

Az *USH2A* génmutációk genotípus-fenotípus összefüggései genotipizált eseteink bemutatásával

VÉGH ANDRÁS DR.¹, LESCH BALÁZS DR.¹, VÁMOS RITA DR.¹,
TAKÁCS PÉTER ISTVÁN DR.¹, GYÖRGY BENCE DR.², NAGY ZOLTÁN ZSOLT DR.¹,
RIVOLTA CARLO DR.², SZABÓ VIKTÓRIA DR.¹

¹Semmelweis Egyetem, Szemészeti Klinika, Budapest
(Igazgató: Prof. Dr. Nagy Zoltán Zsolt egyetemi tanár)

²Molekuláris és Klinikai Szemészeti Intézet, Bázél, Svájc
(Igazgató: Prof. Dr. Roska Botond egyetemi tanár)

Bevezetés: Az Usher-kór autoszomális recesszív módon öröklődő betegség, amely szemészeti szempontból szindrómás retinitis pigmentosa képében manifesztálódik. Az Usher-szindrómának három fő típusa ismert. A látásromlás mellett a halláscsökkenés a jellemző tünet, amely az I. típusban, csecsemőkorban, a II. típusban kisiskoláskor körül jelenik meg. A III. típusában a hallás- és látásromlás mellett egyensúlyprobléma fordul elő.

A II. típusban a látótér jelentős beszűkülése általában a húszas években alakul ki, amelyet a színlátás és a centrális látás megromlása követ. A betegség kialakulásának hátterében az *ADGRV1*, *USH2A*, és a *WHRN* gének biállélikus mutációi ismertek. Célunk a hallásromlással és retinitis pigmentosára jellemző tünetekkel jelentkező betegek részletes szemészeti funkcionális és eszközös vizsgálata, valamint genotipizálása volt.

Anyag és módszer: A Semmelweis Egyetem Szemészeti Klinikáján működő szemészeti genetikai szakrendelésen jelentkező betegek közül 2 férfit és 2 nőbeteget vizsgáltunk standard szemészeti vizsgálmódszerekkel és multimodális képalkotókkal. A jellemző klinikai képet mutató páciensek genotipizálása új generációs szekvenálással (NGS, Illumina NextSeq készülék, Usher Targeted Gene Panel), a variánsok validálása Sanger-szekvenálással történt.

Eredmények: A vizsgálatban 4 *Usher-szindróma* II-es típusában szenvedő beteget sikerült identifikálni, minden esetben az *USH2A* gén biállélikus mutációi igazolódtak.

Következtetés: A részletes klinikai, képalkotó és elektrofiziológiai vizsgálatokkal, illetve a genotipizálás elvégzésével mind a fenotípus, mind a genotípus dokumentálása megtörtént. Megfigyeltük, hogy a súlyos fenotípus hátterében a DNS-szekvencia hosszának megváltozásával járó mutációk állnak.

Genotype-phenotype correlations in *USH2A* gene mutation-related RP presented with our genotyped cases

Introduction: Usher syndrome is an autosomal recessive hereditary disease that ophthalmologically manifests itself in symptomatic retinitis pigmentosa. Usher syndrome has three major types. Along with sight loss, hearing loss is a typical symptom that appears during infancy in type I of the disease and during school age in type II. In type III, besides sight and hearing loss, balance disorder is also characteristic.

In type II, the significant narrowing of the visual field develops in the third decade, followed by the damage of colour vision and central sight. In the background of its pathogenesis, biallelic mutations of *ADGRV1*, *USH2A* and *WHRN* genes have been reported. Our aim is to precisely assess patients with hearing loss and retinitis pigmentosa, as well as to perform their genotyping.

Materials and methods: 2 male and 2 female patients were examined at the Department of Ophthalmology of Semmelweis University with standard methods and multimodal imaging. Genotyping of patients with characteristic symptoms was performed with new generation sequencing (NGS, Illumina NextSeq, Usher Targeted Panel). The validation of the variants was done with Sanger sequencing.

Results: We identified four patients with type II Usher syndrome who all had the biallelic mutation of *USH2A* gene.

Conclusion: With detailed clinical, imaging and electrophysiological examinations as well as with genotyping, we documented both the phenotype and the genotype of our patients. We have observed that the severe phenotype is caused by mutations involving changes in DNA sequence length.

KULCSSZAVAK

Usher; genotípus, fenotípus, OCT, FAF

KEYWORDS

Usher; genotype, phenotype, OCT, FAF

Kézirat beérkezése: 2022. 09. 12. Közlésre elfogadva: 2022. 09. 15.

Bevezetés

Az Usher-kór autoszomális receszív módon öröklődő betegség, amely szemészeti szempontból szindrómás retinitis pigmentosa képében manifesztálódik. Az *Usher-szindrómának* három fő típusa ismert. A látásromlás mellett a halláscsökkenés a jellemző tünet, amely az I. típusban, csecsemőkorban, a II. típusban, iskoláskorban jelenik meg. A III. típusában a hallás- és látásromlás mellett egyensúlyprobléma fordul elő (1–4).

A betegség első típusában több gén (*MYO7A*, *USH1C*, *USH1G*, *CDH23*, *PCDH15*, *CIB2*) mutációja is érintett, amelyek fehérjetermékei többek között sejtadhéziós, „scaffold”, valamint ionkötő szerepet látnak el. A betegek veleszületett halláskárosodása súlyos vagy teljes. A szimp-tómás retinitis pigmentosa tünetei pubertáskorban kezdődnek, a diagnózisra jellemzően ebben az életkorban kerül sor, a csökkent látás („legal blindness”) pedig általában a negyedik évtizedben alakul ki. A betegséget emellett vesztibuláris hipofunkció és megkésett motoros fejlődés is jellemzi (1–4).

A szindróma második típusában az *USH2A*, *WHRN* és az *ADGRV1* gének mutációi ismertek, ezen gének sejtadhéziós és „scaffold” proteinek mellett G-fehérje kapcsolt receptort kódolnak. A veleszületett halláskárosodás közepes mértékű vagy súlyos, és jellemzően a magas frekvenciákat érinti normális vesztibuláris funkció mellett. A szemészeti tünetek tizenévesen kezdődnek, a retinitis pigmentosa diagnózisát általában a húszas évek során állítjuk fel; a jogi értelemben vett vakság pedig rendszerint a hatodik évtizedben fordul elő (1–4).

A hármas típus jelentősen ritkább, az eltéréseket a jelenleg ismeretlen funkciójú *CLRN1* gén mutációja okozza, az általa kódolt clarin 1-fehérje egy transzmembrán-protein. A halláscsökkenés a beszédtanulás után alakul ki; a hallást, a látást és

a vesztibuláris rendszert érintő tünetek súlyossága igen nagy változatosságot mutat. A hallásvesztés progresszív jellegű; a vesztibuláris diszfunkció általában enyhe és az esetek 50%-ában fordul elő. A látáspanasz általában nyctalopiával (szürkületi látászavar) kezdődik, jellemző a csőlátótér kialakulása és a második évtizedben jelentkező centrális látásromlás (1–4).

Betegek és módszerek

A vizsgált betegek a Semmelweis Egyetem Szemészeti Klinikáján működő szemészeti genetikai szakrendelésen jelentkező betegek közül 2 férfi és 2 nőbeteg voltak.

Vizsgálati módszereink alapját standard szemészeti vizsgálatok (refrakció, visus, biomikroszkópos vizsgálat fundustükrözéssel, fundusfotó – Topcon® funduskamera) adták. Emellett multimodális képalkotást (IR fundusfotó, OCT, FAF – Spectralis Heidelberg®) is alkalmaztunk. Elektrofiziológiai vizsgálataink a „full-field” és a multifokális ERG-t foglalták magukban. A genotípust ismertető genetikai vizsgálatot a Molekuláris es Klinikai Szemészeti Intézet (Basel) laboratóriumában végezték új generációs szekvenálással (NGS, Illumina NextSeq® készülék, Usher Targeted Panel), a validálás Sanger-szekvenálással történt.

Eredmények

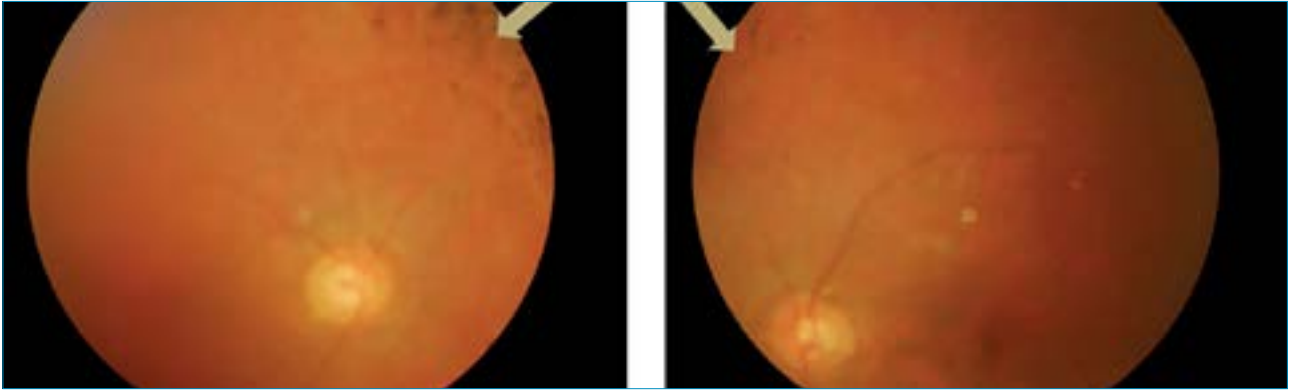
A vizsgálatban 4 *Usher-szindróma* II-es típusában szenvedő beteget sikerült azonosítani, minden esetben az *USH2A* gén biállélikus mutációi igazolódtak.

Első vizsgált betegünk egy 44 éves férfi, aki szindrómás retinitis pigmentosával érkezett. Hallókészüléket ötéves kora óta visel; első szemészeti tünete a 14 éves korában felismert farkasvaktság volt. Az *Usher-szindróma* diagnózisára 26 éves korában került sor. Szemészeti

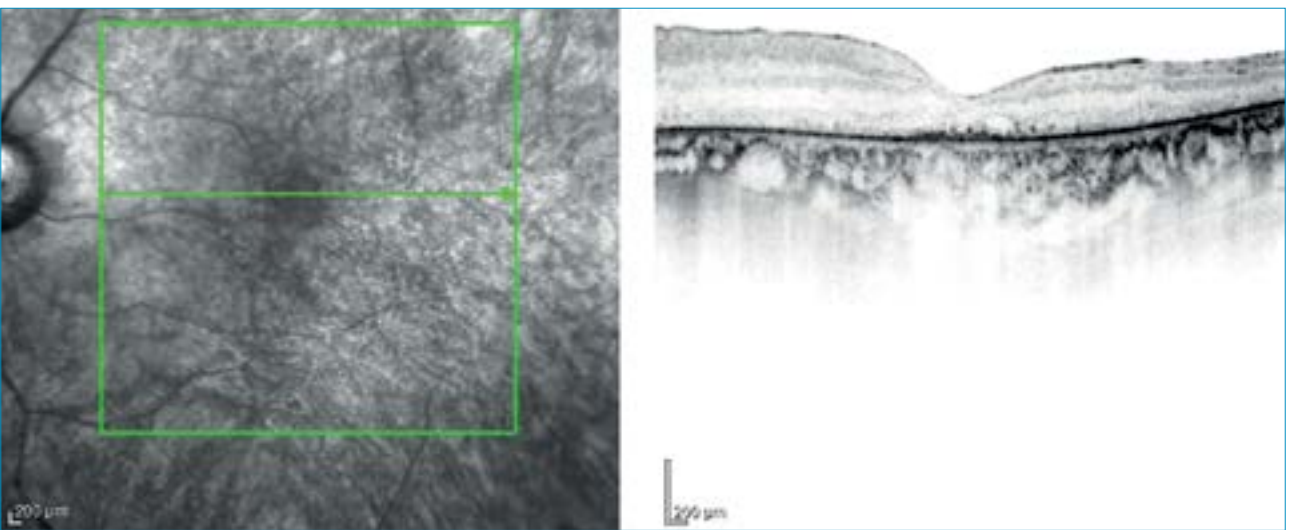
anamnézisében mindkét oldali pseudophakia szerepel, a kataraktaműtétekre 12 év különbséggel került sor. Általános anamnézisében kezelt hipertónia szerepel. Legjobb korrigált visusa vizsgálatkor jobb oldalon fé, bal oldalon kml. Vizsgálata során fotoaverzió jellemezte. Tíz évvel ezelőtti látótérvizsgálata 10°-ra beszűkült látótérrel, csőlátást ábrázolt. „Full-field” ERG-vizsgálatán a scotopikus és a fotopikus válasz megszűnt; multifokális ERG-n súlyosan csökkent amplitúdók voltak megfigyelhetők a centrális gyűrűkben. Fundusán réslámpás vizsgálattal porcelánfehér papilla, szűkebb erek, makulatájon céltábla rajzolatú („bull’s eye-like”) megjelenés, a periférián csontsejtszerű és paravasalis pigmentáció volt látható. Emellett fundusfotó és OCT-vizsgálat is készült (1–2. ábrák). Genetikai eredménye heterozigóta keretelölődést okozó duplikációt és intronikus mutációt mutatott az *USH2A* génben (1. táblázat).

Második betegünk egy 64 éves görög származású nő, szindrómás retinitis pigmentosával. Családi anamnézise pozitív, anyai ágon mind nők, mind férfiak érintettek voltak a betegség tüneteiben. Hallókészüléket gyermekora óta visel, az *Usher-szindróma* diagnózisát 39 éves korában kapta meg. Anamnézisében a 90-es években végzett mindkét oldali radiális keratotomia szerepel, valamint 6 évvel ezelőtt mindkét oldali szürkehályog-műtét történt 1 év különbséggel. Általános anamnézisében osteoporosis szerepel. Vizsgálata során fotoaverzió jellemezte. Refrakciója: –4,0 Dsph/–4,5 Dsph; BCVA: 0,1/0,1. Egy évvel ezelőtti látótérvizsgálata csőlátást, 5°-ra beszűkült látótérrel ábrázolt. „Full-field” ERG-vizsgálatán a scotopikus és a fotopikus válasz megszűnt; multifokális ERG-n súlyosan csökkent amplitúdók a centrális gyűrűkben. Fundusán réslámpás vizsgálattal halvány papilla, szűkebb erek, atrófiás makulatáj, periférián csontsejtszerű és para-

Rövidítések: BCVA: legjobb korrigált visus („best corrected visual acuity”), Dsph: szférikus dioptria, ERG: elektroretinográfia, FAF: fundus autofluoreszcencia, fé: fényérzés, IR: infravörös („infrared”), kml: kézmozgás látás, RNS: ribonukleinsav, NGS: új generációs szekvenálás („new generation sequencing”), OCT: optikai koherencia tomográfia



1. ábra: Színes fundusfotó halvány papillával, gracilis érrajzokkal. A nyílak a periférián látható csontsejt-alakú pigmentkicsapódást jelölik



2. ábra: Bal oldali makula OCT. Látható a megtartott foveolaris behúzotttság, de a neuroretina szerkezete kifejezett destrukciót mutat az ellipszoid és az RPE-rétegekben, amely magyarázza a beteg csőlátását

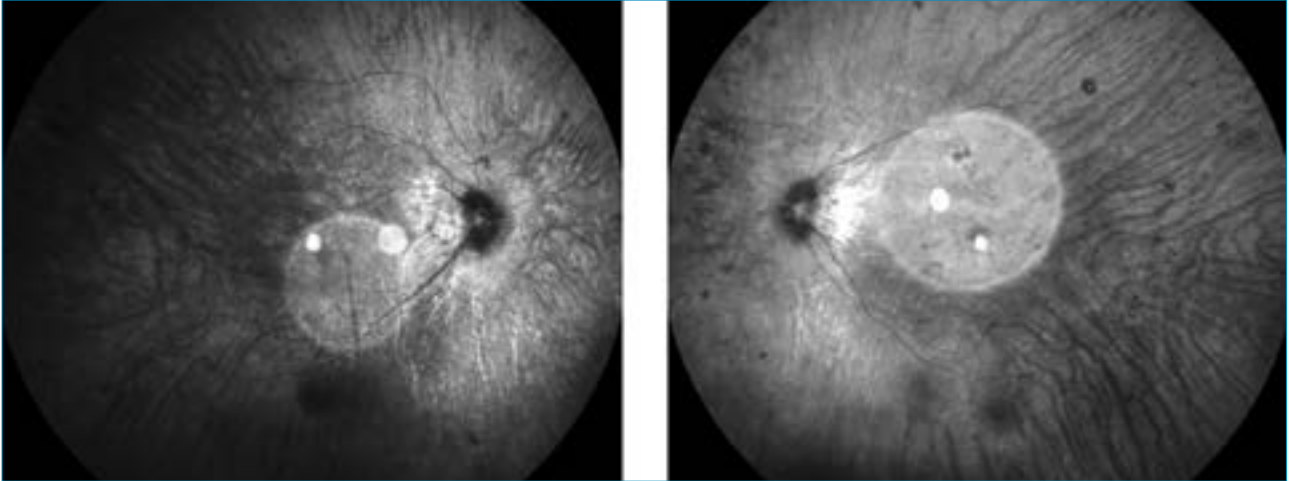
vasalis pigmentáció, nagy atrófiás foltok voltak láthatók. Emellett fundusfotó, FAF- és OCT-vizsgálat is készült (3–4. ábrák). Genetikai eredménye heterozigóta korai terminációt okozó „stop mutációt” és deléciót mutációt mutatott az *USH2A* génben (1. táblázat).

Harmadik betegünk egy 48 éves férfi volt, szintén szindrómás retinitis pigmentosával. Hallókészüléket 3 éves kora óta visel, első szemészeti tünete 18 éves korában jelentkezett farkasvaktság formájában. Az *Usher-szindrómát* 26 éves korában diagnosztizálták, mindkét szemén szürkehályog-műtétet végeztek műlencse-beültetéssel öt évvel ezelőtt. Általános anamnézise eseménytelen, alapbetegsége nincs. Mindkét szeme kismértékben my-

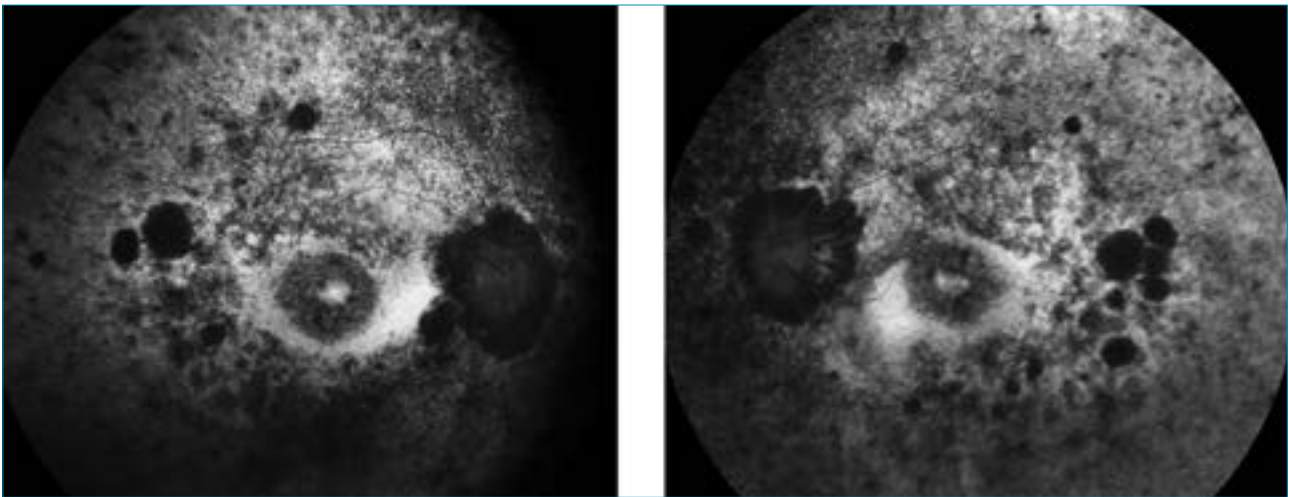
op, bal oldalt astigmiaival ($-3,0$ Dsph/ $-2,5$ Dsph, $-1,0$ Dcyl 20°), két évvel ezelőtt legjobb korrigált visusa mindkét oldalon kml volt. Már húsz évvel ezelőtti látótérvizsgálatán is 5° -os csőlátás ábrázolódott. „Full-field” ERG-vizsgálatán a scotopikus és a fotopikus válasz megszűnt; multifokális ERG-n súlyosan csökkent amplitúdók a centrális gyűrűkben. Fundusán réslámpás vizsgálattal halvány papilla, szűkebb erek, atrófiás makulatáj, a periférián csontsejtszerű és paravasalis pigmentáció, illetve nummularis pigmentkicsapódás látható. Fundusfotó, FAF- és OCT-vizsgálat is készült (5–6. ábrák). Genetikai vizsgálatának eredménye heterozigóta kereteltolódást okozó duplikációt és egy aminosavcserét ered-

ményező pontmutációt mutatott az *USH2A* génben (1. táblázat).

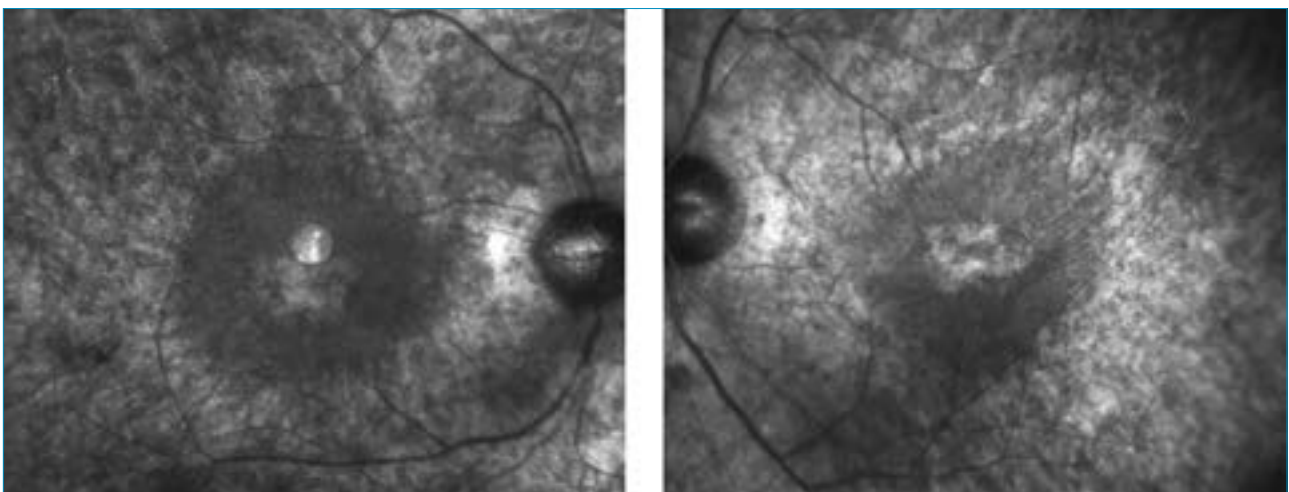
Negyedik betegünk egy 43 éves nő, aki szintén szindrómás retinitis pigmentosával fordult hozzánk. Hallássérültségére 4 éves korában derült fény, hallókészüléket 5 éves korában kapott. Farkasvaktsága 20 éves korában jelentkezett, az *Usher-szindrómát* 30 éves korában diagnosztizálták. Családi anamnézisében apai ágon myopia és időskori makuladegeneráció szerepel. Első vizsgálatokkor legjobb korrigált visusa mindkét oldalt $0,1$, amely azóta enyhe romlást mutat; látótere 10 és 20° közötti tartományra szűkült be. „Full-field” ERG-vizsgálatán a scotopikus és a fotopikus válasz megszűnt; multifokális ERG-n súlyosan csökkent amplitúdók a



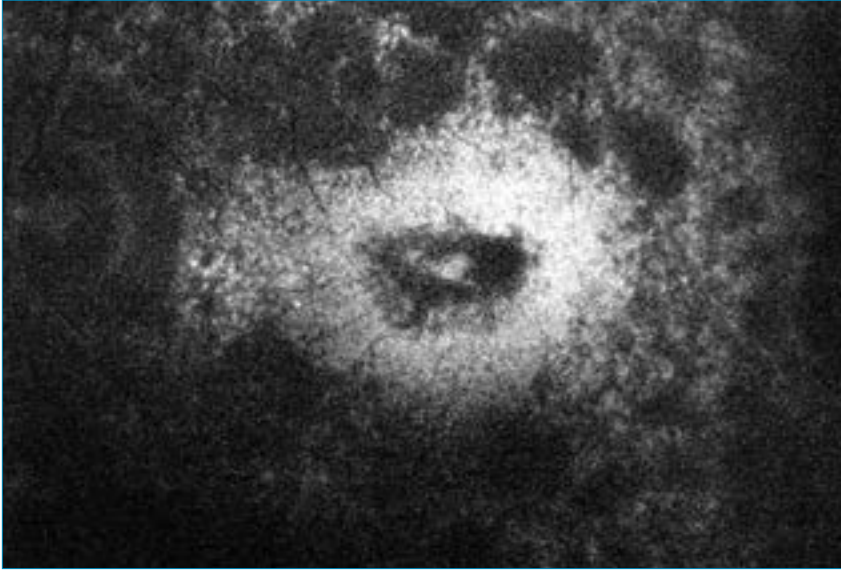
3. ábra: Mindkét oldali infravörös fundusfotó. Látható a szűk érhálózat; valamint az elvékonyodott retinán keresztül áttűnik a chorioidea érhálózata



4. ábra: Mindkét oldali FAF-kép. Látható a peripapilláris hipoautofluoreszcencia, amely foltokban fundusszerte megfigyelhető, valamint a makula céltábla rajzolatú megjelenése. A gerjesztési hullámhossz $\lambda = 488 \text{ nm}$



5. ábra: Infravörös fundusfotó. Mindkét oldali makulán látható a céltábla-szerű megjelenés



6. ábra: Bal oldali FAF-kép cél tábla megjelenésű makulával, peripapilláris és a periférián foltos hipoa autofluoreszcenciával. A gerjesztési hullámhossz $\lambda=488$ nm

centrális gyűrűkben. Fundusán részlámipás vizsgálattal halvány papilla, szűkebb erek, makulatájon ödéma, periférián csontsejtszerű pigmentáció és a középperiférián pigmentkicsapódás volt látható. FAF- és OCT-vizsgálat is készült (7–8. ábrák). Genetikai vizsgálatának eredménye heterozigóta pontmutációt mutatott az *USH2A* génben (1. táblázat). Eredményeinket az 1. táblázatban összegezzük.

Következtetés

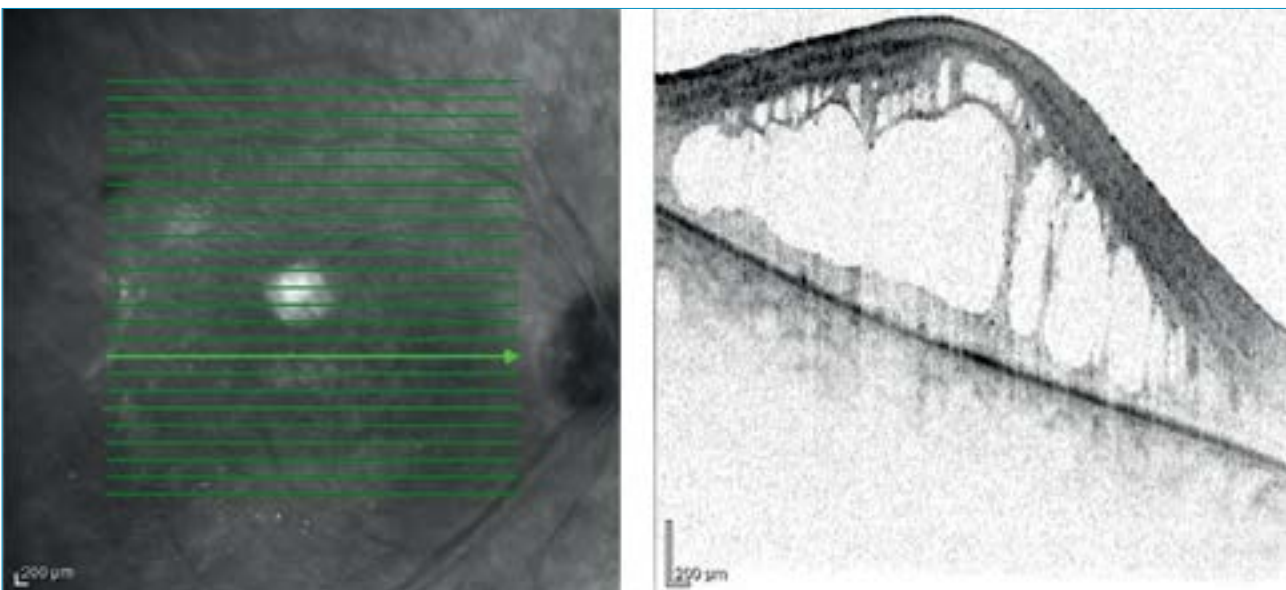
A részletes klinikai, képalkotó és elektrofiziológiai vizsgálatokkal, illetve a genotipizálás elvégzésével mind a fenotípus, mind a genotípus dokumentálása megtörtént.

Eseteink elemzése azt mutatta, hogy a súlyos fenotípus hátterében, mind a négy esetben az *USH2A* gén DNS-szekvenciahosszának megváltozásával járó mutációk állnak, duplikáció esetén bázispár-többlet, deléció esetén bázispár-hiány

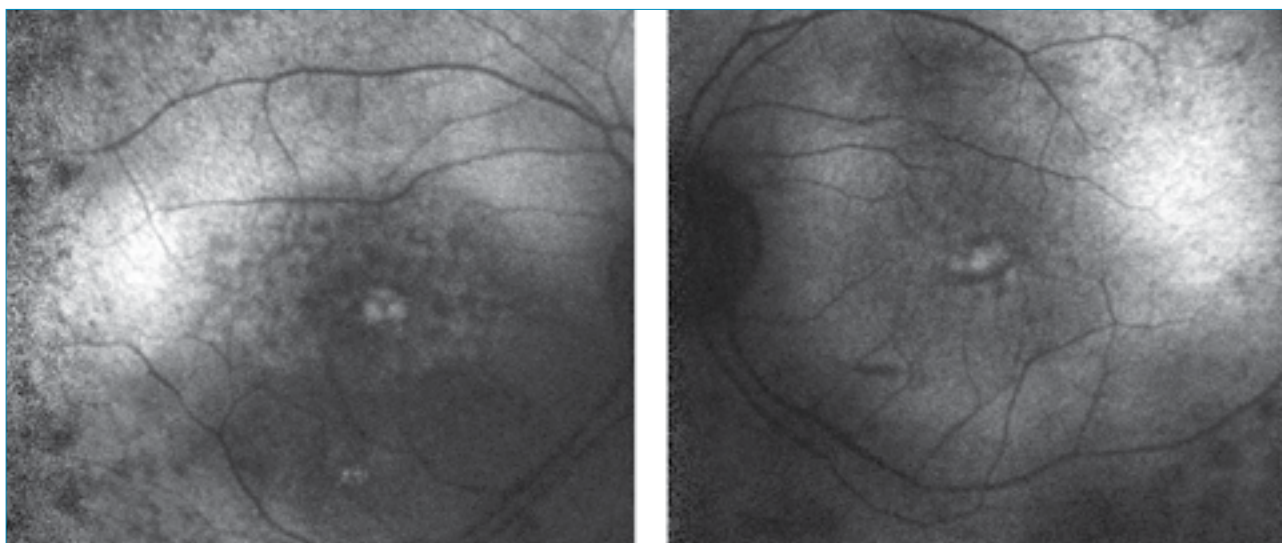
magyarázza a fehérjefunkció kifejezett károsodását. Misszensz-mutációk esetén a DNS-lánc hossza nem változik, hanem a nukleotidcsere eredményeképp aminosavcsere történik, amely a harmadlagos fehérjeszerkezetben okoz jelentős funkcióváltozást eredményező eltéréseket.

A szemészeti genetikai betegségek több szervrendszer funkciójának a károsodásával is járhatnak, ezért fontos a betegek felismerése és megfelelő vizsgálata. Alapos gyanú esetén, például az *Usher-szindrómában* szimultán látás- és hallásromlás mellett célszerű a páciens szemészeti genetikával foglalkozó centrumba irányítani. Ez azért elengedhetetlen, mert ez a betegcsoport progresszív és jelentős életminőség-romlást okoz, amelyre a betegnek fel kell készülnie. A szemészeti- és a genetikai tanácsadás segítségével a betegek tudatosan tudják tervezni jövőjüket mind életviteli, mind családtervezési szempontból.

Az utóbbi években azonban számos kutatás folyik a genetikai betegségek gyógyítására, amelyek közül a legtöbb még preklinikai fázisban tart. A módszerek között olyan génterápiás eljárások vannak, mint a víruskarrier (adeno-asszociált- és lentivírusok)



7. ábra: Jobb oldali makula OCT magas intraretinalis makulaödémával



8. ábra: Mindkét oldali FAF-kép makulaödémával és a periférián hipoautofluoreszcens területekkel. A gerjesztési hullámhossz $\lambda=488$ nm

1. táblázat: Az USH2A génben talált mutációk

Beteg	Neme	Nukleotid-eltérés 1. allél	Proteineltérés 1. allél	Nukleotid-eltérés 2. allél	Proteineltérés 2. allél
1.	férfi	c.920_923dup	p.(H308Qfs*16)	c.8682-9A>G	Splicing hiba
2.	nő	c.11864G>A	p.(W3955X)	skip exon 22 → 24	Rövidebb fehérjetermék
3.	férfi	c.920_923dup	p.(H308Qfs*16)	c.1297C>T	p.(P433S)
4.	nő	c.2610C>A	p.(C870*)	c.2299del	p.(E767Sfs*21)

segítségével történő hiányzó gén bevitel („gene replacement”), az antiszensz RNS segítségével (ASO, „antisense oligonucleotide”) történő génexpresszió-csökkentés, valamint a CRISPR-Cas9 bakteriális enzimrendszerrel történő génszerkesztés („gene editing”). Kifejezetten az USH2A gén 13. exonjának mutációs „hot spot-jában” található mutációkra klinikai vizsgálat zajlik az ultevursen nevű antiszensz oligonukleotiddal,

amely az említett exont kizárja az átíródásból (transzlációból) ezáltal rövidebb, azonban funkcióképes fehérje keletkezik (exon skipping). Ezek a technológiák igen ígéretesek a jövőben alkalmazható molekuláris terápiák tekintetében, azonban jelenleg még fejlesztés alatt állnak. Betegeink rendszerint tájékozottak a kutatások alakulásával kapcsolatban, de fontos számukra hangsúlyozni, hogy az ígéretes kísérleti eljárások számukra jelenleg még

nem alkalmazhatók a klinikai gyakorlatban (3–5).

Nyilatkozat

A szerzők kijelentik, hogy speciális eseteket ismertető eredeti közleményük megírásával kapcsolatban nem áll fenn velük szemben pénzügyi vagy egyéb lényeges összeütközés, összeférhetlenségi ok, amely befolyásolhatja a közleményben bemutatott eredményeket, az abból levont következtetéseket vagy azok értelmezését.

IRODALOM

1. Fuster-García C, García-Bohórquez B, Rodríguez-Muñoz A, et al. Usher Syndrome: Genetics of a Human Ciliopathy. *International Journal of Molecular Sciences* 2021; 22(13): 6723. <https://doi.org/10.3390/ijms22136723>
2. Zhu T, Chen D, Wang L, et al. USH2A variants in Chinese patients with Usher syndrome type II and non-syndromic retinitis pigmentosa. *British Journal of Ophthalmology* 2021; 105: 694–703. Epub 2020 Jul 16. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2019-315786>
3. Toms M, Pagarkar W, Moosajee M. Usher syndrome: clinical features, molecular genetics and advancing therapeutics. *Therapeutic Advances in Ophthalmology* January 2020; 12: 1–19. <https://doi.org/10.1177/2515841420952194>
4. Gwenaelle GS, Géléoc Aziz El-Amraoui. Disease mechanisms and gene therapy for Usher syndrome. *Hearing Research* 2020; 394: 107932. ISSN 0378-5955, <https://doi.org/10.1016/j.heares.2020.107932>
5. Ledford, Heidi. CRISPR treatment inserted directly into the body for first time. *Nature* 2020; 579(7798): 185–186. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-00655-8>

LEVELEZÉSI CÍM

Dr. Végh András, Semmelweis Egyetem, Szemészeti Klinika, Budapest, Mária u. 39.
E-mail: vegh.andras@med.semmelweis-univ.hu