* mutations in Hungarian patients with amyotrophic lateral sclerosis. Manuscript in preparation.

Egyéb közlemények

- I. Kinyo A, Valyi P, Farkas K, Nagy N, Gergely B, **Tripolszki K**, Torok D, Bata-Csorgo Z, Kemeny L, Szell M. A newly identified missense mutation of the EDA1 gene in a Hungarian patient with Christ–Siemens–Touraine syndrome. *Arch Derm Res* 2014; 306(1):97-100. **IF:2,270**
- II. Nagy N, Valyi P, Csoma Z, Sulak A, **Tripolszki K**, Farkas K, Paschali E, Papp F, Toth L, Fabos B, Kemeny L, Nagy K, Szell M. CTSC and Papillon–Lefèvre syndrome: detection of recurrent mutations in Hungarian patients, a review of published variants and database update. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 2014; 2(3):217-228.
- III. Vályi P, Farkas K, **Tripolszki K**, Sulák A, Széll M, Nagy N, Nagy K. Rekurrens európai misszensz mutáció egy magyar Papillon-Lefèvre szindrómában szenvedő családban. *Fogorvosi Szemle* 2014; 107(3):87-92.
- IV. Nagy N, Farkas K, **Tripolszki K**, Sulák A, Kemény L, Széll M. A cylindromatosis gén mutációi által okozott genodermatosisok. *Bőr Vener Szemle* 2014; 90:(5) 185-193.

- V. Sulak A, Toth L, Farkas K, **Tripolszki K**, Fabos B, Kemeny L, Valyi P, Nagy K, Nagy N, Szell M. One mutation, two phenotypes: a single nonsense mutation of the CTSC gene causes two clinically distinct phenotypes. *Clin Exp Dermatol* 2016; 41(2):190-195. **IF: 1,092**
- VI. **Tripolszki K**, Knox R, Parker V, Semple R, Farkas K, Sulák A, Horváth E, Széll M, Nagy N. Somatic mosaicism of the PIK3CA gene identified in a Hungarian girl with macrodactyly and syndactyly. *Eur J Med Genet* Apr;59(4):223-6. **IF: 1,81**
- VII. **Tripolszki K**, Farkas K, Sulák A, Duga B, Melegh B, Knox R, Parker V, Semple R, Kemény L, Széll M, Nagy N. Atypical neurofibromatosis type 1 with unilateral limb hypertrophy mimicking overgrowth syndrome. Accepted manuscript. *Clin Exp Dermatol*. Accepted on 28 June 2016. **IF: 1,315**

1 BEVEZETÉS

1.1 *Amiotrófiás laterális szklerózis*

1.1.1 Klinikai leírás

Az amiotrófiás laterális szklerózis (ALS; ORPHA803) egy gyógyíthatatlan neurodegeneratív betegség, mely az alsó- és felső motoneuronok pusztulásával jár. A felnőttkori motoneuron betegségek közé a következőket soroljuk: ALS, a felső- és alsó motoneuronok érintettségével; primer laterália szklerózis (PLS), csak felső motoneuron léziók; és alsó motoneuron betegség, melyet a pontobulbáris és/vagy spinális motoneuronok érintettsége jellemez. Egy a közelmúltban megjelent közleményben leírtak szerint az ALS klinikai tünetei egy széles spektrum mentén mozognak, a felső motoneuronok kizárólagos érintettségétől az alsó motoneuronok kizárólagos érintettségéig.

Az érintett egyének a betegség kialakulását követően átlagosan 3-5 évig élnek, a halált leggyakrabban légzési elégtelenség okozza. Az ALS-ben szenvedő betegek hozzávetőlegesen 5-10%- a családi halmozódást mutat, míg a többi eset a sporadikus esetek közé tartozik, bár egyes népcsoportok esetében ez az arány eltérő lehet. Az ALS gyógyítására jelenleg nem létezik hatékony kezelés, vannak a betegség progresszióját lassító készítmények, mint a riluzole, mely a glutamát kibocsátást gátolva lassíthatja a betegség előrehaladását.

1.1.2 Genetikai háttér

Az ALS genetikai háttérének feltérképezésére irányuló kutatások nagy jelentőséggel bírnak, mivel segítenek felderíteni az sejthalál mechanizmusát a betegségben. Eddigi eredmények alapján elmondható, hogy a betegség kialakulásának leggyakoribb mechanizmusai a citoplazmatikus fehérje aggregátumok és a kóros RNS anyagcseréhez köthető. Eddig több, mint 20, az ALS kialakulásával kapcsolatba hozható gén került leírásra, melyek a Mendeli öröklődést mutató ALS formákat okozzák, további 100 génben található variánsok pedig mint hajlamosító faktorokként ismertek (ALSoD Adatbázis). Az ALS autoszómális domináns,

autoszómális recesszív és X-hez kötött öröklődésmentet mutathat. A familiáris esetek főként autoszómális domináns öröklődésmentet mutatnak.

1.1.2.1 Szuperoxid-dizmutáz 1 gén (*SOD1*)

Az ALS kialakulásáért felelős gének közül a szuperoxid-dizmutáz 1 (*SOD1*) az egyik leggyakrabban mutációkat hordozó gén, mely a familiáris esetek 12-23%-ának és a sporadikus esetek 7%-ának kialakulásáért felelősek. A *SOD1* gén a Cu/Zn szuperoxid-dizmutáz enzimet kódolja, mely a szuperoxid (reaktív oxigén származék) oxigénné és hidrogén peroxiddá való inaktivációját katalizálja, ezzel antioxidáns védelmet biztosítva. A *SOD1* génen található mutációkat Rosen és mtsai. 1993-ban hozták először kapcsolatba a betegség kialakulásával, és azóta 170 mutáció került leírásra. Kóroki mutációk a *SOD1* gén minden exonjában egyaránt előfordulhatnak.

1.1.2.2 TAR DNS kötő fehérje gén (*TARDBP*)

A humán TDP-43 a HIV-1 vírus transzaktív válasz (TAR) DNS kötő elem transzkripció represszorok felderítésével kapcsolatos kutatások kapcsán került először leírásra 1995-ben. A TDP-43 ALS kialakulásával való összefüggését először 2006-ban írták le, és azóta több mint 40, az ALS kialakulásának hátterében álló mutáció került azonosításra. A *TARDBP* gén 6 exonból áll, és egy mutáció kivételével (p.D169G in exon 4), az eddig azonosított patogén variánsok az utolsó exonra lokalizálódnak.

1.1.2.3 Angiogenin gén (*ANG*)

Az *ANG* gén az angiogenint, egy 123 aminosavból álló, 14,1kDa molekulatömegű fehérjét kódol, mely a 14q11.2 kromoszómán helyezkedik el. Az *ANG* fehérje a pankreatikus ribonukleázok szupercsaládjába tartozik, és az rRNS biogenezisében, sejtproliferációban és a tRNS hasításával történő fehérje transzláció gátlásban játszik kulcsfontosságú szerepet. Az *ANG* gént az ír és skót ALS-ben szenvedő betegek vizsgálata kapcsán, 2004-ben hozták először összefüggésbe a betegség kialakulásával. Az *ANG* génen található mutációkhoz köthető ALS az ALS9 típusba

tartozik, mely egy autoszómális domináns öröklődésmentet mutató felnőttkorban jelentkező betegség. Napjainkig 29 ALS-sel asszociált variáns került detektálásra az *ANG* génen.

1.1.2.4 Chromosome 9 open reading frame 72 gén (C9orf72)

A *C9orf72* gén a leggyakrabban mutációt hordozó gén, melyet az ALS kialakulásával kapcsolatba hoztak. A gén első intronjában egy hexanukleotid (GGGGCC) repeat expansziót (RE) azonosítottak ALS és/vagy frontotemporális demenciában szenvedő egyéneknél. A repeat expanszió a 4400-as egységet is elérheti, míg normál tartományba a 2-23 számú ismétlődések tartoznak. A repeat expanszió mellett a *C9orf72* génen egy splice site-ot érintő mutációt írtak le 2016-ban.

1.1.2.5 Senataxin gén (SETX)

A senataxint kódoló gén (*SETX*) mutációit a *SOD1* gén eltéréseinél kisebb gyakorisággal detektálták ALS-ben. A *SETX* egy helikáz proteint kódol, mely az RNS anyagcserében és a genom integritás fenntartásában játszik fontos szerepet.

1.1.2.6 Fused in sarcoma gén (FUS)

A *FUS* gén a 16p11.2 kromoszómán található, és egy 526 aminosavból álló fehérjét kódol. A *FUS* fehérje egy nukleoprotein, mely a transzkripcióban, splicing-ban, RNS transzportban valamint a genom integritás fenntartásában játszik szerepet.

1.2 Célkitűzés

Munkám során célul tűztem ki 6 (*SOD1*, *TARDBP*, *ANG*, *FUS*, *SETX* és *C9orf72*), az ALS kialakulásának hátterében álló gén vizsgálatát egy magyar ALS-ben szenvedő betegekből álló csoportban (n=66). A dolgozatomban összefoglaltak képezik az első magyar ALS betegek kapcsán végzett genetikai vizsgálati eredményeket.

2 Betegek és módszerek

2.1 Vizsgálatba bevont betegek

A betegek (n=66) vizsgálatba történő bevonását a Szegedi Tudományegyetem, Neurológiai Klinika munkatársai végezték. Minden vizsgálatba bevont beteg megfelelt az ALS diagnózis felállításához használt módosított El Escorial és az Awaji-shima kritériumoknak.

2.2 Módszerek

2.2.1 DNS izolálás

Előzetes írásbeli beleegyezést követően perifériás vérminta vétel történt minden vizsgálatba bevont betegtől (n=66) és egészséges kontroll egyéntől (n=110). A genomi DNS izolálás a QIAamp DNA Blood Mini Kit használatával történt.

2.2.2 Mutáció szűrés hagyományos kapilláris szekvenálással

A *SOD1*, *TARDBP* és *ANG* gének teljes kódoló szakaszait és azokkal határos intron régiókat PCR reakció során amplifikáltam, és az így kapott termékeket megszekvenáltattam. A szekvenálás során kapott szekvenogramokat a vad típusú génszekvenciákhoz hasonlítva értékeltem ki. Minden régiót, melyben mutációt azonosítottam, egy független PCR reakció során újraamplifikáltam, és újraszekvenáltattam.

2.2.3 Repeat expanzió vizsgálat

2.2.3.1 Repeat-primed PCR és fragmenthossz analízis

Egy két lépésből álló módszert alkalmaztam a *C9orf72* génen található GGGGCC hexanukleotid RE vizsgálatához. A hexanukleotid repeat expanzió azonosítása a 6 bázispáronként jelentkező jelek jelenléte alapján történt, melyek fűrészfog mintázatot mutattak.

2.2.3.2 Genotipizálás

Annak eldöntésére, hogy a repeat expanziót hordozó egyén hordozza-e az ehhez kapcsolt rizikó haplotípust, a rs3849942 variánst választottam ki, mint a rizikó haplotípus markerét. A genotipizáláshoz fluoreszcensen jelölt szekvenciaspecifikus próbákat használtam.

2.2.4 Célzott-régió szekvenálás

2.2.4.1 Könyvtár készítés

Az amplikonokat úgy terveztem, hogy a 3 vizsgált gén (*SETX*, *FUS* és *C9orf72*) kódoló régióit illetve azokat határoló intronszakaszokat lefedjék. Az amplikon könyvtárak a Roche 454 amplikon könyvtár készítési kézikönyve szerint lettek összeállítva. Az amplikon könyvtár elkészítését követően az emulziós PCR-t és szekvenálást is elvégeztem.

2.2.4.2 Bioinformatikai kiértékelés

A Roche pipeline hatékonyságának növelése érdekében egy saját pipeline-t használtam a célzott-régió szekvenálásból származó eredmények kiértékelésére.

3 Eredmények

3.1 *SOD1* gén

Kapilláris szekvenálás alkalmazásával a szuperoxid dizmutáz 1-et kódoló génen négy különböző mutációt sikerült azonosítani 5 ALS-ben szenvedő beteg esetében: három az irodalomból ismert heterozigóta misszensz mutációt (c.43G>A p.Val14Met; c.272A>C p.Asp90Ala; c.435G>C p.Leu144Phe) és egy új, eddig nem leírt mutációt (c.275_276delAA, p.Lys91ArgfsTer8).

Az általam azonosított új mutáció (c.275_276delAA, p.Lys91ArgfsTer8) a *SOD1* gén negyedik exonjában található; kereteltolódást okoz, így 8 új aminosav épül be a fehérjébe, majd egy korai stop kodon jelentkezik. A p.Lys91ArgfsTer8 *SOD1* mutáció nem volt jelen a 110 egészséges kontroll egyénben illetve egyik általam használt mutációs adatbázisban sem.

A p.Leu144Phe mutáció a *SOD1* gén ötödik exonjában található, és 2 általam vizsgált ALS-ben szenvedő nőbeteg esetében detektáltam. A p.Val14Met mutációt, mely a *SOD1* gén első kódoló régiójában található, egy sporadikus ALS-ben szenvedő nőbeteg esetében azonosítottam, akinél az első tünetek 62 éves korban jelentkeztek. A p.Asp90Ala mutáció, mely a leggyakoribb *SOD1* mutáció Európában, a gén negyedik exonjában található, és egy magyar beteg esetében sikerült azonosítani. A p.Asp90Ala *SOD1* mutációt hordozó beteg esetében az rs111273304 splice-donor variánst (c.239+2T>A) is azonosítottam heterozigóta formában.

3.2 *TARDBP* gén

A kapilláris szekvenálás során egy az irodalomból ismert misszensz mutációt azonosítottam a *TARDBP* gén 6. exonjában (c.931A>G, p.Met311Val). Ez a variáns elsőként egy belga származású betegben került detektálásra Lemmens és munkatársai által 2009-ben.

3.3 *ANG* gén

Az *ANG* gén mutáció szűrése során két heterozigóta mutációt detektáltam (c.3G>A, p.Met-24Ile; c.169C>T, p.Arg33Trp). A p.Met-24Ile mutáció a szignál peptid régióban található, és először Conforti és munkatársai írták le 2008-ban egy olasz származású beteg vizsgálata kapcsán. Ezt a mutációt a *SOD1* p.Val14Met mutációt hordozó betegben azonosítottam, így ő két ALS-sel asszociált génben is hordozott valamilyen patogén variánst.

A második azonosított angiogenin mutáció (c.169C>T, p.Arg33Trp) a nukleáris transzlokációs szignált érinti, és eddig nem szerepelt az ALSod adatbázisban.

3.4 *C9orf72* gén

A *C9orf72* gén vizsgálata során a GGGGCC repeat expansziót egy beteg esetében sikerült detektálni heterozigóta formában. A többi beteg esetében (akiknél nem detektáltunk repeat expansziót) az átlagos repeatszám 5 volt (minimum 2 és maximum 17 repeat). A repeat expansziót hordozó beteg a rs3849942 rizikó allélt is hordozta, amit előzőleg a Finn rizikó haplotípus markereként írtak le.

3.5 *SETX* gén

Újgenerációs szekvenálás alkalmazásával egy az irodalomból eddig nem ismert misszensz mutációt (c.791A>G, p.Asn264Ser) azonosítottam a *SETX* génen egy magyar nőbeteg esetében. Az új c.791A>G, p.Asn264Ser *SETX* mutáció jelenlétét hagyományos kapilláris szekvenálással is megerősítettem. A mutáció nem volt jelen a beteg klinikailag tünetmentes 45 éves fiában illetve az egészséges kontroll egyénekben sem. Az újonnan azonosított variáns a *SETX* fehérje N-terminális régiójának egy az emlősökben konzervált régióját érinti.

4 Következtetések

Egy magyar ALS-ben szenvedő betegekből álló csoportban (n=66) a *SOD1*, *TARDBP*, *ANG*, *C9orf72*, *SETX* és *FUS* gének vizsgálatát végeztem el.

4.1 A *SOD1* gén mutációi

Azonosítottam egy az irodalomból eddig nem ismert valószínűleg patogén heterozigóta mutációt (p.Lys91ArgfsTer8) és három ismert misszensz mutációt (p.Val14Met, p.Asp90Ala and p.Leu144Phe) a *SOD1* génen. Az általam vizsgált betegek 7,5%-a hordozott valamilyen kóroki *SOD1* mutációt.

Az azonosított két bázispárt érintő deléción kereteltolódást eredményez, mely következtében nyolc új aminosav beépülése után korai stop kodon jelentkezik. A fehérje termék nagymértékű csonkulása következtében sérül a C57–C146 diszulfid híd.

A p.Asp90Ala mutáció a leggyakrabban előforduló *SOD1* mutáció Európában, és ismert, hogy domináns és recesszív öröklődésmenetet is társítottak hozzá. A magyar betegben azonosított p.Asp90Ala *SOD1* mutáció mellett egy bizonytalan jelentőséggel bíró ritka splice site variánst is azonosítottam.

A p.Leu144Phe misszensz mutáció a balkáni régióban leggyakrabban előforduló *SOD1* variáns, melyet egy sporadikus és egy familiáris esetben detektáltam a magyar betegcsoport vizsgálatakor.

A p.Val14Met mutáció egy rendkívül ritka variáns, melyet egy látszólag sporadikus ALS betegben detektáltam. A *SOD1* mutációk nem voltak jelen a 110 egészséges kontroll egyénben.

4.2 A *TARDBP* gén mutációi

Egy az irodalomból ismert kóroki mutációt (p.Met311Val) azonosítottam a *TARDBP* gén 6. exonjában. Egy mutáció kivételével (p.Asp169Gly a 4. exonban) az eddig leírt *TARDBP* mutációk mindegyike a C-terminális régiót kódoló régióban találhatóak. A magyar betegben detektált p.Met311Val mutáció a glicin gazdag régióra lokalizált, mely a fehérje más fehérjékkel való interakciójáért (beleértve a különböző ribonukleoproteineket) felelős.

4.3 Az *ANG* gén mutációi

Két heterozigóta mutációt azonosítottam az angiogenin génen (c.3G>A, p.Met-24Ile, p.Met1Ile; c.169C>T, p.Arg33Trp, p.Arg57Trp). A p.Met-24Ile patogén variáns a szignál peptidet kódoló régióra lokalizált, és először 2008-ban írták le Conforti és munkatársai. Ezt a variánst ugyanabban a betegben azonosítottam, aki a *SOD1* p.Met14Val mutációt is hordozta. Mivel a mutáció a start kodon harmadik bázisát érinti, befolyásolhatja a fehérje helyes transzlációját. A második detektált *ANG* variáns (p.Arg33Trp) a ²⁹IMRRRGL³⁵ nukleáris transzlokációs szignált érinti, így az angiogenin nukleáris transzlokációja sérül. A ³¹RRR³³ arginineknek kritikus szerepe van az angiogenin nukleáris transzlokációjának irányításában. A R³³ elengedhetetlen a nukleáris transzlokáció során, a ³¹RR³² pedig irányítják ezt a folyamatot.

4.4 *C9orf72* gén repeat expansió

A vizsgált 66 betegből egy esetben sikerült detektálni repeat expansió jelenlétét a *C9orf72* gén első intronjában. A beteg a RE mellett a rs3849942 rizikó allélt is hordozta heterozigóta formában, ami arra utal, hogy ugyanazon alapító hatás felelős a magyar beteg esetében azonosított és sok más kutatócsoport által azonosított RE létrejöttéért. Az általam vizsgált magyar ALS betegek 1,5%-ában volt jelen a RE a *C9orf72* génen, és ez nagymértékben eltér a nyugat-európai populáció vizsgálatok eredményeitől. Ezen eredmények azt is szemléltetik, hogy az ALS háttérében álló genetikai eltérések különböző(het)nek a különböző földrajzi régiókban és népcsoportokban.

4.5 A *SETX* gén mutációi

Célzott-régió szekvenálás alkalmazásával egy új kóroki variánst detektáltam a *SETX* génen (p.Asn264Ser). Eddig ezen a génen 17 patogén variánst írtak le, melyeket az autoszómális domináns öröklődést mutató 4-es típusú juvenilis ALS kialakulásával hoztak összefüggésbe. Az új *SETX* mutációt hordozó magyar beteg fenotípusa eltért a 4-es típusú ALS-re jellemző fenotípustól, mivel a magyar beteg esetében csak az alsó motoneuronok voltak érintettek, a 4-es típusú ALS-re pedig a kombinált alsó- és felső motoneuron érintettség a jellemző. Ez az első azonosított *SETX* mutáció a magyar ALS populációban.

4.6 A *FUS* gén mutációi

A magyar betegek genetikai vizsgálata során a *FUS* génen kóroki variánst nem detektáltam.

5 Összefoglalás

Az amiotrófiás lateral szklerózis (ALS) egy gyógyíthatatlan neurodegeneratív betegség, mely az alsó- és felső motoneuronokat érinti. Az esetek hozzávetőlegesen 90%-a sporadikus, míg a maradék 10% családi halmozódást mutat. A betegség komplex genetikai háttéréből adódóan a kóroki variáns csak ritka esetekben azonosítható. Eddig több, mint 20, az ALS kialakulásával kapcsolatba hozható gén került leírásra, melyek a Mendeli öröklődést mutató ALS formákat okozzák, további 100 génben található variánsok pedig mint hajlamosító faktorokként ismertek (ALSoD Adatbázis).

Munkám során célul tűztem ki egy magyar ALS-ben szenvedő betegekből álló csoport genetikai vizsgálatát, mely során 6 (superoxide dismutase, *SOD1*; TAR DNA binding protein, *TARDBP*; angiogenin, *ANG*; senataxin, *SETX*; fused in sarcoma, *FUS* és chromosome 9 open reading frame 72, *C9orf72*), az ALS kialakulásának háttérében álló gén vizsgálatát végeztem el. A dolgozatban összefoglaltak képezik az első magyar ALS betegek kapcsán végzett genetikai vizsgálati eredményeket.

A módosított El Escorial és az Awaji-shima diagnosztikai kritériumoknak megfelelő betegek (n=66) vizsgálatba történő bevonását a Szegedi Tudományegyetem, Neurológiai Klinika munkatársai végezték el. A *SOD1*, *TARDBP* és *ANG* gének kódoló régióinak és azokat határoló intron szakaszainak vizsgálatát hagyományos kapilláris szekvenálással végeztem el. A *C9orf72* gén első intronjában található GGGGCC hexanukleotid repeat expanszió vizsgálatát egy két lépésből (amplikon fragmenthossz analízis és repeat-primed PCR) álló módszerrel vizsgáltam. Annak eldöntésére, hogy a repeat expansziót hordozó egyén hordozza-e az ehhez kapcsolt rizikó haplotípust, a rs3849942 variánst választottam ki, és a genotipizáláshoz fluoreszcensen jelölt szekvenciaspecifikus próbákat használtam. A *SETX*, *FUS* és *C9orf72* gének kódoló régióinak és azokkal határos intronszakaszok mutáció szűrését célzott-régió szekvenálással végeztem el, és az újgenerációs szekvenálásból származó adatok kiértékeléséhez egy saját bioinformatikai pipeline-t alkalmaztam.

Hagyományos kapilláris szekvenálás alkalmazásával egy az irodalomból eddig nem ismert heterozigóta frameshift mutációt (c.275_276delAA, p.Lys92ArgfsX8) és három már ismert patogén variánst (p.Val14Met; p.Asp90Ala és p.Leu144Phe) detektáltam a *SOD1* génen öt ALS-ben szenvedő magyar beteg esetében. Az új *SOD1* mutáció (p.Lys91ArgfsTer8) kereteltolódást és 8 új aminosav beépülését

eredményezi, és ezt követően pedig korai stop kodon jelentkezik, ami a fehérje nagymértékű csonkulásához vezet. A *TARDBP* génen egy igazoltan patogén misszensz mutációt azonosítottam (p.Met311Val), mely a TDP-43 fehérje C-terminális régiójának más fehérjékkel való interakcióját befolyásolja. Két heterozigóta misszensz variánst detektáltam az *ANG* génen (c.3G>A, p.Met-24Ile; c.169C>T, p.Arg33Trp). A p.Met-24Ile angiogenin mutáció a szignál peptidet kódoló régióban található, és a start kodon elvesztéséhez vezet. A második angiogenin mutáció pedig a nukleáris transzlokáció szempontjából kulcsfontosságú aminosavat érinti. Egy beteg esetében detektáltam repeat expanzió jelenlétét a *C9orf72* gén első intronjában, és ez a beteg a repeat expanzió mellett a rs3849942 rizikó allélt is hordozta. A célzott-régió szekvenálás segítségével egy új valószínűleg patogén variánst (c.791A>G, p.Asn264Ser) azonosítottam a *SETX* génen, mely a fehérje N-terminális régiójának más fehérjékkel való interakcióját módosítja, és emlősökben konzervált.

Ezek az eredmények hozzájárulnak a genetikailag rendkívül heterogén betegség genetikai hátterének feltérképezéséhez, és lehetőséget nyújt az ALS-sel kapcsolatos mutációs adatbázisok bővítéséhez.

6 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Nagy Nikoletta adjunktusnőnek, az értekezés elkészítésében és a vizsgálatok kivitelezésében nyújtott segítségéért.

Köszönöm Prof. Dr. Széll Mártának, hogy az értekezés alapjául szolgáló munka elvégzéséhez megfelelő körülményeket biztosítottak az SZTE ÁOK Orvosi Genetikai Intézet molekuláris biológiai laboratóriumában.

Hálás vagyok az SZTE ÁOK Neurológiai Klinika munkatársainak, Dr. Engelhardt Józsefnek, Dr. Klivényi Péternek, Török Nórának és Dr. Vécsei Lászlónak a betegek vizsgálatba történő bevonásáért és a betegek klinikai adatainak összefoglalásáért.

A *C9orf72* repeat expanszió vizsgálatban pozitív kontrollként szolgáló mintákért köszönet Dr. Antonia Ratti-nak, Dr. Cinzia Tiloca-nak és Dr. Vincenzo Silani professzor úrnak (Department of Neurology and Laboratory of Neuroscience, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milánó, Olaszország).

Szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Csányi Bernadettnek a *C9orf72* repeat expanszió vizsgálat kivitelezésében nyújtott minden segítségéért, valamint Dr. Kereszty Évának, hogy ezen vizsgálatok kivitelezéséhez biztosította a körülményeket az SZTE ÁOK Igazságügyi Orvostani Intézet laboratóriumában.

Hálás vagyok Dr. Dr. Vincent Procaccio-nak és Dr. David Goudenege-nek (University of Angers, Franciaország) hogy lehetőségem volt egy tanulmányút keretében az újgenerációs szekvenálási eredményeim bioinformatikai kiértékelésére az ő irányításuk alatt.

Végül szeretném hálámat kifejezni az Orvosi Genetikai Intézetben dolgozó összes kedves kollégámnak kitartó segítségükért.