

A genetikai architektúra szerepének vizsgálata Parkinsonizmusban

Doktori tézisek

Illés Anett

Semmelweis Egyetem
Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Molnár Mária Judit, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Sipos Ildikó, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Hidasi Eszter, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Nagy György, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Molnár-Érsek Barbara, Ph.D., tudományos munkatárs

Dr. Szegedi Róbert, Ph.D., főorvos

Budapest
2020

Bevezetés

A Parkinson-kór (PD) a második leggyakoribb progresszív neurodegeneratív betegség. A legfrissebb tanulmányok szerint körülbelül 6 millió ember érintett világszerte. A 60 éves kor fölötti népesség 2%-át érinti, míg a 80 éves kor fölötti népességben ez az arány már 4%. A betegség 10%-a azonban már fiatal életkorban (20-50 év) jelentkezik, mely háttérében sokkal valószínűbb, hogy valamilyen genetikai tényező áll.

A motoros funkciózavarok háttérében elsősorban a substantia nigra pars compacta sejtjeiben végbemenő dopaminerg idegsejtek pusztulása áll. A PD-s betegek körében a nem-motoros tünetek prevalenciája a betegség súlyosságával és a progresszió mértékével együtt nő, valamint előrejelezhetik a motoros tünetek megjelenését is. Ez kritikus jelentőségű a terápiás gyakorlatban, mivel a motoros tünetek megjelenésekor a substantia nigra dopaminerg sejtjeinek már 70-80%-a elpusztult. Továbbá klinikai szempontból komoly előnyt jelenthet a Lewy-testek kialakulásának előrejelzése, mivel ilyen esetben az α -synucleint célzó terápiák hatásosak lehetnek. A PD

progressziójában a kóros fehérje aggregáció mellett a mitochondriális diszfunkció, a neuroinflammáció és az excitotoxicitás is fontos szerepet játszik.

A különböző vizsgálatok során sok esetben a klinikai és a patológiai diagnózisok között jelentős eltérést találtak. Továbbá a genetikai heterogenitás nagyban nehezíti az összefüggések pontosabb megértését, ugyanis a hasonló fenotípus mögött nagyon sok különféle genetikai ok húzódhat. Ráadásul sok esetben az azonos genetikai variánsal rendelkező betegeknél is egyéni különbségek lehetnek a megnyilvánuló fenotípusban.

Általánosságban elmondható, hogy a monogénes familiáris formák mögött ritka, nagy penetranciájú patogén mutációk állnak, míg a sporadikus formák környezeti és genetikai hajlamosító tényezők együttes jelenlétéből fakadnak. Ennek ellenére a két forma a legtöbb esetben nem különíthető el egyértelműen a klinikai tünetek alapján. Az azonosított variánsok klinikai jelentőségének tisztázása érdekében további kutatásokra van szükség.

A növekvő genetikai információ ellenére a PD genetikai etiológiája az esetek 40%-ában még felderítetlen. Az újgenerációs szekvenálás (NGS) széles körű elterjedése lehetővé tette számos potenciális gén azonosítását, amelyek fontos szerepet játszhatnak a PD kialakulásában. Mivel a különféle neurológiai rendellenességek átfedő klinikai tünetekkel jelentkeznek, ezért egyre nagyobb számban írnak le olyan géneket PD-vel összefüggésben, amelyeket korábban más neurodegeneratív betegséggel asszociáltak. A PD genetikai formáinak egyre mélyebb megértése rámutatott a szinaptikus transzmisszió, a vezikuláris reciklizáció, a mitochondriális- és a fehérjeminőség-ellenőrzés fontosságára a betegség patogenezisében.

A PD környezeti kockázati tényezői esetében vannak olyan bizonyítékok, amelyek szerint a dopamin transzporter (DAT) diszregulációja is szerepet játszik a betegség patomechanizmusában. A kokain fokozza a dopaminerg jelátvitelt, mivel kötődik a DAT-hoz, és megakadályozza a dopamin újbóli felvételét a szinaptikus résekből. Noha a kokainhasználók körében a PD

magasabb kockázatának bizonyítéka vitatott, már bebizonyosodott, hogy az agy szerkezete megváltozik, és az α -synuclein konformációja kompaktabbá válik.

Összességében, figyelembe véve a PD genetikailag heterogén jellegét, a sporadikus és a familiáris PD genetikai architektúrájának tisztázása javítja a diagnosztikai pontossági rátákat. Következésképpen lehetővé teszi a veszélyeztetett egyének preszimptomás diagnosztizálását és tesztelését az érintett családokban. Ezenkívül kiterjeszheti ismereteinket a betegség genetikai és neuropatológiai mechanizmusairól, amelyek kiemelkedően fontosak lehetnek új terápiák kidolgozásában. Végül javítja annak a lehetőségét, hogy a különféle PD betegeket genetikai altípusokba soroljuk. Ez elősegítheti a betegek hatékony kezelését a betegség lefolyásába történő hatékony beavatkozás révén.

Célkitűzések

A célkitűzéseinket a következőképpen foglalhatjuk össze:

1. A Parkinsonizmus genetikai hátterének vizsgálata a magyar populációban. A heritabilitás hátterében álló öröklésmódok tisztázása, a PD genetikai diagnosztikája során alkalmazandó algoritmus kidolgozása.
2. A Parkinsonizmussal összefüggésben álló genetikai elváltozások jelenlétének és előfordulási gyakoriságának vizsgálata magyar betegeknél.
3. A talált genetikai architektúra és a fenotípus korrelációjának vizsgálata. Útmutatás kidolgozása a genetikai tanácsadásra a genetikai eredmények közzléséhez, a gén-környezet interakció értelmezéséhez.
4. A Parkinsonizmusban szenvedő páciensek regiszterének és biológiai mintagyűjteményének kialakítása, trial-ready kohort létrehozása, annak érdekében, hogy genetikailag stratifikált betegeink számára a klinikai vizsgálatokban való részvételt, minél nagyobb valószínűséggel tudjuk biztosítani.

Módszerek

A vizsgált betegek

Vizsgálatunkba azok a betegek kerültek bevonásra, akiknél egyértelműen azonosíthatók voltak a Movement Disorder Society (MDS) kritériumai alapján Parkinsonizmusra utaló tünetek, vagyis a bradykinesis együttesen volt jelen vagy nyugalmi tremorral vagy rigiditással vagy mindkettővel. A doktori értekezés elkészítéséhez 152 EOPD (AOO 25-50 év), 30 familiáris LOPD (AOO >50 év) és négy JOPD (AOO <25 év) beteg került beválogatásra. NGS vizsgálattal 66 beteg esetében elemeztük a genetikai architektúrát.

A genetikai kutatás során alkalmazott módszerek

A genetikai vizsgálatokhoz a DNS izolálást Qiagen DNA Blood Mini kittel végeztük perifériális vérmintából. A PD-vel asszociált leggyakoribb gének (*PRKN*, *PINK1*, *LRRK2*, *SNCA* és *PARK7*) vizsgálatát Sanger-féle bidirekcionális szekvenálással ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer készülékkel végeztük. Az exoni kópiaszám eltéréseket MLPA módszerrel (Multiplex Ligáció-függő Próba Amplifikáció) vizsgáltuk. A *C9orf72* GGGGCC

hexanukleotid ismétlődésszám meghatározása repeat-primed PCR reakcióval és az azt követő fragment analízissel történt. A PD panel vizsgálathoz egy általunk tervezett Agilent SureSelectQXT Target Enrichment reagenst, a teljes exom szekvenáláshoz Agilent SureSelectQXT Human All Exon v5 reagenst használtuk. A panel-szekvenálás Illumina MiSeq, míg a teljes exom szekvenálás Hiseq 2500 platformon zajlott. Az elemzési lépésekben a GATK HaplotypeCaller, a SnpEff, a ClinVar, a dbNSFP, valamint a VariantAnalyzer szoftvereket alkalmaztuk. A variánsok klasszifikálása az ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) által közzétett útmutató alapján végeztük. Az esélyhányadokat (OR) a Medcalc szoftverrel számoltuk ki. A kvantitatív változók átlaga \pm standard eltérés felhasználásával kerültek leírásra. Elemeztük a ritka variáns teher hatását a tünetek megjelenésének időpontjára ANOVA teszttel. Az oligogénes hatás lehetőségének vizsgálatára kiszámítottuk a variáns terhelést azokban az egyéneknél, akiknél NGS analízist végeztünk.

Eredmények

Szekvenálás és MLPA

Ritka, káros eltérések PD-asszociált génekben, amelyek valószínűleg összeegyeztethetők a monogénes PD-vel

A *PRKN* gén 7. exon duplikációját 4 sporadikus esetben, míg a *SNCA* gén duplikációját egy sporadikus esetben igazoltuk. Az *LRRK2* génben egy korábban már leírt L1795F patogén eltérést detektáltunk két esetben. Valamint három új, valószínűleg káros variánst azonosítottunk (*LRRK2*-Y1649S, *EIF4G1*-M1357T, *VPS35*-K552I). A *DNAJC13* L2170W aminosavcsere, amely egyes tanulmányok szerint csak minor genetikai kockázati tényező, egy további betegben került azonosításra. Az aminosavcserevel járó variánsokat familiáris PD betegekben írtuk le (a tünetek megjelenésének átlagos időpontja $41,5 \pm 11,6$ év).

Korábban már PD-vel asszociált genetikai rizikó variánsok

Korábbi irodalmi adatok alapján PD-re hajlamosító genetikai kockázati variánst 51 betegben azonosítottunk. A vizsgált csoportban öt heterozigóta genetikai rizikó

variánst írtunk le a *GBA* génben (H294Q, E365K, T408M, N409S és L483P). A *GBA* eltérést hordozó páciensek körében több megkülönböztető klinikai jellegzetességet azonosítottunk. Az *LRRK2* génben a heterozigóta M1647T mutációt hat betegben, míg a homozigóta S1647T eltérést 27 betegben detektáltuk. A *PINK1* A340T eltérést hét beteg, a G411S szubsztitúciót pedig két beteg esetében azonosítottuk az általunk vizsgált csoportban.

Az összes detektált eltérés, amelyet korábban genetikai rizikó tényezőként közöltek $OR > 1$ értéket vett fel, kivétel a *PINK1* A340T variánst, melynél az $OR = 0,4$. Azonban csak a *GBA* T408M variáns esetében tudtunk szignifikáns összefüggést ($p < 0,05$) kimutatni.

„Többszörös-találat” mechanizmus, amely befolyásolja a PD kockázatát

Az adatok elemzése során 12 olyan esetet találtunk, ahol egy heterozigóta károsító mutáció egy AR-PD kapcsolt génben együttesen fordul elő vagy egy már korábban leírt kockázati tényezővel vagy egy ritka variánssal valamelyik másik PD kapcsolt génben. Kockázati variánsokat azonosítottunk a *LRRK2*, a *GBA* és a *DNAJC13* génekben.

Valószínűleg káros eltérés találtunk a *PRKN*, a *PINK1*, a *SYNJ1*, a *TMEM230*, a *DNAJC6*, a *C19orf12*, és a *PLA2G6* génekben. Bizonyos esetekben AD-PD génekben azonosított variáns (pl. *DNAJC13-S790Y*, *LRRK2-I803T*) mellett is találtunk ismert rizikó faktort (*LRRK2-S1647T*). Az oligogénes öröklési mintázat tesztelése során mind az átlagéletkor, mind a medián alacsonyabb a tünetek megjelenésének idejét tekintve az együttesen előforduló variánsok számának növekedésével, ám ez az esetünkben nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét.

Kruskal-Wallis statisztikai elemzés kimutatta, hogy a Parkinsonizmussal diagnosztizált betegek esetében, a szűrési kritériumok szigorításával, a PD-asszociálta génekben nő a variánsok száma a nem PD-vel diagnosztizált neurodegeneratív betegekhez, és a kontroll személyekhez képest. Bár, ez sem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét.

Monoallélikus heterozigóta variáns AR-PD-vel társított génekben

A vizsgálat során öt AR öröklésmentet mutató génben feltételezhetően káros szubsztitúciót írtunk le heterozigóta

formában (*PRKN*-R234Q, D243N, R275W; *VPS13C*-S2904L, *DNAJC6*-F414Y, *CP*-I898M; *PLA2G6*-R396W), amelyek valószínűleg potenciális rizikófaktorként növelhetik a PD kialakulásának esélyét. Érdekes, hogy a tünetek megjelenésének ideje azokhoz az esetekhez hasonlít, ahol korábban leírt rizikó faktort azonosítottunk.

A *POLG* előfordulási gyakorisága a magyar PD kohortban

A *POLG* gén teljes kódoló régióját 67, parkinsonizmus tüneteivel kezelt beteg esetében elemeztük. Az analízis során 6, aminosavcserével járó eltérést azonosítottunk. Ezek közül kettőt korábban polimorfizmusként írtak le (E1143G és Q1236H). A korábbi irodalmi adatok alapján potenciálisan kóros variánsokat egy-egy esetben találtunk (az összetett heterozigóta T251I+P587L eltérést, és a heterozigóta G737R szubsztitúciót). Továbbá egy eddig még nem leírt aminosavcserét (H613D) azonosítottunk egy harmadik esetben.

A *C9orf72* repeat expanzió előfordulási gyakorisága a magyar PD kohortban

A kutatásunk során 147, magyar, nem-rokon, Parkinsonizmus tüneteivel rendelkező beteg esetében

vizsgáltuk a *C9orf72* hexanukleotid ismétlődés méretét repeat-primed PCR reakcióval. Két esetben azonosítottunk 30 fölötti ismétlődés-számot (egy-egy esetben 31 és 32 ismétlődés-szám), amely az esetek 1,4%-a. Az esetek 7,5%-a (11 db) 23 és 30 ismétlődés közötti intermedier mutáció. A kóros ismétlődésszámot mutató páciensek átlagos életkora a tüneteik megjelenésekor $55,67 \pm 12,68$ év volt. A pozitív esetek közül egy esetben volt pozitív a családi anamnézis. Az egyik pozitív esetben igazoltunk kognitív hanyatlást, illetve két további intermedier esetben. A levodopa kezelés 10 esetben (egy pozitív, kilenc intermedier) a tünetek javulását eredményezte, egy intermedier esetben (juvenilis férfi beteg) pedig nem volt tapasztalható válasz. A *C9orf72* hexanukleotid repeat expansió és a tünetek megjelenésének időpontja között nem mutattunk ki lényeges összefüggést.

A környezeti és a genetikai rizikó tényezők kölcsönhatásának elemzése egy eset bemutatásán keresztül

Egy kézremegés tünetével vizsgált 44 éves férfi beteg, a tünet megjelenése előtt 18 hónapon át rendszeresen használt kokaint nazálisan (napi ~1 g-ot – 15 mg/kg). A beteg 10 hónappal a vizsgálat előtt már abbahagyta a kokain használatát.

A neurológiai vizsgálat kezdeti Parkinsonizmust valószínűsített, de a remegés atípusos volt. A családi kórtörténetből kiemelendő, hogy a beteg apja és a fia is mozgásszervi rendellenességekben (tremor, nyugtalan láb szindróma) szenved. Az agyi MRI (fecskefarok jel hiánya) és a DaTscan vizsgálat is PD-re utalt. A genetikai vizsgálat során az *LRRK2* génben a S1647T homozigóta kockázati tényezőt azonosítottuk.

A klinikai és a DaTscan eredmények alapján olyan Parkinson-szindrómát feltételeztünk, mely egy toxikus környezeti tényező és a genetikai kockázati tényező együttes jelenlétéből fakad. Egy év kokain absztinencia után a remegés jelentősen csökkent. Másfél évvel az első DaTscan után ellenőrző vizsgálatot végeztünk, amely normál radiopharmacón dúsulást mutatott a striatumban, csak enyhe aszimmetriával.

Következtetések

Vizsgálataink során Magyarországon elsőként végeztünk komprehenzív genetikai elemzést Parkinson-kórban.

A teljes PD kohort 8,1%-ában igazoltunk monogénes okot a betegség hátterében és a betegek 32,3%-ában genetikai hajlamosító tényezőt írtunk le. Az AR-PD génekben azonosított monoallélikus eltérések valószínűleg, mint hajlamosító tényezők növelik a PD kialakulásának kockázatát. Az eredményeink hozzájárultak az ilyen típusú eltérések szerepéről szóló ismeretek bővítéséhez. A *POLG* gén elemzése során azonosított potenciálisan patogén eltérések hangsúlyozzák a mitochondriális gének vizsgálatának fontosságát a Parkinsonizmussal diagnosztizált páciensek esetében.

A „többszörös-találat” mechanizmus jelentősége is felmerült, mivel 12 esetben „többszörös-találat” hatást feltételeztünk a tünetek hátterében. Az oligogénes hatás statisztikai elemzése alapján felvázolható egy olyan tendencia, amely értelmében a potenciálisan káros, ritka variánsok dúsulása figyelhető meg az érintett személyekben. Egy olyan tendencia is körvonalazódott,

amely szerint a feltételezhetően káros variánsok számával fordítottan arányos a tünetek megjelenésének ideje.

Elsőként igazoltuk magyar PD kohortban, hogy a *C9orf72* hexanukleotid repeat expanzió is társulhat Parkinsonizmussal. Ez alapján ajánlást tettünk arra, hogy a PD genetikai diagnosztikájába ez a gén is bevonandó.

A kokain, mint környezeti kockázati tényező és egy genetikai hajlamosító tényező együttes hatását igazoltuk egy korai Parkinsonizmus tüneteit mutató páciens esetében. Az eset alapján feltételezzük, hogy a kokain használat következtében végbemenő molekuláris változások részben visszafordíthatók. A kokainhasználat és a Parkinsonizmus kapcsolata nagyon komplex kérdéskör, melyben az egyes asszociációk értelmezése sokat segít a PD patomechanizmusának jobb megértésében.

Az eredményeink segítségével új genetikai diagnosztikai ajánlást dolgoztunk ki a magyar PD betegek költséghatékony diagnosztikájára vonatkozóan.

Saját publikációs jegyzék

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

1.) Illés A, Balicza P, Gál A, Pentelényi K, Csabán D, Gézsi A, Molnár V, Molnár MJ. (2020) Az örökletes Parkinson-kór mint a POLG-gén károsodásának új klinikai megjelenési formája [Hereditary Parkinson's disease as a new clinical manifestation of the damaged POLG gene]. Orvosi Hetilap, 161.20: 821–828. **IF: 0,564**

2.) Illés A, Csabán D, Grosz Z, Balicza P, Gézsi A, Molnár V, Bencsik R, Gál A, Klivényi P, Molnár MJ. (2019) The role of genetic testing in the clinical practice and research of early-onset Parkinsonian disorders in a Hungarian cohort: Increasing challenge in genetic counselling, improving chances in stratification for clinical trials. Frontiers in Genetics, 10:1061. **IF: 3,517**

3.) Illés A, Balicza P, Molnár V, Bencsik R, Szilvási I, Molnár MJ. (2019) Dynamic interaction of genetic risk factors and cocaine abuse in the background of

Parkinsonism—a case report. BMC neurology, 19.1:260.
IF: 2,233

A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk

1.) Fekete B, Pentelényi K, Rudas G, Gál A, Grosz Z, Illés A, Jimoh I, Csukly G, Domonkos A, Molnar MJ. (2019). Broadening the phenotype of the TWNK gene associated Perrault syndrome. BMC Medical Genetics, 20(1), 1-8.
IF: 1,740

2.) Melicher D, Illés A, Littvay L, Tárnoki ÁD, Tárnoki DL, Bikov A, Kunos L, Csabán D, Buzás EI, Molnár MJ, Falus A. (2019) Positive association and future perspectives of mitochondrial DNA copy number and telomere length – a pilot twin study. Archives of Medical Science, 15.1 **IF: 2,380**

Dóra Melicher and Anett Illés contributed equally to this work.

3.) Balicza P, Grosz Z, Molnár V, Illés A, Csabán D, Gézsi A, Dézsi L, Zádori D, Vécsei L, Molnár MJ. (2018)

NKX2-1 New Mutation Associated with Myoclonus, Dystonia, Pituitary Dysfunction and Empty Sella. *Frontiers in genetics*, 9:335. **IF: 3,517**

4.) Kecskeméti N, Szönyi M, Gáborján A, Küstel M, Milley GM, Süveges A, Illés A, Kékesi A, Tamás L, Molnár MJ, Szirmai Á, Gál A. (2018) Analysis of GJB2 mutations and the clinical manifestation in a large Hungarian cohort. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 275.10:2441-2448. **IF: 1,750**

5.) Balicza P, Grosz Z, Bencsik R, Illés A, Gál A, Gézsi A, Molnár MJ. (2018) Significance of whole exome sequencing in the diagnostics of rare neurological diseases - own experiences through a case presenting with ataxia]. *Orvosi Hetilap*, 159.28:1163-1169. **IF: 0,564**

6.) Varga NÁ, Pentelényi K, Balicza P, Gézsi A, Reményi V, Hársfalvi V, Bencsik R, Illés A, Prekop C, Molnár MJ. (2018) Mitochondrial dysfunction and autism: Comprehensive genetic analyses of children with autism

and mtDNA deletion. Behavioral and Brain Functions, 14.1:4. **IF: 2,457**

7.) Melicher D, Illés A, Pállinger É, Kovács ÁF, Littvay L, Tárnoki ÁD, Tárnoki DL, Bikov A, Molnár MJ, Buzás EI, Falus A. (2018) Tight co-twin similarity of monozygotic twins for hTERT protein level of T cell subsets, for telomere length and mitochondrial DNA copy number, but not for telomerase activity. Cellular and molecular life sciences, 75.13:2447-2456. **IF: 7,014**