

# Beszámoló

„Keratinizációs zavarok ultrastrukturális és genetikai vizsgálata”

T 043004 számú OTKA pályázat

Témavezető: Dr. Kárpáti Sarolta

## I. DARIER KÓR ÉS HAILEY-HAILEY BETEGSÉG VIZSGÁLATA

### I/1. BEVEZETÉS. KLINIKAI ÉS ÉLETTANI ALAPOK

A Darier-kór, más néven dyskeratosis follicularis a pubertás után, kórosan elszarusosott papulákkal jelentkezik a szeborreás bőrterületeken (pl. mellkason, háton, arcon). Hátterében 1999-ben fedezték fel az endoplazmatikus retikulum kalcium ATP-ázát (SERCA2) kódoló *ATP2A2* gén mutációit. Két évvel később egy másik autoszomális dominánsan öröklődő bőrbetegség, a Hailey-Hailey-kór (krónikus benignus familiáris pemphigus) okaként a Golgi készülék kalcium pumpáját (hSPCA1) kódoló *ATP2C1* gén mutációit írták le. E kórkép felnőttkorban a nagy hajlatok területén hólyagok, eróziók kialakulásával jár. A két betegség közös sajátossága a sejtek egymás közötti kapcsolatainak szövettani képen megfigyelhető felbomlása (acantholysis) az epidermis szuprabazális rétegeiben.

A SERCA2 fehérje az endoplazmatikus retikulum (ER) membránjában helyezkedik el, s működése során egy ATP molekula hidrolízisével két kalciumiont juttat az endoplazmatikus retikulum lumenébe. Ezáltal a citoplazma és az ER lumen kalciumion-koncentrációjának szabályozásában játszik fontos szerepet.

A hSPCA pumpa egy ATP molekula bontásával egy kalcium- vagy mangániont juttat a Golgi készülék lumenébe. Szerepet játszik a citoplazmatikus kalciumion-koncentráció és a kalciumion-oszcillációk szabályozásában, valamint a Golgi készülék és a szekretoros vezikulumok lumeneiben a fehérjék poszttranszlációs módosításához szükséges kalcium- és mangánion-koncentráció biztosításában.

Mind a SERCA2, mind a hSPCA1 fehérje a szervezet valamennyi sejtjében megtalálható, ennek ellenére a két betegség tünetei a bőrre korlátozódnak. Nem ismert, hogyan vezetnek a kalciumpumpa-gének mutációi a két betegségben megfigyelhető strukturális eltérésekhez.

## I/2. CÉLOK

- A magyarországi Darier-kóros és Hailey-Hailey-kóros betegek összegyűjtése, klinikai jellemzése.
- A betegek perifériás véréből DNS izolálás, az érintett gének teljes kódoló szakaszának analízisével a betegség-okozó mutációk azonosítása.
- Az eredmények összevetése a klinikai képpel az esetleges fenotípus-genotípus összefüggések feltárása céljából.
- Az intracelluláris kalciumion-koncentráció által szabályozott differenciációs folyamat összehasonlítása egészséges és Hailey-Hailey-kóros betegek keratinocytáinak tenyésztésében.

## I/3. MÓDSZEREK

### *DNS izolálás, PCR amplifikáció*

DNS-t perifériás vér lymphocytáiból az elfogadott módszereknek megfelelően izoláltuk. Minden vizsgált személy írásos beleegyező nyilatkozatban engedélyezte a genetikai vizsgálat elvégzését.

Mindkét betegségben az érintett gén teljes kódoló szakaszának vizsgálatára volt szükség. Darier-kórban az *ATP2A2* gén 21 exonját, Hailey-Hailey betegségben az *ATP2C1* gén 28 exonját amplifikáltuk az exonokkal határos szomszédos introniális szakaszokra illeszkedő oligonukleotid primerek felhasználásával.

### *Konformáció szenzitív gél-elektroforézis (CSGE), automatizált szekvencia-analízis*

A heteroduplex analízist 8% polyacrylamidot, 10% etilén-glikolt, 15% formamidot és 20xGT puffert tartalmazó vertikális gélben végeztük. A mintákat 5 percig tartó, 98 °C-on történő denaturációt követően 68 °C-on 55 percig inkubáltuk futtatás előtt. A heteroduplexeket SYBR Green I. (Sigma) festéssel tettük láthatóvá.

A heteroduplex analízis során kiválasztott, megváltozott elektroforetikus futási sebességet mutató szakaszokat ABI Prism 310 automata szekvenáló rendszerrel (Applied Biosystem) szekvenáltuk.

### *PCR termékek restriktív fragment hossz analízise*

Néhány esetben a detektált mutációk jelenlétét restriktív endonukleázokkal való emésztéssel verifikáltuk.

### *Neutrális polimorfizmus kizárása normál kontrollok szűrésével*

Új missense mutációk detektálása esetén 50, a betegségben nem szenvedő normál kontroll egyén 100 allélján vizsgáljuk az adott eltérés jelenlétét vagy hiányát konformáció szenzitív gélelektroforézissel annak vizsgálatára, hogy neutrális polimorfizmusról vagy betegségekötöz mutációról van-e szó.

### *RNS vizsgálat*

Egy betegünkben introniális báziscserét detektáltunk, mely esetben felmerült, hogy az eltérés új hasítási helyet alakíthat ki a spliceosome enzimkomplexe számára. E feltevés bizonyítására RNS vizsgálatot végeztünk. Perifériás vér limfocitáiból teljes RNS-t vontunk ki, majd reverz transzkripciót végeztünk. Az így kapott teljes cDNS-oldatból az mRNS egy 162 bázispár hosszú szakaszának amplifikációját végeztük saját tervezésű PCR primerek felhasználásával. A kapott PCR-termékek hosszát agaróz gélelektroforézissel határoztuk meg. A PCR-termékeket tisztítottuk, majd két irányban automatizált szekvencia analízist végeztünk.

### *Keratinocyta tenyészet*

Hámsejttenyészethez Hailey-Hailey betegekötöl vett punch biopsziás mintákból és normál kontroll egyéneken más okból eltávolított bőrbézészeti minták eltérést nem tartalmazó szegélyéből nyertünk keratinocytákat. Amint elérték a kívánt sűrűséget (70-80%-ban összefüggő réteget képeztek), a sejtek felének tápoldatát 1.2 mM-os kalciumion-koncentrációjúra cseréltük, ezzel stimulálva differenciációjukat. A sejtek másik feléhez ismét alacsony, 0.07 mM kalciumion-koncentrációjú tápoldatot adtunk. 24 óra elteltével a sejteket további vizsgálatokhoz gyűjtöttük össze. Ezáltal valamennyi kísérletben differenciálódott és differenciálatlan normál és Hailey-Hailey-kóros betegekötöl származó hámsejtek fehérje- vagy RNS-tartalmát hasonlíthattuk össze.

### *Fehérjekivonás és Western immunoblotting*

A sejteket homogenizációs pufferben reszuszpendáltuk és a szuszpenziót homogenizáltuk. A minták fehérjetartalmát BCA kittel határoztuk meg. Western immunoblot-ot standard módszerek szerint végeztünk.

A mintákat kemilumineszcencia révén detektáltuk. Mivel célunk egyes fehérjék mennyiségének összehasonlítása volt a normál kontrollokötöl és a betegekötöl származó

minták között, több módszerrel is kontrolláltuk, hogy egyenlő mennyiségű fehérjét alkalmaztunk-e valamennyi mintából.

A végső értékeléshez a kemilumineszcenciával nyert fotókon az egyes minták kvantitatív összehasonlításához denzitometriát végeztünk, majd mintánként az involucrin csíkhöz rendelhető számadatokat a béta-aktinhoz tartozóval normalizáltuk, és a betegekből nyert minták fehérjetartalmát a normál kontrollok fehérjetartalmának százalékában határoztuk meg.

#### *RNS kivonás, reverz transzkripció és valódi idejű kvantitatív PCR*

Sejtkultúrából gyűjtött mintákból standard, kereskedelemben kapható kittel (QIAGEN) teljes RNS kivonást végeztünk. Valódi idejű kvantitatív PCR-t ABI 7900 PCR készüléken SYBR Green módszerrel végeztünk. Belső kontrollként a 18S riboszomális RNS-t használtuk.

Minden sejtmintából 3 azonos involucrin-, és 3 azonos kontroll PCR reakciót futtattunk. Az adatokat a  $2^{-\Delta\Delta CT}$  módszer alkalmazásával analizáltuk.

#### *Luciferáz assay*

A kalciumionok involucrin promoterre kifejtett szabályozó hatását normál kontrollokból ill. Hailey-Hailey betegekből származó keratinocytákban luciferáz esszével határoztuk meg. A sejteket két különböző vektor-konstrukttal transzfektáltuk, lipofekt alapú SuperFect transzfekciós reagens felhasználásával. Egyikük tartalmazta az involucrin promoter 3.7 kb hosszúságú szakaszát; ebben a konstrukttban az involucrin promoter aktivációja luciferáz enzim termelődéséhez vezet.

Az involucrin promotert a kalciumion-koncentráció megemelésével stimuláltuk, majd a stimuláció hatékonyságát a luciferáz enzim mennyiségével arányos felvillanások mérésével, luminométerrel határoztuk meg.

#### *Az involucrin mRNS féléletidejének meghatározása*

Az involucrin transzkripcióját a kalciumion-koncentráció megemelésével stimuláltuk, majd 10 µg/ml actinomycin D hozzáadásával leállítottuk az mRNS szintézist. 0, 1, 6 és 18 óra elteltével gyűjtöttünk mintákat, majd RNS extrakció és reverz transzkripció után valódi idejű kvantitatív PCR-rel határoztuk meg az involucrin mRNS mennyiségét. Belső kontrollként GAPDH mRNS mennyiségét mértük.

## I/4. EREDMÉNYEK

16 Darier-kóros betegben végeztük el a teljes kódoló régió mutációanalízisét, s a munka eredményeként 11 különböző, heterozigóta mutációt azonosítottunk (**1. táblázat**), köztük 9 új, az irodalomban korábban nem ismertetetett mutációt.

**1. táblázat**

|     | <b>Mutáció</b> | <b>A mutáció típusa</b>                      | <b>A mutáció következménye fehérje szinten</b> | <b>Érintett fehérje struktúra/domén</b> |
|-----|----------------|--|--|---|
| 1.  | 116A→C         | missense                                     | N39T   | S1                                      |
| 2.  | 482C→A         | missense                                     | A161D  | β-redőzet                               |
| 3.  | 492G→C         | missense                                     | R164S  | β-redőzet                               |
| 4.  | 542C→G         | missense                                     | T181R  | β-redőzet                               |
| 5.  | 558insT        | Leolvasási keret eltolódása                  | PTC +5as                                       | β-redőzet                               |
| 6.  | 1288-6A→G      | New splice site, leolvasási keret eltolódása | PTC +21as                                      | P-domén                                 |
| 7.  | 1320delT       | Leolvasási keret eltolódása                  | PTC+8as  | foszforilációs hely (P-domén)           |
| 8.  | 1821delC       | Leolvasási keret eltolódása                  | PTC +3as                                       | Nukleotid-kötő (N-) domén               |
| 9.  | 2104G→A        | Missense                                     | D702N  | Hinge domain                            |
| 10. | 2369A→C        | Missense                                     | Q790P  | M6                                      |
| 11. | 2727T→A        | Non-sense                                    | C909X  | M8                                      |

Hailey-Hailey-kórbán az *ATP2C1* gén teljes kódoló szakaszának vizsgálatával 3 heterozigóta mutációt azonosítottunk. Egy betegben a 13. exonban található 1085. pozíciót érintő adenin inszerció kereteltolódás révén STOP kodon kialakulásához vezet 11 kodonnal az eltérés után. Egy másik páciens vizsgálata a exonban az 1516. pozícióban álló citozin timinre cserélődését mutatta ki. Ezáltal a cDNS 506. triplete CAG helyett TAG STOP kodorra változott.

A harmadik detektált mutáció egy 25 bázispár hosszúságú szakasz deléciója a gén 5' nem kódoló régiójából (nt+4-+29del). Ezen a szakaszon található az Sp-1 transzkripció faktor kötőhelye, melynek hiányában irodalmi adatok szerint az *ATP2C1* génről történő transzkripció mértéke minimális.

Egészséges kontroll személyek, valamint Hailey-Hailey kóros betegek tenyésztett hámsejtjeiben Western blottal határozva meg az involukrin fehérje mennyiségét, Hailey-Hailey-kórbán differenciálódott állapotban csökkent involukrinszintet találtunk. Az eleve

kevesebb involukrint tartalmazó sejtek a kalciumkoncentráció emelésére kevésbé fokozták az involukrin expresszióját. Ugyanezt figyeltük meg az mRNA szintű vizsgálataink során is.

Az involukrin gén promoterének luciferáz-esszével való vizsgálata során megfigyeltük, hogy a kalciumkoncentráció megemelésének hatására az involukrin promoter aktivitása normál sejtekben négyszeresére, Hailey-Hailey kóros sejtekben hatszorosára fokozódott. A csökkent involukrin mRNA mennyiség tehát nem a defektív promoter aktiváció következménye.

A sejtek mRNA-szintézisének actinomycin D-vel való leállítását után Hailey-Hailey-kóros betegek hámsejtjeiben az involukrin transzkriptum lebomlását fokozottnak találtuk.

## **I/5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS AZ EREDMÉNYEK HASZNOSÍTÁSA**

Magyarországi Darier-kóros betegekben keresve az *ATP2A2* gén mutációit, 11 heterozigóta eltérést találtunk, melyből nyolc variációt mi detektáltunk először. Két pontszerű deléció, egy inszerció és egy splice-site módosító introniális báziscsere mellett hat missense és egy nonsense mutációt írtunk le.

Hailey-Hailey kóros betegekben az *ATP2C1* gént vizsgálva 3 új mutációt: egy inszerciót, egy nonsense mutációt és egy, a gén 5' nem-kódoló szakaszát érintő, 25 bázispár kiesésével járó delécióit találtunk.

A klinikai kép és a háttérben álló mutációk között egyértelmű genotípus-fenotípus összefüggést nem találtunk.

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy Hailey-Hailey-kóros betegekből származó keratinocytákban a nyugalmi kalciumkoncentráció normál kontrollokból származó sejtekhez képest emelkedett, s a beteg sejtek kisebb intracelluláris kalciumjellel válaszolnak az extracelluláris kalciumkoncentráció emelkedésére. Hailey-Hailey-kóros betegekből származó hámsejtben a megemelkedett intracelluláris kalciumkoncentráció strukturális és funkcionális következményeit kerestük. Az elszarusodó sejtboríték egyik vázfehérjéjének, az involukrinnak szintjét betegekből származó sejtekben csökkentnek találtuk, míg a késői differenciációs markerek szintje nem változott.

A csökkent involukrinszint okát kutatva az involukrin mRNA szintjét csökkentnek találtuk, s későbbi vizsgálataink tanúsága szerint e jelenség háttérében a transzkriptum fokozott lebomlása állt.

Mindezen *in vitro* eredmények jelentőségének értékeléséhez szükség van további, *in vivo* vizsgálatok elvégzésére, illetve annak vizsgálatára, vajon a fokozott mRNA lebomlás más struktúrfehérjék transzkriptumait is érinti-e.

## II. COMÈL-NETHERTON SZINDRÓMA VIZSGÁLATA (A *SPINK5* GÉN ANALÍZISE)

### II/1. BEVEZETÉS

A Comèl-Netherton szindróma ritka, súlyos autoszomális recesszív öröklődésű társult ichthyosis. A klinikai tünetek: congenitalis ichthyosiform erythroderma, későbbi életkorban ichthyosis linearis circumflexa, trichorrexis invaginata (bambusz haj), emelkedett szérumszintű IgE, hipereozinofília, bakteriális infekciókra fokozott hajlam, valamint lelassult növekedés és fejlődés, malnutríció és egyes esetekben mentális retardáció. A betegségre jellemző továbbá, hogy a Comèl-Netherton szindrómában szenvedő újszülöttek mortalitása igen magas (30%). A betegség klinikai megjelenése nagy átfedést mutat más immunológiai deficienciát okozó kórképekkel pl. a RAG gének mutációi által okozott Omenn szindrómával, a Leiner betegségcsoport pedig az ismeretlen eredetű neonatális erythroderma, rövid töredezett haj valamint csökkent növekedés együttesét foglalja magába.

A Comèl-Netherton szindróma diagnosztikájában nélkülözhetetlen az bőr ultrastruktúrájának vizsgálata. A betegek bőrnek stratum granulosum elvékonyodott, gyakran teljesen hiányzik, a keratinocitákban elektrondenz csapadékot tartalmazó vezikulák vannak jelen, melyek még a stratum corneumban is kimutathatók. A betegség diagnosztikájának molekuláris alapokra való helyezésével a diagnosztikai eljárás felgyorsítható.

A betegség hátterében a *SPINK5* gén mutációi állnak. A *SPINK5* gén egy 15 doménos Kazal típusú szerinproteáz inhibitor –LEKTI– kódol. A LEKTI mRNS illetve a fehérje hiánya diagnosztikai jelentőségű. A *SPINK5* gén egyes polimorfizmusai atopiás megbetegedésekkel összefüggést mutatnak.

### II/2. EREDMÉNYEK

Munkacsoportunk négy Comèl-Netherton szindrómában szenvedő beteg mutáció analízisét végezte el. Számos ismert mutáció és fenotípusban nem megnyilvánuló polimorfizmus mellett egy új mutációt azonosítottunk (**2-5. táblázat**), egyes esetekben a genetikai defektus mechanizmusának, esetleges fenotípusra gyakorolt hatásának igazolása még folyamatban van. Eredményeinket publikációra előkészítettük. Bevezettük a *SPINK5* gén RNS szintű vizsgálatát, a génexpressziós vizsgálatokat. A 2. táblázat által genotípusában jellemzett beteg esetében az adott betegség gén mRNS szintje detektálhatatlan volt. További vizsgálataink számára előkészítettük a *SPINK5* gén polimorfizmusainak vizsgálatát atopiás dermatitisben.

**2. táblázat** (Comèl-Netherton szindróma által érintett 1. beteg)

| <b>SPINK5 exon</b> | <b>Genetikai eltérés</b>                             |
|--------------------|--|
| <b>4</b>           | <b>238insG (Bitoun 2002) PTC-t generáló mutáció</b>  |
| 10                 | 882+20 A→G polimorfizmus                             |
| 11                 | 891 C→T polimorfizmus                                |
| 24                 | 2313+31 C→G polimorfizmus                            |
| 24                 | 2313+48 G→A polimorfizmus                            |
| 24                 | 2313+51 polimorfizmus                                |
| 25                 | 2358C→T polimorfizmus                                |
| 25                 | 2412C→T polimorfizmus                                |
| <b>26</b>          | <b>2468delA (Bitoun 2002) PTC-t generáló mutáció</b> |

**3. táblázat** (Comèl-Netherton szindróma által érintett 2. beteg)

| <b>SPINK5 exon</b> | <b>Genetikai eltérés</b>                     |
|--------------------|--|
|                    | 800 A→G polimorfizmus                        |
|                    | 882+20 A→G polimorfizmus                     |
| 10                 | 882+46 insT polimorfizmus                    |
| 12                 | 1011-12 C→T polimorfizmus                    |
|                    | 1093-26 C→T polimorfizmus                    |
|                    | 1093-10 A→G polimorfizmus                    |
|                    | 1103 G→A polimorfizmus                       |
| 13                 | 1188 T→C polimorfizmus                       |
|                    | 1258 A→G polimorfizmus                       |
| 14                 | 1302+19 G→A polimorfizmus                    |
| 18                 | 1659 C→T polimorfizmus                       |
| 23                 | 2132 G→A polimorfizmus                       |
|                    | <b>2294 C→A, T765N új mutáció</b>            |
| <b>24</b>          | 2313+31 C→G polimorfizmus                    |
| 25                 | 2348C→T; 2412C→T polimorfizmus               |
|                    | insT 2267-22 polimorfizmus                   |
| 28                 | insA 2267-21 polimorfizmus verifikálás alatt |
| 29                 | 2740-59 C→A SNP                              |

**4. táblázat** (Comèl-Netherton szindróma által érintett 3. beteg)

| <b>SPINK5 exon</b> | <b>Genetikai eltérés</b>                    |
|--------------------|---|
| 10                 | Q800R; 882+46 insT polimorfizmus            |
| 12                 | 1011-12 C→T polimorfizmus                   |
| 13                 | S368N H396H polimorfizmus                   |
| 16                 | 40911delT polimorfizmus                     |
| <b>26</b>          | <b>2468delA (Bitoun et al 2002) mutáció</b> |

**5. táblázat** (Comèl-Netherton szindróma által érintett 4. beteg)

| <b>SPINK5 exon</b> | <b>Genetikai eltérés</b>                       |
|--------------------|--|
| 10                 | 800 A→G, 882+20 A→G, 882+46 insT polimorfizmus |
| 12                 | 1011-12 C→T polimorfizmus                      |
| 13                 | 1093-26 C→T; 1093-10 A→G; 1103 G→A; 1188 T→C   |
| 14                 | 1258 A→G; 1302+19 G→A polimorfizmus            |
| 18                 | 1659 C→T polimorfizmus                         |
| 23                 | 2132 G→A polimorfizmus                         |
| 25                 | 2348C→T; 2412C→T polimorfizmus                 |
| 28                 | insT 2267-22; insA 2267-21 verifikálás alatt   |
| 29                 | 2740-59 C→A SNP                                |



### **III. EPIDERMOLYSIS BULLOSA SIMPLEX VIZSGÁLATA (KRT5/14 GÉNEK ANALÍZISE)**

#### **III/1. BEVEZETÉS**

Örökletes, hólyagképződéssel járó bőrgyógyászati megbetegedések (epidermolysis bullosa EB) hátterében a bőr bazálmembrán zónájában elhelyezkedő struktúrproteinek veleszületett károsodása áll, a hám integritása sérül, a nyomásnak kitett területeken vagy látszólag spontán hólyagképződés alakul ki, esetenként keratinizációs zavarral társulva. A bőr integritását, mechanikai ellenálló képességét struktúrproteinjeinek és kapcsoló-struktúráinak megfelelő működése, szerkezetének stabilitása biztosítja. Elsősorban a bazálmembránzóna molekulái, a dermist az epidermishez rögzítő kapcsoló struktúrák (anchor rostok, hemidesmosomák), a keratinocyták tonofilamentumai (keratinok) valamint a keratinocytákat összekapcsoló desmosomák és adherens junkciók biztosítják a bőr szerkezetének stabilitását.

Az EB csoport leggyakoribb és egyben klinikailag legenyhébb formája az epidermolysis bullosa simplex (EBS). Döntő többségében autoszomális domináns, igen ritkán autoszomális recesszív öröklődésmentű betegség. EBS esetén a dermo-epidermális szeparáció a bazálmembrán felett, a bazális sejtrétegben van. Esetenként a keratinocytákban degeneratív elváltozások, fokális keratinizációs zavarral társult formáiban összecsapzódott keratin rögök, ún. keratin clumps jelenség figyelhető meg. Rövid idővel a születés után, a mechanikai traumának kitett területeken többnyire serosus hólyagok keletkeznek, melyek hamar megnyílnak, gyorsan hámosodó erosiókat hagyva maguk után (1. ábra). Hegképződés nincs, de miliumképződés ritkán előfordulhat. A szájnyalkahártya, a haj, a körmök és a fogazat érintettsége – alcsoporttól függően – ritkább. A meleg évszakokban, a hyperhidrosis miatt gyakran romlik a betegek állapota („nyári hólyagosodás”), de az élet előrehaladtával a hólyagképződés aktivitása általában csökken.

Az EBS egyik speciális formája, az EB herpetiformis (Dowling-Meara, MIM 131760) esetében hólyagok a születés után képződnek a törzsön, tenyéren, talpon. A törzs gruppírozott, herpetiform hólyagjai pigmentációt hátrahagyva gyógyulnak. A hólyagképződés a korral mérséklődik, azonban tenyéri és talpi hyperkeratosis alakulhat ki. Ultrastrukturálisan a bazális hámsejtekben durva keratin-tonofilamentum aggregáció, clumps-képződés detektálható. A keratin 5 és keratin14 molekulák mutációi többnyire a nagyfokú evolúciós állandóságot mutató szekvenciákat érintik (pl. helix iniciációs motívum). Ezen szakaszok kóros eltérései akadályozzák a keratin fehérjék magasabbrendű, filamentáris struktúrákba történő szerveződését és a keratin filamentumok összecsapzódásához vezetnek.

Az enyhébb fenotípusú lokalizált, döntően tenyéri-talpi tünetekkel jellemezhető (Weber-Cockayne) (MIM 131800) és generalizált (Köbner) EBS (MIM 131900) formákban hólyagok általában a mechanikai traumának leginkább kitett helyeken keletkeznek (láb, kéz, sarok, térd, könyök) és súlyosabb következmény nélkül gyógyulnak. Mutációkat ugyancsak a *KRT5/14* génekben, enyhébb fenotípusban a tonofilamentum aggregációt okozó kritikus régióon kívül találtak. A keratin-clumping nem jellemzője az ultrastrukturális képnek. Muscularis dystrophiával társult formáiban plectin gén (*PLEC1*) mutációk állnak. Az irodalom említi néhány az EBS fenotípusba illeszthető és hisztológiailag bazális epidermolysist mutató, lethális kimenetelű esetet is.

EBS-ben a keratin 5 és a keratin 14 – azaz rétegspecifikusan csak a bazális keratinocitákban jelenlévő – keratinok mutációit azonosították. EBS esetén a dermo-epidermális szeparáció a bazálmembrán felett, a bazális keratinociták szintjén történik. Ebben a kórképben a bőrön és a nyálkahártyán nyomásra, dörzsölésre vagy spontán hólyagok képződnek. Az EBS egyes altípusaiban, a keratinok magasabb rendű filamentáris struktúrába történő szerveződéséért felelős régiók károsodása esetén (pl. nagyfokú evolúciós állandóságot mutató hélix-szegélyező szekvenciák, 2B domén egyes részei stb.) a hólyagképződéshez elszarusodási zavar, tenyéri-talpi keratoderma és köröm dystrophia társul.

## III/2. MÓDSZEREK

Munkánk célja volt 11 az EBS betegségben érintett család genetikai hátterének vizsgálata, mutáció analízisének elvégzése. A betegek klinikai képe, ultrastrukturális vizsgálati eredményei megfeleltek az EBS kórkép diagnosztikai kritériumainak. Vizsgálatainkat 4 a súlyosabb tünetekkel járó EBS Dowling-Meara és 7 az enyhébb típusú EBS Weber-Cockayne formájában szenvedő betegeknél végeztük. 7 család esetében autoszomális domináns öröklődésment volt látható, a másik 4 családnál egyedül a vizsgált személy volt érintett a betegségben. Az utóbbi esetben felmerül a mutációgenesis *de novo* illetve az átörökítésnek a szülők gonadáliis mozaicizmusán alapuló formája.

A vizsgálatok során a betegek és egészséges családtagjaik perifériás véréből DNS-t izoláltunk. Ezt követően a *KRT5* és *KRT14* gén összes exonját PCR segítségével amplifikáltuk, majd a termékeket konformáció szenzitív gélelektroforézissel (CSGE) válogattuk. A shift pozitív exonok szekvenciáit egy tisztítási eljárás után automata szekvenálással határoztuk meg. A mutációk verifikálása restriktív endonukleázokkal történt (Dde I., Aci I., Sau3AI., Mbo II.).

### III/3. PSEUDOGÉNEK VIZSGÁLATA

A vizsgálatot megnehezítette a *KRT14* pszeudogén jelenléte. A pszeudogének olyan genomiális DNS szekvenciák, amelyek adott populációban jelen vannak, nem funkcionálisak, és az ismert génekkel homológ szakaszokkal rendelkeznek, evolúcionálisan a működő gének rokonai. Funkcionalitás elveszésének több oka is lehet. Ezek általában olyan változások, amik a start és stop kodonokat vagy egyéb szabályozó szakaszokat érintenek, amelyek fontosak a gének transzkripciójához. Mivel a pszeudogének szekvenciája nagy százalékban megegyezik a funkcionális génével, ezért PCR során amplifikálódhat, amivel a későbbi eredményeket meghamisíthatja. Ennek kiküszöbölésére munkacsoportunk egyedi módszert dolgozott ki, egyénileg tervezett primereket alkalmaztunk, és allés-specifikus amplifikációt végeztünk. A primer párok a funkcionális génnel voltak homológok. Szigorúan optimalizált, kontrollált PCR feltételek között a primer párok csupán a célszekvenciák, a funkcionális génszakaszok amplifikációját eredményezik.

### III/4. EREDMÉNYEK

EBS-DM formájában két új, az EBS-WC formájában két új és két ismert mutációt sikerült kimutatnunk. A *KRT14* gén 1 exonjában EBS-WC fenotípust okozó új (L136Q) mutációt azonosítottunk, mely a keratin 14 fehérje alfa-helikális 1A doménjének szerkezetét módosítja. A *KRT14* gén 6 exonjában két új EBS-DM fenotípust eredményező (E411K, I412N) és egy ismert EBS-WC fenotípusban megnyilvánuló (R388C) mutációt detektáltunk, melyek a keratin 14 fehérje 2B doménjét érintik. A *KRT5* gén 5 exonjában egy új (R331G) és egy ismert (E170K) mutációt találtunk, melyek a keratin 5 fehérje 2B doménjének szerkezetét módosítják.

Jelen OTKA kutatómunkánk során komplettáltuk korábbi OTKA pályázataink során megkezdett a *COL7A1* gén esetében végzett populáció genetikai vizsgálatunkat. A számos új mutáció azonosítása mellett- kiemelendő, a közép-európai epidermolysis bullosa dystrophica fenotípusú beteg populációban domináló, 12,8%-os gyakorisággal előforduló rekurráló VII. típusú kollagén gén (*COL7A1*) K142R mutációjának azonosítása, ami a mutáció detekciós stratégiai változását okozhatja ebben a régióban.

#### IV. ÖSSZEFOGLALÁS

Az elmúlt három évben OTKA pályázatunk segítségével megteremtettük hazánkban a legsúlyosabb örökletes bőrgyógyászati kórképek közt egyes keratinizációs zavarok (pl. társult ichthyosisok, dyskeratosis follicularis) ultrastrukturális és genetikai vizsgálatainak alapjait, lehetővé téve a későbbiekben a prevenciót célzó DNS alapú prenatális diagnosztikát. Jelen kutatómunkánk szorosan kapcsolódott a korábbi „Az ichthyosisok ultrastrukturális és genetikai vizsgálata” című T032139 számú OTKA pályázatunkhoz.

Dyskeratosis follicularisban (M. Darier) szenvedő betegekben az *ATP2A2* gén 11 heterozigóta mutációját találtunk, melyből nyolc variációt elsőként detektáltunk.

Hailey-Hailey kóros betegekben az *ATP2C1* gént vizsgálva 3 új mutációt találtunk. A klinikai kép és a háttérben álló mutációk között egyértelmű genotípus-fenotípus összefüggést nem volt. Korábbi adatok alapján Hailey-Hailey-kóros betegekben származó hámsejtekben a megemelkedett intracelluláris kalciumkoncentráció strukturális és funkcionális következményeit kerestük. A betegekben származó sejtekben csökkent az involukrin expressziója, míg a késői differenciációs markerek szintje nem változott. E jelenség háttérében a transzkriptum fokozott lebomlása állt.

Négy Comel-Netherton szindrómában szenvedő beteg esetében a *SPINK5* gén mutációanalízisét végeztük el és bevezettük a gén RNS szintű vizsgálatát.

A bazális keratinocytákban specifikusan expresszálandó keratin 5 és 14 gének teljeskörű vizsgálatát és a *KRT14* pseudogén allélspecifikus amplifikációval történő elkülönítését végeztük. A *KRT14* gén új (L136Q, E411K, I412N) és egy ismert (R388C) valamint a *KRT5* gén (R331G, E170K) mutációit azonosítottuk.

Kutatómunkánk során vállalt célkitűzéseink nagyrészt megvalósultak, bevezettük az *ATP2A2*, *ATP2C1*, *SPINK5* gének mutáció analízisét, megújítottuk a *KRT5/14* gének vizsgálatát, keratinocytáiban kultúrában *in vitro* vizsgáltuk a Ca-pumpák működését, és működésének módosulását. A foetalis bőr protein expresszió vizsgálata kellő számú minta hiányában a későbbi terveink között szerepel.

Nemzetközi publikációkban számoltunk be az *ATP2A2*, *ATP2C1*, *COL7A1* gének első hazai mutáció analíziséről és a munka alapján 2005-ben PhD fokozatszerzés alapját képező dolgozat született. További publikációink előkészület alatt állnak. 2005-ben kutatócsoportunk meghívást kapott a GENESKIN (Rare genetic skin disease: advancing diagnosis, management and awareness through a European network) integrált európai projektben való részvételre.