

AZ AMIOTRÓFIÁS LATERÁLIS SZKLERÓZIS GENETIKAI HÁTTERÉNEK VIZSGÁLATA

TDK PÁLYAMUNKA

Készítette:

Török Dóra

SZTE ÁOK VI. évf, 3. csoport

Témavezető: Dr. Nagy Nikoletta PhD, egyetemi adjunktus
Dr. habil. Széll Márta PhD, DSc
az MTA doktora, tanszékvezető egyetemi tanár

**Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Genetikai Intézet**

**Szeged
2013**

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

A	adenin
AD	autoszómális domináns
Ala	alanin
ALS	amiotrófiás laterális szklerózis
AOA2	ataxia okuláris apraxia 2
APEX1	Apurinic Endonuclease DNA repair enzyme 1
AR	autoszómális recesszív
Asn	aszparagin
ATXN2	Ataxin-2
C	citozin
C9ORF72	chromosome 9 open reading frame 72
CHMP2B	charged multivesicular body protein 2B
CMT 4J	Charcot-Marie Tooth betegség 4J típusa
DAO	D-aminosav oxidáz
DENN	Differentially Expressed in Normal and Neoplasia
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
DPR protein	dipeptid repeat protein
fALS	familiáris amiotrófiás laterális szklerózis
FTD	frontotemporális demencia
FTLD	frontotemporális lobáris degeneráció
FUS	fused-in sarcoma
G	guanin
GEF	guanin nukleotid exchange faktor
GTP	guanozin-trifoszfát
HDL	Huntington-disease like
HFE	hemokromatózis
His	hisztidin
HSP	herediter spasztikus paraplégia
IAHSP	infantilis aszcendáló herediter spasztikus paralízis
IBMPFD	inklúziós test miopátia Paget kórral és frontotemporális demenciával
Leu	leucin
mRNS	messenger ribonukleinsav
NEFH	Neurofilament Heavy
PBP	progresszív bulbáris paralízis
PD	Parkinson kór
PGRN	Progranulin
PLS	primer laterális szklerózis
PMA	progresszív muskuláris atrophia
PON	paraoxanáz
PRPH	Peripherin
RAN transláció	repeat-associated non-ATG transláció

RNS	ribonukleinsav
sALS	sporadikus amiotrófiás laterális szklerózis
SCAR 1	autoszómális recesszív spino-cerebelláris ataxia
SIGMAR1	Sigma Non Opiod Intracellular Receptor
SMA	spinális muszkuláris atrophia
SMN	Survival Motor Neuron
SNP	single nucleotid polymorphism
SOD1	szuperoxid-dizmutáz 1
T	timin
TARDP	TAR DNS-kötő protein
Thr	threonin
VAPB	vesicle associated membrane protein associated protein B (Membránhoz asszociált vezikulához asszociált protein B)
VCP	Valosin Containing Protein (valosin tartalmú protein)
VEGF	vascular endothelial growth factor (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor)

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	1
TARTALOMJEGYZÉK	3
1. ÖSSZEFOGLALÁS	4
2. BEVEZETÉS	5
2.1. A motoneuron betegségek	5
2.2. Az amiotrófiás laterális szklerózis	5
2.2.1. Az amiotrófiás laterális szklerózis előfordulási gyakorisága	5
2.2.2. Az amiotrófiás laterális szklerózis jellemző tünetei	7
2.2.3. Az ALS klinikai diagnózisa	8
2.2.4. Az ALS típusai	9
2.3. A <i>chromosoma open reading frame (C9ORF72)</i> gén	11
2.3.1. A <i>C9ORF72</i> frontotemporális demenciában már ismert kóroki eltérése	11
2.3.2. A <i>C9ORF72</i> gén celluláris funkciója	13
2.3.3. A <i>C9ORF72</i> gén kóroki szerepe más megbetegedésekben	15
3. CÉLKITŰZÉS	16
4. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK	17
4.1. Betegek	17
4.2. Módszerek	18
4.2.1. Vérvétel	18
4.2.2. DNS izolálás	18
4.2.3. PCR amplifikáció	19
4.2.4. Gélelektroforézis és géldokumentáció	20
4.2.5. Szekvenálás	21
5. EREDMÉNYEK	22
6. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	27
7. IRODALOMJEGYZÉK	29
8. ÁBRAJEGYZÉK	32
TÁBLÁZATOK	32
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	33
NYILATKOZAT	34

1.ÖSSZEFOGLALÁS

Bevezetés: Az amiotrófiás laterális szklerózis (ALS; ORPHA803) a centrális és perifériás mozgató idegsejtek fokozatos pusztulásával, az izmok progresszív sorvadásával járó kórkép. Az ALS szövődménye az izmok sorvadásból adódó, súlyos esetekben akár korai elhalálozáshoz is vezető bénulás. Az esetek mintegy 10%-a familiáris.

Az ALS-ben szenvedő betegek és családtagjaik számára mindeddig genetikai kivizsgálás és prenatális diagnosztika nem állt rendelkezésre Magyarországon, ezért vizsgálataim során célul tűztem ki a magyar ALS betegek esetében a előforduló oki genetikai eltérések azonosítását.

Módszerek: Az ALS genetikai háttere meglehetősen heterogén, eddig mintegy 20 génen azonosítottak a betegség kialakulásáért felelős oki mutációkat. A vizsgálatainkba bevont 71 ALS-ben szenvedő beteg esetében a vizsgált géneket a klinikai tünetek és a neurológiai szakvélemény alapján választottuk ki.

Eredmények: Vizsgálataim során a *C9ORF72* gén kódoló szakaszainak és az azokat határoló intronális szakaszoknak a direkt szekvenálását végeztem el mutációk azonosítása céljából.

Következtetés: Vizsgálataim jelentősége, hogy az ALS betegek esetében a betegség kialakulásáért felelős oki eltérések azonosítása révén lehetőséget nyújt prenatális diagnosztika végzésére és ezáltal jelentősen befolyásolhatja a családtervezést az érintett családok esetében. Vizsgálataim a magyarországi leggyakoribb oki genetikai eltérések azonosítása révén hozzájárulhat egy későbbi ALS mutációs szűrőpanel kialakításához valamint fenotípus-genotípus összefüggések jobb megismeréséhez is.

Témavezetők: Dr. Nagy Nikoletta PhD, Dr. Széll Márta PhD, DSc

2.BEVEZETÉS

2.1.Motoneuron betegségek

Az amiotrófiás laterális szklerózis (ALS) a motoneuron betegségek közé tartozik, mivel a kórkép fő jellegzetessége a motoneuronok progresszív degenerációja. A motoneuron betegségek felnőttekben leggyakrabban előforduló típusa az amiotrófiás laterális szklerózis, amely olyan nagy arányban képviseli ezen betegségeket, hogy az irodalomban gyakran szinonimaként használják a két fogalmat.

Az amiotrófiás laterális szklerózis heterogén neurodegeneratív kórkép, melynek fő jellegzetessége az alsó és felső motoneuronok degenerációja. (*Chen et al. 2013*) Abban az esetben, ha csak az alsó motoneuronok károsodását jelző tünetek állnak fenn, a diagnózis progresszív muskuláris atrofia (PMA) (*Wijesekera et al. 2009*); míg az izolált felső motoneuron károsodást jelző spaszticitással járó állapotokat primer laterális szklerózisnak (PLS) nevezzük. A PLS lefolyása nagyban eltér az ALS-étől, hiszen itt a betegség évtizedekig eltarthat. (*Almeida et al. 2013*) Ha csupán a bulbáris izmok érintettek, progresszív bulbáris paralízis (PBP) a kórisme. Természetesen vannak esetek, amikor e kórképek nehezen különíthetők el egymástól, és előfordulnak olyan esetek is, hogy az eredetileg PBP-ként diagnosztizált betegség az évek során klasszikus ALS-sé progrediál. Egyre gyakoribb emiatt, hogy a korábbi PBP megnevezést bulbáris típusként, míg a klasszikus ALS-t spinális típusként említik. (*Wijesekera, Leigh, 2009*)

2.2.Az amiotrófiás laterális szklerózis

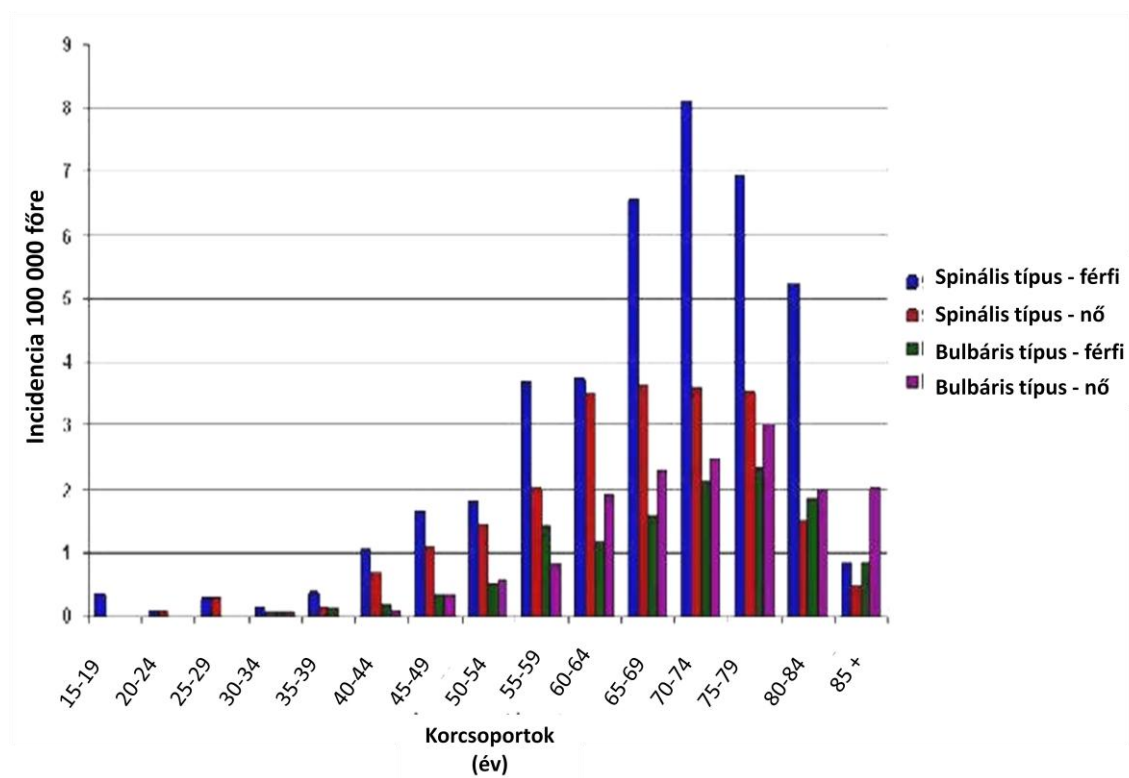
2.2.1.Az amiotrófiás laterális szklerózis előfordulási gyakorisága

Az ALS incidenciája 2:100 000, prevalenciája 6-8:100 000. Leggyakrabban átlagosan 64 éves korban, 55 és 65 év között kezdődik a betegség. Az incidencia az életkorral növekszik. Az esetek kevesebb, mint 5%-a lép fel 30 éves kor előtt; azonban egyre gyakrabban írnak le fiatal korban jelentkező betegséget. Ha a betegség 25 éves kor előtt jelentkezik, juvenilis formáról beszélünk. (*Silani et al.,2011*) Irodalmi adatok alapján az ALS 1,5-szer gyakrabban érinti a férfiakat, mint a nőket. Megfigyelték azt is, hogy a bulbáris megjelenés gyakoribb a nők és az idősebb korosztály körében. (*Silani et al.,2011*) A betegség átlagosan 2-5 év alatt vezet halálhoz.

Geográfaiilag nagy eltérések találhatóak a betegség előfordulásában. A Nyugat Csendes-óceáni betegség típus prevalenciája 50-100-szor magasabb, mint a máshol előforduló típusoké, azonban ezen jelentős eltérés oka még ismeretlen. Az itt élő betegekben a Nyugat Csendes-óceáni típusban az ALS jellemzően Parkinson-kórral társul.

A nem-Nyugat Csendes-óceáni típus gyakrabban érinti a Egyesült Államok-beli fehér lakosságot, mint a nem fehéreket, azonban ezen adatok pontos magyarázata sem tisztázott még. (Cronin et al., 2007)

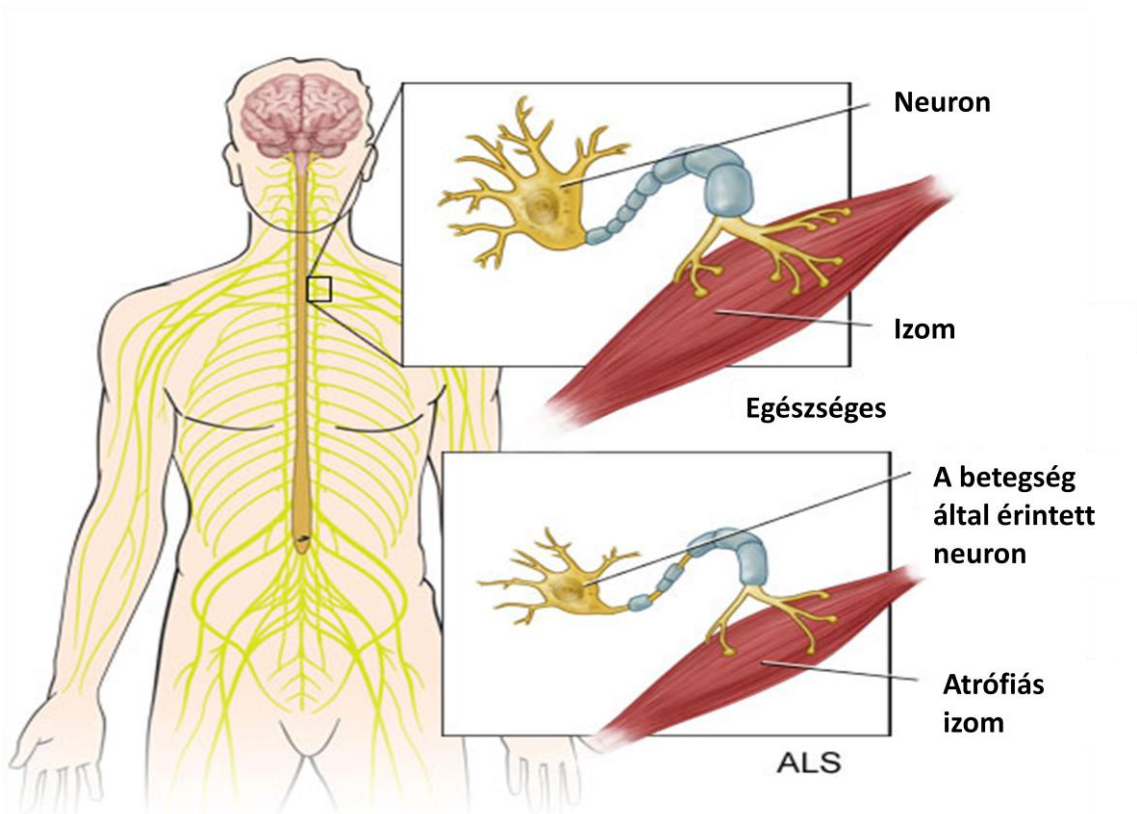
Az ALS incidenciája Európában homogén eloszlást mutat. Az incidencia értéke 2,16:100 000, hasonlóan a világ más részein előforduló értékekhez. Az Európában végzett tanulmányok is férfi dominanciáról számolnak be, amely esetekben jellemzően spinális kiindulású betegség. A 1. ábra mutatja a kor és nem szerinti incidencia értékeket Európában. (Logroscino et al., 2010)



1.ábra Az amiotrófiás laterális szklerózis incidenciája kor és nem szerint Európában (Logroscino et al., 2010)

2.2.2. Az amiotrófiás laterális szklerózis jellemző tünetei

A betegség neve tulajdonképpen leíró diagnózis, amely két jellegzetes eltérést ragad ki a betegség morfológiai jellemzői közül. Az „amiotrófiás” a neuronpusztulás következményeként létrejövő perifériás izomsorvadást írja le, míg a „laterális szklerózis” a gerincvelő elülső és oldalsó kötegében bekövetkező, a motoneuronok helyét elfoglaló glióvizist írja le. (Silani *et al.*,2011) A betegség jellemzően a primer motoros kortextben, az agytörzsben és a gerincvelőben elhelyezkedő motoneuronokat egyaránt érinti. A motoneuronok károsodása fokális izomgyengeséget okoz, amely a proximális és a disztális végtagizmokat egyaránt érintheti. Ritkán előfordulhat, hogy a gyengeséget megelőzi az izmok atrófiája. (2. ábra) Mindez jellemzően aszimmetrikusan lép fel, de a betegség progressziójával érintetté válik az ellenoldali végtag is. A betegség lefolyásával az érintett betegek végül tolószékre kényszerülnek. (Silani *et al.*,2011)



2. ábra Az amiotrófiás laterális szklerózist jellemző motoneuron degeneráció és izomatrophia

<http://www.georgetownhospitalsystem.org/stw/Page.asp?PageID=STW038148>

Az idő múlásával egyre több izom működésében lép fel deficit, a garatizmok érintettsége dizartriát okoz, és ahogy ez a tünet súlyosbodik, nyelési nehezítettség lép

fel. Emiatt gyakoriak a táplálkozási problémák, a malnutrició. A betegek egy részében ezen bulbáris lokalizációjú tünetek jelentkeznek először. (*Silani et al.,2011*) Az esetek 80% a fentebb említett végtagi tünetekkel jelentkező (spinális típus), míg 20%-ban az utóbbi jelenségekkel, bulbáris tünetekkel lép fel a kórkép (bulbáris típus). (*Chen et al. 2013*)

Az ALS végstádiumát általában 3-5 év alatt éri el. Ekkor a légzési izmok bénulása következtében légzésbénulás alakul ki, mely végül a betegek halálát okozza. (*Silani et al.,2011*)

A kognitív képességek, az érzékelés és az autonóm idegrendszeri funkciók általában intaktak maradnak. A motoros kiesési tünetek legtöbbször nem érintik a szemmozgásokat, ill. medencefenéki záróizomzat működését. (*Redler and Dokholyan 2012.*)

Az ALS-ben szenvedő betegek jelentős hányadánál kognitív deficiencia is előfordul. Ezekben a betegekben főleg a frontális kérgi funkciók sérültek. Klinikailag ezekre a betegekre az impulzív viselkedés, személyiségváltozás és a mindennapos feladatok elvégzésének zavara jellemző. Ezek a tünetek változó súlyosságban jelennek meg. Az igen súlyos esetekben a kórkép neve frontotemporális demenciával (FTD) társuló amiotrófiás laterális szklerózis. (*Tim Van Langenhove et al., 2012; Hosler et al., 2000*) A kórképet már 1975-ben Pinsky és mtsai. leírták, megállapítva, hogy jellemzően familiáris halmozódású esetekről van szó. (*Pinsky et al., 1975*)

2.2.3. Az ALS klinikai diagnózisa

A kezdetben fellépő tünetek az ALS egyes típusaiban nagy mértékben eltérnek, gyakoriak az atípusos betegségformák, ami gyakran diagnosztikai és differenciáldiagnosztikai nehézségek elé állítja még a szakorvosokat is. Előfordul, hogy a kezdeti diagnózis nem az ALS, a helyes diagnózist gyakran csak a betegség előrehaladtával állapítják meg. A diagnosztizált ALS esetén sem lehet biztos kijelentést tenni a betegség várható lefolyásáról, hiszen az egyes típusok progressziójukban, az életminőség alakulásában, a várható túlélés szempontjából különbözőek lehetnek.

Napjainkban az ALS elsősorban klinikai diagnózis, mely a tünetek és az azt alátámasztó elektrofiziológiai vizsgálatok eredménye alapján kerül felállításra. Gyakran végeznek emellett a biztos diagnózis megállapítása érdekében képalkotó vizsgálatokat, neuropszichológiai tesztek, illetve vesznek izombiopsziát. (*Silani et al.,2011*)

2.2.4. Az ALS típusai

Az amiotrófiás laterális szklerózis etiológiája az elmúlt évek intenzív kutatásai ellenére még ma sem ismert teljesen. Az esetek 90%-a sporadikus (sALS), a fennmaradó 10%-ban familiáris formáról (fALS) beszélünk

A betegség hátterében napjainkig 20 gént sikerült azonosítani, amelyek mutációja kóroki tényezőként szerepel az fALS kialakulása során. (3. ábra) (*Ticozzi et al., 2011*) A különböző mutációk különböző molekuláris eltérések révén okoznak motoneuron degenerációt. (*Chen et al. 2013*)

Genetikai altípus	Kromoszómális lókus	Gén	Fehérje	Betegség kezdete	Öröklődés	Klinikai jellegzetesség	A gén által okozott más betegségek
ALS1	21q22.1	SOD1	Cu/Zn SOD-1	Adult	AD/AR	Klasszikus ALS	-
ALS2	2q33-2q35	Alsin	Alsin	Juv	AR	Lassú lefolyású, főleg felső motoneuron jelek és arcizom spaszticitás	PLS/IAHSP
ALS3	18q21	ismeretlen	ismeretlen	Adu	AD	Klasszikus ALS főleg alsó végtagi érintettség	-
ALS4	9q34	SETX	Senataxin	Juv	AD	Lassú lefolyású, disztális motoros neuropátia piramisjelekkel	SCAR, AOA2
ALS5	15q15-21	SPG 11	Spatacsin	Juv	AR	Lassú lefolyású	HSP
ALS6	16p11.2	FUS	Fused in Sarcoma	Juv/ Adu	AD/AR	Klasszikus ALS	-
ALS8	20q13.3	VAPB	VAPB	Adu	AD	Klasszikus és atípusos ALS	SMA
ALS9	14q11.2	ANG	Angiogenin	Adu	AD	Klasszikus ALS, FTD és parkinsonizmus	-
ALS10	1p36.2	TARDBP	DNA-binding protein	Adu	AD	Klasszikus ALS	-
ALS11	6q21	FIG 4	Phosphoinositide-5phosphatease	Adu	AD	Gyors lefolyás, piramisjelekkel	CMT 4 J
ALS12	10p13	OPTN	Optineurin	Adu	AD/AR	Lassú lefolyás, végtagi érintettség főleg felső motoneuron tünetekkel	Nyílt zugú glaukóma
ALS14	9p13.3	VCP	VCP	Adu	AD		
ALS15/ALSX	Xp11	UBQLN2	Ubiquilin 2	Adu/ Juv	XD	Felnőttkori, FTD-vel vagy anélkül Felső majd alsó motoneuron tünetek	IBMPFD
ALS16	9p13.2-21.3	SIGMAR1	SIGMAR1	Juv	AR	Juvenilis formájú klasszikus ALS	-
ALS-FTD1	9q21-22	ismeretlen	ismeretlen	Adu	AD	ALS és FTD	FTD
ALS-FTD2	9p21	C9ORF72	C9ORF72	Adu	AD	ALS és FTD	FTD
NA	2p13	DCTN1	Dynactin	Adu	AD		FTD
Más, ritka ALS-t okozó gének						Disztális motoros neuropátia hangszalagbénulással	-
ALS3	18q21	ismeretlen	ismeretlen	Adu	AD	Klasszikus ALS végtagi érintettséggel, főleg az alsó végtagon	-
ALS7	20ptel-p13	ismeretlen	ismeretlen	Adu	AD/AR	Klasszikus ALS	-
NA	12q22-23	DAO	DAO	Adu	AD	Klasszikus ALS	-

1. táblázat Az amiotrófiás laterális szklerózis hátterében álló mutációk (*Chen et al. 2013*)

Az 1. táblázat rövidítései: PLS: primer laterális szklerózis; IAHSP: infantilis aszcendáló hereditér spasztikus paralízis; SCAR 1: autoszómális recesszív spino-cerebelláris ataxia; AOA2: ataxia okuláris apraxia 2; HSP: hereditér spasztikus paraplégia; VAPB: Vesicle associated membrane protein associated protein B (Membránhoz asszociált vezikulához asszociált protein B); SMA: spinális muskuláris atrófia, CMT 4J: Charcot-Marie Tooth betegség 4J típusa, VCP: Valosin Containing Protein (valosin tartalmú protein); IBMPFD: inklúziós test miopátia Paget kórral és frontotemporális demenciával; SIGMAR1: Sigma Non Opioid Intracellular Receptor; C9ORF72: Chromosome 9 open reading frame 72; PD: Parkinson kór; DAO: D-aminosav oxidáz; FTD: frontotemporális demencia; AD: autoszómális domináns, AR: autoszómális recesszív

Az öröklődő esetek többségében autoszómális domináns öröklésment volt igazolható. A familiáris esetek hátterében leggyakrabban, mintegy 20%-ban a *SOD1* gén mutációi állnak, a *SOD1* mutációk azonban a sporadikus esetekben is előfordulnak a betegek mintegy 2%-ában. Jellemző, hogy fALS esetében a tünetek 10 évvel korábban jelentkeznek, mint a sporadikus formában, a nőket és férfiakat a familiáris forma egyenlő arányban érinti, és a betegség rövidebb idő alatt éri el végstádiumát. A juvenilis formájú ALS általában familiáris típusú. (*Silani et al.,2011; Nelson, 1996; Armon, 2003*)

Fontos eredmény, hogy a genetikai és specifikus klinikai altípusok között néhány esetben szoros összefüggést sikerült találni. (*Chen et al.,2013*)

Az irodalmi adatok arra utalnak, hogy a sporadikus forma hátterében is gyakran genetikai eltérések állnak. A sALS esetek hátterében is sikerült ugyanis kimutatni, bár kisebb gyakorisággal a fALS esetek kóroki tényezői közül a *SOD1*, *C9ORF72*, *TDP-43* és *FUS* gének mutációit. Emellett néhány genetikai eltérést sikerült csak a sporadikus formával is összefüggésbe hozni. (2. táblázat) (*Chen et al.,2013*)

Gén	Fehérje	Kromoszómális lókus	ALS-sel társult variáns
APEX1	Apurinic Endonuclease DNA repair enzyme 1	14q11.2	SNP asszociációk
ATXN2	Ataxin-2	12q24.12	poli Q ismétlődések
CHMP2B	Chromatin Modifying Protein 2B	3p11.2	mutációk
HFE	Haemochromatosis	6p22.2	SNP asszociációk
NEFH	Neuro filament Heavy	22q12.2	deléciók és inszerciók
SMN1	Survival Motor Neuron 1	5q12.2-q13.3	abnormális számú génmásolat
SMN2	Survival Motor Neuron 2	5q12.2-q13.3	abnormális számú génmásolat
PON 1,2,3	Paraoxonase	7q21.3	SNP asszociációk és mutációk
PRPH	Peripherin	12q13.12	mutációk
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	6p21	promóter SNP-k
PGRN	Progranulin	17q21.31	deléciók

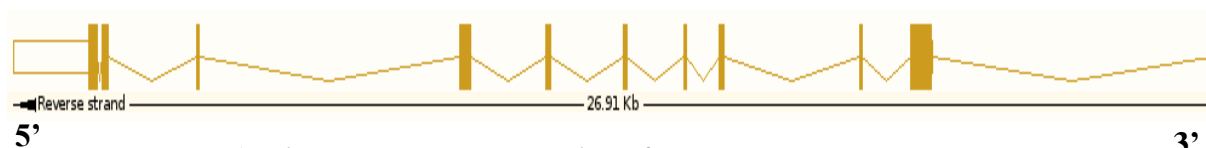
2. **táblázat A sporadikus amiotrófiás laterális szklerózissal összefüggésbe hozott gének** (*Chen et al.,2013*)

A 2. táblázat rövidítései: *APEX1*: Apurinic Endonuclease DNA repair enzyme 1; *ATXN2*: Ataxin-2; *CHMP2B*: Charged multivesicular body protein 2B; *HFE*: hemokromatózis; *NEFH*: Neuro filament Heavy; *SMN*: Survival Motor Neuron; *PON*: Paraoxonase; *PRPH*: Peripherin; *VEGF*: Vascular Endothelial Growth Factor (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor); *PGRN*: Progranulin.

Bár a sALS oka egyelőre tisztázatlan, valószínű, hogy a betegség nem vezethető vissza egyetlen kóroki tényezőre, háttérben multiplex genetikai és környezeti faktorok állnak. (Siddique N and Siddique T, 2008) A 2. táblázatban feltüntetett gének polimorfizmusai (SNP), poliglutamin ismétlődések (poly Q), a gének kóros számú ismétlődése, deléciók és inszerciók állnak a sALS háttérben. (Chen et al., 2013)

2.2. A chromosome open reading frame 72 (C9ORF72) gén

A frontotemporális demenciával járó ALS vagy frontotemporális lobáris degenerációval (FTLD) járó ALS háttérben a C9ORF72 gén (3. ábra) eltérései ismertek.



3. ábra A chromosome open reading frame 72 (C9ORF72) gén sematikus ábrája (Ensembl Genome Browser). A vízszintes vonal a gént, a függőleges sávok pedig a kódoló szakaszok elhelyezkedését és méretét reprezentálják a génen.

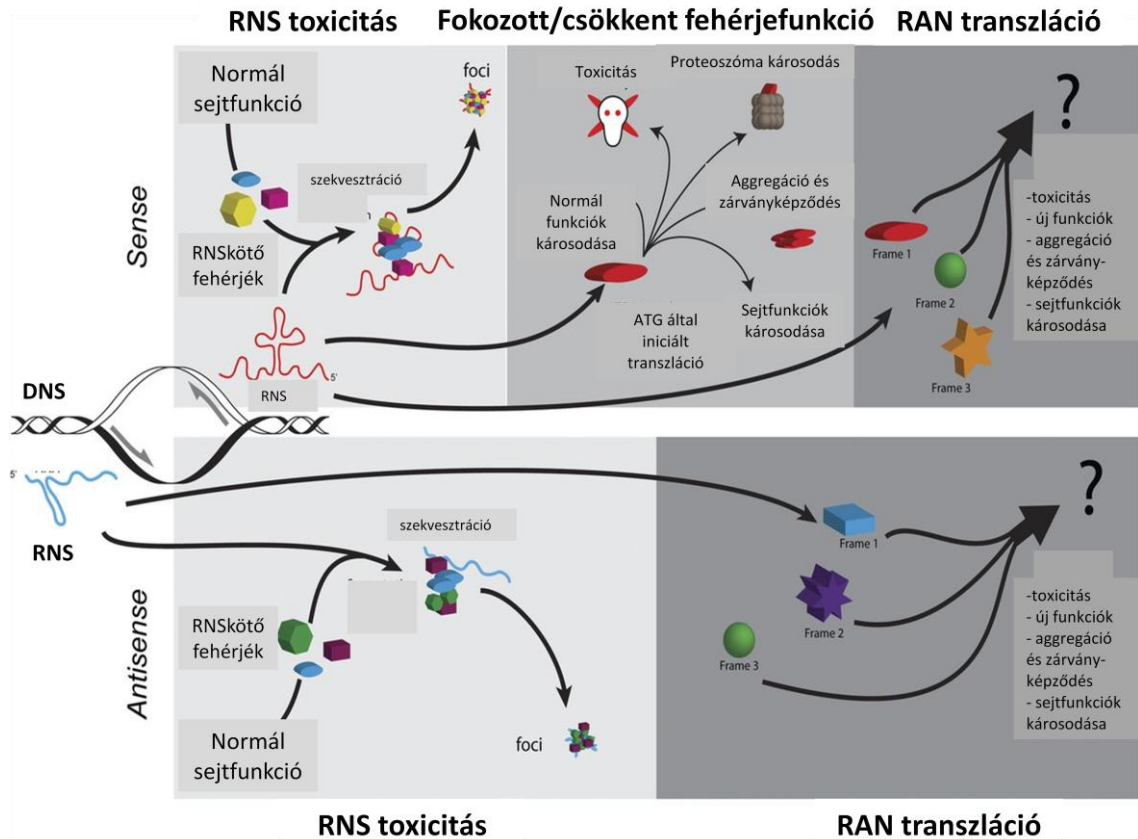
A C9ORF72 gén a 9-es kromoszóma rövid karján (9p21.2) helyezkedik el. A gén 12 exonból épül fel, beleértve az első nem kódoló váltakozó exont is, melynek előfordulhat 1a és 1b típusa.

2.3.1. A C9ORF72 frontotemporális demenciában már ismert kóroki eltérése

Eddig az ALS-sel kapcsolatban egy intronikus GGGGCC hexanukleotid expanzió szerepét írták le, amely a nem kódoló 1a és 1b exon között helyezkedik el. (DeJesus-Hernandez et al., 2011) Az egészséges egyéneknél a hexanukleotidok ismétlődési száma legfeljebb 23 volt, míg ez a szám a betegekben 700-1600-ig terjedt (DeJesus-Hernandez et al., 2011) amely Renton vizsgálatai alapján 250 volt. (Renton et al., 2011) Az eltérést familiáris és sporadikus ALS-ben szenvedő betegek esetén is sikerült azonosítani. (DeJesus-Hernandez et al., 2011) Vizsgálataik alapján DeJesus-Hernandez és Renton megállapították, hogy ez a leggyakoribb genetikai eltérés FTD-ALS-ben. Egy másik tanulmány szerint a fALS esetek 51,6%-ában, míg a sALS esetek 9,6%-ában volt jelen a GGGGCC expanzió, míg ez a kontroll egyéneknél nem volt megfigyelhető. Megállapították azt is, hogy az intronikus expanzióval rendelkező

betegekben a betegség később kezdődik, gyakoriak a bulbáris tünetek, ill. rosszabb életkilátásokra számíthatnak. (Debray et al., 2013)

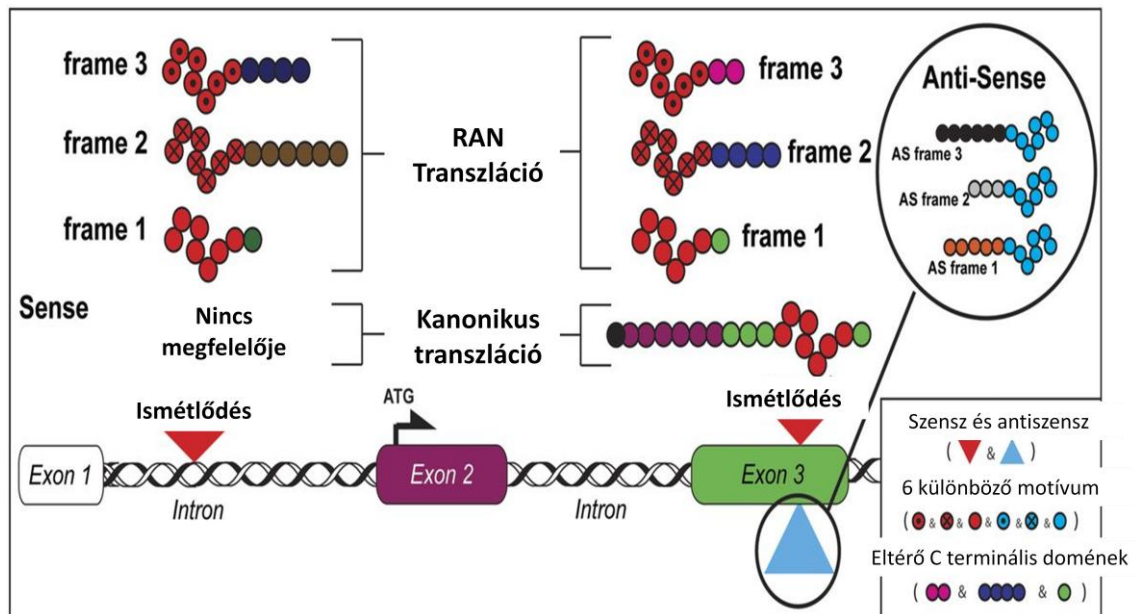
A korábbi elképzelések két fő mechanizmussal magyarázták az expansziók kóros szerepét. Egyrészt a túlzott vagy éppen csökkent működésű fehérjék keletkezésével, másrészt kóros RNS keletkezésével, amely toxikus hatású a sejtre. (4. ábra)



4. ábra A DNS expansziók potenciális citotoxikus hatásai (Cleary and Ranum, 2013)

A 4. ábra rövidítései: DNS: dezoxi-ribonukleinsav; RNS: ribonukleinsav RAN transzláció: repeat-associated non-ATG transzláció

A legújabb feltételezések szerint létezik egy harmadik út, amikor is AUG start kodon nélkül zajlik le a transzláció. Ez a váratlan, nem kanonikus formája a fehérje transzlációnak hossz és szerkezet függő folyamat, mely kereteltolódás illetve az RNS változása nélkül zajlik le és jellegzetessége számos különböző ismétlődő motívumnak. Ez a szokatlan mechanizmus rendellenes fehérjék (RAN proteinek) keletkezéséhez vezet, hozzájárulva a neuronok degenerációjához. (5. ábra) (Mori et al., 2013; Cleary and Ranum, 2013)



5. ábra A RAN transztláció (Cleary and Ranum, 2013)

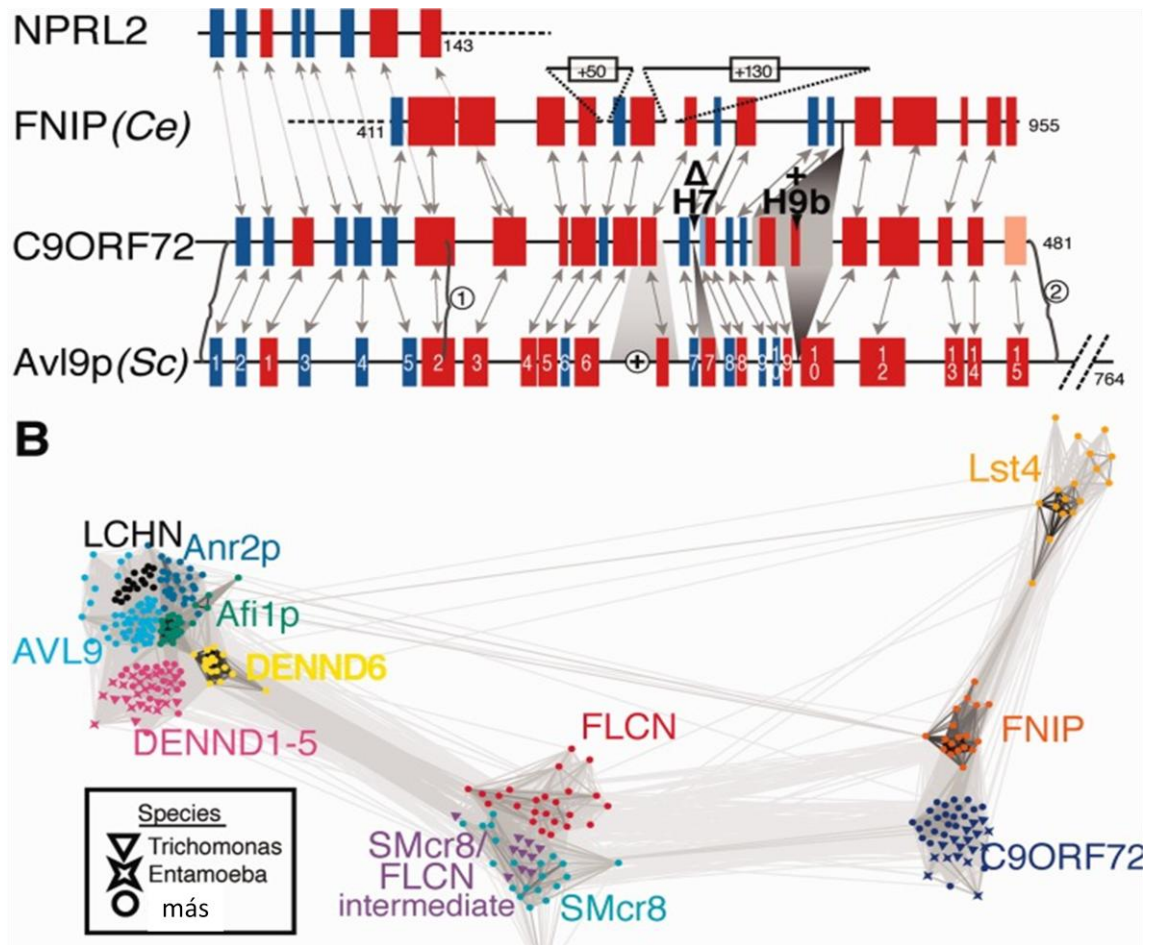
5. ábra rövidítése: RAN transztláció: repeat-associated non-ATG transztláció

A RAN-transztláció a frontotemporális demenciával társult amiotrófiás laterális szklerózis (FTD/ALS) mellett számos neurológiai megbetegedés létrehozásában szerepet játszik, ahol kóros expanzió áll a betegség létrejöttének hátterében, úgymint spinocerebelláris ataxiában, 1-es típusú disztrófia miotónikában és fragilis X tremor ataxia szindrómában (Cleary and Ranum, 2013)

Más kóros mutációt az ALS-sel kapcsolatban napjainkig még nem azonosítottak.

2.3.2. A *C9ORF72* gén celluláris funkciója

Annak ellenére, hogy a GGGGCC hexanukleotid expanzió citotoxikus mechanizmusa ismert, a *C9ORF72* gén celluláris funkciójáról nagyon keveset tudunk. Levine és mtsai vizsgálták a gén lehetséges funkcióját. Kutatásaik alapján strukturális homológiát véltek felfedezni ezen gén terméke és a DENN-like szupercsaládba (Differentially Expressed in Normal and Neoplasia) tartozó fehérjék között. (6. ábra)



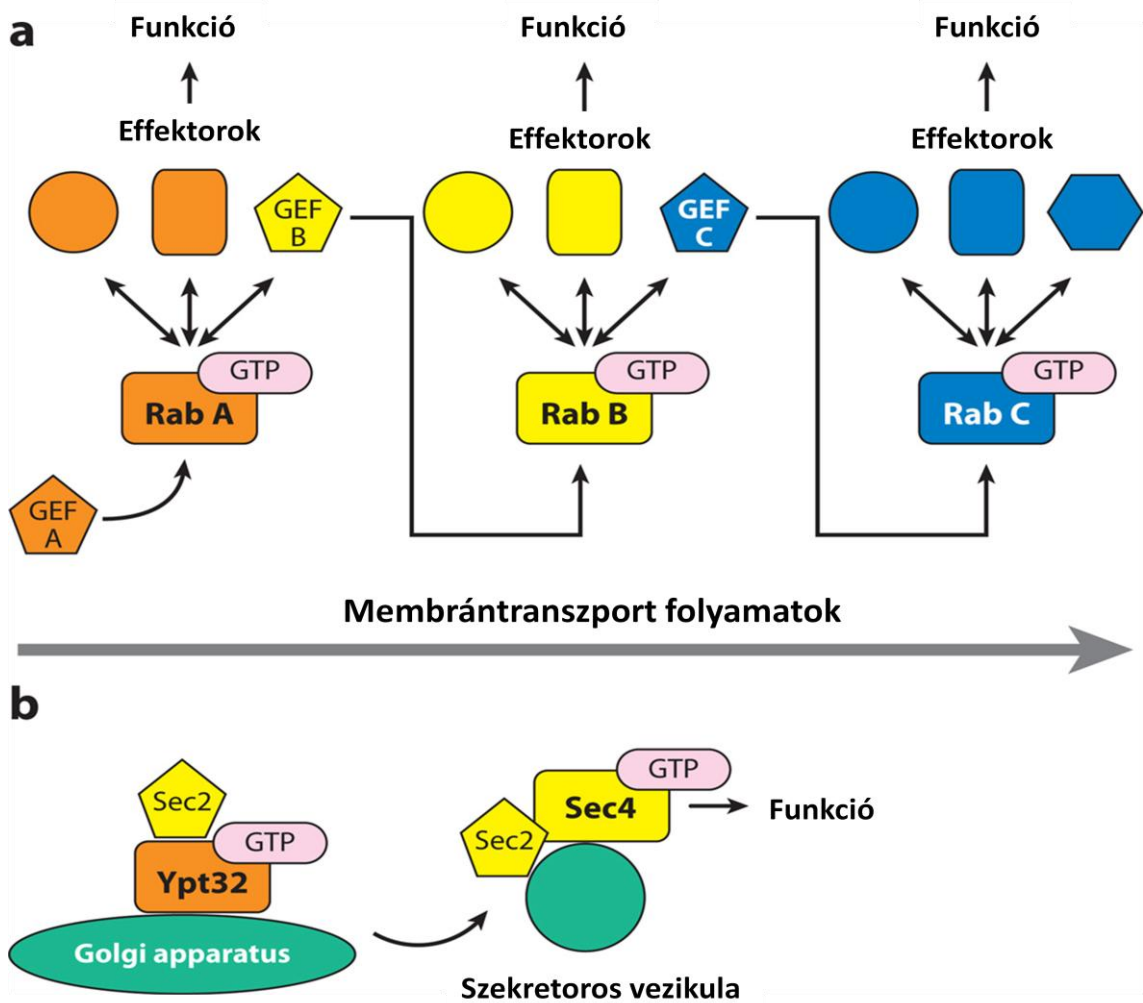
6. ábra A C9ORF72 gén strukturális homológia alapján a DENN-like szupercsalád tagja

Az ábrán a C9ORF72, a DENN és más strukturális homológok közti kapcsolatok láthatók. (A) A DENN-like szupercsaládba tartozó fehérjék és a C9ORF72 közti homológ szakaszok láthatók az ábrán. Pirossal jelöltek és a hélixek, kékkel a redők. (B) A DENN-like szupercsaládba tartozó fehérjék strukturális homológia szerinti csoportosítása. (Levine *et al.*, 2013) [12]

A 6.ábra rövidítései: DENN: Differentially Expressed in Normal and Neoplasia; C9ORF72: chromosome open reading frame 72

Ezen fehérjéknek fontos funkcionális doménje a GEF-domén, amelynek szerepe van a membrántranszport-folyamatokban, a lizoszómák felismerésében. (9. ábra) (Wu *et al.*, 2011) Ezen folyamatoknak funkcionális szerepük van a neuronok túlélésében és degenerációjában, amely magyarázhatja ezen génmutáció oki szerepét a betegség kialakulásában. A talált strukturális homológia alapján Levine és mtsai szerint a gént *DENN-like 72*-nek (*DENNL72*) célszerű elnevezni. (Levine *et al.*, 2013)[12]

Levine és *mtsai.* eredményei arra utalnak, hogy az ismétlődések funkciónyerése mellett, a DENNL72 haploinsufficiencia kritikus mértékben csökkentheti a Rab aktivációját, gátolva ezzel az endocitózis vagy autofagocitózis bizonyos aspektusait, melyek a nélkülözhetetlenek a neuronok túlélésében. (7.ábra) (Levine *et al.*, 2013) [13]



7. ábra A GEF szerepe a membrántranszport-folyamatokban (Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2012)

Az a, ábrán látható, hogy a Rab GTPáz a saját GEF domainje által aktiválódik. Ez az aktiválódás szükséges számos membrán transzport folyamat végbemeneteléséhez. . b, A Rab-GEF aktiváció folyamatát élesztőben írták le először.

A 7.ábra rövidítései: *GEF*: guanin nukleotid exchange faktor; *GTP*: guanozin-trifoszfát

2.3.3. A C9ORF72 gén kóroki szerepe más megbetegedésekben

A *C9ORF72* gén intronikus expansiója és Parkinson-kór, ill. egyéb parkinsonizmussal járó állapotok között is sikerült összefüggést találni. Jellemzően ezeknek a betegeknek pozitív a családi anamnézise Parkinson-kórra, degeneratív demenciákra vagy ALS-re. (*Lesage et al., 2013*) Egy másik munkacsoport összefüggésbe hozta a *C9ORF72* genetikai eltéréseit a primer laterális szklerózis (PLS), a progresszív muszkuláris atrofia (PMA), a Huntington-kór-szerű szindróma (HDL szindróma), ill. az Alzheimer-kór kialakulásával is (*Liu et al., 2013*)

3. CÉLKITŰZÉS

Az ALS-ben szenvedő betegek és családtagjaik számára mindaddig genetikai kivizsgálás és prenatális diagnosztika nem állt rendelkezésre Magyarországon, ezért vizsgálataim során célul tűztem ki a magyar ALS betegek esetében előforduló oki genetikai eltérések azonosítását.

Vizsgálatom során a *C9ORF72* gén exonjainak, ill. az azokat kódoló intronikus szakaszoknak a szekvencia analízisét végeztem el kóroki mutációk azonosítása céljából.

4. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

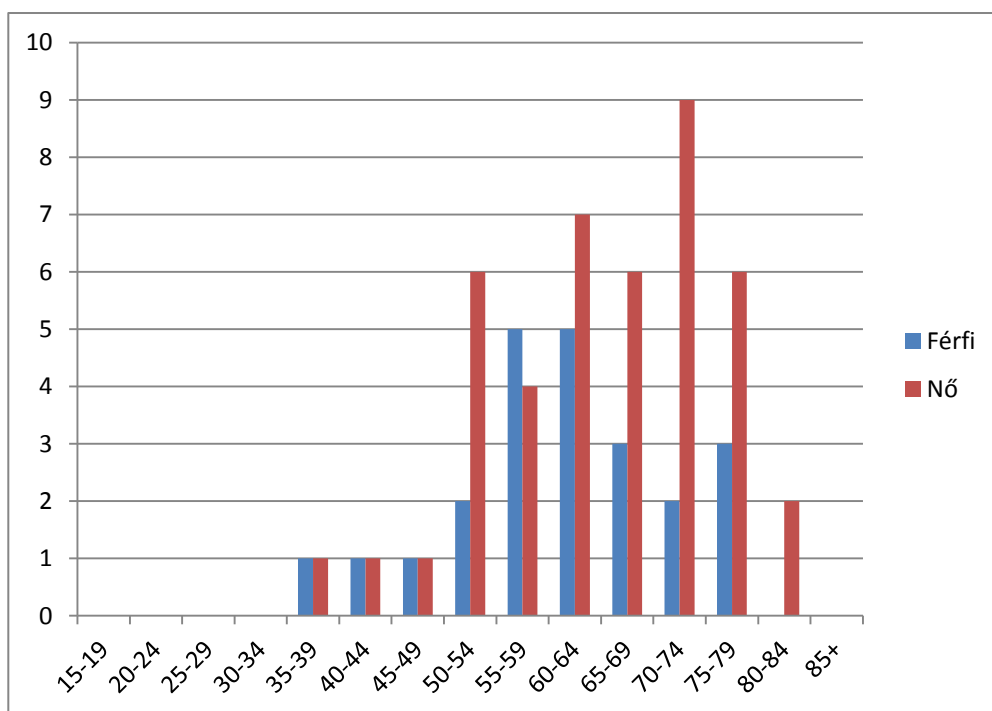
4.1. BETEGEK

Vizsgálatunkba 71 ismert amiotrófiás laterális szklerózisban szenvedő beteget vontunk be. Ez az esetszám viszonylag nagynak mondható, tekintve, hogy az ALS ritka betegség, melynek incidenciája 2:100 000. A betegek az SZTE ÁOK Neurológiai Klinika gondozásában állnak, vizsgálatunkba való bevonásukat a klinikai tünetek és neurológiai szakvélemény alapján Dr.Klivényi Péter (SZTE ÁOK Neurológiai Klinika) javasolta.

Betegek száma	71
átlag életkor (év)	63,23
nők száma	46
férfiak száma	25
nő : férfi arány	1,84:1

3.táblázat A vizsgálatba bevont 71 ismert ALS beteg adatai

A vizsgálatunkban szereplő ALS betegek átlag életkora megfelel az epidemiológiai adatokban szereplő átlagos életkornak, amely 64 év.



8. ábra A vizsgálatba bevont betegek nem és korcsoport szerinti eloszlása

A vízszintes tengelyen a korcsoportok vannak években feltüntetve, a függőleges tengely jelöli az adott csoportba tartozó betegek számát. A kék oszlopok a férfiakat, a piros oszlopok a nőket jelölik.

Vizsgálatunkban a nők és férfiak közötti 2:1 arány eltér az általában tapasztalt férfi dominanciától, amelyet feltételezhetően mintánk alacsony elemszáma magyaráz.

4.2. MÓDSZEREK

4.2.1. Vérvétel

A genetikai vizsgálatok elvégzéséhez a betegektől vért vettünk. Vizsgálatunkhoz a betegektől 5 ml vért vettünk véralvadás gátolt EDTA-s csőbe. A vért szétosztottuk három 1,5 ml-es Eppendorf csőbe, majd a vérmintákat $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk felhasználásig.

4.2.2. DNS izolálás

A teljes vérből genomi DNS izolálást végeztünk a QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) segítségével.

A genomikus DNS izolálás vérből (QIAGEN):

Előkészületek: Minden szükséges oldatot szobahőmérsékletre melegítünk
56 C°-ra előmelegítjük a termosztátot

A mintákat szobahőmérsékletre melegítjük

1. 20 µl QIAGEN proteázt pipettázunk az Eppendorf csövek aljára
2. 200 µl teljes vért rápipettázunk
3. 200 µl AL puffert adunk hozzá, röviden vortexeljük (15 s)
4. 56 C°-on 10 percig inkubáljuk a mintákat
5. A mintákat röviden lecentrifugáljuk
6. 200 µl tiszta etanolt adunk a mintákhoz, röviden vortexeljük (15 s), majd lecentrifugáljuk
7. A mintákat rávisszük az oszlopokra (az oszlopokat 2 ml-es gyűjtő csövekbe tesszük), majd lefugáljuk (1 percig, szobahőmérsékleten, 8000 rpm). Ezt követően új gyűjtő csövekbe tesszük az oszlopokat.
8. 500 µl AW1 puffert adunk hozzá, majd lefugáljuk a mintákat (1 percig, szobahőmérsékleten, 8000 rpm). Ismét új gyűjtő csövekbe tesszük az oszlopokat.
9. Hozzáadunk 500 µl AW2 puffert, és ismét lecentrifugáljuk a mintákat (3 percig, szobahőmérsékleten, 14000 rpm). Ezután új 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe tesszük az oszlopokat.
10. Lecentrifugáljuk a mintákat (1 percig, szobahőmérsékleten, 14000 rpm). Ezt követően új 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe tesszük az oszlopokat.
11. Hozzáadunk 100 µl AE puffert vagy desztillált vizet az oszlopokhoz. Ezt szobahőmérsékleten történő inkubálás követi 5 percig, majd lecentrifugáljuk (1 percig, szobahőmérsékleten, 8000 rpm).

4.2.3. PCR amplifikáció

A PCR amplifikálásokhoz templátként a genomi DNS-ből 3 µl-t használtunk fel reakciónként. Ezen kívül a reakció elegy tartalmazott 7 µl Dream Taq Green PCR Master Mix-et (Fermentas), 3 µl desztillált vizet és 2 µl-t a megfelelő primerpárokból. A primereket az UCSC Genome Browser (www.genome.ucsc.edu) és a Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) interneten elérhető programok segítségével terveztük. A PCR

amplifikálásokat egy MyCycler PCR géppel (BioRad) végeztük a következő programokkal.

1. lépés: 10 perc 95°C-on
2. lépés: 30 másodperc 95°C-on (denaturálás)
3. lépés: 30 másodperc 59°C-on (annealing)
4. lépés: 45 másodperc 72°C-on (szintézis)
5. lépés: 10 másodperc 72°C-on
6. lépés: 4°C fok ∞

A 2., 3. és 4. lépéseket 40 alkalommal ismételtük meg. Az annealing hőmérséklet és a ciklusok száma az adott primerpár függvénye volt, a szintézis reakció idejét pedig az amplifikált termék várható hossza határozta meg.

Grádiens PCR

Primereink annealing hőmérséklete 59 C°. Ennek ellenére előfordul, hogy a primerek optimalizálására van szükség. A primerek optimalizálásának egyik lehetősége, hogy az annealing hőmérséklet változtatásával igyekszünk javítani a reakció sikerén.

A grádiens PCR reakció során alkalmazott annealing hőmérsékletek:

- a: 61,8 C°
- b: 60,5 C°
- c: 58,7 C°
- d: 57,5 C°

Ezt követően az adott primert a legsikeresebbnek vélt reakció hőmérsékletén használtuk.

4.2.4. Gélelektroforézis és géldokumentáció

A PCR termékeket 2%-os agaróz gélen (SeaKem LE agaróz, Lonza) 2,5 μ l GelRed (Biotium) jelenlétében, TBE puffert (Lonza) használva futtattuk meg.

Gélöntés menete

1. 0,8 g SeaKem agaróz port és
40 ml 1x TBE puffert kimérünk
2. Mikrohullámú sütőben kb. 1 perc alatt felforraljuk, míg átlátszó lesz
3. 2,5 µl GelRed-et adunk hozzá
4. Ezután a tartóba helyezzük, majd 15 percig szobahőmérsékleten, ezután 10 percig hűtőszekrényben tároljuk, míg megszilárdul

Gélfuttatás menete

1. Az első zsebbe a 3 µl nagy molekulásúlyú marker kerül
2. A többi zsebbe szintén 3 µl PCR termék
3. 90 V-on, 30-40 percig futtatjuk a mintákat

A GelRed-del festett géleket egy BioRad Molecular Imager® GelDoc™ XR géldokumentációs rendszert használva a QuantityOne szoftver segítségével analizáltuk.

4.2.5. Szekvenálás

A szekvenálások a PCR reakció termékekből történtek megfelelő tisztítás után, Big Dye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems) felhasználásával ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) szekvenáló géppel. A szekvenálás szolgáltatását a Delta Bio 2000 Kft nyújtotta számunkra.

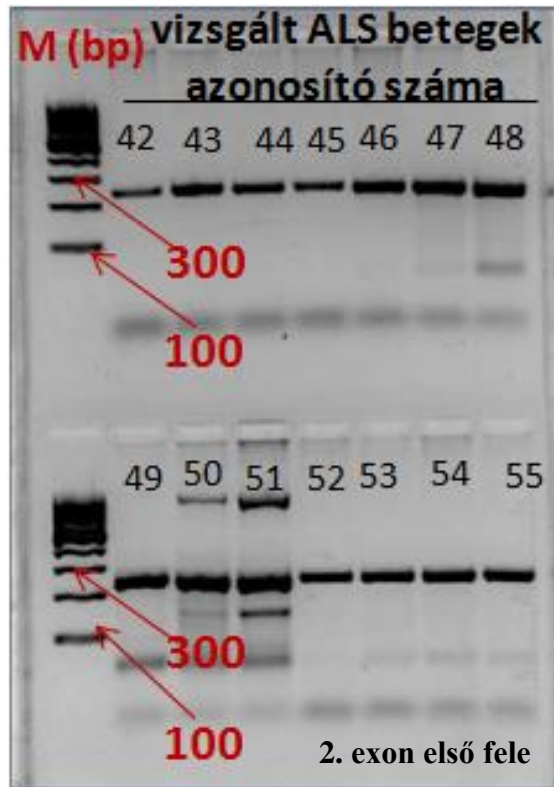
5. EREDMÉNYEK

A betegség hátterében álló genetikai eltérés vizsgálata során a gén kódoló régióinak, valamint az exonok és a szomszédos intronális szakaszok felamplifikálását végeztük el PCR reakció segítségével. Az alkalmazott primerek listáját az 4. táblázat mutatja be.

Primer név	Bázissorrend (5'-3')
C9-X2a-F	ATC TCC GGA GCA TTT GGA TA
C9-X2a-R	GAG TGT GGT TGG CAA GAA AAG
C9-X2b-F	GGC TCC AAA GAC AGA ACA GG
C9-X2b-R	ACA TTT ATT GTT TGA TGT TCA CTG C
C9-X3-F	TTA ATT TCC TAC CCC TGC CC
C9-X3-R	GCC TTG ACA AAT GTA GCC ATC
C9-X4-F	GCC CAG CTT CTC TCA TAT TAC G
C9-X4-R	ATC CAG GAT TTT GTG TGT GCT
C9-X5-F	TTC TCG GAA ATG AAG GCA GT
C9-X5-R	GGT ATC TGC TTC ATC CAG CTT
C9-X6-F	ACT AAT TGG GCT GTT TTA AGG C
C9-X6-R	CAC TGT TGC CAC AAG GTG TC
C9-X7-F	TCT TTC ATA AGC AAA TCA GTG GTC
C9-X7-R	TCT CTG GGC ATG TCA ATA TGA G
C9-X8-F	TCG TTT GGC ATG TAA GAC AGT AA
C9-X8-R	ACC AGC AGG CAG AGC ATT AC
C9-X9-F	TCA AGT GAG GGA TTG TGG AAG
C9-X9-R	TGC TGA GCA GAA CTC TGG G
C9-X10-F	CTG CCA AGC ACT GTC AAC AC
C9-X10-R	TGT TAA GAT CGC CCT CTG CT
C9-X11-F	TCC TTC ACA GAA AAG CCT TGA
C9-X11-R	TCC CCA CAC CAC TGA GCT AC

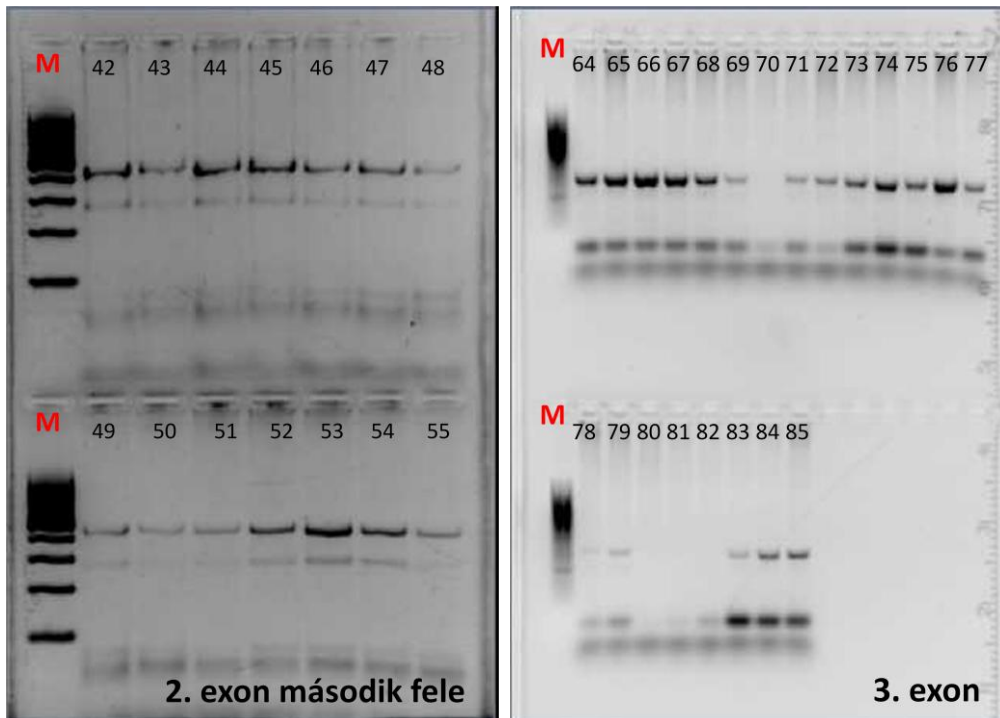
4. táblázat A *C9ORF72* gén amplifikálásához használt primerek listája

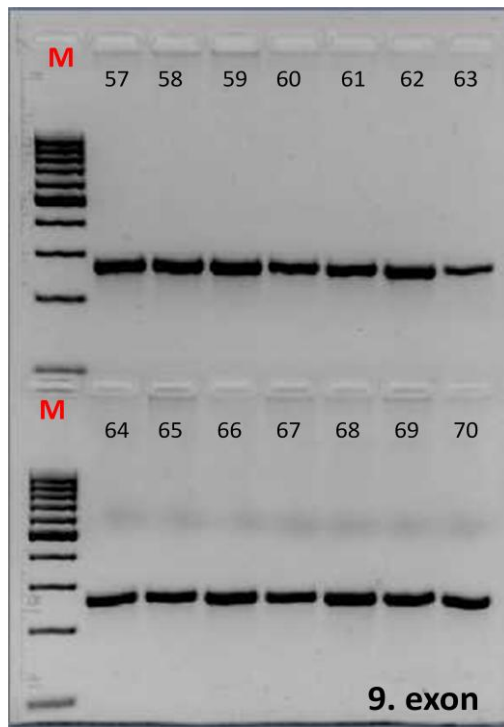
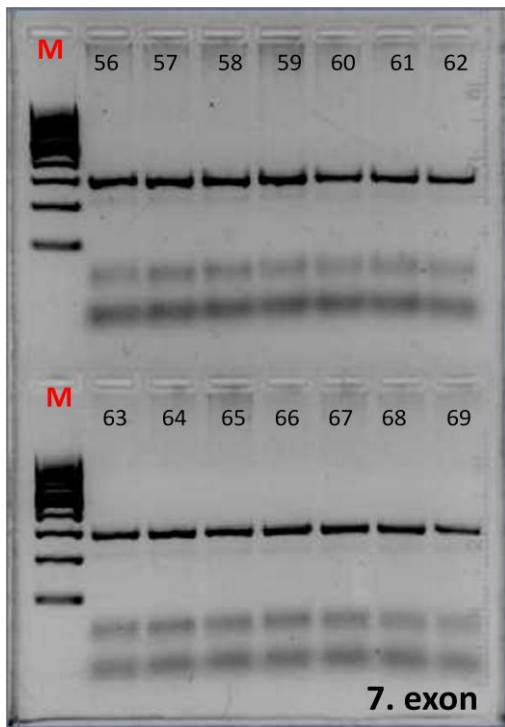
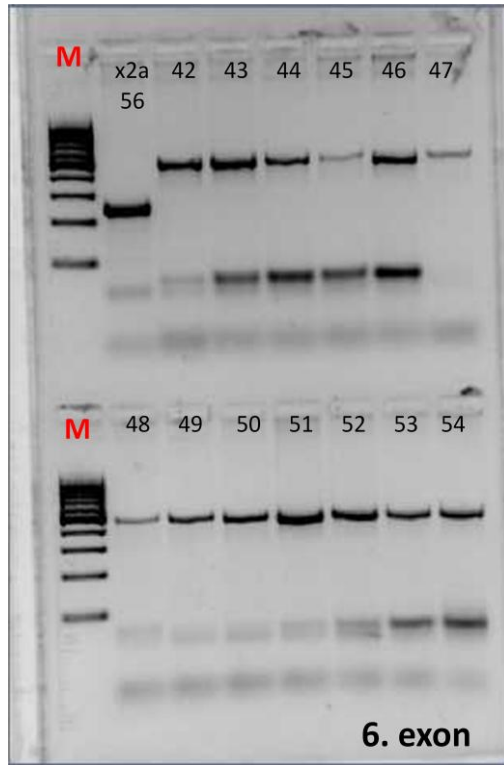
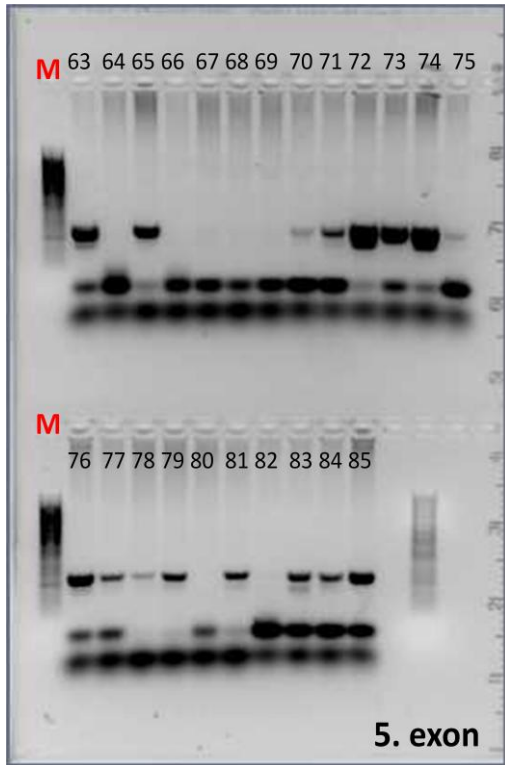
A PCR reakció eredményét agaróz gélen történő gélelektroforézissel ellenőriztük (9 és 10. ábra), majd a mintákat megszekvenáltattuk.

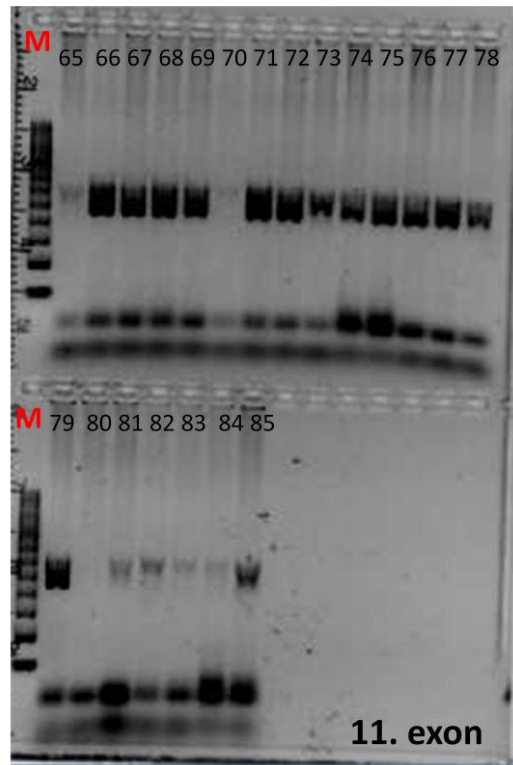


9.ábra A 2-es exon első felének gélelektroforézis képe

Az ábrán a 2-es exon első felének PCR reakcióval felamplifikált termékei látszanak. Az első oszlop felett látható M a nagy molekulású markert jelöli (1000 bázispár – 100 bázispár). A többi oszlopban az egyes betegek mintái láthatók, amelyeket a betegek vizsgálat során használt azonosító száma jelez.

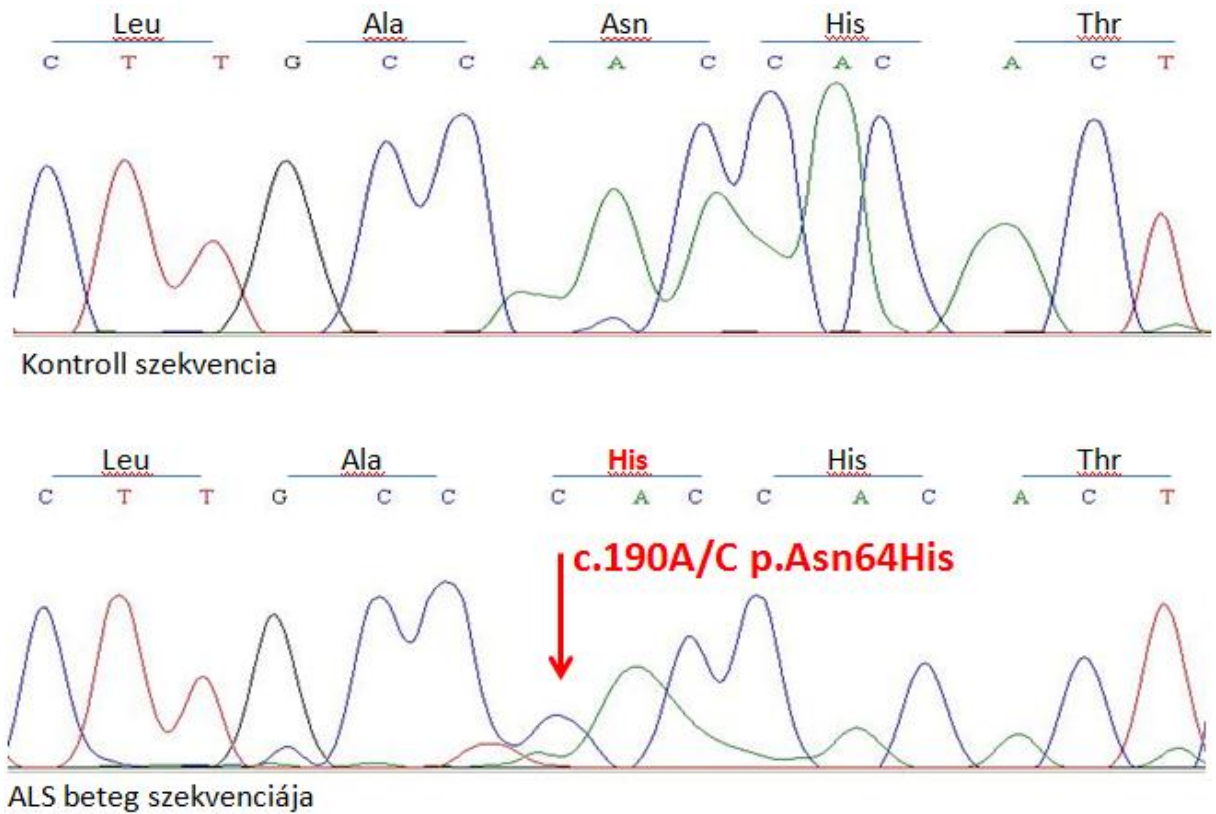






10. ábra A *C9ORF72* gén vizsgált exonjainak felamplifikálás után gélelektroforézissel ellenőrzött agaróz gélképei

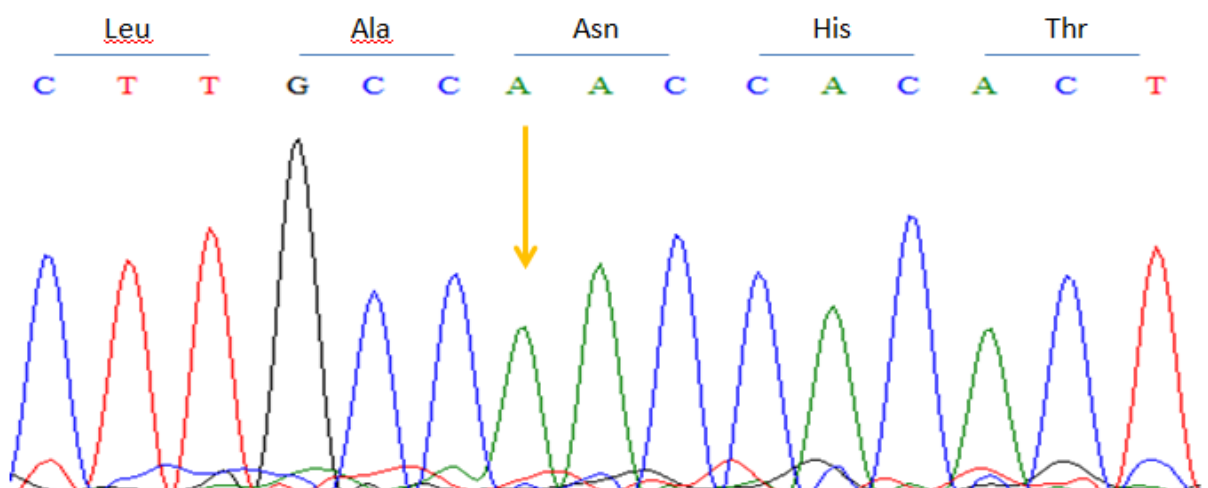
Az eddig vizsgált exonok közül a 2. exon középső részén találtunk eltérést több beteg esetén is. (11. ábra) A felső szekvenciakép mutatja a vad típust, tehát kontroll, egészséges DNS-t, míg az alsó szekvenciaképen jelöltük a talált eltérést. Az eltérés a 190. bázispárban található, egy adenin-citozin csere. Ez a mutáció a kódolt aminosavakban is eltérést okoz, általa az eredeti aszparagin hisztidinné változik a fehérjében. Az általunk talált mutáció ezek alapján misszensz mutáció, amely valószínűleg funkcionális eltérést is okoz a fehérjében.



11. ábra Az általunk talált adenin-citozin csere a 2. exon középső részén

A 11. ábra rövidítései: *A*: adenin; *C*: citozin; *T*: timin; *G*: guanin; *Leu*: leucin; *Ala*: alanin; *Asn*: aszparagin; *His*: hisztidin; *Thr*: threonin

Az általunk talált ígéretesnek tűnő bázispárcsere azonban sajnos a visszaválidálás során szekvenálási műtermékek bizonyult. (12. ábra)



12. ábra A validálás során készült szekvenciakép

A 12. ábra rövidítései: *A*: adenin; *C*: citozin; *T*: timin; *G*: guanin; *Leu*: leucin; *Ala*: alanin; *Asn*: aszparagin; *His*: hisztidin; *Thr*: threonin

6. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A neurogenetikai betegségek a gyakori neurológiai kórképekhez képest kevésbé ismertek, a betegségek háttérben álló eltérések kutatására fordított figyelem is kevesebb. Ezen betegségek a gyakori betegségekhez hasonlóan okozhatnak enyhe, súlyos vagy igen súlyos klinikai képpel járó eltérést is, a tünetek kifejezetten ronthatják az életminőséget, stigmatizációt és szocializációs nehézségeket okozva. A neurogenetikai betegségek esetében egy meghatározott genetikai eltérés, egy gén defektusa és ennek következtében egy fehérje hibája döntő hatású. Ezen kórképekben szenvedő betegek genetikai vizsgálata során elsődleges a kóroki mutáció azonosítása, mely később lehetőséget nyújt prenatális diagnosztika végzésére és ezáltal nagy hatással lehet a családtervezésre, illetve hozzájárulhat új, oki terápiás eljárások kifejlesztéséhez is, mely nagy mértékben javíthatja majd a neurogenetikai kórképekben szenvedő betegek életminőségét.

Munkám során a magyar ALS-ben szenvedő betegek genetikai háttérének vizsgálatát tűztem ki célul. Habár az ALS genetikai háttére meglehetősen összetett és számos az ALS kialakulásáért felelős gén illetve genetikai variánst térképeztek fel, a klinikai jellegzetességek és a neurológiai szakvélemény figyelembe vételével munkám során a *C9ORF72* gén vizsgálatát végeztem el.

A *C9ORF72* gén eltéréseit irodalmi adatok az amiotrófiás laterális szklerózis egy sajátos altípusával, a frontotemporális demenciával járó amiotrófiás laterális szklerózissal hozták összefüggésbe. Ez a kórkép a mozgásszervi nehézségeken túl személyiség és magatartásváltozással is jár. Ez tovább súlyosbítja a betegség kapcsán fellépő szocializációs problémákat, jelentős terhet róva a beteg családjára.

Vizsgálataimba 71 ALS-ben szenvedő beteg került bevonásra, akiknél a *C9ORF72* gén kódoló szakszainak és az azokkal határos intronoknak a mutáció szűrését végeztem el direkt szekvenálással. Vizsgálataim során kezdetben egy több betegben is előforduló új misszensz variánsnak imponáló eltérést azonosítottam, mely a *C9ORF72* gén 2. exonjában helyezkedett el (c.190A/C p.Asn64His). Ez a misszensz variáns nem volt ismert, mint gyakori variáns, SNP. Azonban eredményeim validálásakor, melyet ellentétes irányból történő szekvenálással végeztem, a mutáció jelenlétét nem sikerült igazolni.

A betegség összetett genetikai háttere miatt vizsgálataink még nem tekinthetők lezártak. További terveink közé tartozik a *C9ORF72* gén minden exonjának vizsgálata. Emellett célunk még a vizsgálatba bevont betegekben szintén ezen a génen az említett intronikus GGGGCC expansió vizsgálata is. Az intronikus expansió vizsgálata mellett távlati terveink között szerepel a további az ALS kialakulása szempontjából fontos szerepet betöltő gének, mint a *FUS* és a *SETX* gének vizsgálata.

Mindezen vizsgálatokkal hosszú távú célunk egy ALS mutációs szűrőpanel kialakítása, amelyek prenatalis diagnosztikai vizsgálatok végzéséhez elengedhetetlenek. A széles körű diagnosztikus eszköztár ellenére sincs olyan vizsgálat, amely lehetővé tenné a betegség objektív diagnózisát. Rutinszerűen még nem terjedt el a genetikai vizsgálatok alkalmazása, amely nagy mértékben segíthetné a betegség felismerését, akár már a manifesztálódást megelőzően. A genetikai háttér jobb megismerése által pedig nem csupán a diagnózis, de a genotípus-fenotípus asszociációk révén a prognosztikai tényezők megállapítása és esetleg oki terápiais eljárások fejlesztésének megalapozása is lehetségessé válik. Az felderített oki genetikai eltérések összesített adatainak felhasználásával lehetséges volna egy olyan mutációs szűrőpanel kialakítása, amely lehetővé tenné a prenatalis diagnosztikai vizsgálatok végzését.

Vizsgálataim során a ritka neurogenetikai kórkép, az ALS tanulmányozására fókuszáltam. Vizsgálataim jelentősége a páciensek és kezelőorvosaiak számára, hogy a vizsgált betegek esetében azonosítottam a betegség kialakulásáért felelős kóroki mutációt, ami lehetőséget nyújt prenatalis diagnosztika végzésére és ezáltal befolyásolhatja a családtervezést ezekben az igen stigmatizáló, életminőséget rontó kórképben. Vizsgálataim ugyanakkor a kóroki eltérés azonosításával alapjául szolgálhatnak további új kezelési stratégiákat, génszűrés, génterápiás eljárásokat kidolgozó kutatásoknak. A génszűrés, génterápia szempontjából a neurogenetikai betegségek különösen jó modellbetegségek lehetnek, mivel a korrekciót követően helyreálló fenotípus könnyen vizsgálható, követhető. A későbbiekben a genetikai analízist tervezzük funkcionális vizsgálatokkal is kiegészíteni.

Vizsgálataim összhangban vannak az Európai Unióban folyó, jelenlegi orvosbiológiai kutatások tendenciáival, mivel a ritka betegségek mechanizmusának megismerése elősegítheti a gyakori betegségek további megértését is. Pontosan ez a helyzet az ALS esetében is, hiszen a betegség alapjául szolgáló *C9ORF72* mutációk vizsgálata további betekintést eredményezhet a gyakori mozgásszervi rendellenességek, és más neurodegeneratív kórképek folyamataiba is.

7. IRODALOMJEGYZÉK

1. Almeida V, de Carvalho M, Scotto M, Pinto S, Pinto A, Ohana B, et al.: Primary lateral sclerosis: predicting functional outcome. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2013; 14(2):141-5.
2. Armon C: Epidemiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis/Motor Neuron Disease. *Motor Neuron Disorders. Butterworth Heinemann* 2003; 28:195-197.
3. Chen S, Sayana P, Zhang X, Le W.: Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Mol Neurodegener.* 2013; 8(1):28.
4. Cronin S, Hardiman O, Traynor BJ.: Ethnic variation in the incidence of ALS: a systematic review. *Neurology.* 2007; 68(13):1002-7.
5. Debray S, Race V, Crabbé V, Herdewyn S, Matthijs G, Goris A, Dubois B, Thijs V, Robberecht W, Van Damme P: Frequency of C9orf72 repeat expansions in amyotrophic lateral sclerosis: a Belgian cohort study. *Neurobiol Aging.* 2013; 34(12):2890.e7-2890.e12.
6. DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., Nicholson, A. M., Finch, N. A., Flynn, H., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., and 16 others: Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron.* 2011; 72: 245-256.
7. Emi Mizuno-Yamasaki, Felix Rivera-Molina, and Peter Novick: GTPase Networks in Membrane Traffic. *Annu Rev Biochem.* 2012; 81:637-659.
8. Hosler, B. A., Siddique, T., Sapp, P. C., Sailor, W., Huang, M. C., Hossain, A., Daube, J. R., Nance, M., Fan, C., Kaplan, J., Hung, W.-Y., McKenna-Yasek, D., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Horvitz, H. R., Brown, R. H., Jr.: Linkage of familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia to chromosome 9q21-q22. *JAMA.* 2000; 284:1664-1669.
9. <http://www.georgetownhospitalsystem.org/stw/Page.asp?PageID=STW038148>
10. John D. Cleary and Laura P.W. Ranum: Repeat-associated non-ATG (RAN) translation in neurological disease. *Hum. Mol. Genet.* 2013; doi: 10.1093/hmg/ddt371
11. Lesage S, Le Ber I, Condroyer C, Broussolle E, Gabelle A, Thobois S, Pasquier F, Mondon K, Dion PA, Rochefort D, Rouleau GA, Dürr A, Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group: C9orf72 repeat expansions are a rare genetic cause of parkinsonism. *Brain.* 2013; 136(Pt 2):385-91.
12. Levine TP, Daniels RD, Gatta AT, Wong LH, Hayes MJ.: The product of C9orf72, a gene strongly implicated in neurodegeneration, is structurally related to DENN Rab-GEFs. *Bioinformatics.* 2013; 29(4):499-503.

13. Levine TP, Daniels RD, Wong LH, Gatta AT, Gerondopoulos A, Barr FA.: Discovery of new Longin and Roadblock domains that form platforms for small GTPases in Ragulator and TRAPP-II. *Small GTPases*. 2013; 4(2):62-9.
14. Liu Y, Yu JT, Zong Y, Zhou J, Tan L.: C9ORF72 Mutations in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2013 Aug 10. [Epub ahead of print]
15. Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chiò A, Mitchell D, Swingler RJ, Millul A, Benn E, Beghi E; EURALS: Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010; 81(4):385-90.
16. Mori K, Weng SM, Arzberger T, May S, Rentzsch K, Kremmer E, Schmid B, Kretschmar HA, Cruts M, Van Broeckhoven C, Haass C, Edbauer D: The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTLN/ALS. *Science*. 2013; 339(6125):1335-8.
17. Nelson LM: Epidemiology of ALS. *Clin Neurosci*. 1995-1996; 3(6):327-31.
18. Pinsky, L., Finlayson, M. H., Libman, I., Scott, B. H.: Familial amyotrophic lateral sclerosis with demencia: a second Canadian family. *Clin. Genet*. 1975; 7:186-191.
19. Redler RL, Dokholyan NV: The complex molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2012; 107:215-62.
20. Renton, A. E., Majounie, E., Waite, A., Simon-Sanchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J. R., Schymick, J. C., Laaksovirta, H., van Swieten, J. C., Myllykangas, L., Kalimo, H., Paetau, A., and 65 others: A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*. 2011; 72 257-268.
21. Siddique N, Siddique T: Genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2008; 19(3):429-39.
22. Silani V, Messina S, Poletti B, Morelli C, Doretto A, Ticozzi N, Maderna L: The diagnosis of Amyotrophic lateral sclerosis in 2010. *Arch Ital Biol*. 2011; 149(1):5-27.
23. Ticozzi N, Tiloca C, Morelli C, Colombrita C, Poletti B, Doretto A, Maderna L, Messina S, Ratti A, Silani V: Genetics of familial Amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Ital Biol*. 2011; 149(1):65-82.
24. Van Langenhove T, van der Zee J, Van Broeckhoven C: The molecular basis of the frontotemporal lobar degeneration-amyotrophic lateral sclerosis spectrum. *Ann Med*. 2012; 44(8):817-28.
25. Wijesekera LC, Leigh PN.: Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis*. 2009; 4:3.
26. Wijesekera LC, Mathers S, Talman P, Galtrey C, Parkinson MH, Ganesalingam J, et al.: Natural history and clinical features of the flail arm and flail leg ALS variants. *Neurology*. 2009; 72(12):1087-94.

27. Wu X, Bradley MJ, Cai Y, Kümmel D, De La Cruz EM, Barr FA, Reinisch KM: Insights regarding guanine nucleotide exchange from the structure of a DENN-domain protein complexed with its Rab GTPase substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(46):18672-7.

8. ÁBRAJEGYZÉK

1. ábra Az amiotrófiás laterális szklerózis incidenciája kor és nem szerint Európában	6
2. ábra Az amiotrófiás laterális szklerózist jellemző motoneuron degeneráció és izomatrophia	7
3. ábra A <i>chromosome open reading frame 72 (C9ORF72)</i> gén sematikus ábrája	11
4. ábra A DNS expansziók potenciális citotoxikus hatásai	12
5. ábra A RAN transláció	13
6. ábra A C9ORF72gén strukturális homológia alapján a DENN-like szupercsalád tagja	14
7. ábra A GEF szerepe a membrántranszport-folyamatokban	15
8. ábra A vizsgálatba bevont betegek nem és korcsoport szerinti eloszlása	18
9. ábra A 2-es exon első felének gélelektroforézis képe	23
10. ábra A C9ORF72 gén vizsgált exonjainak felamplifikálás után gélelektroforézissel ellenőrzött agaróz gélképei	23
11. ábra Az általunk talált adenin-citozin csere a 2. exon középső részén	26
12. ábra A validálás során készült szekvenciakép	26

TÁBLÁZATOK

1.táblázat Az amiotrófiás laterális szklerózis háttérében álló mutációk	9
2. táblázat A sporadikus amiotrófiás laterális szklerózissal összefüggésbe hozott gének	10
3.táblázat A vizsgálatba bevont 71 ismert ALS beteg adatai	17
4. táblázat A C9ORF72 gén amplifikálásához használt primerek listája	22

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Nagy Nikolettának, az SZTE ÁOK Orvosi Genetikai Intézet egyetemi adjunktusának és Dr Széll Mártának, az SZTE ÁOK Orvosi Genetikai Intézet tanszékvezető egyetemi tanárának a megértő, segítőkész szakmai támogatásért és útmutatásért.

Köszönettel tartozom Dr. Klivényi Péternek, az SZTE ÁOK Neurológiai Klinika egyetemi docensének, a vizsgálatban részt vevő betegek gondozásáért és vizsgálatba való bevonásáért.

Külön szeretném megköszönni Dr. habil. Széll Mártának, az SZTE ÁOK Orvosi Genetikai Intézet tanszékvezető egyetemi tanárának, hogy lehetőséget biztosított kísérleteim elvégzéséhez.

PÁLYÁZATI TÁMOGATÁS

A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

PÁLYAMUNKA ALAPJA

Rendezvény címe: Szegedi Tudományos Diákköri Konferencia

Rendezvény helye, ideje: Szeged, 2013.

Előadás címe: Az amyotrophiás lateralis sclerosis genetikai hátterének vizsgálata

Előadás szerzője: Török Dóra VI.

Előadás értékelése: II. helyezés

Rendezvény címe: Országos Tudományos Diákköri Konferencia

Rendezvény helye, ideje: Szeged, 2013.

Előadás címe: Az amyotrophiás lateralis sclerosis genetikai hátterének vizsgálata

Előadás szerzője: Török Dóra VI.

NYILATKOZAT

Saját munkám: DNS izolálás
 PCR reakciók összeállítása
 2% agaróz gél öntése
 gélfuttatás
 PCR termékek szekvenanciaanalízishez előkészítése
 a szekvenciaképek analízise
 szakirodalom követése, feldolgozása
 a pályamunka összeállítása

Alulírott Török Dóra, a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának hallgatója ezennel büntetőjogi felelősségem tudatában kijelentem és aláírással igazolom, hogy Az amiotrófiás laterális szklerózis genetikai hátterének vizsgálata című pályamunkám **saját, önálló munkám**; az abban hivatkozott nyomtatott és elektronikus szakirodalom felhasználása a szerzői jogok nemzetközi szabályainak megfelelően készült.

Tudomásul veszem, hogy plágiumnak számít:

- szó szerinti idézet közlése idézőjel és hivatkozás megjelölése nélkül;
- tartalmi idézet hivatkozás megjelölése nélkül;
- más publikált gondolatainak saját gondolatként való feltüntetése.

Alulírott kijelentem, hogy a plágium fogalmát megismertem, és tudomásul veszem, hogy plágium esetén pályamunkám visszautasításra kerül.

Szeged,év hó nap

.....

aláírás

TÉMAVEZETŐ: Dr. Nagy Nikoletta PhD Dr.Széll Márta PhD, DSc.

LEVELEZÉSI CÍM: tordori@gmail.com