

Záróbeszámoló

A pályázat címe:

Örökletes és immunológiai bőrgyógyászati kórképek epidemiológiai és molekuláris genetikai vizsgálata

OTKA nyilvántartási szám: **F049556**

Futamidő: **2005-2008.**

Témavezető: **Dr. Medvecz Márta (korábbiakban Dr. Csikós Márta)**

Semmelweis Egyetem Budapest, Bőr-Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika

MTA-SE Molekuláris Medicina Kutatócsoport

Megjegyzés: 2006-ban személyes adataimban történő változás miatt publikációimat korábbiakban Dr. Csikós Márta, majd a későbbiekben Dr. Medvecz Márta néven jegyeztem.

Bevezetés és előzmények:

Témám, az örökletes és immunológiai hátterű bőrgyógyászati kórképek epidemiológiai és molekuláris genetikai vizsgálata a dermatológia igen tág területét öleli fel. Az ilyen széleskörű kutatómunka végzésének feltétele volt egy összehangolt, több részterülettel párhuzamosan foglalkozó munkacsoportban való kutatás. A tudományos munkám során elért eredményeim ezért egyben kutatócsoportunk, a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikáján működő MTA-SE Molekuláris Medicina Kutatócsoport bőrgyógyászati részlegének eredményeit is tükrözik, melynek vezető helyettese vagyok.

Jelen pályázatom szorosan kapcsolódott és folytonosságot biztosított munkacsoportunk korábbi OTKA ill. más szervezetek által támogatott projektjeinek:

- A kutatási téma címe: Ichthyosisok ultrastrukturális és genetikai vizsgálata. OTKA nyilvántartási szám: T 032139
- A kutatási téma címe: Keratinizációs zavarok ultrastrukturális és genetikai vizsgálata. OTKA nyilvántartási szám: T 043004
- A kutatási téma címe: Az epidermális barrier örökletes betegségei. ETT: T-05-391
- GENESKIN (Rare Genetic Skin Diseases, European Network) koordinációs akció (LSHM-CT-2005-512117).
- NKFP/1/2001 Széchenyi-terv pályázat, 7/31/04 sorszám 21/1 résztvevő. Allergia genomika. Epidermolysis bullosa kutatócsoport

I. Örökletes bőrgyógyászati kórképek vizsgálata

Az örökletes bőrgyógyászati kórképek (genodermatosisek) kutatása világszerte dinamikusan fejlődik. Munkacsoportunk elsősorban a hólyagképződéssel járó és az elszarusodási zavart okozó genodermatosiseket vizsgálja. Pályázatom futamideje alatt számos, korábbiakban bizonytalan etiológiájú kórkép hátterében újonnan azonosították a jellegzetes fenotípus kialakításáért felelős target fehérjéket és az ezeket meghatározó betegség géneket. Ennek következtében a genodermatosisek reklasszifikációja napjainkra szinte folyamatossá vált. Munkacsoportunk célja volt ezért korábbi munkáink komplettálása mellett (pl. *COL7A1*, *KRT5*, *KRT14*, *LAMB3*, *TGMI*, *SPINK5*, *ATP2A2* és *ATP2C1* gének vizsgálata), további új gének analízisének bevezetése is (haj-specifikus keratinok, *LAMA3*, *LAMC2*, *ABCA12*, *CDKN2A*), valamint az ezekhez kapcsolódó mutációsűrés technológiájának javítása, régióink genetikai sajátosságait tükröző profil, esetlegesen rekurráló vagy halmozódó mutációk azonosítása.

I.1 Örökletes hólyagképződéshez vezető genodermatosisek

I.1.1. Epidermolysis bullosa simplex (EBS)

A hereditær mechanobullózus epidermolysis bullosa (EB) csoport leggyakoribb és klinikailag az életminőséget változó fokban rontó formája az EBS. Döntő többségében autoszomális domináns öröklődésű betegség. EBS esetén a klinikailag hólyagképződésben megnyilvánuló dermo-epidermális szeparáció a bazálmembrán felett, többnyire a bazális keratinocyták szintjén (bazális formák) található.

Az EBS gyakori, klinikailag releváns altípusainak hátterében az epidermisz bazális keratinocytáira specifikus, cytoskeleton vázot alkotó keratin-5 és keratin-14 intermedier tonofilamentum molekulák zavara, ill. az ezeket meghatározó gének (*KRT5* vagy *KRT14*) mutációja áll.

Eredmények: 9 EBS által érintett beteg esetében a *KRT5* és *KRT14* gének mutációit és polimorfizmusait, valamint a genotípus-fenotípus korrelációt vizsgáltuk. A betegek fenotípusát a klinikai kép, anamnézis, öröklődésű vizsgálat (családfa analízis), ultrastrukturális és immunfluoreszcens antigén mapping vizsgálat segítségével klasszifikáltuk. A molekuláris genetikai metodika a következő volt: genomiális DNS preparáció perifériás vér limfocitáiból, PCR amplifikáció, konformációs szenzitív gélben végzett heteroduplex analízis (CSGE), direkt automata szekvencia analízis, verifikáló RFLP és reszekvenálás.

A *KRT14* gén új p.L136Q, p.E411K, p.I412N és ismert p.R388C mutációját, valamint a *KRT5* gén új p.R331G, p.E190D, p.I183V és ismert p.E170K, p.Q191P mutációit detektáltuk 6 EBS Weber-Cockayne (MIM 131800), 2 EBS-Dowling-Meara (MIM 131760) és 1 EBS-Köbner (131900) fenotípus variáns esetében.

További 5 polimorfizmusnak, a magyarországi populációra vetített allél frekvenciáját 100 EBS által nem érintett személy 200 kromoszómáján végzett szűréssel határoztuk meg.

Új metodikai fejlesztés: A mutációanalízist megnehezítette a *KRT14* diszfunkcionális, inaktív pszeudogén szekvencia jelenléte, mely nagyfokú homológiát mutat a funkcionális *KRT14* génnel. Ennek kiküszöbölésére új, a mutációanalízist pontosabbá, hatékonyabbá tevő módszert dolgoztunk ki (egyéni tervezett primereket, single-step allél specifikus PCR-t, RFLP-t alkalmaztunk). In silico vizsgálatok után, a *KRT14* gén extrém fokú polimorfizmusának ismeretében, introniális polimorfizmusok és pszeudogén homológiák elkerülésével választottuk az allél-specifikus primerek annealációs és priming helyét. Amplikonjaink direkt szekvenálásra is alkalmasak egyben. További restriktív endonukleáz emésztéssel is kizártuk a pszeudogén szekvencia kontamináció lehetőségét.

Eredményeinket OTKA támogatás feltüntetésével publikáltuk: *Journal of Investigative Dermatology* (2009) 129, 229-231.

I.1.2. Epidermolysis bullosa junctionalis lethalis (Herlitz)= (EBJ-H)

Gyakran a születéskor is észlelhető, autoszomális recesszív öröklődésű, ritka genodermatosis (MIM 226700). A hólyagképződés során a bazálmembrán rétegei a lamina lucida szintjén távolodnak el egymástól. Az akrális, arcot, hajas fejbőrt is érintő bőrtünetek gyorsan generalizálódnak és az extrém bőr fragilitás mellett a gasztrointesztinális, respiratorikus és genitourinális traktust is érintő rapidan progrediáló hólyagképződés zajlik. Gyakran az első életévekben fatális kimenetelű genodermatosis.

Az EBJ lethalis (Herlitz) fenotípus a laminin-332 (korábbi nomenklatúrában laminin-5) heterotrimer adhéziós molekula hiányára, ill. ennek megfelelően az $\alpha 3$, $\beta 3$, $\gamma 2$ láncokat kódoló *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2* gének nonsense mutációira vezethető vissza

Irodalmi adatok alapján, a kelet-közép európai régióban az EBJ-H fenotípus hátterében elsősorban a *LAMB3* gén fehérjeszintézist megszakító primer PTC (premature-termination-codon) vagy splice site mutációi állnak (frame shift révén generált PTC). Munkacsoportunk a korábbiakban kisszámú, sporadikus EBJ-H esetben a *LAMB3* gén mutáció analízise során a

LAMB3 gén 14. exon ismert 1903C→T, p.R635X rekurráló mutációját azonosította, két esetben sikeres DNS-alapú prenatális vizsgálatot végezett.

Epidemiológiai vizsgálataink eredményei: Két index személynél kezdett kivizsgálás kapcsán irányult figyelmünk egy magyarországi régióra, ahol anamnesztikus adatok gyűjtése során számos, potenciálisan EBJ-H variáns következtében elhalálozott gyermeket azonosítottunk. Az EBJ-H fenotípus megfigyelésünk szerint az észak-magyarországi romungro lakosság körében az átlagnépességhez mérten kiugróan nagy arányban fordul elő. Társadalomorvostani szempontból ennek hátterében feltételezésünk szerint a szocio-kulturális izoláció, a vérrokon házasságok nagyobb aránya állhat. Klinikai és molekuláris genetikai szempontból alapító hatás következtében domináló gyakoriságú, a betegek körében homozigóta statusban hordozott halmozódó mutációt valószínűsítettünk. 2005-2007. évek közötti időszakban több alkalommal a klinikai körülményeken túlmenően, helyszíni adatgyűjtést, fenotípus vizsgálatot és mintavételt végeztünk, a helyi egészségügyi ill. védőnői szolgálat támogatásával. Az érintettek körében több alkalommal DNS szeparáció történt. Családfa analízis segítségével tártuk fel a maguk az érintett családok körében sem mindig ismert halmozott vérrokon kapcsolatrendszeret.

Morfológiai és genetikai vizsgálatok eredményei: A betegek fenotípusát a klinikai kép, anamnézis, öröklődésmenet vizsgálat (családfa analízis), ultrastrukturális és immunfluoreszcens antigén mapping vizsgálat segítségével klasszifikáltuk. A dermo-epidermális junkciós zóna lamina lucida rétegében húzódó lízist és a laminin-332 adhéziós heterotrimer molekula láncainak hiányát detektáltuk. Ezért a target *LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2* gének mutációanalízisét kezdtük el, munkahipotézisünk szerint nonsense, direkt vagy másodlagos módon a fehérjeszintézist megszakító PTC vagy splice site mutációk irányában.

A molekuláris genetikai metodika a következő volt: genomiális DNS preparáció perifériás vér limfocitáiból, PCR amplifikáció, bidirekcionális direkt automata szekvencia analízis, verifikáló RFLP és reszekvenálás. Elsőként a *LAMB3* (laminin 5 beta lánc) gén komplett vizsgálatát végeztük el, azonban sem a korábbiakban sporadikusan nagy számban észlelt p.R635X mutáció, sem egyéb mutáció egyértelműen nem volt kimutatható. Ezt követően a *LAMA3* és *LAMC2*, laborunkban a pályázati időszakban újonnan beállított gének vizsgálatát komplettáltuk, hasonló eredmények mellett. Számos neutrális polimorfizmus azonosításán kívül, aktuálisan nem ismerjük az adott fenotípusért felelős genotípust.

Tekintettel a téma nagy klinikai relevanciájára, kutatómunkánk jelen OTKA pályázat lezárulását követően is prioritást élvez. Tervezzük a mutációanalízis ismétlését, és RNS szintű expressziós vizsgálatok bevezetését. Felmerül a molekuláris vizsgálatok melletti citogenetikai vizsgálat végzésének lehetősége is, esetleges kromoszomális szintű defektusok vizsgálatára.

Eredmények hasznosítása, prevenció: Vizsgálataink eredményessége esetén, eredményeink gyakorlati tudományos és népegészségügyi felhasználása hordozó szűrés révén a genetikai prevencióban, letális kimenetelű kórformára való tekintettel a DNS alapú prenatális diagnosztikában biztosított, amiben kutatócsoportunk már gyakorlattal rendelkezik. Vizsgálataink eredményeként a régió kedvezőtlen csecsemőhalandósági mutatóinak lényeges javulását várjuk, és erről publikációk formájában tervezünk számot adni.

I.1.3. Epidermolysis bullosa dystrophica (EBD)

Az epidermolysis bullosa dystrophica (EBD) a mechanobullosus genodermatosisok gyakori előfordulású csoportja, mely enyhe fenotípussal járó autoszomális domináns (EBDD) és súlyosabb tünetekkel jellemezhető autoszomális recesszív módon (EBDR) egyaránt öröklődik. A hólyagképződés dermolyticus, ezért a bőrtünetek hegeképződéssel gyógyulnak. Valamennyi kórforma hátterében közvetlenül a bazálmembrán alatt, a felső dermisben húzódó

anchor fibrillumok legfontosabb építőkövének, a VII. típusú kollagén fehérje génjének (*COL7A1* gén) mutációi állnak.

Recesszív, súlyos generalizált EBD (korábbi nomenklatura szerint Hallopeau-Siemens variáns, MIM 226600): súlyos, generalizált forma, melyet születéskor fellépő, progresszív jelleget mutató kiterjedt hólyagképződés, rossz gyógyhajlamot mutató ulceráció és masszív hegesedés jellemez. A kéz és lábujjakon pseudosyndactylia és mutiláció alakul ki, az orális és gasztrointesztinális érintettség (oesophagus strictura, stenózisok) malnutricióhoz, fehérjehiányos állapothoz, növekedési retardációhoz és súlyos anaemiához vezet. A bőrtüneteket további számos számos cutan és extracutan komplikáció kísérheti, melyek közül a legjelentősebb a korai fellépésű agresszív spinocelluláris carcinoma. További szövődményei: szekunder reaktív amyloidosis, corneális erosiók, súlyos infekciók, dystrophiás és gravis carieses fogazat, pszichológiai komplikációk.

Eredmények: egy aktuálisan 4 éves recesszív EBDR-Hallopeau-Siemens variáns által érintett fiúgyermeket vizsgáltunk, aki a család nem-vérrokonszülőktől származó, egyedüli érintett tagja. Morfológiai vizsgálatok során immunfluoreszcens antigén mapping technikával a hólyagfedélen a VII. típusú kollagén festődésének kiesését detektáltuk. A fenti képnek megfelelően, a VII. típusú kollagén prekursor-fehérjét kódoló *COL7A1* gén mutációanalízisét kezdtük. A molekuláris genetikai metodika a következő volt: genomális DNS preparáció perifériás vér limfocitáiból, PCR amplifikáció, konformációszenzitív gélben végzett heteroduplex analízis (CSGE), bidirekcionális direkt automata szekvenálás, verifikáló RFLP és reszekvenálás. Vizsgálatainkkal sikerült kimutatnunk, hogy a gyermek a *COL7A1* gén két, egymástól eltérő mutációját (p.R1343X és 7154delC) compound heterozigóta formában hordozza. Az anyai eredetű ismert p.R1343X PTC mutáció a fehérjeszintézist direkt módon szakítja meg, míg az apai eredetű allélon észlelt új, az irodalomban nem közölt 7154delC deléción a fehérjelánc translációját a mutáció pozícióját követő második, 2387 kodonban szakítja meg korai terminációs kodon generációjával (frame shift).

Az eset genotípus-fenotípus korrelációjának elemzése kapcsán tehát azonosítottuk a kóros fenotípusért felelős mutációkat, erre alapozva felkészültünk az érintett szülőpár esetében a prevenciót célzó, a következő terhesség során kivitelezhető DNS-alapú prenatális diagnosztikára.

Eredményünket a későbbiekben, elsősorban annak a prevencióban történő gyakorlati felhasználását követően tervezzük publikálni.

I.1.4. Epidermolysis bullosa dystrophica és spinocelluláris carcinoma

Eredeti munkatervünket kibővítő, további onkodermatológiai irányú kutatásainkat finn partnerekkel folytatott együttműködésben végeztük (Department of Dermatology, University of Turku and Turku University Central Hospital, Turku, Finland.).

Az epidermolysis bullosa dystrophica súlyos, recesszív formáiban (EBDR) gyakori komplikáció a klinikailag agresszív, rapid progressziót mutató spinocelluláris carcinoma (SCC) megjelenése. Immunohisztokémiai vizsgálatokkal (monoklonális antitestekkel végzett festésekkel) elemeztük a mátrix metalloproteináz-7 (MMP 7), MMP-13, MMP-9, E-cadherin és syndecan-1 szerepét EBDR asszociált (n=25) és sporadikus SCC (n=61) valamint M. Bowen (n=28) esetében. A mátrix metalloproteinázok az endopeptidázok családjába tartoznak, és fontos tényezői a SCC növekedésének, inváziójának és metasztázis képzésének. Az MMP szerepe EBDR-rel társult SCC esetében még nem volt ismert.

Eredmények: MMP-7 valamennyi EBDR asszociált SCC-ban kimutatható volt (legkifejezettebben az inváziós vonalakban), ahol a cadherin és syndecan-1 festődés feltűnően redukált vagy hiányzó volt. Továbbá a MMP-7 a sporadikus SCC 98%-ában és a M. Bowen 68%-ában volt kimutatható. Az MMP-7 expressziója a sporadikus SCC-vel összevetve jelentősen erősebb volt az EBDR-rel társult SCC-ban és hasonlóan erős volt az alacsony

differenciált daganatokban. MMP-13-at az EBDR asszociált SCC 96%-ában és minden sporadikus SCC-ban kimutattuk. MMP-9-et valamennyi vizsgált SCC szövetminta esetében a gyulladásosejtek tartalmazták.

Eredményeink felvetik, hogy a MMP-7 és MMP-13 a SCC progressziós, tumor-sejt specifikus markerei, és így az EBDR-rel társult SCC potenciális terápiás targetjei lehetnek. Továbbá eredményeink azt sugallják, hogy az MMP-7 szerepet játszik a cadherin és syndecan-1 tumorsejtfelszíni eliminációjában.

A témában további perspektivikus, szöveti microarray vizsgálataink (target: MMP-7, CD44v3, HB-EGF) folyamatban vannak.

Eredményeink egy részét már sikeresen publikáltuk: *Br J Dermatol. 2008 Apr; 158 (4):778-85. Epub 2008 Feb 16.*

I.1.5. Morbus Hailey-Hailey

Az autoszomális dominánsan öröklődő bőrbetegség, a Hailey-Hailey-kór (korábbi nomenklatúrában krónikus benignus familiáris pemphigus, MIM 169600) okaként a Golgi készülék kalcium pumpáját (hSPCA1) kódoló *ATP2C1* gén mutációit írták le. A fenotípus felnőttkorban a nagy hajlatok területén hólyagok, majd eróziók kialakulásával jár. Hisztomorfológiai sajátossága a sejtek egymás közötti kapcsolatainak felbomlása (acantholysis) az epidermis szuprabazális rétegeiben. 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.

Eredmények: Két beteg fenotípusát a klinikai kép, és hisztológiai vizsgálatok segítségével azonosítottuk. A betegek genotípusában, két, egymástól eltérő heterozygota statusban hordozott új mutációt találtunk (1085insA, és p.Q506X mutációk).

Publikáció: *Clin Exp Dermatol. 2005 Sep;30(5):575-7.* A publikáció egy doktori dolgozat alapját képezte.

I.2 Örökletes elszarusodásai zavarok

I.2.1. Lamelláris ichthyosis

Autoszomális recesszív módon öröklődő (MIM 242300) generalizált elszarusodási zavarok heterogén csoportja. Születéskor manifesztálódik, a testet lemezes, nagy kiterjedésű, erősen tapadó hámlémezek borítják (collódió-baby), ectropiummal társul. Később lemezes hámlás kezdődik, és lassan felépülnek a kezelés nélkül jellegzetes klinikai képet mutató fenotípusok.

Jelen vizsgálatunkban közelebbről az ún. erythrodermát nem mutató fiatal nőbeteget (klasszikus lamelláris ichthyosis, I. típusú lamelláris ichthyosis) vizsgáltunk, akinek klinikai képét nagyelemű, lemezes pikkelyes hámlás és palmoplantaris keratoderma jellemezte. A típusos fenotípust rutin és ultrastrukturális hisztomorfológiai vizsgálatok eredménye is alátámasztotta (típusos cholesterol kristályok a stratum corneumban).

Eredmények: a klinikai és morfológiai vizsgálatok specifikus eredménye alapján a *TGMI* (keratinocita transzglutamináz) gén vizsgálatát végeztük el (megjegyzés: a heterogén lamelláris ichthyosis csoport multigenikus hátterű). A *TGMI* gamma-glutamil-epsilon-lizin izodipeptid kötéseket hoz létre Ca⁺⁺ jelenlétében, így járul hozzá a terminális differenciáció során az elszarusodó sejt envelope kialakításához.

Metodika: genomiális DNS preparáció perifériás vér limfocitáiból, PCR amplifikáció, konformáció szenzitív gélben végzett heteroduplex analízis (CSGE), direkt automata

szekvencia analízis. A beteg compound heterozygota státusban hordozza a *TGMI* gén p.Arg553Pro és p.Arg126His mutációit.

Publikáció: Eredményeink publikációja tudományos folyóiratcikk formájában, OTKA támogatás feltüntetése mellett előrehaladott állapotban, leadás előtt áll. Korábbiakban poszter-absztrakt formájában publikáltuk: ESDR kongresszus (2007), J Invest Dermatol (2007), Volume 127 (505).

I.2.2. Harlequin-ichthyosis

A Harlequin-ichthyosis (OMIM 242500) az autoszomális recesszív öröklődésű congenitális ichthyosisok családjába tartozó súlyos, gyakran fatális kimenetű elszarusodási zavar. Az újszülöttek vaskos, páncélszerű collódium membránban jönnek a világra, ectropium, eclabium, deformitások, szekunder cardialis és respiratorikus elégtelenség, infekciók társulása gyakori. A fenotípus hátterében álló *ABC12* gén ill. terméke az ATP-binding cassette =ABC transzporter család tagja, és immunoelektron mikroszkópos vizsgálatok szerint, a szuprabazális epidermis keratinocytáinak lamelláris granulumaiban a keratinizáció, terminális differenciáció során upregulált. A transzporter defektusa következtében az intercelluláris lipid szekréció zavart szenved, a bőr lipid barrierjének elvesztése pedig Harlequin-ichthyosis klinikai képében nyilvánul meg, emellett a II. típusú lamelláris ichthyosis etiopathogenezisében is szerepet játszik.

Eredmények: egy vérkonon szülőpár, egy korábbiakban exitált és egy ismételt Harlequin-ichthyosis fenotípust mutató újszülött gyermekét vizsgáltuk. A klinikai diagnózist a bőrbioptizás minta rutin, és ultrastrukturális vizsgálata is alátámasztotta. Az érintett gyermekek genotípusában az *ABC12* gén 12. exonjában homozigóta státusban hordozott új, az irodalomban korábbiakban nem közölt p.R116X nonsense-PTC mutációt detektáltuk. (Metodika: genomiális DNS preparáció perifériás vér limfocitáiból, a teljes génszakasz PCR amplifikációja, direkt automata szekvencia analízis). Mutációanalízisünk eredményének gyakorlati felhasználása a prevenció terén, DNS-alapú prenatális diagnosztikában biztosított.

Publikáció: eredményünket előadás formájában már közöltük, publikációja előkészületben van.

I.2.3. Comel-Netherton szindróma

Autoszomális recesszív, ritka elszarusodási zavar (MIM 256500). Kongenitális, generalizált ichthyosiform erythroderma, ectropium, majd egy típusos klinikai triász (ichthyosis linearis circumflexa, trichorrexia invaginata, atopia) jellemzi. Hátterében egy szerin proteáz inhibitor fehérje (LEKTI, limpho-epithelial Kazal-type inhibitor) génjének (*SPINK5*) mutációi állnak.

Eredmények: Hazánkban elsőként vizsgáltuk a *SPINK5* gént, és egy Comel-Netherton szindrómában szenvedő beteg esetében a 238insG és a 2468delA compound heterozygota státusban hordozott mutációkat detektáltunk.

Eredményeinket előadás és poszter-absztrakt formájában már közöltük (ESDR kongresszus (2006), J Invest Dermatol 2006, Vol 126, Supp 3, s39 (221)), folyóiratcikkben történő publikációja előkészítés alatt áll.

I.2.4. Conradi-Hünemann-Happle szindróma

Az X-hez kötött domináns öröklődésű Conradi-Hünemann-Happle szindróma (CDPX2, MIM 302960) a chondrodysplasia punctata elnevezésű heterogén betegségcsoportba tartozik. Kezdetben szegmentális ichthyosiform erythroderma jelentkezik, majd folliculáris atrophoderma és hyperpigmentáció alakul ki. Muszkuloszkeletális eltérések (epiphiseális kalcifikáció, aszimmetrikus végtag rövidülés, scoliosis, alacsony termet), heges alopecia, szegmentális cataracta, palmoplantaris keratoderma, fogászati eltérések jelentkezhetnek. A

fenotípus háttérében a 3beta-hydroxysteroid-Delta8-Delta7-isomeráz (másnéven emopamil-binding protein, EBP) gén mutációja áll, ami a lanosterol-cholesterol konverzió egy köztes lépését katalizálja.

Eredmények: két bőrtünetekkel és orthopédiai-radiológiai tünetekkel (chondrodysplasia punctata) is rendelkező beteg esetében végeztük el az EBP gén vizsgálatát. Egyik betegünk esetében in utero radiológiai vizsgálat vetette fel a fenotípus lehetőségét. Két új mutációt, a p.W129X PTC nonsense, valamint egy kis inszerciót, a 406insG mutációt azonosítottuk.

Publikáció: Eredményeink publikációra történő előkészítése, OTKA támogatás feltüntetésével, folyamatban van.

I.2.5. Monilethrix

A bőrfüggelék haj autoszomális domináns öröklődésű genodermatosisa (MIM 158000). Változó fokú alopecia, a hajsálak törékenysége, perifollikuláris hyperkeratosis jellemzi. A hajsálak orsószerű kiszélesedésének és elkeskenyedésének periodikus (0.7-1mm) váltakozása jellegzetes. Genetikai háttére heterogén: a haj cortex keratin gének (*KRT81*, *KRT83*, *KRT86* és *DSG4*) mutációi állnak a háttérében.

Eredmények: multi-locus vizsgálatunk során egy többgenerációs monilethrix által érintett nagycsalád esetében a *KRT86* (korábbi nomenklátúra szerint *hHb6*) gén p.E402K hot spot mutációját és Q139P ismert polimorfizmusát találtuk. Laborszintű metodikai újításunk volt a PCR reakciók reoptimalizálása mellett a heteroduplex emésztés valamint a nagyfelbontású olvadásgörbe elemzés szűrőmódszerének bevezetése.

Publikáció: eredményeinket poszter-absztrakt és előadás formájában ismertettük (ESDR kongresszus (2007) - J Invest Dermatol (2007), Volume 127 (502)), valamint publikációra előkészítettük, amit lehetőség szerint, további betegek analizésének elvégzése után, OTKA támogatás feltüntetésével tervezünk közzéadni.

I.2.6. Morbus Darier

A M. Darier (dyskeratosis follicularis, MIM 124200) autoszomális domináns öröklődésű, folliculáris elszarusodási zavarban ún. dyskeratosisban megnyilvánuló genodermatosis. A pubertás után, elsősorban a seborrheás bőrterületeken sárgásbarna színű, helyenként összefolyó, plakkokat képző keratotikus papulák jelennek meg. Jellegzetes körömelváltozások és nyálkahártya tünetek kísérhetik, ill. neuropszichiátriai tünetek gyakori társulását is megfigyelték. Háttérében az endoplazmatikus retikulum kalcium ATP-áz (SERCA2) kódoló *ATP2A2* gén mutációi állnak. 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.

Eredmények I. Magyarországi Darier-kóros betegek *ATP2A2* gén mutációanalízisét végeztük. Metodika: genomiális DNA preparáció perifériás vér limfocitáiból, konformációszenzitív gélben végzett heteroduplex analízis (CSGE), automata szekvenálás. Egy középkorú M. Darier, depresszió, cutis verticis gyrata és hyperprolactinaemia által együttesen érintett nőbeteg esetének feldolgozása kapcsán a Tins558 inszerciót találtuk az *ATP2A2* gén egyik allélján.

Publikáció: *Acta Derm Venereol* 2006; 86: 59-60

Eredmények II. Háron további M. Darier által érintett beteg esetét közzétettük. A betegek egymástól eltérő, az öröklődésű sajátosságainak megfelelően, heterozygota statusban hordoztak *ATP2A2* gén mutációkat. Egy esetben aminosav cseréje vezető p.T181R missense mutációt, egy másik esetben a 1821delC kis deléciót találtuk, ami frame shift révén

a fehérjeszintézist megszakító PTC-re vezetett. Új metodika bevezetésével bizonyítottuk egy introniális pozíciójú nukleotid csere (1288-6A>G) új splice site generálása által, a fenotípusra gyakorolt hatását. RNS szintű vizsgálatok: In silico splice site predikációs szoftver mellett RNS preparációt végeztünk perifériás vér limfocitáiból majd az RT-PCR reakció termékét agaróz gélelektroforézissel és szekvenálással verifikáltuk.

Publikáció: *Journal of Dermatological Science* (2005) 38, 231-234. A publikációk egy doktori dolgozat alapját képezték.

I.3 Egyéb genetikai hátterű bőrgyógyászati betegségek vizsgálatai

I.3.1. *CDKN2A* gén mutációinak vizsgálata multiplex primer melanomás és familiarisan halmozódó melanomás betegek körében

Eredeti munkatervünkön túlmutatóan, új, perspektívikusan klinikánk doktori képzését is szolgáló témát kezdtünk.

A melanoma malignum pathogenezisében számos epigenetikus faktor (pl. UV fény expozíció) mellett genetikailag meghatározott tényezők is szerepet játszanak (DNS-repair kontrolláló gének, pigmentációért felelős gének, humán melanocortin I receptor gén stb).

Az utóbbi években számos, a melanoma malignum képződésre fokozottabban predisponáló gén vált ismertté (pl: *CDKN2A*, *CDK4*, *MC1R* gének). Irodalmi adatok hívták fel a figyelmünket arra, hogy a gyakoribb, sporadikus melanoma malignumtól eltérően, a ritkább, primer multiplex fellépésű, valamint a familiárisan halmozódó melanoma malignum molekuláris genetikai háttere más.

A *CDKN2A* gén (vagy *INK4A/ARF* locus) a 9p21 kromoszomán lokalizált, 3 exonból áll (1 α / β , 2 és 3). Két alternatív splice variáns cyclin-dependens kináz inhibitor proteint kódol (p16^{INK4A} és p14^{ARF}). Ezen vad-típusú proteinek tumor szuppresszor aktivitással rendelkeznek, a sejt ciklus inhibitorai (p16^{INK4A}: a G1-S sejt ciklus checkpoint mechanizmusa részeként a tumor szuppresszor retinoblastoma (pRB) protein foszforilációját befolyásolja; p14^{ARF}: a sejtciklus G1-G2 átmenetét szakítja meg közvetve).

Eredmények. A pályázat futamideje alatt vezettük be klinikánkon a *CDKN2A* gén vizsgálatát. A *CDKN2A* gén számos mutációja vált ismertté napjainkig, közöttük a p.G101W alapító hatás révén elterjedt mutáció. Munkánk első szakaszában az európai és észak-amerikai melanomás beteg populációkban igen elterjedt p.G101W mutációnak a kimutatását célozzuk meg a magyarországi melanoma által érintett betegek körében. Vizsgálataink második fázisában tervezzük elvégezni a teljes *CDKN2A1* gén mutáció analízisét az adatbázisokban szereplő már ismert, de kevésbé gyakori előfordulású, illetve esetlegesen elsőként általunk azonosított új mutációk irányában.

Klinikánk nagyszámú beteget gondozó onkodermatológiai részlegének archív adatainak feldolgozása valamint újabb betegek adatainak klasszifikálása, regiszterbe rendezése, biológiai mintáinak gyűjtése folyamatban van. Vizsgálataink komplettálása a későbbiekben várható.

I.3.2. Pseudoxanthoma elasticum

Pseudoxanthoma elasticum (PXE, MIM 264800), bőrgyógyászati, szemészeti és cardiovascularis tünetekkel jellemezhető hereditár, szisztémás megbetegedés. Az *ABCC6* (MRP6) transzporter genetikai defektusa áll a hátterében.

Eredmények: Egy korai fellépésű, súlyos szisztémás tünetekkel bíró nőbeteg genotípusát vizsgáltuk. Metodika: DNS preparáció perifériás vér limfocitáiból, direkt szekvenálás. Betegünk tünetei hátterében compound heterozygóta formában az *ABCC6* gén allélein két, egymástól eltérő, a transzporter funkciót döntően befolyásoló nagy deléciót detektáltunk (új, az exon 24-25-et érintő deléció és a gyakran detektált exon 23-29-et érintő deléciót).

Kollaborációs partner: Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University of Regensburg, Debreceni Egyetem Orvos-és Egészségtudományi Centrum, Bőrgyógyászati Klinika, I. sz. Belgyógyászati Klinika).

Publikáció: *J Dermatol Sci.* 2005 Nov;40(2):115-21. Epub 2005 Sep 23.

II. Immunológiai háttérű bőrgyógyászati kórképek vizsgálata

II.1 Atopiás dermatitis

Az atopiás dermatitis (AD) klasszifikációja szerint, két fő klinikai forma különíthető el: extrinsic típusú AD (inhalatív vagy étel allergének szenzibilizációjára utaló emelkedett IgE szintekkel, a bőrtünetek korai fellépésével, enyhe férfi predomanciával, emelkedett interleukin-4 szinttel), és intrinsic típusú AD (normál tartományba eső totál IgE szinttel, specifikus IgE reaktivitás nélkül és alacsony interleukin-4 szinttel). Csupán a klinikai kép alapján a két kórforma nem különíthető el. Jelen kutatásunk célja volt a két atopiás forma pathomechanizmusában rejlő különbségek feltárása.

Előzmények: Előtanulmányaink során AD betegek perifériás véréből nyert limfocitáin cDNA gén-expressziós array vizsgálatot végeztünk, ahol 588, tematikus csoportokba rendezett humán cDNS szekvencia (onkogének, ion csatornák, apoptózis faktorok, transzkripciós faktorok, receptorok, citokinek, interleukinok, interferonok stb.) eltérő expresszivitás mintázatát észleltük extrinsic és intrinsic csoportba sorolt betegek között. 42 gén azonos mértékű emelkedett expresszivitást mutatott a két alcsoportban, 32 volt fokozott expresszivitású csupán az extrinsic mechanizmusú betegekben és 3 gén expressziója mutatott intrinsic dominanciát. Kollaborációs partner a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt-és Immunbiológiai Intézete volt.

Eredmények: Kezdeti céloom volt a megkezdett vizsgálataink komplettálása és részleteiben történő elemzése, verifikálása. Elsőként, az array metodikával kiszűrt, az atopia pathomechanizmusában korábbiakban nem valószínűsített adhéziós fehérje fokozott expressziójának bizonyítását kíséreltük meg. Az atopiás dermatitis klinikailag eltérő formáit (extrinsic és intrinsic formák) képviselő betegek perifériás véréből nyert limfocitáin gén-expressziós RT-PCR vizsgálatot kezdtünk. Kísérletünk egyelőre nem támasztotta alá a cDNS array eredményét, és ezt technológiai okokra vezetjük vissza. A kutatási téma nagy klinikai relevanciájára tekintettel, jelen OTKA pályázat lezárulását követően is további vizsgálataink tárgyát képezi.

II.2 Autoimmun hólyagos betegségek ethiopathogenezisének újabb infekto-genetikai aspektusai – TTV vizsgálatok

Az eredeti célkitűzéseinken túlmenően, új kutatási téma kidolgozását is megkezdttük, aminek alapjául szolgált laborunk technológiai adottsága valamint a Semmelweis Egyetem Bőrklinikáján archivált autoimmun bullosisok savóbankja.

A Torque Teno vírus (TTV) egyszálú, negatív-sense DNS genommal rendelkező, az Anellovirus genusba sorolt vírus. Irodalmi adatok szerint a vírusnak szerepe lehet pl. a súlyos bőrtünetekkel is társuló szisztémás lupus erythematosus (SLE) provokálásában. A multikauzális autoimmun hólyagos kórképek (bullosus pemphigoid (BP), a pemphigus vulgaris (PV), vagy a dermatitis herpetiformis (DH)) vonatkozásában is felmerült az infektológiai háttér, esetleges virális ágensek szerepe. Vizsgálataink során in silico módon, először a betegségek ismert antigén determinánsainak szekvenciáit – BP180 NC16 és C-terminális domének ill. BP230 BP-ben,; desmoglein3 (DSG3) PV-ben, desmoglein1 (DSG1) PF-ban; a szöveti és epidermális transzglutamináz, (TGM2 ill. TGM3 v. TGc ill. TGe) DH-ban - vetettük össze TTV eredetű fehérjeszekvenciákkal. Szignifikáns, hosszú szekvencia-egyezéseket a BP antigének esetében sikerült kimutatni. Meghatároztuk az egyes betegségcsoportokban a virális DNS prevalenciát a betegek savójában (n=93), majd az

értékeket egészséges, önkéntes véradók értékeivel vetettük össze (n=95). Módszer: nested PCR és valós-idejű PCR kimutatás kombinációja, validálás random szekvenálással.

Eredmények: Az autoimmun hólyagos betegek összevont, általános csoportjában a TTV prevalencia értéket a kontroll csoportéval összevethetőnek találtuk (74/93 (77,89%) vs. 62/95 (65,26 %), $p < 0,076$), csak úgy, mint a PV csoport (19/33) esetében. A DH betegek TTV DNS prevalencia értéke magasabb volt, itt csupán egy tendenciát észleltünk (17/20), amely magasabb esetszámú csoportnál szignifikáns is lehet. Eredményeink alapján a BP betegek körében szignifikánsan magasabb (36/40, $p < 0,032$) prevalenciát sikerült kimutatnunk.

Vizsgáltuk továbbá, hogy a BP betegek limfocitái felismerik-e a TTV vírus fehérjét. Limfocita transzformációs tesztet (LTT) végeztünk BP betegek (n=4) ill. kontrollok (n=3) limfocita kultúráin szintetikus TTV peptidekkel. A BP betegek limfocitái erős reakciót mutattak a TTV peptidekre reagálva. Eredményünk felveti annak a lehetőségét, hogy egy hosszasan fennálló, lappangva hordozott TTV fertőzés – mivel a vírusantigének nagyfokú hasonlóságot mutatnak a BP egyes antigénjeinek epitópjaival - szerepet játszhat a BP pathomechanizmusának kialakulásában.

Eredményeinket OTKA támogatás feltüntetésével publikáltuk: *Exp Dermatol. 2008 May;17 (5):446-54*. A publikációnk egy doktori értekezés alapját képezte.

Publikációk (2005-2008):

Könyvfejezet: **1** (folyamatban)
Folyóiratcikk: OTKA támogatás feltüntetésével **4** (megjelent)
(a közeljövőben minimálisan további 3)
OTKA támogatás feltüntetése nélkül **9** (megjelent)
Absztrakt: **13**

Prezentációk (2005-2008):

27 előadás és poszter prezentáció magyar és angol nyelven. (Megjegyzés: a prezentációk absztraktjai formai és terjedelmi okokból nem, azonban a poszterek többsége végleges formátumukban tartalmazta az OTKA támogatás feltüntetését).

Díjak, elismerések:

A Magyar UNESCO Bizottság és a L'oreal Magyarország "A Nőkért és a Tudományért" 2007. évi magyar ösztöndíja.

A Magyar Dermatológiai Társulat Nagygyűlésének poszterdíja (2007).

Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle legjobb kísérletes munkája (2006).

Képzés, oktatás:

A pályázat kapcsán kifejtett kutatómunkához is köthetően munkacsoportunkban 2 fő PhD fokozatot szerzett, valamint 3 fő diplomamunkájának képezte alapját eredményeink prezentációja, amiben témavezetőként működtem közre.

Összefoglalás:

Az elmúlt négy évben OTKA pályázatom segítségével munkacsoportunk jelentős és szerteágazó kutatómunkát végzett az örökletes és autoimmun bőrgyógyászati kórképek epidemiológiai és molekuláris genetikai elemzése terén.

Kutatási tervemben foglaltakkal összhangban, számos genodermatosis (epidermolysis bullosa csoport, elszarusodási zavarok) esetében, a már korábbiakban megkezdett géndiagnosztikai vizsgálataink komplettálása mellett, új gének analízisét vezettük be, ezáltal megteremtettük hazánkban a legsúlyosabb örökletes bőrgyógyászati kórképek (epidermolysis bullosa lethalis Herlitz, Harlequin-ichthyosis) vizsgálatának alapjait. Kutatómunkánk gyakorlati felhasználása a prevenciót célzó DNS-alapú prenatális diagnosztikában biztosított.

Eredeti munkatervünkön túlmutatva, onkodermatológiai tárgyú kutatásokat is végeztünk. Genetikai szűrést kezdtünk a familiárisan halmozódó, illetve primer multiplex melanoma malignum által érintett betegek körében, valamint behatároltuk az epidermolysis bullosa dystrophicához társuló spinocelluláris carcinoma egyik lehetséges terápiás célpontját. Az autoimmun hólyagos betegségek pathogenezisében újabb, infekto-genetikai tényezőként azonosítottuk a TT vírust.

Kutatómunkánk során vállalt célkitűzéseink egy része, az elvégzett kísérletes munka ellenére, technológiai okokra visszavezethetően nem valósult meg (atopiás dermatitis új pathogenetikai faktorainak verifikálása). Tekintettel a téma nagy klinikai relevanciájára, kutatómunkánk jelen OTKA pályázat lezárulását követően is prioritást élvez.

Eredményeinkről nemzetközi publikációk, valamint előadások és poszterek formájában is beszámoltunk. További publikációink előkészítése folyamatban van.

Köszönöm az OTKA Bizottság támogatását és a fentiek alapján kérem a záróbeszámoló elfogadását.

Budapest, 2009-02-28

Dr. Medvecz Márta témavezető