

XXXII.OTDK Biológia Szekció

Teljes exomszekvenálás alkalmazása mitokondriális betegségekben: kongenitális laktát acidózis egy esete

OTDK DOLGOZAT

Készítette: Pöstyéni Etelka

Biológia MSC hallgató

Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Kar

Témavezető: Dr. Komlósi Katalin

PTE KK Orvosi Genetikai Intézet

Társtémavezető: Prof. Dr. Meleghe Béla (PTE KK Orvosi Genetikai Intézet)

Konzulens: Mátyás Petra (PTE KK Orvosi Genetikai Intézet)



Pécs, 2015.

Rövidítések jegyzéke

ATP	adenozin-trifoszfát
bp	bázispár
CSF	cerebrospinal fluid
DNS	deoxiribonukleinsav
kb	kilobázis
LDH	laktát-dehidrogenáz
MELAS	mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes (mitokondriális encephalopathia, laktátacidózis és stroke-szerű epizódok)
mtDNS	mitokondriális DNS
NADP	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NGS	next generation sequencing (új generációs szekvenálás)
PCR	polimerázláncreakció
RNS	ribonukleinsav
rRNS	riboszómális RNS
tRNS	transzfer RNS
WES	whole exom sequencing (teljes exom szekvenálás)

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke

I. Irodalmi bevezető

I.1. Az Új generációs szekvenálás módszere, lehetőségei, korlátai.....	3
I.2. Mitokondriális betegségek.....	4
I.2.1. Mitokondriális betegségek diagnosztikája.....	6
I.2.1.1. Az Új generációs szekvenálás alkalmazása.....	7
I.2.1.2. Energiahiányos állapotok mitokondriális betegségekben...	8
I.2.2. Kongenitális laktát acidózis és okai.....	8

II. Célkitűzés

10

III. Anyagok és módszerek

III.1. A vizsgált család	11
III.2. Molekuláris genetikai módszerek	
III.2.1. A mitokondriális DNS vizsgálata	12
III.2.2. Fibroblast tenyésztés és enzimaktivitás mérés	12
III.2.3. A teljes exom szekvenálás lépései	13
III.2.4. Bioinformatikai kiértékelés.....	13

IV. Eredmények és kiértékelésük

IV.1. Variánsok listája a vizsgált családban	14
IV.2. Eredmények megerősítése hagyományos szekvenálással	10

V. Összefoglalás és diszkusszió

V.1. A TMEM70 gén mutációja a kongenitális laktát acidózis hátterében	15
V.2. A WES alkalmazásának lehetőségei eddig nem azonosított mitokondriális betegségekben.....	16

VI. Irodalomjegyzék.....

17

VII. Köszönetnyilvánítás

19

I. Irodalmi bevezető

I.1. Az Új generációs szekvenálás módszere, lehetőségei, korlátai

A teljes humán genom szekvenciájának megismerését követően a DNS szekvenálási technológiák drámai fejlődése vette kezdetét.

A DNS molekula nukleotidsorrendjének meghatározására kezdetben láncterminációs módszeren alapuló Sanger szekvenálást alkalmaztak, majd az ezredfordulón kezdetét vette az új generációs szekvenálási technológiák (NGS) térhódítása. A hagyományos szekvenálás számos tényezőben, mint például a nyert információ mennyiségében, a detektálás módjában továbbá a láncszintézisben is alapvetően eltér az NGS módszerétől. Az új generációs módszerek esetében a szekvenálás akár milliós számban lévő templát felhasználásával, párhuzamosan történik ezért ezeket a technológiákat nagy hatékonyságú (deep sequencing) módszereknek is nevezik. A technológia csökkentette a szekvenálás költségeit és ezáltal is hozzájárult az orvosi, biológiai kutatások további fejlődéséhez. Az alkalmazott robottechnika illetve a folyamatosan fejlődő számítógépes technológiák alkalmazása lehetővé tette, hogy az új generációs módszerek az elérhető információmennyiség tekintetében forradalmi újításokat hozzanak a molekuláris biológiában. (MIHÁLY ET AL 2011)

A masszív automatizált szekvenálási technológiák több típusa is ismert, mint például a Roche, a Life technologies SOLID illetve az Illumina által kifejlesztett platformon megvalósuló szekvenálási eljárások. Mindegyik rendelkezik egyedi technológiai, biokémiai jellegzetességekkel azonban néhány közös vonás is fellelhető az eltérő szekvenálási rendszerek munkafolyamatai között (1. kép). Mind esetében elmondható, hogy a kezdeti előkészítő lépések leegyszerűsödtek az eddig alkalmazott hagyományos módszerekhez képest. A könyvtárkészítés a DNS random fragmentációjával indul, amelyet a fragmensek adaptorral való ligációja követ. A fragmentek amplifikációja minden platform esetében megvalósul továbbá a detektálás mindegyik esetében automatikusan történik. (MIHÁLY ET AL 2011)

Mint ahogy minden ismert technológia, az NGS is rendelkezik előnyökkel és hátrányokkal egyaránt. Előnyei közé tartozik, hogy a könyvtárkészítés és az amplifikáció is in vitro valósulhat meg, illetve hogy a mérés során alkalmazott párhuzamosságnak köszönhetően hatalmas adatmennyiség nyerhető egyszeri vizsgálat során. Fontos további előnye, hogy a minta egy felszínen immobilizáltan helyezkedik el, így az enzimatikus manipuláció nagymértékben leegyszerűsödik. A felsorolt előnyök elősegítik a szekvenálási költségek nagymértékű redukcióját a hagyományos szekvenáláshoz képest, amely szintén egy

kiemelkedő előnye az ismertetett technológiának. Az NGS nemcsak előnyökkel, hanem hátrányokkal is egyaránt rendelkezik a Sanger szekvenáláshoz képest. A leolvasott readok száma igaz nagyobb és olvasásuk gyorsabb, hisz párhuzamosan történik, azonban hosszúságuk rövidebb (21-400 bp), illetve a leolvasás pontossága is sokkal alacsonyabb, mint a hagyományos Sanger szekvenálás során. (SHENDURE ET AL 2008)

Az új generációs technológiák megjelenése és nagymértékű előre törése ajtót nyitott a diagnosztika új területeire azáltal, hogy hozzájárul az eddig ismeretlen betegségek mechanizmusának pontosabb feltérképezéséhez illetve lehetővé teszi a személyre szabott orvoslás megvalósítását.

I.2. Mitokondriális betegségek

A mitokondriális betegségek egy rendkívül szerteágazó és heterogén csoportját képezik a betegségeknek, amelyek bármely korban, sokféle tünettel és többféle öröklődési mintázattal jelentkezhetnek. Hátterükben leggyakrabban a mitokondriális légzési lánc rendellenes működése állhat. (SASKIA ET AL 2011)

A citoplazma sejtorganellumaként a mitokondriumok egyedi sajátossága, hogy a nukleáris genomtól elkülönülő és eltérő örökítőanyaggal is rendelkeznek, amely tRNS-t, rRNS-t és néhány mitokondriális proteint is kódol. A humán mitokondrium genom 16S és 12S rRNS-t illetve 22 tRNS-t kódol, amelyek nélkülözhetetlenek az organellum genomjában kódolt fehérjék transzlációjához. A fehérjéi egyrészt a saját genomjáról íródnak át és ezeknek a fehérjéknek a transzlációs folyamatai is a mitokondriumon belül zajlanak le, másrészt a nukleáris genom is kódol mitokondriális fehérjéket, amelyek a transzlációt követően transzportálódnak a mitokondriumba. (COOPER 2000)

A mitokondrium belső membránjában több mint 70 különböző polipeptid vesz részt a légzési lánc kialakításában, melynek működése a szervezetben lezajló aerob metabolikus folyamatokban elengedhetetlen. Az alegeységek túlnyomó többsége nukleáris transzkripciót követően a citoszolban szintetizálódik, 13 darab esszenciális alegeységet pedig a 16,5 kb nagyságú mitokondriális DNS (mtDNS) kódol. A humán sejt a mtDNS-t több ezer kópiában tartalmazza, ezek születéskor általában azonosak (homoplazmia). Abban az esetben azonban, amikor a mtDNS által kódolt génmutáció miatt betegség alakul ki, akkor a vad típusú és a kóros mitokondrium együtt is jelen lehet a sejten belül (heteroplazmia). A mutációt hordozó mtDNS aránya szervek és szövetek szintjén egyetlen személy szervezetén belül is eltérő lehet.

A mitokondrium anyagcserében betöltött esszenciális szerepe miatt, a mitokondriális betegségek gyakoriak a veleszületett anyagcsere betegségek között. Bármely életkorban

megjelenhetnek és többnyire multiszisztémás formában jelentkezhetnek habár monoszisztémás formái, mint a különböző miopátiák is ismertek. (SASKIA ET AL 2011) Az eddigi felmérések alapján különböző formái ma már 5000 születésből 1 csecsemőnél is jelentkezhetnek. A mitokondriális betegségek kisebb részében (25%) a mitokondriális DNS eltérése azonosítható, a fennmaradó részt pedig a nukleáris génekben bekövetkező eltéréseknek tulajdonítják. A legtöbb esetben sporadikus megjelenésű, ilyenkor a szórványos felbukkanása miatt nem állapítható meg tiszta genetikai kapcsolat az esetek között, de számos familiáris mitokondriális kórkép is ismert. (OHTAKE ET AL 2014)

A rendellenes működés hátterében a nukleáris vagy a mtDNS-ben kódolt génmutációk is állhatnak. A bioszintézis folyamatában és a mitokondriális funkciókban részt vevő közel 1500 gén a sejtmagban kódolt, ezek közül több mint 100 olyan gént fedeztek fel, amelyek a mitokondriális betegségekben szerepet játszanak (OHTAKE ET AL 2014). Az általuk kódolt mitokondriális folyamatok közé tartoznak a például a mitokondriális fehérjeszintézis, a légzési lánc egyes elemeinek szintézise és a koenzim Q-10 bioszintézise is. A nukleáris DNS eltérések autoszómális recesszív vagy autoszómális domináns úton is öröklődhetnek, míg a mtDNS anyai öröklésmentet követ. A mtDNS deléciók de novo is kialakulhatnak, ebben az esetben lehetséges, hogy a család egyetlen tagjánál jelentkeznek a betegség tünetei.(CHINNERY ET AL 2014)

Az öröklésment alapján megkülönböztetnek mitokondriális (anyai), autoszómális recesszív, autoszómális domináns és X-hez kapcsolt öröklésmentet. A mitokondriális öröklésment során a nők és a férfiak egyaránt érintettek lehetnek, azonban csak a betegséget okozó mutációt hordozó nők képesek a betegség továbbadására az utódoknak. Az autoszómális recesszív öröklésment során a betegség kialakításában szerepet játszó gén testi kromoszómán helyezkedik el és mindkét allélnak mutációt kell hordoznia a betegség kialakításához. Az autoszómális domináns öröklésnél egyetlen hibás allél is elegendő a betegség megjelenéséhez és így nők és férfiak több generáción keresztül érintettek lehetnek a betegségben. Az X-hez kötött öröklésmentnél túlnyomó többségében az egyetlen X kromoszómájuk miatt főként férfiak betegednek meg.

A mitokondriális betegségek számának növekedése és a fenotípus-genotípus komplexitásának megismerése megkövetelte a mutáció detektáló módszerek fejlesztését melyek a klinikai, biokémiai, szövettani vizsgálatok mellett új diagnosztikus módszerek lehetőségét teremtette meg.

I.2.1. Mitokondriális betegségek diagnosztikája

A mitokondriális kórképek diagnosztizálása rendkívül nehéz a polimorf fenotípusos megjelenés illetve a fellépő inter- és intrafamiliaris heterogenitás miatt melyek akadályozzák a genotípus –fenotípus korreláció egyértelmű tisztázását.(MANCUSO ET AL 2007)

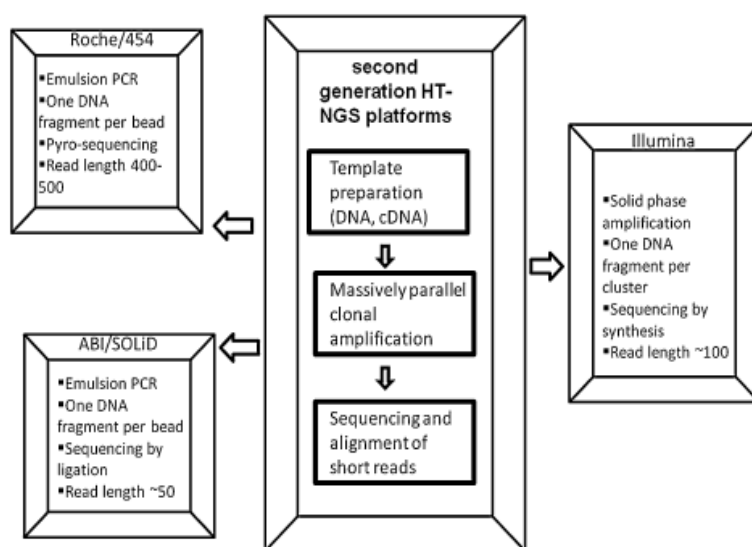
A betegségek megfelelő azonosításhoz nélkülözhetetlen a klinikai fenotípus vizsgálata (fizikális vizsgálat), az öröklésmenet feltárása (családtörténet) illetve a fenotípus mértékének meghatározása (biokémiai és szövettani vizsgálatok). A defektív mitokondriális protein szintéziséből származó klinikai tünetek rendkívül változatos és gyakran szövetspecifikus megjelenést mutatnak, amelynek oka nem minden esetben ismert. (BONCZONADI ET AL. 2014) A vér, vizelet és CSF metabolikus vizsgálata számos esetben nélkülözhetetlen a kórkép egyértelmű azonosításához. Az emelkedett laktát és alanin koncentráció a vérben és/vagy a cerebrospinalis folyadékban (CSF) egyértelműsítheti a mitokondriális betegség jelenlétét. A vázizomból végzett biopszia a szöveti és biokémiai analízishez célravezető lehet. A diagnózis felállításához szövet vagy vérmintákból izolált DNS felhasználásával végzett molekuláris genetikai vizsgálat elvégzése szintén szükséges lehet, hogy feltárjuk a kórfolyamat hátterében álló esetleges genetikai tényezőket is. Olyan betegek esetében, akiknél jól ismert, anyai úton öröklődő szindróma (pl. MELAS) feltételezhető, a legcélravezetőbb a mtDNS pontmutációk szűrése. Familiáris esetben, a család három generációra visszamenőleg való feltérképezése segítséget nyújthat az öröklődési mintázat és/vagy a diagnózis felállításában. (CHINNERY ET AL 2014) A szindrómák esetében különösen nehéz az azonosítás hisz lehetséges, hogy nem minden beteg mutatja az adott szindrómára jellemző összes jellegzetes tünetet. Ezekben az esetekben a genomiális mutációk keresése megerősítve a szindrómára jellemző klinikai tünetekkel és a családfavizsgálattal, egyértelműsítheti a szindróma jelenlétét az egyes betegeknél.(SASKIA ET AL 2011)

A genetikai technológiák folyamatos innovációja dinamikus fejlődést eredményezett a genetikai betegségek diagnosztizálásában is. A teljes genom szekvenálás az eltérések elsődlegesen DNS szinten történő azonosításával és ezáltal az invazív és komplex biokémiai tesztek elkerülésével gyorsan megváltoztatta ezen betegségek diagnosztizálását.(BONCZONADI ET AL. 2014)

I.2.1.1 Az Új generációs szekvenálás alkalmazása

Az új generációs szekvenálás (NGS) alkalmazása az extrém heterogenitással jellemezhető mitokondriális betegségek vizsgálata során új távlatokat nyitott.

A kóroki génvariánsok feltérképezése során mindkét genom vizsgálata szükséges, hisz a nukleáris gének közül is több mint 100 gén esetében ismert patogén, mitokondriális defektus háttérben álló mutáció. A kóroki gének rengetege illetve a genotípus és a fenotípus esetében tapasztalt nagyfokú variabilitásából adódóan, a hatalmas adatmennyiséggel dolgozó NGS alkalmazása nagymértékben növelte a diagnosztika hatékonyságát. Az NGS során alkalmazott kittek lehetőséget teremtenek szimultán mindkét genom együttes analízisére, így ebből a szempontból is leegyszerűsítik és felgyorsítják a kóroki gének azonosítását. A mitokondriális kórképeknél számos esetben sporadikus megjelenés tapasztalható, ilyenkor nem célravezető a családfa analízisen alapuló kapcsoltsági vizsgálat így az új generációs módszerek alkalmazása ezekben az esetekben is megoldást nyújthat. Az új generációs módszerekkel történő szekvenálás különböző biokémiai háttérrel rendelkező platformon is megvalósulhat. (1. kép)



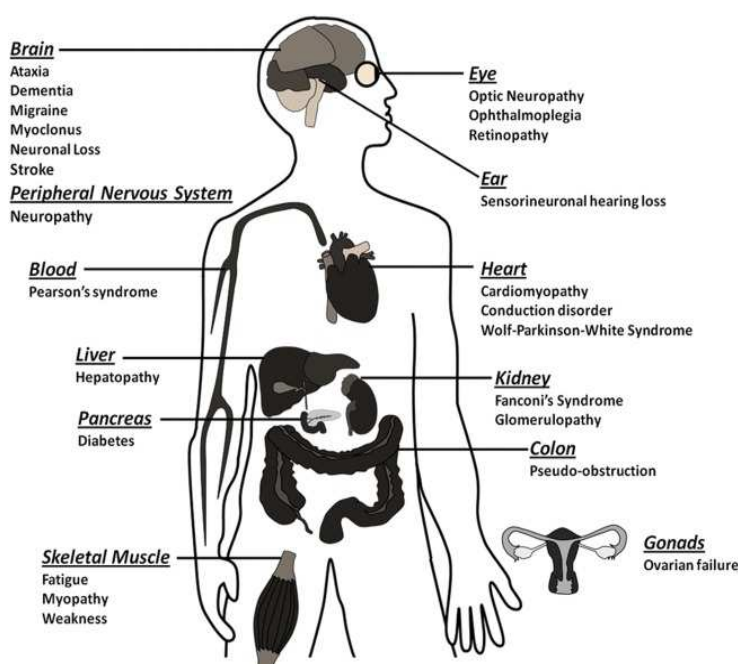
1.kép A három NGS platform (Roche, ABI Solid, Illumina) technikai jellemzői (PAREEK ET AL 2011)

A technológia nyújtotta lehetőségek a mitokondriális betegségek genetikai háttérének felderítésében forradalmi változásokat idéztek elő. A betegségek ezen diverz és heterogén csoportjának részletesebb megismerése érdekében végzett NGS kutatások számának növelése hozzájárul a mitokondriális betegségek diagnosztikájának drámai fejlődéséhez.

I.2.1.2 Energiahiányos állapotok mitokondriális betegségekben

Az eukarióta sejtekben a mitokondrium kiemelt szerepet játszik a metabolikus energia előállításában, melynek során az oxidatív foszforiláció mechanizmusával szénhidrátok és a zsírsavak lebontásával ATP keletkezik. A sejtek energiaellátásában betöltött szerepéből adódóan, a működésében bekövetkező esetleges változások esetén leginkább a nagy energiaigényű szervek, szervrendszerek működése károsodhat. (2. kép)

A betegek a neuromuszkuláris és más szervrendszerek változatos diszfunkciójának kombinációját mutathatják. A nagy energiaszükségletű szervek/szervrendszerek közül az agy, a retina, a szív, a vese és a vázizom a leggyakrabban érintett. A szövetspecifitásból adódóan, alkalmazhatnak biopszia vizsgálatokat az egyes betegségek vizsgálata során. Az agy esetében az ataxia a demencia, a szem esetében retinopathia, a veséknél glomerulopathia, a szív esetében cardiomyopathia, a vázizmoknál myopathia jelentkezhet. A mitokondriális betegségek bármely korban jelentkezhetnek, általában multisisztémás formában habár a monosisztémás formái is ismertek, mint a különböző miopátiák. (SASKIA ET AL 2011)



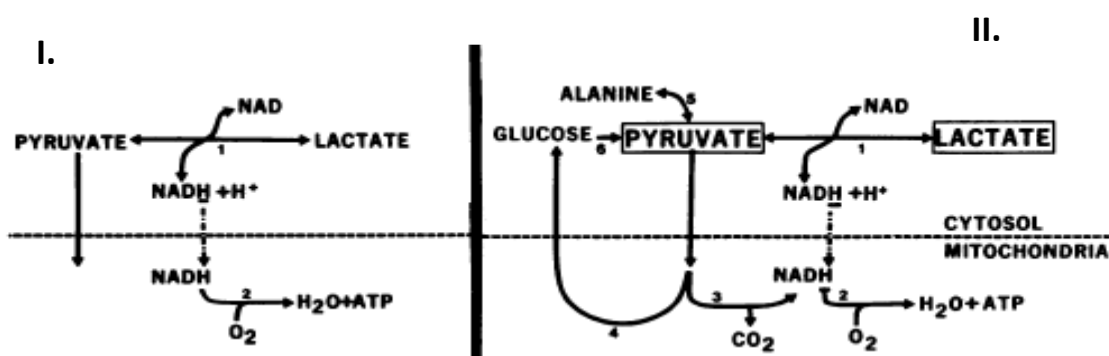
2 .kép: A mitokondriális betegségek egyes formái (CHINNERY ET AL 2013)

I.2.2.1. Kongenitális laktát acidózis és okai

A laktát acidózis az egyik leggyakoribb labordiagnosztikai eltérés a mitokondriális betegségek csoportjában. Nem egy általános, tünetekkel jellemezhető betegség, hanem egy komplex biokémiai eltérés, amelynek hátterében számos tényező állhat. A laktát acidózisnak

ma már több típusa is ismert. Szöveti hypoxia során kialakult laktát acidózist „A”-típusú laktátacidózisnak nevezünk. Abban az esetben, ha a laktát acidózis nem szöveti hypoxia eredménye „B” típusú laktát acidózisról beszélünk. (LUFT ET A 2001)

A metabolikus folyamatok során a laktát a citoplazmában keletkezik laktát-dehidrogenáz (LDH) enzim katalizálta reakcióban mely enzim minden szövetünkben jelen van. Az LDH és NADH felhasználása révén a piruvát laktáttá alakítása történik meg. A laktát akkumuláció bekövetkezhet egyrészt a megemelkedett piruvát koncentráció következtében vagy a citoszolikus NADH és oxidált formája a NAD közötti arány megváltozásának eredményeként. A piruvát többek között proteinből és a glikolízis révén glükózból is keletkezhet. A glikolízis mértéke abban az esetben növekszik nagymértékben, ha az ATP mennyisége lecsökken. A piruvát oxidációja piruvát-dehidrogenáz segítségével valósul meg, a másik piruvát felhasználó útvonal pedig az mikor a mitokondriumba való belépést követően glükózzá alakulhat. A veleszületett rendellenességek között rendkívül gyakori ezen metabolikus útvonal defektusa. A laktát túlprodukció és a piruvát akkumuláció származhat túlzott fehérjebontásból és csökkent piruvát-dehidrogenáz aktivitás eredményéből is, mely a piruvátnak az acetyl-koenzim-A-vá való alakulását katalizálja. (HALPERIN ET AL 1977)



3. kép: A laktát acidózis biokémiai alapjai. I.: laktát produkció. II.: piruvát akkumuláció. 1: laktát-dehidrogenáz, 2: elektrontranszport rendszer, 3: piruvát-dehidrogenáz, 4: glükogenezis, 5: alanin aminotranszferáz (HALPERIN ET A 1977)

A kongenitális laktát acidózis számos oka közül a leggyakoribb oka a piruvát-dehidrogenáz enzim defektusa, amely az energiatermelés defektusához és ezáltal a neuromuszkuláris szervrendszer fejlődési zavarához vezethet.

II. Célkitűzés:

Az új generációs DNS szekvenálási technikák megjelenése hatalmas perspektívát nyitott a ritka betegségek etiológiájának tisztázásában. Az elmúlt évek publikációiból ismert, hogy a teljes exomszekvenálás (WES) módszere a nem ismert háttérű, mendeli öröklésű kórképek vizsgálata esetében a családok hozzátétőlegesen 60%-ban ad eredményt: 30%-ban már ismert gén kerül azonosításra új fenotípusos megjelenéssel, 30%-ban azonban új gén szintű eltérés azonosítható. Munkám során a mitokondriális betegségeket választottuk modellként arra, hogy az új generációs módszerek segítségével kíséreljünk meg azonosítani új mutációkat/új géneket.

Konkrét célkitűzések:

1. Egy kongenitális laktát acidózissal jelentkező két beteg gyermek fenotípusos, biokémiai jellemzése és pontos családfa elemzése.
2. Az index páciens mitokondriális DNS vizsgálata esetleges mtDNS mutáció azonosítása céljából.
3. Az index páciens és két szülője izolált DNS mintájából teljes exomszekvenálás elvégzése.
4. A WES során nyert nyersadatok részletes bioinformatikai elemzése.
5. A WES során azonosított eltérések megerősítése Sanger-szekvenálással.
6. A családtagok hordozósági szűrése Sanger-szekvenálással.
7. Fenotípus-genotípus korreláció felállítása az irodalmi estek összevetésével.

III.2. Molekuláris genetikai módszerek

III.2.1. A mitokondriális DNS vizsgálata

A DNS vizsgálatok a résztvevők írásos beleegyezését követően valósultak meg. Intézetünkben kezdetben egy célzott előzetes szűrés történt meg a táblázatban szereplő MELAS (mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes) mutációkra az érintett fiúgyermekben, azonban egyik esetében sem tudtunk eltérést detektálni mitokondriális szinten.(1. táblázat)

G583A	T3271delT
G1606A	T3291C
A3243G	T3308C
A3252G	T4290C
C3256T	G4332A
A3260G	G13513A
T3271C	A13514G
C14680A	A14690G

1. táblázat: Vizsgált MELAS mutációk az index páciensben

Az eredmények ismeretében nukleáris mutáció jelenlétét feltételeztük a tünetek hátterében. A további célzott géndiagnosztika illetve a sorozatos enzimaktivitás-mérések hosszadalmas volta miatt a teljes exomszekvenálás módszerét választottuk az eset megfejtéséhez.

III.2.2. Fibroblast tenyésztés és enzimaktivitás mérés

A súlyos tejsav-acidózis piruvátdehidrogenáz-hiány lehetőségét vetett fel elsőként, azonban az érintett betegek fibroblast-tenyészetéből elvégzett enzimaktivitás-mérés nem tudott csökkenést igazolni a kontrollokhöz képest. Mivel a piruvátdehidrogenáz hiányon kívül a tünetek hátterében számos egyéb enzimdefektus merült fel, a sorozatos enzimaktivitás-mérések és célzott géndiagnosztika rendkívül hosszadalmas volta miatt esetünkben a teljes exomszekvenálás vált kézenfekvővé.

III.2.3. A teljes exom szekvenálás lépései

A külföldi kooperációban elvégzett teljes exomszekvenálás során a család tagjainak DNS izolálása SureSelect Human All Exon Kit felhasználásával valósult meg. Az elkészített könyvtár szekvenálása HiSeq2500 Illumina platformon történt. Az átlagos lefedettség 121 volt, amelynek 97%-ában a target több, mint 20-szoros lefedettségben volt jelen. A betegség hátterében egy autoszómális recesszív öröklődésmenetet feltételezve, az élő érintett fiúgyermek és szülei mintájából a teljes exomszekvenálás során azon variánsok kerültek kiszűrésre, melyek az érintett betegben homozigóta vagy összetett heterozigóta, a szülőkből egyidejűleg heterozigóta formában voltak jelen.

III.2.4. Bioinformatikai kiértékelés

A családban a szülők és a lánytestvér tünetmentesek voltak, így egy autoszómális recesszív öröklésmentet feltételezve, a fiúgyermek és a szülei mintában a teljes exomszekvenálás során azon variánsok kerültek kiszűrésre melyek az érintett betegben homozigóta vagy összetett heterozigóta, a szülőkből egyidejűleg heterozigóta formában voltak jelen

A nemzetközi együttműködésben elvégzett WES-elemzés során a közel 90 ezer variánsból az adatbázisok felhasználásával történő SNP kizárás illetve a technikai okokból adódó hibák kiszűrését követően 96 variáns került azonosításra, melyből 20 variáns mutatott összefüggést autoszómális recesszív öröklésmenttel. A 20 variáns közül 3 gén ismerten közrejátszik mitokondriális anyagcsereutakban, melyből azonban csak egyetlen homozigóta mutáció társult funkcióvesztéssel, és így biokémiaailag patogénnek tekinthető. Ez a *TMEM70* gén c.{317-2A> G} homozigóta mutációja volt.

IV. Eredmények és kiértékelésük

IV.1. Variánsok listája a vizsgált családban

A teljes exom szekvenálás során 3 olyan gént találtak, amelyek ismertek közrejátszanak mitokondriális anyagcsereutakban (*HMGCL*, *MARS2*, *TMEM70*), melyekből azonban csak a homozigóta formában jelenlévő *TMEM70* gén A317-2A> G splice mutációja társult funkcióvesztéssel.

IV.2. Eredmények megerősítése hagyományos szekvenálással

A teljes exom szekvenálást követően elvégzett hagyományos szekvenálással történő megerősítés során, a *TMEM 70* génben lévő eltérés az index páciensben és fiútestvéreben homozigóta, a szülőkben és a leánytestvéreben heterozigóta formában volt jelen.

A családukban azonosított *TMEM70* génmutáció klinikailag relevánsnak tekinthető és a tünetek oki magyarázatát jelenti. Bár a szülők között vérrokonság nem ismert, a homozigóta eltérés jelenléte akár azzal is magyarázható, hogy a fenti mutációra nézve magasabb hordozás ismert a roma populációban.

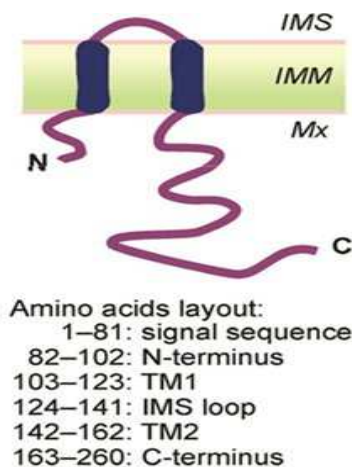
V. Összefoglalás és diszkusszió

V.1. A TMEM70 gén mutációja a kongenitális laktát acidózis hátterében

A mitokondriális légzési lánc oxidatívfoszforilációs folyamatainak eredményeként keletkező ATP nélkülözhetetlen a szervezet normál fiziológiás állapotának fenntartásában.

A komplex V. teszi lehetővé az ATP szintézist az ATP-szintáz enzimatisz aktivitása révén. Az enzimmel négy nukleárisan kódolt gén hozható kapcsolatba: az *ATP5A1*, az *ATP5E*, az *ATPAF2* és a *TMEM70* gén. Az *ATP5A1* és az *ATP5E* az α és ϵ szerkezeti alegységeket, az *ATPAF2* és a *TMEM70* gén pedig az ATP-szintáz bioszintézisét befolyásolja. Alapvetően a felsorolt gének esetében megjelenő esetleges mutációk esetében hasonló fenotípus alakul ki, amikor is csökken az összeszerelt, funkcionális ATP-szintáz jelenléte. (HEJZLAROVÁ ET AL 2014)

A *TMEM70* gén ismert mutációinak száma folyamatosan nő, így a betegek száma is magasabb a másik három felsorolt nukleáris génhez viszonyítva. A *TMEM70* gén a 8-as kromoszómán található, 3 exonból épül fel és egy 260 aminosavból álló 21 kDa nagyságú mitokondriális transzmembrán fehérjét kódol. (1. kép)



4. kép: A TMEM70 fehérje szerkezete (HOUSTEK ET AL 2009)
IMS: intermembrántér, IMM: mitokondriális membrán, Mx: mitokondriális mátrix

Az ATP-szintáz szintézisében betöltött szerepéből adódóan a *TMEM70* gén mutációinak eredményeként ATP deficiencia alakulhat ki. Az elégtelen mitokondriális energiaellátás leginkább azon szervek diszfunkciójához vezethet, amelyeknek magas az energiaszükségletük (pl. szív, agy, vázizmok). A 317-2A> G mutáció a második intron végén található splice mutáció mely eltávolítja a splicing kötőhelyet a 3. exon előtt, így

többszörösen hiányos és instabil transzkriptek képződéséhez vezet, melyek gátolják a TMEM70 fehérje szintézisét és ezáltal az ATP-szintáz hiányát okozhatják. A homozigóta formában kongenitális laktát acidózis, ataxia és dismorfia is kialakulhat.(HOUSTEK ET AL 2009)

V.2. A WES alkalmazásának lehetőségei eddig nem azonosított mitokondriális betegségekben

A teljes exom szekvenálás számos mendeli betegség vizsgálata során, illetve olyan heterogén fenotípus-genotípus képpel rendelkező kórképek esetében is hatékony eszköznek bizonyult, mint a mitokondriális betegségek.(FOLK ET AL 2012)

Munkánk összegzéseként elmondható, hogy a kóroki mutáció azonosítása révén a mutáció szűrése lehetővé válik a magzati diagnosztika során a család további gyermekvállalása estén. Ezen túlmenően a *TMEM70* A 317-2A> G mutációt eddig csak roma betegekben került leírásra és az általunk bemutatásra került eset az első Magyarországon leírt család. Intézetünk az eset megfejtését követően vizsgálni kezdte az egészséges magyar, illetve roma biobank mintáiban a *TMEM70* gén ezen mutációjának előfordulásait, hogy feltárja a két populáció között megjelenő esetleges allélfrekvencia különbségeket, illetve a hordozás gyakoriságát a magyar roma populációban.

Munkánk, mint egy modellként szolgál a teljes exomszekvenálás, mint új generációs stratégia alkalmazására az eddig azonosítatlan mitokondriális betegségekben és rávilágít ezen új technológia nyújtotta lehetőségekre.