

A szteroid-rezisztens nephrosis két új mechanizmusa

Doktori értekezés

Dr. Balogh Eszter

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Tory Kálmán, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Váradi András, egyetemi tanár
Dr. Ledó Nóra, klinikai orvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Vásárhelyi Barna, egyetemi tanár
Szigorlati bizottsági tag: Dr. Haltrich Irén, tudományos főmunkatárs
Dr. Szabó László, osztályvezető főorvos

Budapest
2020

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
Rövidítések jegyzéke	3
1 Bevezetés	4
1.1 Sztteroid-rezisztens nephrosis szindróma	4
1.2 A podocin fehérje lokalizációja, szerkezete és funkciója	5
1.3 A podocin fehérjék oligomerizációja – domináns negatív hatás és interallélikus komplementáció	6
1.4 Vesezületett diszkeratózis, humán telomeráz komplex, pszeudouridiláció....	11
1.5 Egy új <i>DKC1</i> mutáció azonosítása	15
2 Célkitűzések	21
3 Módszerek	22
3.1 A podocin-oligomerizáció vizsgálata	22
3.1.1 Podocint expresszáló plazmidok felsokszorozítása	22
3.1.2 A podocin variánsok tranziens expressziója, immunprecipitációja és peptidelúciója.....	23
3.1.3 Natív podocinok jelölése fluorofórokkal és az azt követő fluoreszcencia-spektroszkópia	25
3.1.4 Statisztikai elemzések.....	25
3.2 Az új diszkerin mutáció hatásának vizsgálata	26
3.2.1 Diszkerin és NOP10-et expresszáló plazmidok létrehozása	26
3.2.2 Mutáns diszkerin és NOP10 fehérjét kódoló plazmidok létrehozása	28
3.2.3 A diszkerin és NOP10 fehérjék expressziója, immunprecipitációja, peptidelúciója.....	28
3.2.4 Nyomásperturbációs fluoreszcens spektroszkópia	29
3.2.5 A humán diszkerin lokalizációjára vonatkozó immuncitológiai vizsgálatok	30
3.2.6 Zebrahalak genotipizálása, mutáns zebrahalak azonosítása	31
3.2.7 <i>Dkc1</i> ^{-/-} és <i>dkc1</i> ^{+/?} genotípusú zebrahal lárvákon végzett áramlási citometriás vizsgálatok a telomerhossz meghatározására	35
3.2.8 <i>Dkc1</i> ^{-/-} és <i>dkc1</i> ^{+/?} genotípusú halakon végzett western blot vizsgálatok (<i>dkc1</i> , p53).....	35

3.2.9	X-kromoszóma inaktiváció mértékének meghatározása humán sejtekben 36	
3.2.10	Vad és mutáns zebrahal törzsekből kivont RNS-en végzett immuno- northern blot technika.....	39
3.2.11	A hal és a humán 28S és 18S RNS alegységek érintettségének vizsgálata 40	
3.2.12	Statisztikai elemzések.....	41
4	Eredmények.....	42
4.1	A podocin oligomerizáció vizsgálatának eredményei.....	42
4.2	Az új diszkerin mutáció vizsgálatának eredményei.....	44
4.2.1	A Glu206Lys diszkerin-NOP10 valamint a diszkerin-Thr16Met NOP10 köölcsönhatásának változásai a vad variánssal való asszociációhoz képest	44
4.2.2	A vad és Glu206Lys diszkerin lokalizációjának vizsgálata	47
4.2.3	A CRISPR/Cas9 injektálást követően kiszűrt mutáns zebrahal törzsek... 48	
4.2.4	Az áramlási citometriával meghatározott telomerhossz mérések eredményei.....	52
4.2.5	A <i>dkc1</i> ^{-/-} zebrahalak p53 szintje	54
4.2.6	Az X-kromoszóma inaktivációs mérések eredményei	55
4.2.7	A <i>dkc1</i> ^{-/-} mutáns zebrahalak riboszomális RNS-pszéouridilációja	59
4.2.8	A <i>dkc1</i> ^{-/-} zebrahalakból kivont RNS-en végzett integritási mérések eredményei.....	63
5	Megbeszélés.....	68
5.1	A podocin-oligomerizáció vizsgálata	68
5.2	Az új <i>DKCI</i> mutáció hatásának vizsgálata.....	69
6	Következtetések.....	73
7	Összefoglalás	74
8	Summary.....	75
9	Irodalomjegyzék	76
10	Saját publikációk jegyzéke	86
10.1	A disszertációhoz kapcsolódó közlemények jegyzéke.....	86
10.2	A disszertációtól független közlemények jegyzéke	87
11	Köszönetnyilvánítás	88

Rövidítések jegyzéke

SRNS	szteroid-rezisztens nephrosis szindróma
GFB	glomeruláris filtrációs barrier
ESRD	végstádiumú veseelégtelenség
FSGS	fokális szegmentális glomeruloszklerózis
DNS	dezoxiribonukleinsav
RNS	ribonukleinsav
RNP	ribonukleoprotein
rRNS	riboszomális RNS
snRNS	kis nukleáris RNS
snoRNS	kis nukleoláris RNS
scaRNS	kis Cajal-test asszociált RNS
DC	dyskeratosis congenita / veleszületett diszkeratózis
TERT	telomeráz reverz transzkriptáz
TERC	telomeráz RNS komponens
IRES	belső riboszóma- belépési hely
LOD	„logarithm of the odds”
NGS	új generációs szekvenálás
cDNS	komplementer DNS
HEK	humán embrionális vesesejt
FRET	Förster-féle / fluoreszcens rezonancia-energia transzfer
GFP	zöld fluoreszcens fehérje
HA	Influenza Haemagglutinin
BSA	borjú szérum albumin
PBS	Foszfát pufferes sóoldat
CTT	C-terminális helikális rész
RIN	RNS integritási szám

1 Bevezetés

1.1 Szteroid-rezisztens nephrosis szindróma

A gyermekkorban kialakuló nephrosis szindróma az esetek 10-20%-ában rezisztens a szteroid-kezelésre. A szteroid-rezisztens nephrosis a gyermekkori krónikus veseelégtelenség 6-7%-áért felelős. Prognózisa rossz, hosszútávon az esetek többségében vesepótló kezelést tesz szükségessé. Elkülönítünk genetikai és egyéb formákat, mely alapvető kérdés a terápia meghatározásában. Az egyéb formák elsősorban immunológiai eredetet jelentenek, de előfordulnak ritkább, metabolikus, toxin-mediált és infekció talaján kialakuló típusok is. A genetikailag meghatározott szteroid-rezisztens nephrosis szindróma (SRNS) formák hátterében leggyakrabban az *NPHS2*, *WT1*, *NPHS1*, *MYO1E*, *TRPC6*, *INF2* mutációi állnak ¹, melyek valamennyien a glomeruláris filtrációs barrier (GFB) valamely fehérjéjét kódoló gének. A glomeruláris filtrációs barrier fenesztált endothelből, glomeruláris bazális membránból és podocita lábnyúlványokból áll ². Az SRNS hátterében leggyakrabban a glomeruláris résmembránt alkotó (*NPHS1*, *NPHS2*, *CD2AP*), a podociták szerkezeti (*MYO1E*, *ARHGDI1*, *TTC21B*, *WDR73*), bazális membránhoz való adhéziójáért (*LAMB2*, *ITGA3*, *LAMB3*, *ITGB4*, *CD151*), differenciációjáért és megfelelő funkciójáért (*WT1*, *PLCE1*, *PTRO*) felelős fehérjéket kódoló gének mutációi állnak (a teljesség igénye nélkül), és az érintett gének azonosítása még nem zárult le ^{3, 4}. A glomeruláris résmembránt érintő mutációk okozta SRNS a transzplantált vesében nem újul ki.

Az *NPHS1* a nephrin fehérjét kódoló gén. Mutációi a finn típusú, autoszomális recesszív módon öröklődő veleszületett (az élet első három hónapjában kialakuló) nephrosissal társulnak. A podocin fehérjét kódoló *NPHS2* az alábbiakban kerül majd részletezésre. A *CD2AP* által kódolt fehérje a nephrinnel és a podocinnal is interakcióban áll, hibás szerkezete congenitalis nephrosist okoz. A *MYO1E* a podociták citoszkeleton fehérjéje, a gén mutációi kisgyermek- vagy iskoláskorban vezetnek végstádiumú veseelégtelenséghez. A podociták adhéziójáért felelős laminin béta 2 lánc meghibásodása/hiánya a *LAMB2* mutációi következtében a congenitalis nephrosissal, és/vagy microcoriával és neuromuscularis megbetegedéssel járó Pierson-szindrómához vezetnek. A *WT1* leggyakrabban *de novo* kialakuló mutációit autoszomális domináns öröklésmentet mutató nephrosis szindróma kapcsán ismerjük, mely nagy Wilms-tumor

kockázattal valamint fiú gyermekeknél a genitourinális traktus fejlődési rendellenességeivel jár (Denys-Drash szindróma). A *TRPC6* egy, a podociták apikális membránjában elhelyezkedő kalciumcsatornát kódol, melynek károsodása már gyermekkorban fokális szegmentális glomeruloszklerózis (FSGS) kialakulásához vezethet ⁵⁻⁷. Az *INF2* által kódolt Inverted-formin 2 az aktin filamentumok polimerizációjáért és depolimerizációjáért felelős fehérje. Elsősorban podocitákban és némely tubuláris vesesejtben expresszálódik, de leírták expresszióját Schwann-sejtekben is ⁸. A nephrinnel is kapcsolatban áll. Mutációi késői (3-4. életévizedben jelentkező) FSGS-hez, illetve bizonyos mutációk esetén Charcot-Marie-Tooth szindrómához (herediter motoros és szenzoros perifériás neuropathia, lábdeformitás), illetve halláscsökkenéshez vezethetnek ^{9, 10}.

1.2 A podocin fehérje lokalizációja, szerkezete és funkciója

A podocin fehérjét az 1-es kromoszómán elhelyezkedő *NPHS2* gén kódolja, mutációinak az SRNS patomechanizmusában betöltött szerepére 2000-ben mutatott rá Corinne Antignac munkacsoportja a párizsi Necker Kórház nephrológiai kutatólaboratóriumában ¹¹. Ezen SRNS forma autoszomális recesszív öröklődésmentet mutat. Az így létrejövő nephrosisa 3 hónap-5 éves kor közötti kezdet, rendszerint 10 éves kor előtt kialakuló végstádiumú veseelégtelenség (ESRD) és az extrarenális tünetek hiánya jellemző. Az *NPHS2* gén által kódolt podocin fehérje kizárólag a podocitákban expresszálódik. Integráns membránfehérje, a stomatin család tagja ¹². A teljes fehérje 383 aminosavból áll, az integráns membránrész a 105-121 aminosavakra terjed ki. Hajtű-szerű szerkezetet mutat, a fehérje N- és C-terminálisa a podociták lábnyúlványának citoszolja felé néz, interakciós partnerek révén a citoszkeletonnal teremt kapcsolatot valamint a többi podocin molekulával homooligomereket képez. Az intramembrán szakasz a sejtmembrán lipidtutajaiban helyezkedik el, ezen a ponton kapcsolódik a podociták közötti résmembránt alkotó nephrin fehérjéhez. (A lipidtutajok olyan membrán mikrodomének, ahol a sejt jelátviteli folyamatai egy ponton térben és időben összekapcsolódhatnak, növelve azok hatékonyságát). A stomatin fehérjék családjá az eritrociták membránjából ismert. A stomatin 200-600 kDa méretű fehérje, 9-12-szeres oligomerekbe rendeződik annak C-terminálisa révén valamint a sejtmembrán lipidtutajaihoz horgonyzódik rövid intramembrán szakaszával. Ez a két folyamat, a C-

terminális oligomerizáció és lipidtutajokhoz való horgonyzódás, egymásnak nem feltétele ¹³.

A podocinnal interakcióba lépő további fehérjék a CD2AP és a TRPC6 ¹⁴. A podocin funkciója jelen ismereteink szerint a glomeruláris résmembrán szerkezetének fenntartása és az intracelluláris jelátviteli kapcsolatok révén a podociták adaptációjának elősegítése ¹⁵, de részleteiben és mélységében funkciója mindmáig nem egészében ismert.

1.3 A podocin fehérjék oligomerizációja – domináns negatív hatás és interallélikus komplementáció

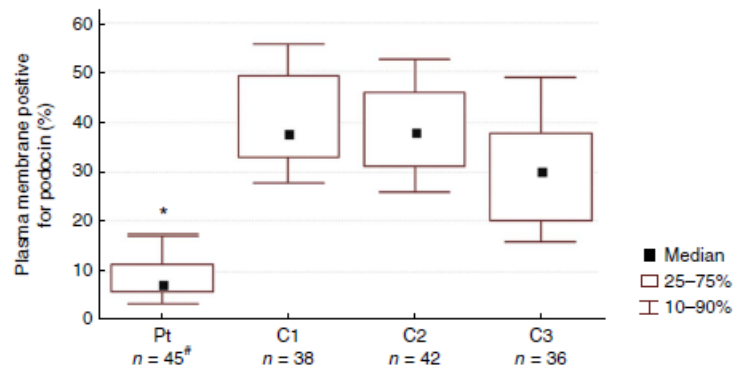
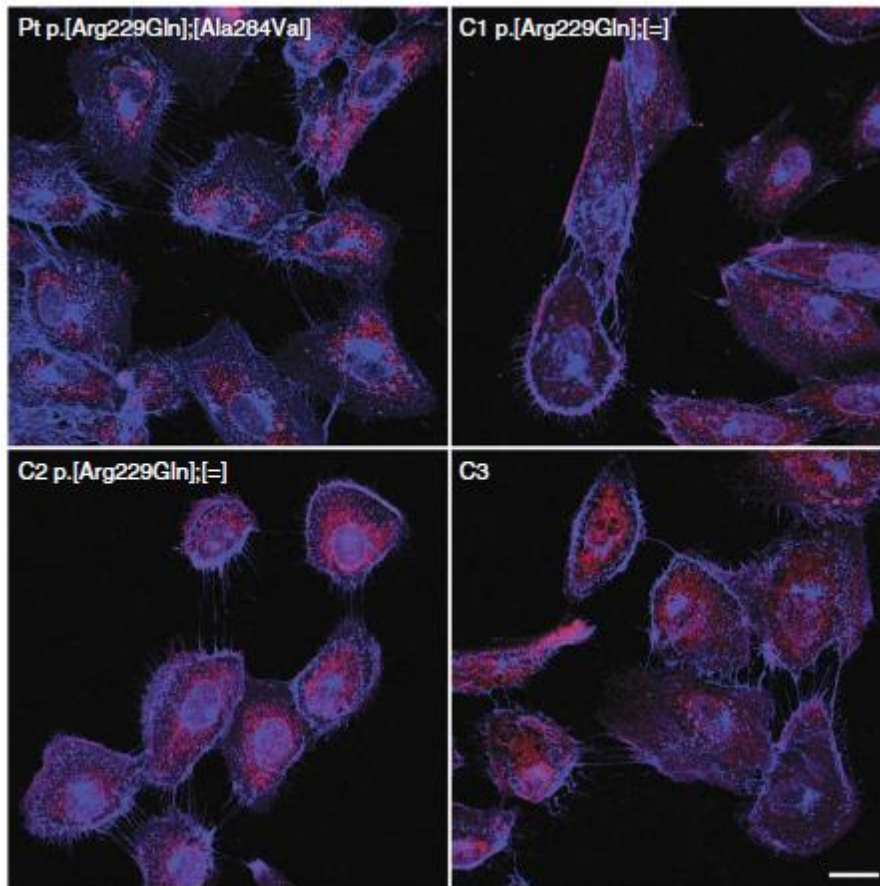
Az SRNS congenitalis és infantilis formájának hátterében 15-39%-ban, a gyermekkori forma mögött 13-14%-ban állnak az *NPHS2* mutációi ^{16, 17}.

A podocin fehérje oligomerizációs készsége a bevezetőben került említésre. Kutatócsoportunk 2014-es közleménye szolgált a podocin témában történt kutatásaink alapjául ¹⁸. Ezen cikk megfogalmazza a podocint kódoló *NPHS2* példáján, hogy autoszomális recesszív módon öröklődő betegségekben egy allél patogenitása lehet a transz-asszociált allélon (*NPHS2* esetében annak 3' végén) elhelyezkedő mutáció függvénye. Az egyik allélról átíródó fehérje kifejthet domináns negatív vagy éppenséggel ellenkezőleg, komplementáló hatást a másik allélról átíródó fehérjére. Ez a jelenség már sok évtizede ismert a biológiában ¹⁹ a dolog újdonságát azonban elsősorban az képezi, hogy humán betegségekben nem volt ismert hasonló jelenség. Ez alapvető szempont lehet a klinikai diagnosztikus és terápiás lépésekben valamint az érintett párok genetikai tanácsadásában. Az említett jelenséget az p.Arg229Gln (R229Q) podocin variáns kapcsán figyelték meg. Kutatócsoportunk így korábban kimutatta, hogy az *NPHS2* gén gyakori variánsa (R229Q, MAF: 3,6%, rs61747728 ²⁰) csak meghatározott transz-asszociált variánsokkal együtt patogén. Homozigóta formában önmagában nem okoz betegséget ²¹. Az R229Q variánst az európai átlagpopuláció hét százaléka hordozza, így fontos annak megértése, hogy mely társulásokban patogén ^{18, 22, 23}.

A podocin a citoszolba nyúló részei révén di-és oligomereket képez. Az eddigi ismeretek alapján N- és a C-terminálisa is részt vesz a di-és oligomerizációban ²⁴. Az egyes domének pontos szerepe ebben egyelőre nem ismert.

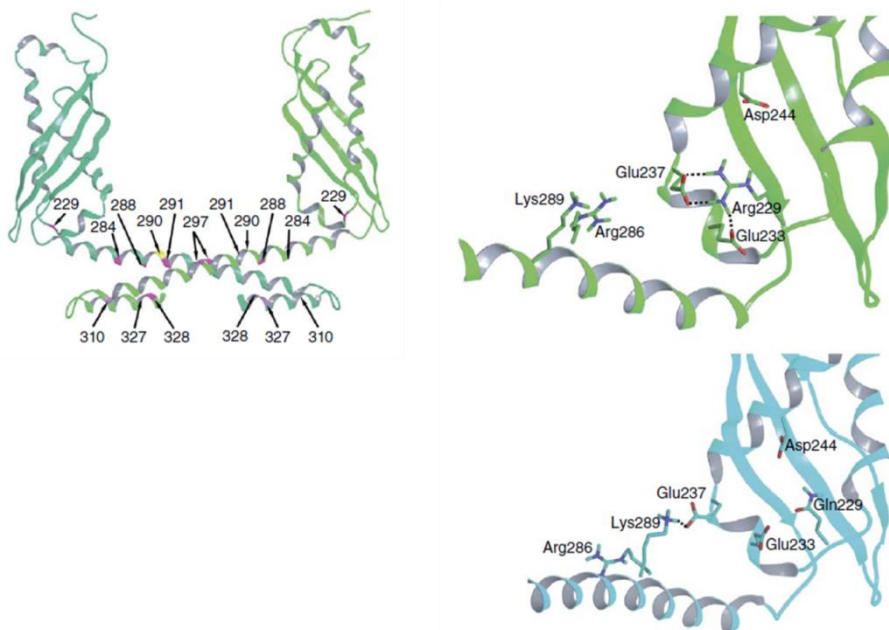
Kutatócsoportunk korábban azt figyelte meg, hogy SRNS-ben szenvedő betegek többségében a p.Arg229Gln csak bizonyos, 7-8. exonokat érintő mutációkhoz társult. A leggyakrabban érintett aminosavak az Ala284, Ala288, Arg291, Ala297, Glu310, Leu327 és a Gln328 voltak. A p.Val290Met közeli elhelyezkedése ellenére nem bizonyult patogén társulásnak a p.Arg229Gln-nal, melyet részben szerkezeti eltérésekkel magyaráztak²⁵.

A C-terminális szakasz patogén mutációi sejtkultúrában végzett, fehérjelokalizációs kísérletek és *in silico* számított fehérjeszerkezeti modellek alapján domináns negatív hatással bírhatnak a vad podocinnál mérsékelten rigidebb szerkezetű, p.Arg229Gln podocinra. Amely mutációkkal a p.Arg229Gln patogén, azokkal a fehérje variánsokkal a sejtmembránba való kijutása gátolt, a heterooligomerek intracellulárisan helyezkednek el. A homozigóta formában ismert patogén p.Ala297Val variáns a vad podocin membránba kihelyeződését is mérsékelheti, de ez csak jelzett mértékű, betegséget így nem okoz (heterozigóta formában tehát nem patogén), azonban az p.Arg229Gln podocint olyan mértékben bent rekeszti az intracelluláris kompartmentekben, hogy társulásuk fiatal felnőttkori FSGS-hez vezet. Vizeletből kivont podocitákban is sikerült igazolni ezt az észrevételt egy másik (p.Arg229Gln- p.Ala284Val) patogén társulás esetében, ahol endogén podocin nem lelhető fel érdemi mennyiségben a sejtmembránban (1.ábra).



1. ábra: Endogén podocin elhelyezkedése vizeletből kivont podocitákban p.Arg229Gln és p.Ala284Val variánsokat hordozó, SRNS miatt gondozott (Pt) és nem *NPHS2*-asszociált glomerulopathiában szenvedő betegeknél (C1-3), utóbbiakból ketten heterozigóta p.Arg229Gln hordozók. Piros: endogén podocin Kék: wheat germ agglutinin, (WGA) membránmarker. Az immunfluoreszcens kép alatt számszerűsített formában ábrázolható a membránlokalizált podocin az endogén podocin borította, WGA-val jelölt membránfelület százalékában (n: a vizsgált sejtek száma).¹⁸

Fehérjeszerkezeti modellekben a vad homodimerek C-terminális (aminosavak 161-383) részét vizsgálva azt találták, hogy a két feji régiót helikális, coiled-coil doméneket alkotó szakaszok (aminosavak 271-372) kötik össze. A p.Arg229Gln a fehérje globuláris feji részében helyezkedik el. Az alapesetben itt található Arg229 három másik aminosavval (Glu233, Glu237, Asp244) képez hidrogénkötést. Az Arg229Gln csere következtében ebből két (Glu233, Glu 237) kötés megszakad és két új jön létre (Arg286, Lys289; 2. ábra), amelyek újabb fej- és helikális rész közötti kapcsolatok lévén rigidebbé teszik a fehérje szerkezetét. A patogén társulások (p.Arg229Gln-p.Ala284Val/p.Ala297Val heterodimerek, p.Ala284Val homodimerek) szerkezete eltér a nem patogén társulásokétól (pl. vad-p.Arg229Gln, vad-p.Ala284Val heterodimerek), a nem patogén társulások szerkezetükben nagymértékben egyeznek a vad-vad podocin homodimerével (2.ábra).



2. ábra: Vad podocin homodimerek szerkezeti modellje a C-terminális rész ábrázolásával (aminosavak 161-383) és a p.Arg229Gln variáns hatása a podocin szerkezetére. Az aminosavcsere hatására a Glu233-al és a Glu237-el a 229. aminosav kapcsolata megszakad, és két új hidrogén-kötés jön létre a Glu237-Lys289 és Arg286 aminosavak között, így növelve a fehérje rigiditását. ¹⁸

Fenti eredményeknek közvetlen hatása van a genetikai tanácsadásra. Ha egy szülőpár egyike az 1-6. exonokban hordoz mutációt, a másik pedig a p.Arg229Gln podocin variánst kódoló allélt, akkor a gyermekük nem lesz érintett. A jelenség rávilágított a podocin di-és oligomerizációjának klinikai jelentőségére, és a molekuláris alapok megértésének fontosságára.

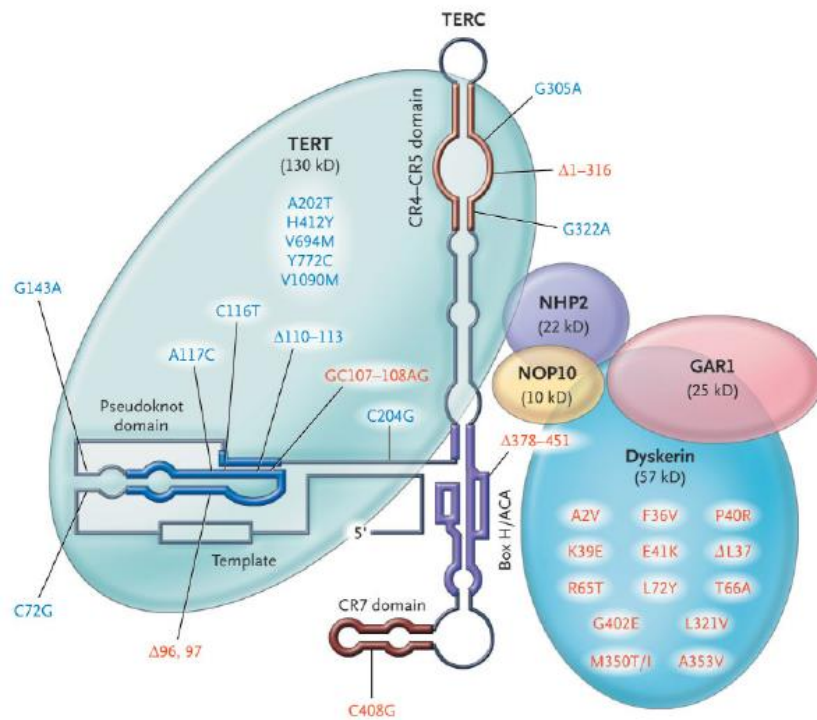
1.4 Veleszületett diszkeratózis, humán telomeráz komplex, pszeudouridiláció

A veleszületett diszkeratózis (dyskeratosis congenita, DC) egy öröklött, csontvelő elégtelenséggel, leukoplákiával, körömdisztrófiával, korai öregedéssel és fokozott tumorkockázattal járó kórkép. Öröklődésmenete lehet X-hez kötött, autoszomális domináns és autoszomális recesszív, valamennyi forma hátterében a telomerhosszabbító apparátus fehérjéit kódoló gének (*TERT*, *TERC*, *DKC1*, *NOP10*, *GAR1*, *NHP2*, *TINF2*) mutációi állnak. Az X-hez kötött diszkeratózis formákat a *DKC1* (*Cbf5p/NAP57*) mutációi okozzák²⁶. A kódolt diszkerin fehérje a telomeráz komplex része, de emellett ellát egy poszttranszkripciós RNS módosítási feladatot is, az úgynevezett pszeudouridilációt, ahol az uridin bázis pszeudouridinné alakul át. Az eddig ismert valamennyi X-hez kötött veleszületett diszkeratózis hátterében a *DKC1* azon pontmutációi állnak, amelyek nem annak pszeudouridilációért felelős katalitikus helyét kódoló régiójában helyezkedtek el. A diszkeratózisban leírt mutációk elsősorban a gén 5' és 3' végeiben találhatóak²⁷⁻³¹.

A diszkerin erősen konzervált fehérje, szerkezete az archeáig visszamenően hasonló a humánéhoz. A humán diszkerin fehérje 514 aminosavból áll. Két, kristályszerkezeti vizsgálatokkal jól elkülöníthető szerkezeti egységet tartalmaz, az úgynevezett katalitikus/ pszeudouridin szintáz és archeozin transzglykoziláz (PUA) doméneket³¹.

A diszkerin fehérje a telomeráz reverz transzkriptázzal (TERT), a telomeráz RNS komponenssel (TERC) és a NOP10, NHP2 és GAR1 fehérjékkel alkot ribonukleoprotein komplexet (3. ábra). A diszkerin egyik, ismertebb funkciója a kromoszómavégi telomerrégiók meghosszabbítása, mely nélkül, mivel a DNS polimeráz a kromoszómák 3' végének meghosszabbítására teljes mértékben nem képes, azok minden sejtosztódással (DNS replikációval) rövidülnének. Ez védi meg a kromoszómákat az egymással való összetapadástól és a degradációtól, mely egy ponton túl a sejtek apoptózisához vezetne³². Telomeráz funkcióját ribonukleoprotein komplexben tölti be, a telomeráz reverz transzkriptázzal (TERT) és a TERC-el együtt. A TERT felelős a katalizátor funkcióért, a TERC adja a templátot a 6 bázispárból álló telomer szekvencia (5'-TTAGGG-3') kromoszómák 3' végéhez való illesztéséhez³²⁻³⁴. A *TERT* mutációi a telomeráz aktivitás csökkenése révén elsősorban aplasztikus anaemiával, csontvelő elégtelenséggel járó kórképekben fordulnak elő (az arra való hajlamot növelik), klasszikus diszkeratózis fenotípust ritkán okoznak, emellett

előfordulnak pulmonális fibrózis háttérben is. A *TERC* mutációi autoszomális domináns módon öröklődő DC formákat okoznak, itt is előfordulhat pulmonális fibrózis³⁵⁻³⁷. A *DKCI* mutációi megtartott telomeráz aktivitás mellett járnak telomerhossz rövidüléssel és DC, súlyos esetben Hoyeraal-Hreidarsson szindróma fenotípussal^{36, 38}. A Hoyeraal-Hreidarsson szindróma egy intrauterin növekedésbeni és fejlődésbeni elmaradással, mikrocefáliával, cerebelláris hipopláziával és progresszív pánцитopéniával járó kórkép^{39, 40}.



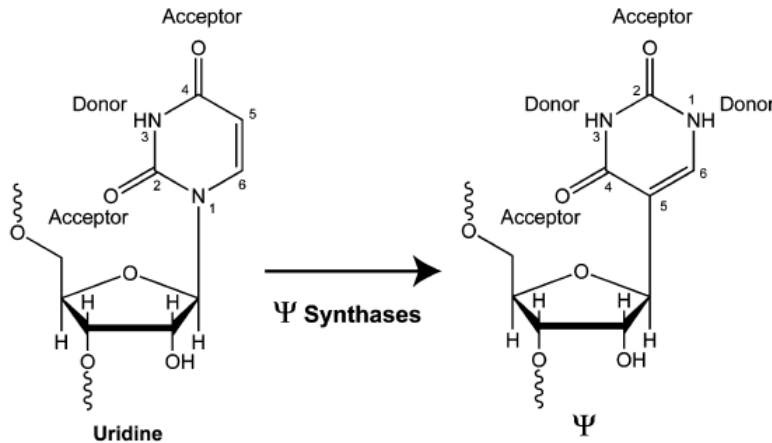
3. ábra: Sematikus ábra a telomeráz komplex szerkezetéről és a kódoló gének gyakori mutációiról; pirossal a DC fenotípust, kékkel a kizárólag csontvelő érintettséget okozó mutációk láthatóak (egybetűs aminosavkóddal). A telomeráz komplex a telomeráz reverz transzkriptázból (TERT), a telomeráz RNS komponensből (TERC) és a diszkerin-NOP10-NHP2-GAR1 fehérjékből felépülő ribonukleoprotein komplex.³⁵

A diszkerin másik, kevésbé ismert funkciója az RNS-ek pszeudouridilációja. Elsősorban a riboszomális és a kis nukleáris RNS-ek pszeudouridilálásában vesz részt. A TERC, mely egy H/ACA bokszt tartalmazó kis nukleoláris RNS, ezen régiója révén, direkt bázispárosodás útján, képes a pszeudouridilálható RNS-ek felismerésére⁴¹. A NOP10 és a GAR1 fehérjék körülölelik ezt a katalitikus domént. A pszeudouridiláció a

metiláció mellett az egyik leggyakoribb poszttranszkripciós RNS módosítás, a sejten belül a nukleoluszban és a Cajal-testekben zajlik. A pszeudouridin (ψ) izomerizáció révén jön létre az uridin bázisból. Eukarióta sejtekben jelen ismereteink szerint minden pszeudouridiláció specifikus módon, H/ACA bokszt tartalmazó guide RNS-ek mentén történik. A H/ACA RNS-ek valamennyien a DNS nem kódoló, introni szakaszairól íródnak át. Több mint 100 ilyen RNS ismert ⁴², több mint 100 pszeudouridilációs helyre, mely adatok még nem véglegesek. A H/ACA RNS-ek a pszeudouridiláció helyén, a nukleoluszokban és a Cajal-testekben találhatóak meg, a nukleoluszokban kis nukleolaris (snoRNS), a Cajal-testekben kis Cajal-test asszociált (scaRNS) RNS-ek formájában. Az snoRNS-ek a 18S, 5.8S, és 28S riboszomális RNS-ek, a scaRNS-ek elsősorban a spliceszómához szükséges kis nukleáris RNS-ek pszeudouridilációját végzik. Legnagyobb számban a riboszomális (a bázisok 1,4 %-a) és a spliceoszómát alkotó nukleáris (a bázisok 7%-a) RNS-ek érintettek a pszeudouridiláció folyamatában ⁴³. A pszeudouridiláció további egy hidrogénkötés létrehozása révén növeli az érintett RNS stabilitását, rRNS esetén a transláció megbízhatóságát ^{44, 45}. Az átalakítandó uridin bázis 14-15 bázisnyira helyezkedik el a guide RNS H (ANANNA) vagy ACA bokszához kötő RNS szakaszoktól. A cél és a guide RNS között bázispárosodás történik az érintett uridint kivéve, az így képződött teret nevezzük pszeudouridilációs zsebnek. ⁴¹. Öt pszeudouridin képződéséért felelős szupercsalád ismert, a diszkerin a TruB családba tartozik. Minden pszeudouridin szintázra jellemző egy olyan hurok a szekunder szerkezetben, mely a katalízis szempontjából kritikus aszpartát aminosavat tartalmazza. A TruB család egyéni sajátossága, hogy C-terminálisán egy jelen funkcióban érdemi szerepet nem kapó, azonban számos DC háttérben érintett PUA (archeozin transzglikoziláz) domént tartalmaz (élesztősejtekben az ACA bokszt kötéséért felelős így növelve a guide RNS bekötésének specificitását), szerepét eukariótákban még nem értjük teljesen.

A pszeudouridin szintázok számos különböző szubsztrátjuk ellenére specifikus átalakításokra képesek. A TruB család az aszpartát mellett további közeli, konzervált, poláris oldalláncokat (hisztidin, lizin, aszparagin) tartalmaz, melyek egymással sóhidat képezve körülölelik a katalitikus helyet. Az izomerizáció során átmenetileg megszakad az uridin bázis és a ribóz gyűrű közötti kapcsolat, ezt rotáció majd az 5-ös szénatomhoz

való visszakapcsolódás követi, így egy további H- donor (kötőhely) keletkezik az új bázison ⁴⁶ (4. ábra).



4. ábra: Az uridin izomerizációja pszeudouridinné az RNS láncban, a donor és akceptor atomok jelölésével. Az izomerizáció során átmenetileg megszakad az uridin és a ribózcgyűrű kapcsolata, ezt egy rotáció követi, majd az ötödik szénatom ismét visszacsatlakozik a ribóz gyűrűhöz, amellyel egy új hidrogénkötőhely keletkezik ⁴⁶.

Az uridin pszeudouridinné alakítása következtében az RNS foszfodiészter kötésekkel összefűzött gerincének a rigiditása megnő, az RNS molekulára pedig összességében stabilizáló hatással bír, ugyanis a pszeudouridin bázisok az uridinnál erősebben kötődnek az adenin bázisokhoz, mely befolyással lehet a pszeudouridilált RNS-ek funkciójára is. Termális stabilitásának növekedését is igazolták. A pszeudouridiláció biológiai szerepe egyelőre még nem teljesen tisztázott ⁴⁷. A rRNS pszeudouridilációjának zavara a fehérjeszintézis és a sejtnövekedés zavarához vezet, hiányában a rRNS a tRNS-t kisebb affinitással köti meg és így a translációs hatékonyság csökken. A spliceozómát alkotó snRNS-ek pszeudouridilációjának csökkenése a splicing, tehát a pre-mRNS mRNS-é való átalakításának zavarához vezet ⁴³. Bizonyos, belső riboszóma-belépési hely (internal ribosome entry site, IRES) elnevezésű szerkezeti egységgel rendelkező mRNS-ek translációjának lecsökkenését is észlelték a pszeudouridiláció zavarakor, ezek elsősorban tumorszupresszor (p27/Kip1) és antiapoptotikus fehérjék (Bcl-X1, XIAP) voltak, amely magyarázhatja az eddig ismeretlen eredetű fokozott tumorképződésre való hajlamot diszkeratózisban. Az IRES

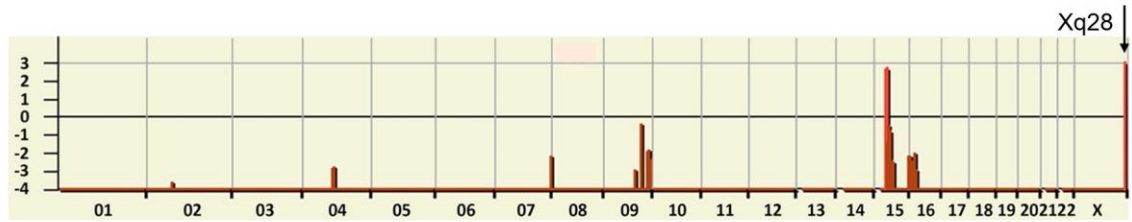
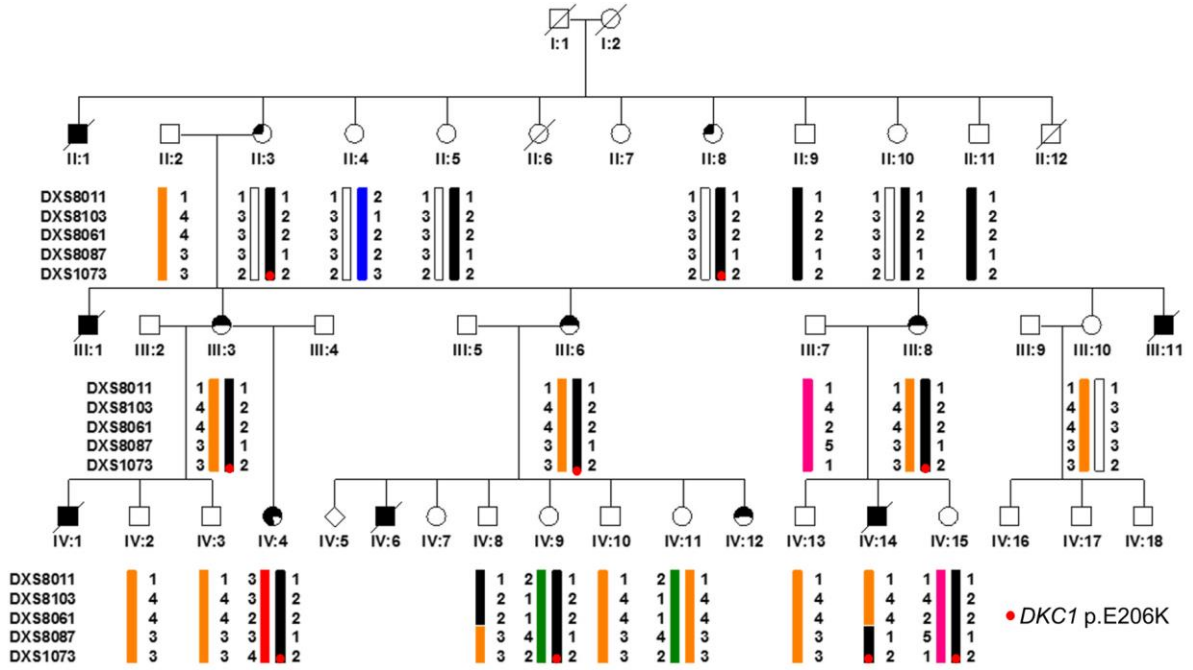
egy alternatív, 5' sapka független útvonal a természetben a transláció iniciációjára. Olyan sejten belüli állapotokban, amikor a klasszikus, sapka-függő transláció zavart szenved (endoplazmatikus retikulum stressz, éhezés, hipoxia) vagy csökkent hatékonysággal működik (mitózis), az IRES-mediált translációs aktivitás megnő. Ilyenkor olyan fehérjék átíródása fokozódik, amelyek a sejtet védik vagy a programozott sejthalál irányába mozdítják el⁴⁷⁻⁴⁹.

1.5 Egy új *DKCI* mutáció azonosítása

Klinikánkon gondoztunk egy súlyosan érintett roma származású fiúgyermeket, szteroid-rezisztens nephrosis szindrómával, mely végstádiumú veseelégtelenséghez vezetett, cataractával, sensorineurális halláscsökkenéssel, enterocolitissal és csontvelő érintettséggel (5. ábra, IV:14). A gyermek 7 éves koráig élt, tüdővérzésben halt meg. A családban több, hasonlóan és súlyosan érintett fiúgyermek is volt (5. ábra, II:1, III:1, III:11, IV:1, IV:6), akik nem éltek meg a hároméves kort sem. A családban az érintett nők egy leány kivételével (IV:4) vagy tünetmentesek voltak, vagy a fiúkhöz képest egészen enyhe tünetekkel bírtak, fiatal felnőtt- vagy középkorban jelentkező cataracta, retinitis pigmentosa és halláscsökkenés formájában (II:3, II:8, III:3, III:6, III:8, IV:12). A tünetek a nagyszülői generációban jelentek meg először. A családi halmozódás és több szervrendszer érintettsége miatt genetikai, az érintettség mértékének nemek közötti különbsége alapján pedig X-hez kötött kórképből gondolkodtunk.

A betegség genetikai hátterének tisztázására első lépésként a Corinne Antignac által vezetett párizsi nephrológiai kutatólaboratóriumban kapcsoltsági analízis történt. A kapcsoltsági vizsgálat során a teljes genom szűrésére kerül sor a beteg és az egészséges családtagokban, és mikroszatellita markerek segítségével vizsgálják, hogy az érintettek genomja hol tér el az egészséges rokonokétól. A markerekhez valószínűségi értékeket (LOD score-t, logarithm of the odds) rendelnek, mely megadja, hogy mekkora eséllyel öröklődik együtt a lókuszt a betegséggel. A LOD tízes alapú logaritmusának a hányadosnak, mi megadja, hogy két lókuszt genetikailag kapcsolt (számláló) vagy nem (nevező). LOD 3 felett 1000-szer több az esélye annak, hogy két lókuszt együtt öröklődik, mint annak, hogy nem. Ezen kapcsoltsági vizsgálat eredményeként szűkíthettük le a keresett mutációt tartalmazó régiót az X-kromoszóma hosszú karjának 28-as, 5 megabázis méretű lókuszára (Xq28). Ezen régió betegséggel való kapcsoltsága

azonban így is csak úgy volt elképzelhető, ha az I:2 dédnagymamában egykor csírasejt-mozaikosság alakult ki, hiszen bizonyos fekete allélt hordozó férfiak (II:9, II:11) nem voltak érintettek. Más X-kromoszóma régió azonban nem öröklődött együtt a betegséggel II:3 utódaiban, így ezen régió kellett a betegségért felelős mutációt tartalmazza. Ezen régióban 75 gén található. Következő lépésként az érintett 5 megabázisos régió új generációs szekvenálását (NGS) végeztük el. Kihhasználva a feltételezett csírasejt-mozaikosságot, az ugyanazon allélokat hordozó (haploidentikus), de egészséges II:9 és érintett IV:14 családtagokat közösen szekvenáltuk, és egy újonnan megjelenő mutációt kerestünk. A kóroki mutáció végérvényes azonosítását Peter Nürnberg kölni genomikai laboratóriumával együttműködésben sikerült elvégezni, az Xq28 lókuszt kódoló régióinak szekvenálásával. Az érintett IV:14 fiúban 21 aminosavcserével járó mutációt találtunk, amelyekből csak egy nem volt jelen az egészséges nagybácsiban (II:9), a *DKC1* gén c.616G>A mutációja. A *DKC1* a diszkerin fehérjét kódolja, és mutációit ezidáig csak diszkeratózisban és HH szindrómában írták le^{28, 50}. A báziscsere fehérje szinten a 206. glutamin aminosav lizinre történő cseréjét okozza.



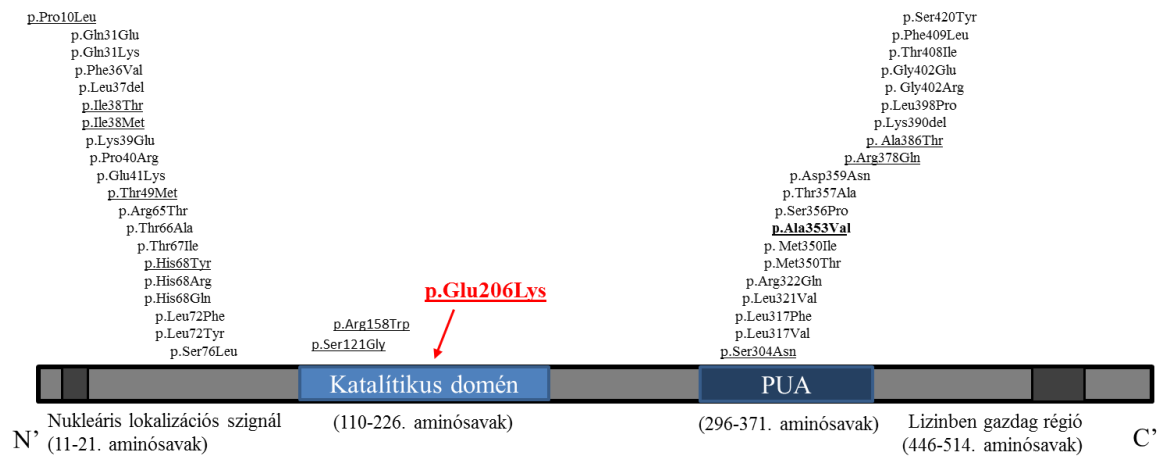
5. ábra: Az érintett család családfája és a kapcsoltsági analízis során azonosított genomi régió. Az érintett férfiakat telt négyzet, a cataracta és halláscsökkenés által érintett nőket félig telt kör, a nephrosis által is érintett leányt (IV:4) háromnegyedig telt kör ábrázolja. A tünetek férfiakban szteroid-rezisztens nephrosis szindróma, cataracta, szenzorineurális halláscsökkenés, enterocolitis voltak. Az érintett férfiak egy gyermek kivételével (IV:14) hároméves koruk előtt meghaltak. Az érintett nők cataractában, (két -III:3 és IV:4- esetben retinitis pigmentosában) és halláscsökkenésben szenvednek, egy leány (IV:4) pedig végstádiumú veseelégtelenséghez vezető nephrosis-szindrómában is. A családtagok alatt a haplotipizálás eredményei láthatóak, mely révén a kóroki mutációt az Xq28 régióra lokalizáltuk (logarithm of the odds, LOD score 3,01). Ezen régió volt az egyetlen az X-kromoszómán, mely a betegséggel szegregált és ezen régió is feltételezte egy *de novo*, csírasejt-mozaikosságot okozó mutáció kialakulását a dédanyában (I:2). Látható, hogy a második generáció nem érintett férfi családtagjai és a későbbi generációk érintett fiú tagjai is hordozzák ezen allélt, ilyen módon az X-kromoszóma adott régiójának célzott új generációs szekvenálásával, a haploidentikus IV:14 és II:9 férfi családtagok ezen genomi régiójának összevetésével azonosította kutatócsoportunk a kóroki *DKC1* mutációt (c.616G>A), mely a piros ponttal jelölt pGlu206Lys aminosavcsere kódolja.

A mutáció következtében savas-bázikus aminosavcsere történik, továbbá elhelyezkedését tekintve egy, az archeáig visszamenően konzervált régióban található, a diszkerin fehérje úgynevezett katalitikus/pszeudouridin szintáz régióját érinti. Ez a régió a NOP10, a GAR1 és az NHP2 fehérjékkel együtt részt vesz a pszeudouridilációban. A diszkeratózisban megfigyelt mutációk elsősorban a *DKC1* 5' és 3' végein, a domének közül a PUA doménben helyezkednek el³¹. A katalitikus domének közelében humán betegségekben összesen két mutáció, a p.Arg158Trp és a p.Ser121Gly ismert, mindkettő súlyos, Hoyeraal-Hreidarsson szindrómára emlékeztető fenotípust okoz (6. ábra)⁵¹.

Predikációs programok szerint patogén, a Polyphen-2 program 0,893, a SIFT program 0,0 értéket adott. Kontroll személyekben (368 fő, ebből 100 roma származású) a mutáció nem volt jelen.

Az érintett családtagok tünetei a veleszületett diszkeratózis tüneteivel csak minimálisan fedtek át, a beteg fiú családtagok csontvelő érintettségben is szenvedtek.

Fentiek alapján kimondható volt, hogy jelen család betegségének hátterében a diszkerin pGlu206Lys mutációja áll.



6. ábra: A diszkerin fehérje szerkezeti egységei és a különböző diszkeratózis-formák hátterében álló mutációk, valamint a jelen családban vizsgált, p.Glu206Lys mutáció elhelyezkedése a fehérjén belül. A DC hátterében álló, eddig leírt mutációk döntő többsége a fehérje N- és C-terminálisán, utóbbiak az archeozin transzglykoziláz (PUA) doménben helyezkednek el. Az újonnan azonosított *DKCI* mutáció egy erősen (archeákig) konzervált régióban van, amelyben csak kettő mutáció volt ismert ezidáig (mindkettő súlyos Hoyeraal-Hreidarsson-szindrómát okoz) és mely a pseudouridiláció katalitikus helye.

A kórkép öröklésmenete hordoz X-hez kötött domináns és recesszív jegyeket is. A cataracta és a halláskárosodás nőkben is megjelenik, a nephrosis és az enterocolitis jellemzően csak fiúknál.

Brit kollaboráns csoportunk (Dr. Aoife Waters, Developmental Biology of Birth Defects UCL Great Ormond Street Institute of Child Health, London) a diszkerinrel interakcióban lévő NOP10 fehérjében azonosított egy homozigóta mutációt mely a p.Thr16Met aminosavcserével jár, szintén konzervált régiót érint és szteroid-rezisztens nehprosis szindrómát, cataractát, sensorineuralis halláscsökkenést és enterocolitist okoz. A vérrokon családban azonosított kórkép autoszomalis recesszív módon öröklődik. A NOP10 fehérjében az irodalomban eddig egyetlen mutációt írtak le (p.Arg34Val), mely diszkeratózist okoz⁵². Az általuk gondozott betegek tünetei a diszkeratózissal és a HH-szindrómával szintén csak jelzett mértékben fedtek át, az egyik betegben cerebelláris hipopláziát és hipomielinizációt észleltek, továbbá enyhe diszkeratózist. Utóbbi olyannyira nem volt szembetűnő, hogy a diagnózis csak a genetikai diagnózist követően született meg a brit bőrgyógyászatban. A mutáció a diszkerin Glu206Lys mutációval megegyezően, szintén a pszeudouridilációs katalitikus zsebben helyezkedik el. Immunprecipitációs kísérletek alapján a kapcsolat a diszkerin és a NOP10 között nem szakad meg (a londoni kutatólaboratóriumban végzett kísérlet alapján).

2 Célkitűzések

1. A podocin C-terminális dimerizációjának megértése a természetben előforduló csonkoló podocin mutációk heterooligomerizációra gyakorolt hatásának vizsgálata révén.
2. A p.Arg229Gln (R229Q) oligomerizációra gyakorolt hatásának meghatározása *in vitro* expresszált natív podocin fehérjék között mért FRET-hatékonyság révén.
3. Egy új, szteroid-rezisztens nephrosis szindrómával, halláscsökkenéssel, cataractával és enterocolitisszel járó kórkép hátterében azonosított kóroki mutáció fehérje-interakcióra és lokalizációra gyakorolt hatásának vizsgálata.
4. A humán *DKC1* mutációnak megfelelő mutáció létrehozása zebrahalban.
5. A *dkc1* mutáns zebrahal törzsekben a fenotípus és a telomerhossz, illetve a pszeudouridiláció kapcsolatának vizsgálata.

3 Módszerek

3.1 A podocin-oligomerizáció vizsgálata

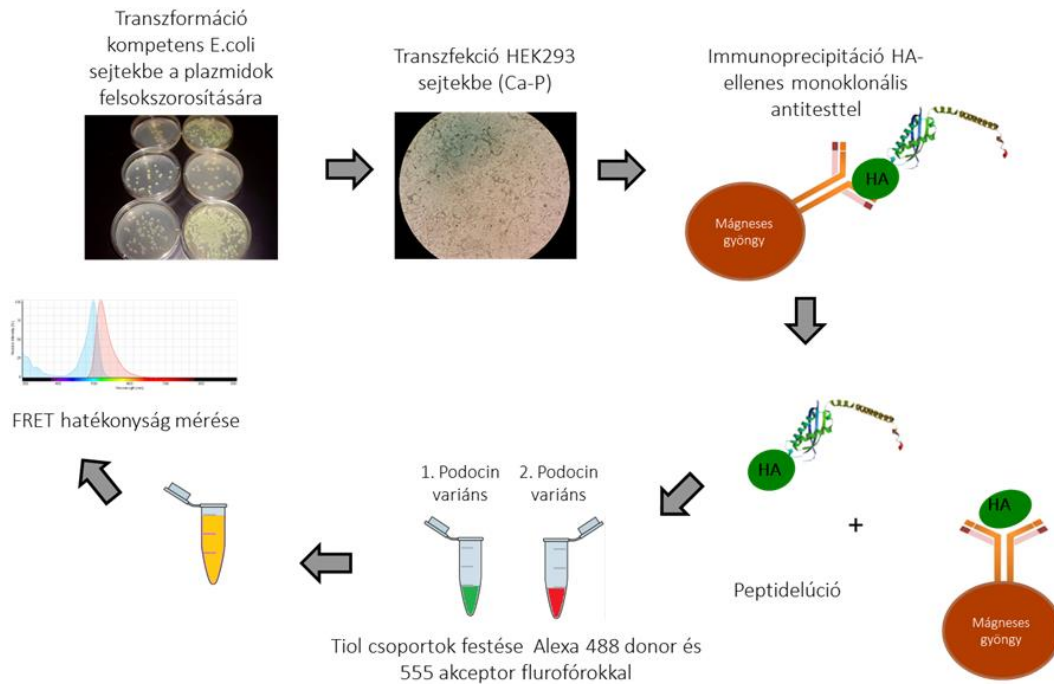
Annak céljából, hogy megértsük a podocin oligomerizáció folyamatát három gyakori, C-terminálist (C-terminal tail: CTT) érintő, leolvasási kereteltolódással járó mutáns, az R286Tfs*17, az A317Lfs*31, az F344Lfs*4 és a mesterségesen létrehozott F344* podocin kapcsolatát vizsgáltuk. Valamennyi mutáns fehérje esetében a keletkező STOP kodon az utolsó exonban helyezkedik el, így nem vezet az mRNS lebomlásához. A CTT régió három helikális elemből (H1,2,3), egy úgynevezett internalizációs (TVV337-339)-motívumból és összekötő szekvenciákból áll. A fenti mutánsok CTT- régió felépítésében különböznek egymástól, az R286Tfs*17 podocin nem, az A317Lfs*31 podocin egy (H1), a F344Lfs*4 és a F344* podocinok két intakt helikális elemet (H1, H2) tartalmaznak, továbbá az említett TVV- motívumot. Az F344Lfs*4 és a F344* podocinok csak egy három aminosavból álló (Leu-Thr-Tyr) frameshift szekvenciában különböznek egymástól.

3.1.1 Podocint expresszáló plazmidok felsokszorosítása

A humán podocin variánsokat (R229Q, R238S, A297V, R286Tfs*17, A317Lfs*31, F344Lfs*4 és F344*) kódoló plazmidok kollaborációs partnereinktől származtak, ahol a cDNS-ek a plexMCS és pEGFP-N1 humán expressziós vektorokban helyezkedtek el BamHI-XhoI/XhoI-EcoRI hasítási helyek mentén. A HA-tag a podocin N-, a GFP tag a annak C-terminálisán helyezkedett el. A plazmidokat kompetens baktériumokban, plazmidok által hordozott antibiotikum rezisztencia (Ampicillin/Kanamycin) alapján felsokszorosítottuk, plazmid kivonó kittel megtisztítottuk, univerzális, plazmidra tervezett primerekkel Sanger szekvenálással ellenőriztük. A disszertációban kifejtett kísérletekben a HA-taget viselő podocin variánsokat kódoló plazmidokkal dolgoztunk tovább.

3.1.2 A podocin variánsok tranziens expressziója, immunprecipitációja és peptidelúciója

A fenti humán podocin variánsokat 37°C-on, DMEM-10% FBS-1% Penicillin-Streptomycin összetételű médiumban fenntartott humán embrionális vesesejtekben (HEK293) expresszáltuk, tranziens, kalcium-foszfát módszeren alapuló transzfekcióval. 48 órás inkubációt követően 150 mM NaCl-ot, 20 mM Tris-t, 1% Triton-X detergenst tartalmazó lízis puffer segítségével, 0,1%-os proteáz inhibitorral való védelemben nyertük ki a sejtekből a fehérjét. A teljes sejt-lizátumot 4°C-on először anti-HA monoklonális antitestekkel (1,5 h; clone HA-7, H9658, Sigma Aldrich), majd mágneses gyöngyökkel (0,5 h; Dynabeads Protein G for Immunoprecipitation, Thermo Fisher Sc.) inkubáltuk. A mágneses gyöngyök az immunglobulinok univerzális, Fc régióját kötötték meg. Az így létrejött immunprecipitátumot három alkalommal lízis pufferrel mostuk. A tiszta podocin fehérje nyeréséhez a podocin molekulákat a HA ellenes monoklonális antitestről kompetitív elúció módszerével távolítottuk el, lízis pufferben oldott, nagy mennyiségű szintetikus HA peptid (HA Peptide lyophilized powder, B23311, Biotool) hozzáadásával. Öt lemosást követően a keletkezett eluátumokat, a megmaradt immunprecipitátumot valamint teljes sejt-lizátumot Western blottal ellenőriztük az alábbiak szerint: SDS-poliakrilamid gélelektroforézist követően nitrocellulóz membránra vittük át a fehérjéket, ezután 5% sovány tejporos blokkolást majd anti-HA monoklonális ellenanyaggal történő festést végeztünk, szekunder ellenanyagként HRP-konjugált antitesteket (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology) használtunk. A detekció elektrokemiluminszcens oldattal (sc-2048, Western Blotting Limunol Reagent) történt. A mintákat a kísérlet folytatásáig -80°C-on tároltuk (7. ábra).



7. ábra: Humán podocin expressziója és peptidelúciója FRET méréshez. A humán podocin variánsokat kódoló plazmidokat kompetens baktériumokban felszorzosítottuk, majd kalcium-foszfát transzfekecióval HEK293 sejtekben tranzienst módon expresszáltuk. A podocin fehérjét a sejtliázátumokból immunprecipitációval kivontuk, az immunkomplexekeket mágneses gyöngyökhöz rögzítettük, innen kompetítív elúcióval oldatokba kinyertük. Az egyes podocin variánsokat flurofórokkal megfestettük, a podocinpárok között FRET-hatékonyságot mértünk.

3.1.3 Natív podocinok jelölése fluorofórokkal és az azt követő fluoreszcencia-spektroszkópia

A következő lépésben az egyes podocin variánsokat fluoreszcens Alexa molekulákkal festettük meg. A FRET mérésekhez 4 μM -os koncentrációban használtuk a podocinokat. Tízszeres koncentrációban adtuk hozzá a festékmolekulákat és fénytől védve, 4°C-on, éjszaka inkubáltuk. A vizsgálni kívánt podocinpárok egyikét donor, (Alexa Fluor 488, A10254, Thermo Fisher), a másikat akceptor (Alexa fluor 555, A20346, Thermo Fisher) maleimid festékekkel jelöltük meg azok tiol-csoportjain. Az éjszakai inkubációt követően kettesével elegyítettük a podocin variánsokat dimerizálódás céljából. A be nem kötött festékmolekulákat szűrővel eltávolítottuk. A két podocin variáns között a bekötött festékmolekulák (fluorofórok) révén Förster-féle rezonáns energiaátadás (vagy másik nevén fluoreszcens rezonancia-energia transzfer, FRET) keletkezik, mely mérhető. Ehhez szükséges a festékmolekulák kellő közelsége (<10nm). Az így kapott FRET-hatékonyság, melyet a donor élettartam csökkenéséből számítottuk ki, jellemzi a két fehérje között fennálló kötést, és bár nem egyenlő azzal, de arányosnak tekinthető a podocin variánsok közötti kötés erősségével. Valamennyi mérést három alkalommal végeztük el, legalább két különböző expresszióból származó fehérjék között. A három mérés átlagát vettük eredményül.

3.1.4 Statisztikai elemzések

A FRET hatékonyságot ANOVA és Tukey HSD post hoc tesztekkel ellenőriztük.

3.2 Az új diszkerin mutáció hatásának vizsgálata

3.2.1 Diszkerint és NOP10-et expresszáló plazmidok létrehozása

A vad és az Ala353Val misszensz mutációt tartalmazó *DKC1* cDNS-ek a kollaboráns munkacsoportunktól kapott pRSF Duet, a NOP10 a pET bakteriális expressziós vektorokból kerültek felszorosításra. A molekuláris cloning lépéseit Sequencher 4.9 szoftverrel terveztük meg. Polimeráz láncreakcióval (PCR) restrikciós helyeket és rövid epitópokat („tag”) kódoló szekvenciákat adtunk a cDNS-ekhez a humán expressziós vektorokba történő átültetés és a későbbi fehérjefelismerés megkönnyítése céljából. A diszkerint kódoló cDNS a pcDNA 3.1 Zeo (+) vektorba került beépítésre az EcoRI-NotI hasítóhelyek közé, N-terminális Flag tag hozzáadásával. A *NOP10* cDNS-ét a pcDNA3.1/V5-His-TOPO vektorba helyeztük HindIII-XhoI hasítóhelyek mentén. Az így keletkező fehérje C-terminális V5-His tag-et hordozott. Az alkalmazott primerek szekvenciái az alábbi táblázatban kerülnek felsorolásra (1. táblázat).

1. táblázat: A diszkerint és NOP10-et kódoló humán expressziós plazmid vektorok létrehozásához alkalmazott primerek szekvenciái (5’-3’ irányban).

EcoRI-Flag- <i>DKC1</i> F	CCGAATCCCACCATGGACTACAAAGACGATGACGACA AGGCGGATGCGGAAGTAAT-3
<i>DKC1</i> -NotI R	TAGAAGCTTGCGGCCGCTTTA
HindIII- <i>NOP10</i> F	CCCAAGCTTCCACCATGTTTCTCCAGTATTACCTCAA
<i>NOP10</i> -XhoI R	CCGCTCGAGTCGAGGACAGGGCGCGGTT
E206K <i>DKC1</i> MG F	CGAGAGCAAAATGATTAAATACGATCCTGAAAGAAGAT TAGG
E206K <i>DKC1</i> MG R	CGAGAGCAAAATGATTAAATACGATCCTGAAAGAAGAT TAGG
T16M <i>NOP10</i> MG F	CGAGCAGGGAGATCGAGTCTATATGCTGAAGAAATTTGA CCCGATGG
T16 M <i>NOP10</i> MG R	CCATCGGGTCAAATTTCTTCAGCATATAGACTCGATCTCC CTGCTCG

A molekuláris cloning lépései az alábbiak voltak:

1. PCR reakció az N-/C-terminális epitóp hozzáadása és a cDNS felszorzósítása céljából. Nagy megbízhatóságú polimeráz enzimmel (Pfu DNA polymerase, EP0501, Thermo Scientific) dolgoztunk a gyári protokolloknak megfelelően, az annealációs hőmérsékletek a *Flag-DKCI* esetében $60,1^{\circ}\text{C}$, a *NOP10* esetében $59,7^{\circ}\text{C}$ voltak.
2. A keletkezett PCR termék futtatása agaróz gélen, megfelelő bázishossz esetén a teljes PCR termék feltisztítása (PCR/DNA fragment extraction kit, DF100, Geneaid).
3. A feltisztított PCR termékek és a cél plazmid vektorok emésztése EcoRI-NotI/HindIII-XhoI enzimekkel (gyári protokollok követésével, ER0271, ER0591, ER0505, ER0691, Thermo F.Sc.)
4. Az emésztett PCR termékek és vektorok agaróz gélben való futtatása, gélből való kivágása, PCR/DNS tisztító kittel való megtisztítása.
5. Ligáció (T4 DNA ligase, 15224017, Invitrogen)
5. Transzformáció kompetens baktériumokba (CH3-Blue, BLI_85040, Biotin). A bakteriális transzformáció során 25-50 μl baktériumszuszpenziót jégen röviden -80°C -ről felengedtünk, ezt követően 10 térfogatszázalék, $\sim 25-50$ ng plazmid DNS-t tartalmazó oldatot kevertünk el bennük óvatosan. 30 percig jégen inkubáltuk az elegyet, ezt követően hősokkot (45 szekundum 42°C , 2 perc jégen) alkalmaztunk a baktériumfal permeabilizálása céljából. A hősokkot követően 1 órán át 10-szeres térfogatú ($\sim 300-500$ μl) Szuper Optimális Broth (SOC) táptalajban ráztuk a baktériumokat 37°C -on. A rázatás végén a baktériumszuszpenziót lecentrifugáltuk (2000 rpm, 2 perc), a felülúszó javát eltávolítottuk, majd Luria-Bertani (LB) médiumot és antibiotikumot (Ampicillin, $100\mu\text{g/ml}$ vagy Kanamycin, $50\mu\text{g/ml}$) tartalmazó agar táptalajokra leoltottuk. A plazmidokat felvett baktériumok antibiotikum rezisztenciájuknak megfelelően nőttek a szelektív táptalajon. A kinőtt telepekből másnap 3 ml térfogatú „mini” kultúrát készítettünk, a „mini” kultúrából a plazmidokat kivontuk (Isolate II plasmid mini kit, BLI_52056, Biotin), Sanger szekvenálással ellenőriztük. Amennyiben a szekvenciák megfelelőek voltak, az adott „mini” kultúrából 300 ml-es „maxi” kultúrát készítettünk a létrehozni kívánt plazmid sokasítása céljából. A baktériumszuszpenzióból ismét plazmid kivonó kittel nyertük ki (NucleoBond Extra Maxi, 740414.10, Macherey-Nagel) a most már nagy mennyiségben ($\sim 500-2000\mu\text{g/ml}$) jelen lévő, transzfekciós tisztaságú plazmidokat.

3.2.2 Mutáns diszkerin és NOP10 fehérjét kódoló plazmidok létrehozása

A diszkerin Glu206Lys és a NOP10 Thr16Met misszensz mutációkat PCR alapú helyspecifikus mutagenézissel (site-directed mutagenesis) hoztuk létre. A mutagenézis során nagy pontossággal dolgozó DNS polimerázokat (PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase, 600670, Agilent) alkalmaztunk. A mutagenézishez használt primerek a fenti (1.) táblázatban láthatóak.

A mutagenézis PCR összetétele az alábbi volt: DNS 20 ng/μl 1 μl; Forward primer 10 μmol/μl 1 μl; Reverz primer 10 μmol/μl 1 μl; 10x Pfu ultra II puffer 5 μl; dNTP 2,5 mmol/l 4 μl; Pfu ultra II Phusion DNA Polymerase 1 μl; víz 37 μl; 50 μl ösztérfogatban.

A mutagenézis PCR program beállításai az alábbiak voltak: 95 ° C 30 sec; 95° C 30 sec; 55 ° C 1 min; 68°C 2 min/kilóbázis; összesen 12 ciklus, majd 4°C az agaróz gélen való futtatásig.

A mutagenézis PCR-t követően, a transzformáció előtt a templát plazmidokat elemésztettük (DpnI enzimmal, mely a metilált DNS hasítására képes, R0176, New England Biolabs) valamint a keletkezett PCR terméket ligáltuk (T4 ligázzal). A transzformáció ultrakompetens (XL2- Blue, 200150, Stratagene) baktériumokba történt a protokoll végén. A transzformációt követően kinőtt klónokat direkt, telepől készült PCR-ből vagy úgynevezett „mini” baktérium szuszpenzióból szűrtük az adott pontmutációra Sanger szekvenálással (a molekuláris cloningshoz használt vagy univerzális plazmid szekvenáló primerekkel). A megfelelő szekvenciát hordozó plazmidokat a fentiekben leírtak szerint „maxi” baktériumkultúra formájában gyarapítottuk, plazmid kivonó kittel kinyertük.

3.2.3 A diszkerin és NOP10 fehérjék expressziója, immunprecipitációja, peptidelúciója

A humán embrionális vesesejtkultúrát (HEK293) 37°-on, 10 cm-es tenyésztő csészékben tartottuk fenn magas glükóz tartalmú DMEM oldatban (11965092) 10% FBS-el (10500064) és 1% Penicillin-Streptomycinnel (15140122, Gibco, Thermo Fisher Sc.) kiegészítve. Mycoplasma kontamináció ellenőrzésére havonta került sor. A vesesejteket vad, Ala353V és Glu206Lys diszkerint valamint vad és Thr16Met NOP10-et kódoló plazmidokkal transzfektáltuk kalcium-foszfát alapú módszerrel (631312,

Clontech Laboratories). A transzfekeciós oldatot tartalmazó médiumot a transzfekeciót követő 6-8 órán belül lecseréltük. 48 órán át inkubáltuk a sejteket fehérjetermelés céljából. Jégen történt a lízis, a lízis puffer 150 mM NaCl-ot, 20 mM Tris-t, 1 % Triton-X-et valamint 0,1% proteáz inhibitor (P8340, Sigma Aldrich) tartalmazott. Valamennyi további lépés jeges aljzaton történt. A teljes sejtlyázatumot 1,5 órán át elegyítettük a 1 µg-ot tartalmazó primer antitest (anti-flag M2, F3165, Sigma Aldrich; anti-V5 rabbit, ab182008/anti-NOP10 antibody, ab134902, Abcam) oldatával. Ezt követően 30 percig mágneses gyöngyökkel történő inkubáció következett. A mágneses gyöngy hozzáadását követően valamennyi lépés mágneses behatás mellett (mágneshez érintés/mágneses eppendorf cső állványra helyezés) történt. A gyöngyözött immunkomplexekeket 3 alkalommal lízis pufferrel mostuk majd egy új eppendorf csőbe helyeztük át. A monoexpresszált célfehérjéket kompetitív elúció módszerével szorítottuk le az őket kötő antitestekről, nagy mennyiségű epitóppal analóg flag/V5 peptid hozzáadásával (B23111, B23511, Biotool; F3290, Sigma Aldrich; 200-400 µg/ml koncentrációban). Öt egymást követő elúciót végeztünk, ahol egy mosás minimum 30 percig tartott. Az így nyert eluátumokat külön eppendorf csövekbe gyűjtöttük. A folyamat végén BSA koncentrációsorra alapozva, abszorpciós spektrofotometriával mértük meg a fehérjék koncentrációját (DC Protein Assay, BioRad). A fehérjéket western blottal verifikáltuk. Anti-flag és anti-V5/anti-NOP10 primer (F3165, Sigma Aldrich, ab182008/ab134902, Abcam), majd kecske vagy egér ellenes, HRP konjugált szekunder (sc-2005, sc-2357, Santa Cruz Biotechnology) ellenanyagokat alkalmaztunk, a keletkezett fehérjesávokat kemilumineszcenciával detektáltuk (Western Blot Luminol Reagens, sc-2048) Molecular Imager VersaDoc MP 5000 System (Bio-Rad) segítségével.

3.2.4 Nyomásperturbációs fluoreszcens spektroszkópia

A vad és mutáns diszkerint és NOP10-et Western bloton történt ellenőrzést követően a fehérjeinterakció vizsgálatához, ún. nyomásperturbációs mérésekhez ⁵³ 1,5 µM-os végkoncentrációban alkalmaztunk, ahol a fehérjepárok mellett a fluorofór (8-Anilino-naftalin-1-szulfonsav, ANS) 30 µM-os koncentrációban volt jelen. Az ANS egy naftalin tartalmú aromás szénhidrogén molekula, mely a fehérjék apoláris felszínéhez képes kötődni. Autofluoreszcenciája van, mely a fehérjékhez való kötődés hatására megváltozik, annak jelintenzitása megnő. Ezen tulajdonságát használtuk ki e mérésnél, amely során növekvő, a tér minden irányából érkező nyomásnak (0-3500 bar) kitett

küvetében az interakcióban álló fehérjék disszociációjakor bekötődő ANS molekulák fluoreszcens jelintenzitását mértük. A nyomást kezdetben 150-300, később 300-400 baronként emeltük, 300 μ l oldaton. A nyomásemeléseket követően 10 percet váraoztunk a hatás beálltáig, ezt követően mértük meg a fluoreszcens jelintenzitást. Az, hogy mely nyomás mellett nő meg a fluoreszcens jelintenzitás és milyen mértékben megközelítőleg korrelál a két fehérje közötti kötőfelület méretével és a kötés erősségével. A vizsgálattal leírt paraméter a fluoreszcencia intenzitás a nyomás függvényében, számított paraméterek a disszociációs állandó (negatív 10-es alapú logaritmus, a pKd) és a disszociáció következtében bekövetkező moláris térfogatváltozás. A görbe menetéből a strukturális heterogenitásra is következtetni lehet, összehasonlító jelleggel. A nyomásperturbációs méréseket a SE Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetében Schay Gusztávval való kollaborációban végeztük el. A módszer kiegészítéseképpen az ELTE-Fehérje-modellező Kutatócsoport és Szerkezeti Biokémiai Laboratóriumával, Karancsiné Menyhárd Dórával létrejött kollaborációnk révén molekuláris dinamika (MD) módszerével *in silico* fehérjeszerkezeti modellekkel gazdagíthattuk a látott képet.

3.2.5 A humán diszkerin lokalizációjára vonatkozó immuncitológiai vizsgálatok

A diszkerin intracelluláris lokalizációjának vizsgálatát a francia kutatólaboratóriumban (Laboratory of Hereditary Kidney Diseases, INSERM, UMR 1163, Imagine Institute, Párizs, Franciaország) végeztük el. A vizsgálatokat M. Saleem-től (Nagy-Britannia, Bristoli Egyetem) származó, humán immortalizált podocita sejtvonalon (AB8/13) kiviteleztük⁵⁴. A sejtek tenyésztése 33°C-on, 10%-os FBS-el, inzulin-transzerrin-szeléniummal és 0,5% Penicillin-Streptomocinnel dúsított RPMI-1640 oldatban (Life Technologies) történt. Ezen a hőmérsékleten a podociták differenciálatlanok, (például podocint sem termelnek), növekedésre-és osztódásra viszont képesek⁵⁴. Az immortalizált humán podocitákat I-es típusú kollagénnel borított fedőlemezekten tenyésztettünk, transzfekciójukat FUGENE non-liposzomális, magas hatékonyságú, alacsony toxicitású transzfekciós kittel végeztük el (Promega FUGENE HD Transfection reagent, E2311). N-terminális flag taget viselő vad, Glu206Lys és Ala353Val diszkerineket monoexpresszáltunk. 48 órás inkubációs időt követően a transzfektált sejteket 5 percig jeges, 4%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk, majd a fixálást követően 15 percig PBS-ben oldott, 1%-os BSA oldattal blokkoltuk. Az

elsődleges, nyúlból származó flag-ellenes antitestet (F2555, Sigma Aldrich) 1:500-hoz hígításban alkalmaztuk, azzal a sejteket 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Másodlagos ellenanyagként kecskében termelt nyúl IgG ellenes, Alexa Fluor 647-konjugált antitesteket (A-21235, Life Technologies) használtunk 1:200-hoz hígításban, valamint a podociták sejtvezájának megfestésére Alexa Fluor 555 phalloidint (A34055, Life Technologies) azonos hígításban, 1 órán át, szobahőmérsékleten. A sejtmagvakat Hoechsttel festettük meg. Konfokális mikroszkóppal 40x-es nagyítású immerziós lencsével (Leica Microsystems) dolgoztunk, az optikai szeletvastagság 800 nm, az x-y pixelméret 86 nm voltak (Leica SP8 confocal microscope, Necker Imaging Facility).

3.2.6 Zebrahalak genotipizálása, mutáns zebrahalak azonosítása

Az ELTE Genetikai Tanszék zebraadánió munkacsoportjával együttműködésben CRISPR/Cas9 rendszer segítségével mutagenezist terveztünk a *tuebingeni* (Tue) zebrahal törzs *dkc1* génjének 7-es és 11-es exonjában. Az injektálásokat követő szűrővizsgálatok tetemes része Klinikánk kutatólaboratóriumában zajlott allélspecifikus PCR-rel és/vagy Sanger szekvenálással. A mutagenezis célja a vizsgált családban létrejött *DKC1* mutáció (c.616G>A, p.Glu206Lys) és az egyik leggyakoribb, diszkeratózist okozó *DKC1* mutáció (c.1058C>T, p.Ala353Val) hal-ekvivalens formájának létrehozása volt.

A hal lárvákból (72 ó-29 napos korig tart a lárva stádium), fenntartott mutáns haltörzsek esetén farokúszókból a DNS-t 50-100 µl 50 mM-os NaOH oldat hozzáadásával, ezt követően 95°C-on 15 percig történő melegítéssel vontuk ki. Hal lárvák esetében a DNS kivonást egy mikroszkóp alatt manuálisan végzett dechorionáló lépés előzte meg. A kivonást követően a minták pH értékét 10 térfogatszázalékban hozzáadott 1M-os TRIS (pH 8,0) oldattal stabilizáltuk. A genomi DNS mintákat Sure Clean Plus (BIO-37047, Bioline) kittel tisztítottuk PCR-nek megfelelő tisztaságúvá a gyári protokoll szerint, azok végkoncentrációját 50 ng/µl-re állítottuk be. Az injektált hal embriókat elsősorban allélspecifikus PCR-el, olykor Sanger szekvenálással szűrtük, amennyiben sikerült létrehozni egy mutációt hordozó törzset, azon halakat és utódaikat a további kísérletekhez farokúszókból, allélspecifikus PCR-el vagy fragmensanalízissel azonosítottuk. A szűrő jellegű allélspecifikus PCR-eket a szenzitivitás növelése érdekében magasabb (38x) ciklusszámon végeztük el, továbbá valamennyi mintára mind a vad, mind a pontmutáció-specifikus primerekkel. A PCR termékeket agaróz

gelen futtattuk. A módszert Sanger szekvenálással validáltuk, ahogyan a megbízhatósága ellenére előforduló kétes esetekben is Sanger szekvenálást végeztünk ellenőrzésképpen. A létrehozott mutációkat hordozó törzsek és utódaik genotipizálására alkalmas másik módszer, a fragmensanalízis során a keletkezett PCR termékeket fluorofórokkal jelöltük meg. Ezen PCR termékek a SE Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetében kapilláris gélelektroforézissel méret szerint elválasztásra kerültek, a visszakapott adatok pedig a fluoreszcens jelintenzitás és a méret függvényében ábrázolhatóak voltak számunkra egy program segítségével (Peak Scanner Software 2, ThermoFischer Scientific; Coffalyser, MRC-Holland), ahol már egy bázisnyi méretkülönbség is láthatóvá vált. Az allélspecifikus PCR-hez, a Sanger szekvenáláshoz és a fragmensanalízishez alkalmazott primerek, reakcióelegyek összetétele és a PCR program beállítások az alábbi táblázatokban kerülnek felsorolásra (2.,3.,4. táblázat).

2. táblázat: A zebraadánió *dkc1* 7-es és 11-es exonjának szekvenáló és allélspecifikus, valamint a fragmensanalízishez használt primereinek szekvenciája (5'-3' irányban).

<i>dkc1</i> in6 F2	TGAACCTTTTCCCTCACTTTTGT
<i>dkc1</i> in7 R1	TGAACCTTTTCCCTCACTTTTGT
<i>dkc1</i> in 10 F1	ACTGATGGCTCTGCAAGACTTT
<i>dkc1</i> in 11 R1	GGGTTGTCGCTAAAATCAAGAG
F mut ex 7 allelspec	ACGATCTACGAGAGCAAGCTTATTA
F vad ex7 allelspec	CCATCTACGAGAGCAAGCTTATTG
R mut ex 7 allelspec	ACCTAATCTTCTCTCAGGATCATATTT
R vad ex 7 allelspec	ACCTAATCTTCTCTCAGGATCATATTC
insF (exon7, insTCATGGT)	TGAAGCGCCAACCTTCATGGT
8GTGinsF	TGTGAAGCGCCAACCTGGTG
8vadF	GTGAAGCGCCAACCTGCGA
zf7_e11_CGCAdel-spec_F	AGAGACACATATCCAAAT
zf7_e11_WT-spec_F	AGAGACACATATCCACGC
zf7_e11_CGCAdel-spec_R	GTCCAAGACCCCATTTGG
zf7_e11_WT-spec_R	GTCCAAGACCCCATTTGC
zf5_e11_delGCAinsC-spec_F	GAGACACATATCCACCAT
zf5_e11_WT-spec_F	GAGACACATATCCACGCA
zf5_e11_delGCAinsC-spec_R	GTCCAAGACCCCATGGTG
M13 F	FAM- TGTAACGACGGCCAGT
FAM- <i>dkc1</i> -in10-F	TGTAACGACGGCCAGTGGATTTGGATGGGTTTC AATGG
<i>dkc1</i> - in11-R-PIG	GTGTCTTAGCCTACATCATGGCGTC

3. táblázat: A zebrahalak szűréséhez és azonosításához alkalmazott PCR reakcióelegyek összetétele.

Allélspecifikus PCR	3,6 μ l dH ₂ O, 5 μ l Immomix, 0,2 μ l F és R primer (10 μ M), DNS (50 ng/ μ l) 1 μ l; Σ 10 μ l
Fragmensanalízis PCR	3,9 μ l dH ₂ O, 5 μ l Immomix, 0,2 μ l F, R é M13 F primer (10 μ M), DNS (50 ng/ μ l) 0,5 μ l; Σ 10 μ l
Szekvenáló PCR	5 μ l dH ₂ O, 5 μ l szekvenáló puffer, 1 μ l szekvenáló premix (enzim), 1 μ l F primer (10 μ M), DNS (50 ng/ μ l) 1 μ l; Σ 10 μ l

4. táblázat: PCR programok beállításai a mutáns haltörzsek genotipizálásához és szekvenálásához.

	Annelációs hőmérséklet (°C)	Elongációs idő, ciklusszám	Termékméret (bázispár)
in6 F- in7 R	57	40 sec, 35x	492
in10F-in11R	54	40 sec, 35x	305
in6-R vad/mut E7 allélspec.	64	30 sec, 38x	192/193
F vad/mut E7 allélspec.- in7R	64	30 sec, 38x	226
insF-in7R	57	30 sec, 35x	272
8GTGinsF/WT F-in7 R	61,3	30 sec, 35	276
11CGCAdeIF/WT F-in11R	60,5	30 sec, 35	192(WT)/193(mut)
in10F-CGCAdeI/WT R	59,5	30 sec, 35	177
Szekvenáló PCR	51	15 sec, 25x	-

3.2.7 *Dkc1*^{-/-} és *dkc1*^{+/?} genotípusú zebrahal lárvákon végzett áramlási citometriás vizsgálatok a telomerhossz meghatározására

Vad fenotípusú (homozigóta vad vagy heterozigóta) és *dkc1* null mutáns, megtermékenyítéstől számított ötödik életnapos zebrahalakban áramlási citometriával határoztuk meg a telomerhosszt. A zebrahalon történő kutatások etikai szabályai alapján ötödik életnapos korig szabad őket kísérleti célra életük kioltásával felhasználni⁵⁵. Mintánként tíz-tíz lárvát használtunk. A zebrahal lárvákat minimum 10 percig tricain-metán-szulfonátba merítettük érzéstelenítés céljából, ezután röviden (30 szekundum) 100 µl 0,5%-os, 4°C-os Na-hipokloritban mostuk, majd mechanikusan szétroncsoltuk őket. PBS/Penicillin-Streptomycinben történő 30 perces inkubációt követően tripszinnel (0,5 mg/ml, 1 percig) és kollagenázzal (0,5 mg/ml, 30-40 percig, 10 percenként keverve) elemésztettük őket.

Az elemésztett szöveteket elkevertük és egy 100 µm pólusméretű szűrőn gravitáció útján áteresztettük, a szűrőt ezt követően PBS-el mostuk. Az átszűrt sejteket lecentrifugáltuk, PBS-ben újra sejtszuszpenzióvá alakítottuk, Bürker-kamrában megszámoltuk. Egy méréshez azonos mennyiségű (1-1,4 millió sejt/ml) sejtet használtunk⁵⁶. A sejtekben fellelhető kromoszómák telomer régióit a Telomere PNA Kit/FITC for Flow Cytometry kittel (K5327, Dako) festettük meg a kit protokolljának megfelelően. Szintén a kit javaslatára külön DNS festékekkel is megszíneztük a kromoszómákat, mely segíti a G0/G1 fázisban lévő sejtek azonosítását. A mérést az élő, G0/G1 fázisban fellelhető sejtekre korlátoztuk, a fluoreszcencia intenzitást a FITC-konjugált telomer specifikus próbával és azok nélkül történt mérések átlagából határoztuk meg. A telomerhosszot a vizsgált sejtek autofluoreszcenciájának és a telomer specifikus próbával jelölt minták fluoreszcenciájának a különbségéből számítottuk. A sejteket BD FACSAria áramlási citométeren (BD Biosciences) analizáltuk Dr. Toldi Gergely és Dr. Florentina Sava segítségével.

3.2.8 *Dkc1*^{-/-} és *dkc1*^{+/?} genotípusú halakon végzett western blot vizsgálatok (*dkc1*, p53)

A *dkc1*^{-/-} és *dkc1*^{+/?} genotípusú hal lárva poolokból (hat-hat lárva/minta) fehérjét izoláltunk a második, negyedik és ötödik fertilizációt követő életnapon. A fehérjét zebraadánióra kifejlesztett protokoll szerint vontuk ki az lárvákból⁵⁷: dechorionálást és a

peteburok eltávolítását követően szodium-dodecil-szulfát (SDS) tartalmú pufferben denaturáltuk a fehérjéket 95°C-on 5 percig. A western gélek zsebeibe azonos számú lárvából kivont fehérjemintákat töltöttünk fel. A western blot technika a fentiekben leírtakhoz hasonlóan zajlott. Primer ellenanyagként nyúlban termelt poliklonális diszkerin ellenes (Dyskerin Ab H-300, sc-48794) vagy egérben termelt monoklonális p53 ellenes (ab77813, clone 9.1, Abcam) antitestet használtunk 1:500 hígításban, másodlagos ellenanyagként pedig HRP-konjugált nyúl ellenes (goat anti rabbit HRP, sc-2004) vagy egér ellenes (goat anti mouse HRP, sc-2005) antitesteket, 1:1000 hígításban. A géltre való feltöltés mennyiségi kontrollját alfa- vagy gamma-tubulin festésével végeztük, egérben termelt gamma tubulin ellenes (T5326, Sigma) vagy nyúlban termelt alfa-tubulin ellenes (ab15246) primer antitestekkel, 1:1000-hez, és egér/nyúl ellenes HRP konjugált szekunder antitestekkel (sc-2005/sc-2004) 1:5000-hez hígításban. A tubulinok festése előtt a membránt stríppeltük. A gélekről felvételeket a Molecular Imager VersaDoc MP 5000 System (Bio-Rad) segítségével készítettünk. A denzitometriás méréseket ImageJ szoftverrel végeztük el.

3.2.9 X-kromoszóma inaktiváció mértékének meghatározása humán sejtekben

Perifériás vérből nyert, döntően leukocita sejtekből (NucleoSpin RNA Blood, 740200, Macherey-Nagel), bőrből és fibroblasztokból (Total RNA Mini Kit Tissue, RT, Geneaid) RNS kivonást majd reverz transzkripciót (BIO-65042, Boline; K1671, Thermo Scientific) végeztünk a gyári protokolloknak megfelelően. A mintákat a súlyosan érintett leánytól (IV:4; perifériás vérmintát 7 és 13 éves, hasbőrt és fibroblasztot 7 éves korban) és édesanyjától (III:3, perifériás vér) nyertük. Az X-kromoszóma inaktivációjának mértékét allélspecifikus, Taqman-próbával kiegészített kvantitatív PCR-el határoztuk meg (LightCycler TaqMan Master, 04535286001, Roche) az alább felsorolt primerek használatával (5. táblázat).

5. táblázat: Az X-kromoszóma inaktiváció meghatározásához végzett Taqman-próbához használt primerek szekvenciája (5'-3' irányban).

E206K wt	5'-GACCATCTACGAGCAAAATGATTG-3'
E206 mut	5'-GGACCATCTACGAGAGCAAAATGATTA-3'
E206K R	5'-CTGCATCTGACCAACTCC-3'
E206K TM	5'-FAM-AGGAATCTTTTGGGTGAGTTGTGAGGC-BBQ-3'

Az allélspecifikus PCR reakcióelegyének összetétele az alábbi volt:

10 µl puffer (LightCycler® 480 Probes Master, Roche), 1 µl E206K wt/E206K mut, 1 µl E206K R, 1 µl E206K TM, 7 µl dH₂O+DNS (20 ng); 20 µl össztérfogatban.

Az allélspecifikus kvantitatív PCR programja (LightCycler® 480 Instrument II, Roche) az alábbi volt:

- I. Denaturáció: 95°C 5 perc 4,4 °C/szekundum, analízis: -
- II. Anneláció:

95°C 10 szekundum 4,4 °C/szekundum	}	analízis: mennyiségi
59°C 15 szekundum 2,2 °C/szekundum		
meghatározás		
- 72°C 5 szekundum 4,4 °C/szekundum
- III. Hűtés: 1 perc 1,5 °C/szekundum, analízis: -

A PCR reakciót követően agaróz gélen ellenőriztük a termékek méretét. A valósídejű PCR során a ciklusszám függvényében ábrázolható a jelintenzitás változása. Azt a ciklusszámot, ahol ez a legmeredekebben emelkedik, küszöbértéknek (threshold) nevezzük, és ez a jelintenzitás arányos a kiindulási templát mennyiségével. Az ehhez az értékhez tartozó ciklusszámot C_p értéknek hívják. Mennél alacsonyabb ciklusszámnál jelentkezik ez a küszöb jelintenzitás, azaz mennél kisebb ez a C_p érték, annál nagyobb mennyiségben volt jelen a kiindulási minta. A programhoz tartozó szoftverrel (LightCycler® Analysis Software) ez a C_p érték kiszámítható volt, így mintában jelenlévő a vad és mutáns allélok arányára ebből tudtunk következtetni. Az ugyanazon mintáról vad és mutáns primerekkel készült valósídejű PCR reakciókból nyert C_p

értékek különbsége adta meg a vad és a mutáns transzkriptumok mennyiségi arányát. A kettőnek azon hatványát véve, ahány ciklusban különböztek a feltörés pillanatában, ahhoz egyet hozzáadva, a 100%-ot ezzel a számmal elosztva kiszámítható a két allél százalékos aránya ($X_{\text{Glu206Lys}}\% = 100 / (2^{(\text{CpGlu206Lys} - \text{Cpvad})} + 1)$).

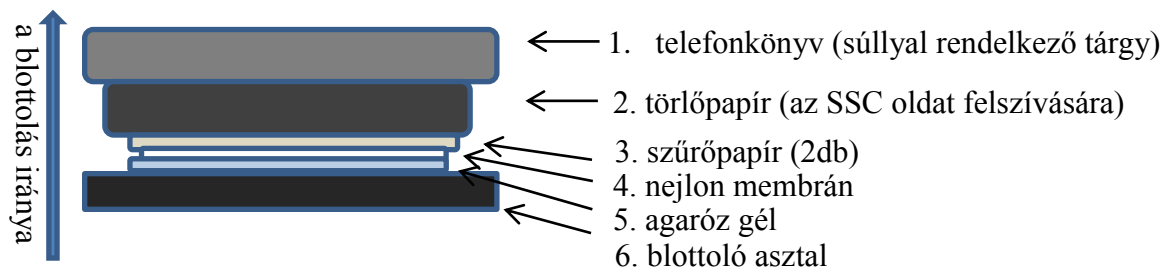
A módszer specificitásáról és a primereknek a két allélhoz való azonos affinitásáról vad és c.616G>A mutáns cDNS-t tartalmazó pcDNA3.1 Zeo(+) plazmidokból készült hígítási soron (10^{-1} - 10^{-6} ng/ μ l) végzett mérésekkel győződünk meg. Valamennyi mérést legalább három alkalommal ismételtük. A mérésekből nyert C_p értékek számtani átlagát vettük eredményül.

3.2.10 Vad és mutáns zebrahal törzsekből kivont RNS-en végzett immuno-northern blot technika

Teljes RNS kivonást végeztünk 12-12 db, négy és fél-ötödik fertilizációt követő életnapos, *dkc1* homozigóta trunkáns mutáns vagy nullmutációt hordozó/homozigóta vad genotípusú lárvából (TRIzol Reagent, 15596026, Invitrogen). A kísérlet Northern blot részét a Nemzeti Agrárkutatói és Innovációs Központ (NAIK) Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézetében (MBK) végeztük Silhavy Dániel és Szádeczky-Kardoss István segítségével. A módosított nukleotidok jelen betegségben feltételezhetően érintett egyikének, a pszeudouridinnak a megfestését egy irodalomban leírt módszer alapján terveztük meg⁵⁸. A mintánként 3 µg RNS-t 1,5%-os denaturáló agaróz gélben futtatunk meg 1x-es MAE oldatban (összetételek alább láthatóak) 75 majd 90 V feszültség alatt, 15 µl gélfeltöltő pufferben, 15 perc 65°C-on történő melegítést követően. A gélekről felvételt készítettünk (Molecular Imaging Gel Doc System, Bio-Rad) a későbbi denzitometriás mérésekhez. A gélt a transzferhez szükséges 10x-es SSC pufferben öblítettük, majd összeállítottuk a kapilláris hatáson alapuló, szendvicstechnikával felépülő transzferrendszert (8. ábra). Egy éjszakán keresztül zajlott a nejlon membránra (Amersham HybondN, RPN203N, GE Healthcare Life Sciences) való blottolás. Blottolást követően az agaróz gél rövid élére tükröződve láttuk a mintasort a nejlon membránon. A blottolt RNS-t a membránnal a kísérlet másnapján UV fény alatt (5 db 8 Watt teljesítményű, 254 nm-en emittáló fénycső) 2x25 szekundumon át keresztköttük. A nejlon membránt ezt követően desztillált vízben öblítettük, majd 5%-os BSA tartalmú PBS oldatban 1 órán át szobahőmérsékleten blokkoltuk. Rövid mosást követően primer, egérben termelt, pszeudouridin ellenes antitesttel (D-347-3, MBL), 1:500-hoz hígításban PBS-ben 1,5 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. Háromszor 10 percig PBS-1% BSA-0,1% Tween20 oldattal történő öblítést követően a membránt egér ellenes, HRP konjugált szekunder ellenanyaggal (sc -2005, Santa Cruz Biotechnology), 1:1000-hez hígításban PBS-ben 1 órán át, szobahőmérsékleten megfestettük. Ismét háromszori mosást követően a membránról a várt jelet kemilumineszcens anyaggal előhívtuk. A denzitometriás méréseket az agaróz gélről és a kemilumineszcens jelekről ImageJ szoftverrel végeztük.

A Northern blot technikához használt oldatok/pufferek receptúrái:

- MAE (10x): pH 7, össztérfogat 1000 ml, RT, fénytől védve, szűrés 0,45 μm -os filterrel; 41,8 g MOPS beolvadva ddH₂O-ba, pH-t állítani 10 M-os NaOH-val, 20 ml Na-acetát (1 M, pH 7,0), 20 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0).
- FDE: össztérfogat 10 ml, tárolás -20°C; 0,01 g brómfenolkék, 0,01 g xilén cianol beoldva 9,8 ml deionizált formamidba, 0,2 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0)
- SSC: 20x-os töménység, pH 7,0 (pH-t állítani 1 M-os sósavval), össztérfogat 1000 ml, RT, autoklávozni; 175,3 g NaCl, 88,23 g Na-citrát (*2 H₂O) (= trisodiumcitrát), dH₂O (melegíteni kell a só beoldásához).
- Formamid: deionizált.
- Mintafelvívő puffer: össztérfogat 100 μl ; 7 μl Mili Q víz, 10 μl 10xMAE, 10 μl FDE, 5 μl etidium-bromid (5 mg/ml), 18 μl formaldehid, 50 μl formamid.



8. ábra: Northern blot technika. A blottoló „szendvics” összetétele. Az éjszaka folyamán zajló RNS blottolás a gravitációval ellenirányban, a kapilláris hatás irányának megfelelően zajlik.

3.2.11 A hal és a humán 28S és 18S RNS alegységek érintettségének vizsgálata

Jelen vizsgálathoz és az immuno-northern blottal azonos mintákból dolgoztunk. Az RNS minőségét, kis és nagy alegységek arányát Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 Pico kit-el (5067-1513, Agilent Technologies) határozták meg számunkra az erre szakosodott laboratóriumban. Az Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 Pico kittel végzett méréseink során a teljes RNS mintáink minőségéről (RIN: RNS Integritási Szám), pikogramm/mikroliter pontosságú koncentrációjáról és az egyes riboszomális alegységek mennyiségének arányáról (rRNS [28S/18S] arány) szerezhettünk tudomást.

Az RNS minőségét jellemző RIN szám egy és tíz között változhat. A mérés maga egy ~ 2 cm²-es chippen zajlik, ahol 12 mintafelvitelre alkalmas zseb található. Egyik helyet minden esetben a létra foglalja el. Meglehetősen nagy hígításban, 0,2-5 ng/μl koncentrációban kerülnek felvitelre az egyes minták, 1 μl térfogatban. A minták elválasztása méret szerint, a gélelektroforézis elve alapján történik.

Az így elkészült elektroferogramok alapján hasonlítottuk össze a 28S és 18S RNS alegységekből nyert csúcsok értékeit, így a két alegység mennyiségi arányát.

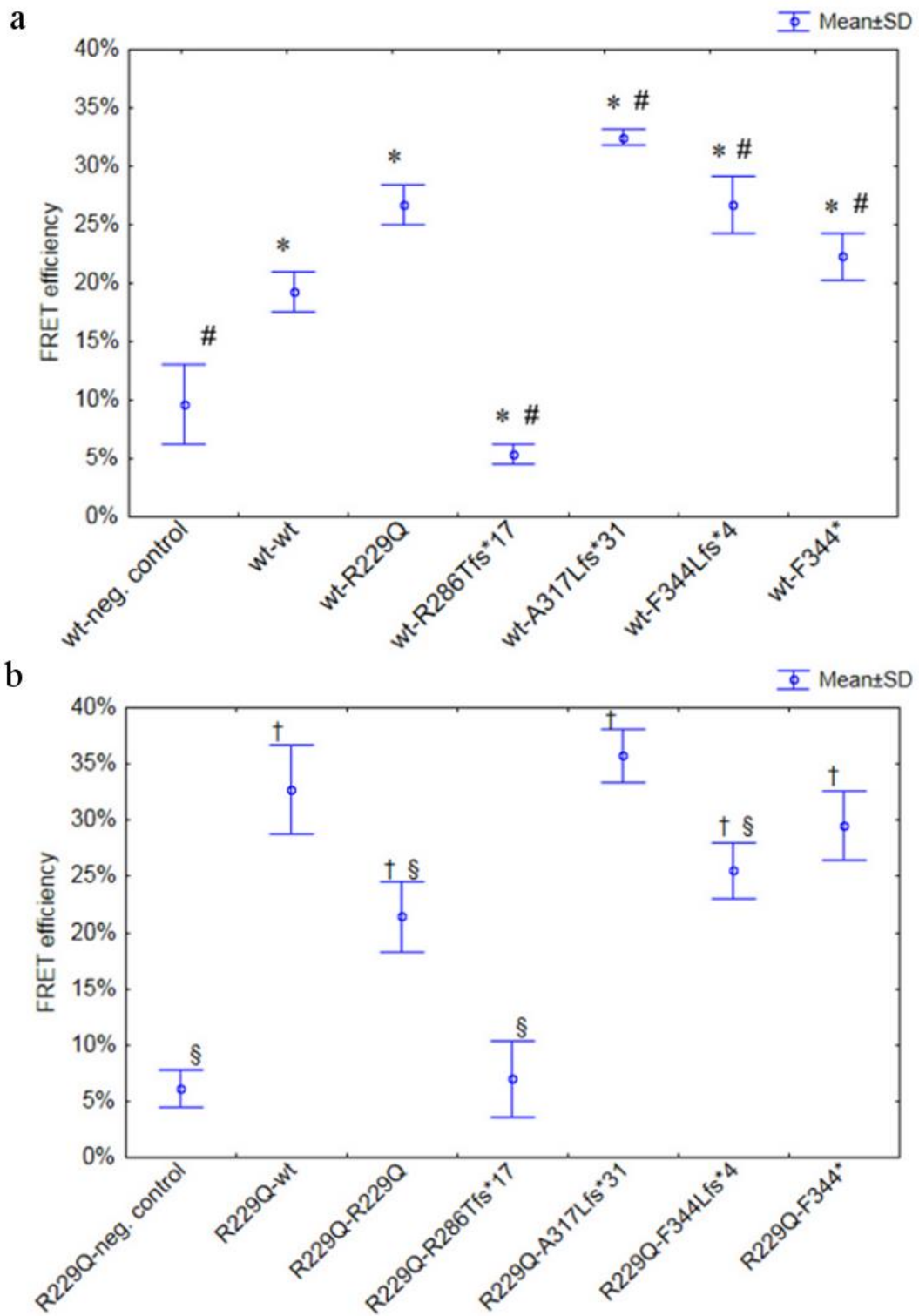
3.2.12 Statisztikai elemzések

A pszeudouridin denzitometria eredményeit és a 28S és a 18S arányát a vad és mutáns zebrahalakból kivont RNS-ekben kétmintás t-próbával vetettük össze. A statisztikai elemzések Statistica 13.2 szoftverrel végeztük.

4 Eredmények

4.1 A podocin oligomerizáció vizsgálatának eredményei

A Förster-féle rezonáns energiaátadás (FRET) hatékonyságát vizsgáltuk különböző, külön megfestett podocin variánsok heterooligomerjeiben. Megközelítőleg 20%-os FRET hatékonyságot mértünk a vad és az R229Q homooligomerjeiben (9. ábra, a,b). A FRET-hatékonyság a vad-R229Q heterodimerek között előbbinél még hatékonyabbnak bizonyult, függetlenül attól, hogy a vad (9. ábra, a) vagy az R229Q (9. ábra, b) podocint jelöltük a donor festékkel. A negatív kontrollokkal összevetve az R286fs*17 podocinok nem adtak érdemi FRET-jelet sem a vad, sem az R229Q podocinnal, melyből a CTT hiányában a dimerizáció hiányára következtettünk (9. ábra, a,b). Ezen eredmények alátámasztották a CTT régió di- és oligomerizációban betöltött kizárólagos szerepét. Az R229Q, A317Lfs*31, F344Lfs*4 és F344* variánsok jelentősen befolyásolták a heterooligomerek között mért FRET-hatékonyságot, ami a C-terminalis dimerizációs hélixek oligomerizációra gyakorolt jelentős hatásáról tanúskodott. A TVV(337-339)-motívummal rendelkező F344Lfs*4 és F344* podocinok R229Q-val való interakciójakor eltérő tendenciájú változást láttunk a FRET-hatékonyságban a vad podocinnal való társuláshoz képest, vad podocinnal való társulásakor az F344Lfs*4 podocin az F344*-nél magasabb, R229-val alacsonyabb FRET-jelet adott. Ebből arra következtettünk, hogy a patogén R229Q-F344Lfs*4 társulás hátterében a frameshift okozta három aminosav (FDL344_346LTY) szerkezeti hatása állhat (9. ábra, a,b). Az R229Q- F344Lfs*4 az egyetlen patogén társulás az itt vizsgáltak közül ⁵⁹.



9. ábra: A podocin a C-terminális régiójában oligomerizálódik.

a-b) FRET-hatékonyság vad (a) és R229Q (b) podocinok homo-és heterooligomerjeiben. A vad és az R229Q podocinokat donor, a trunkáns kötőpartnereket akceptor festékkel jelöltük meg. Az R286Tfs*17 podocinnal észlelt FRET-hatékonyság nem haladja meg a negatív kontrollal mértet, utalva arra, hogy a CTT hiányában a podocin nem képes dimerizálódni. A vad-R229Q heterooligomerek magasabb FRET-hatékonyságot mutattak, mint a vad vagy R229Q homooligomerek, mely konformáció-változásra utal. Az F344* podocin-heterooligomerekhez képest az F344Lfs*4 podocin-heterooligomerek eltérő irányba változtatták a FRET-hatékonyságot, a vad podocinnal való társuláskor növekvő, az R229Q podocinnal való, ismertén patogén társuláskor pedig csökkenő tendenciát láttunk (utóbbi társulás az egyetlen patogén társulás a vizsgáltak közül), mely különbség hátterében a terminális 3 aminosav (FDL344_346LTY) szerkezeti hatása feltételezhető.

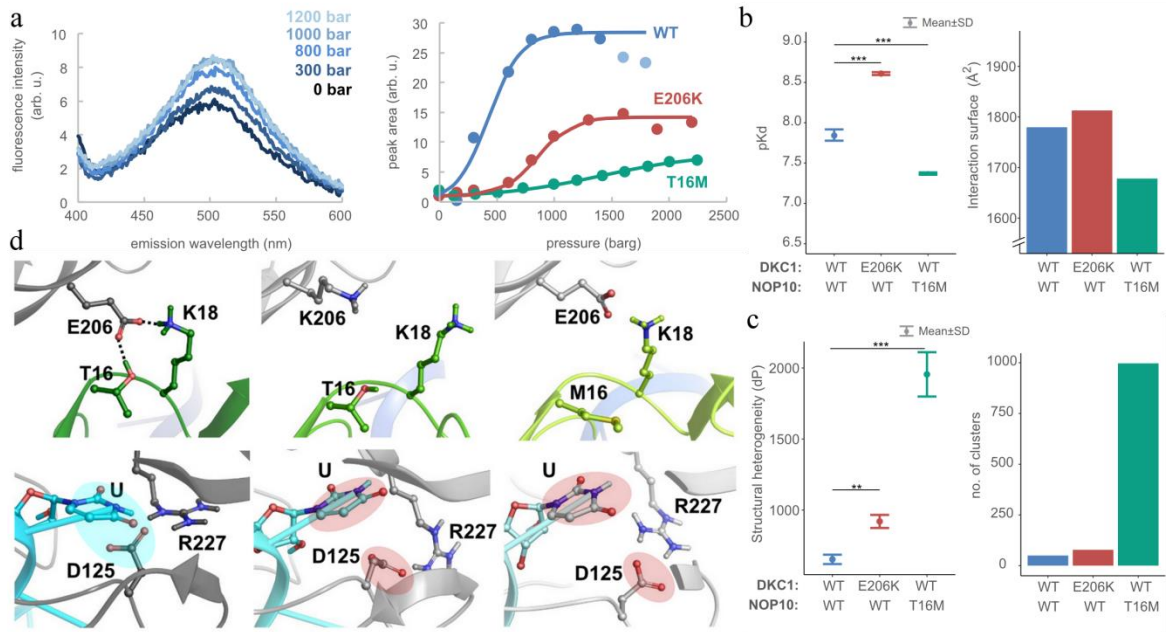
* $P \leq 0,0003$ a vad-negatív kontrollhoz képest, # $P \leq 0,006$ a vad-vad homodimerekhez képest, † $P = 0,0002$ az R229Q-negatív kontrollhoz képest, § $P \leq 0,0003$ az R229Q-R229Q homodimerekhez képest ²³.

4.2 Az új diszkerin mutáció vizsgálatának eredményei

4.2.1 A Glu206Lys diszkerin-NOP10 valamint a diszkerin-Thr16Met NOP10 kölcsönhatásának változásai a vad variánssal való asszociációhoz képest

Nyomásperturbációs fluoreszcencia spektroszkópiával azt tapasztaltuk, hogy a vizsgált *DKC1* és a *NOP10* mutációk esetében ellentétes irányba változott a kötése erősség és a kötőfelszínének mérete, és mindkét esetben nőtt a fehérjék strukturális heterogenitása. Ezen mérések során a fluoreszcens jelintenzitást ábrázoltuk növekvő nyomás függvényében, ahol a mutáns diszkerin-vad NOP10 és a vad diszkerin-mutáns NOP10 fehérje-asszociációk esetén magasabb nyomásoknál, valamint kisebb mértékben észleltük ezen jelintenzitás csúcs megjelenését a vad diszkerin-vad NOP10 társuláshoz képest. A Glu206Lys diszkerin nagyobb jelintenzitás csúcsot adott a Thr16Met NOP10-nél ami nagyobb apoláris kötőfelszínre utal (10. ábra, a). Az így kalkulált fehérjepárokra jellemző disszociációs állandó (K_d) jelentősen megváltozott a vad társulásokhoz képest.

A Glu206Lys diszkerin esetében szignifikánsan magasabb, a Thr16Met NOP10 esetében alacsonyabb pK_d ($pK_d = -\log(K_d)$) értéket észleltünk, mely arányos a kötési erősséggel. A szintén számítással meghatározott, interakcióra képes felszín mind a két mutáns esetében eltért a normálistól, a Glu206Lys diszkerin esetében nagyobb, a Thr16Met NOP10 esetében kisebb volt, azonban ez az eltérés nem volt szignifikáns (10. ábra, b). Fenti változások megerősítettek bennünket abban, hogy az interakció a mutációk ellenére létrejön, annak erőssége azonban megváltozik, feltehetően a fehérjék (kötfelszínek) konformációjának változása miatt. Szerkezeti modellek és a nyomásperturbációs spektroszkópia alapján kiszámítható volt a dimerek strukturális heterogenitása és szerkezeti elemeinek száma, amely a Glu206Lys diszkerin és a Thr16Met NOP10 esetében is megnő, utóbbi esetében szignifikáns mértékben, a vad dimerekhez képest (10. ábra, c). A szerkezeti elemzések segítettek annak az értelmezésében, hogy a mutációk a másodlagos kötések szintjén hogyan befolyásolják a komplex működését és szerkezetét. A diszkerin Glu206 a NOP10 Thr16-el és a Lys18-al alakít ki hidrogénkötéseket. A diszkerin Glu206Lys és a NOP10 Thr16Met aminosavak cseréjekor e két hidrogénkötés megszakad. Továbbá mindkét mutáció hatására a szubsztrát uridin és a diszkerin katalitikus 125. aszparaginsava egymástól térben eltávolodik (10. ábra,d). A két fehérjét érintő mutációk elhelyezkedését és a ribonukleoprotein szerkezeti modelljét szintén az alábbi ábra szemlélteti (10. ábra,e).

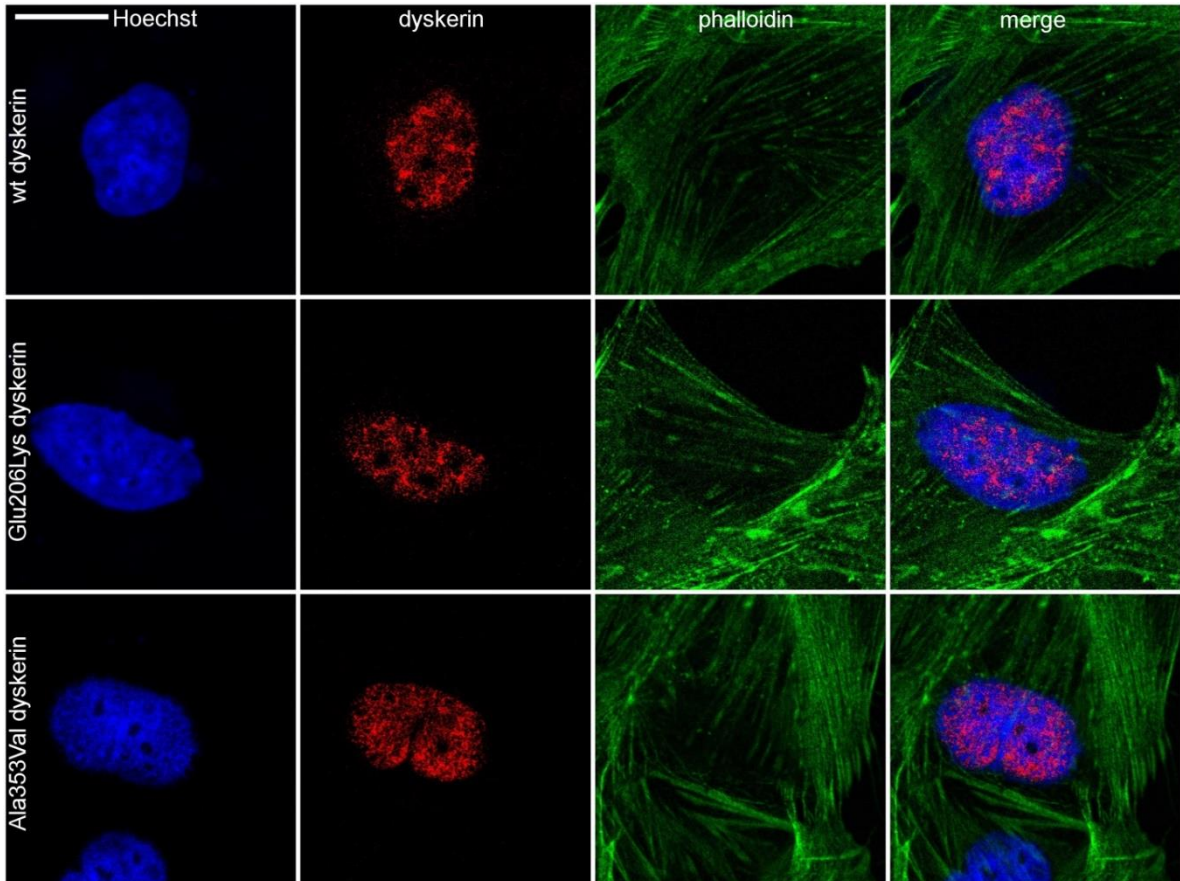


10. ábra: A Glu206Lys és a Thr16Met misszensz mutációk hatása a diszkerin és a NOP10 interakciójára valamint a pszeudouridiláció katalitikus helyének szerkezetére.

a) A fluoreszcens jelintenzitás a nyomás függvényében valamint a fluoreszcens jelintenzitás csúcs a vad (WT) diszkerin-NOP10, a Glu206Lys diszkerin-NOP10 valamint diszkerin-Thr16Met NOP10 fehérjepárok esetében. A fluoreszcens jel a mutáns fehérjékkel való asszociációkkor később (magasabb nyomásoknál) és alacsonyabb jelintenzitással éri el a csúcsát. b) A pKd és az interakciós felszín méretének változása vad és mutáns társulások esetében. A pKd szignifikánsan megnő a Glu206Lys diszkerin-NOP10, és lecsökken a diszkerin-Thr16Met NOP10 esetében a vad-vad társulásokra jellemző értékhez képest. A kötőfelszín mérete ezzel azonos tendenciájú változást mutat. c) Nyomásperturbációs mérések eredményeiből számított strukturális heterogenitás mértéke a különféle asszociációkban. d) MD kalkulációkból ábrázolt fehérje interakciós felszín és pszeudouridilációs aktív centrum; mindkét mutáció megszakítja a Glu206-Thr16 és -Lys18 közötti hidrogénkötéseket, továbbá elmozdítja a pszeudouridilációhoz szükséges Asp125-öt a katalízis helyéről. e) A teljes ribonukleoprotein komplex szerkezete és a Glu206Lys, a Thr16Met és a leggyakoribb veleszületett diszkeratózis és Hoyeraal-Hreidarsson szindróma hátterében álló mutációk elhelyezkedése; DKC1 szürke, NOP10 zöld, GAR1 piros, NHP2 sárga, guide snoRNS világoskék, szubsztrát RNS sötétkék, DC és HH mutációk egyedülálló gömbformátumban láthatóak.

4.2.2 A vad és Glu206Lys diszkerin lokalizációjának vizsgálata

A diszkerin a sejtmagban található, a veleszületett diszkeratózis hátterében sem annak megváltozott lokalizációja áll ⁵⁰. Az immuncitológiai kísérletek során az általunk vizsgált Glu206Lys valamint a gyakori, diszkeratózist okozó Ala353Val mutáns diszkerin lokalizációja megfelelt a vad diszkerinének (11. ábra).



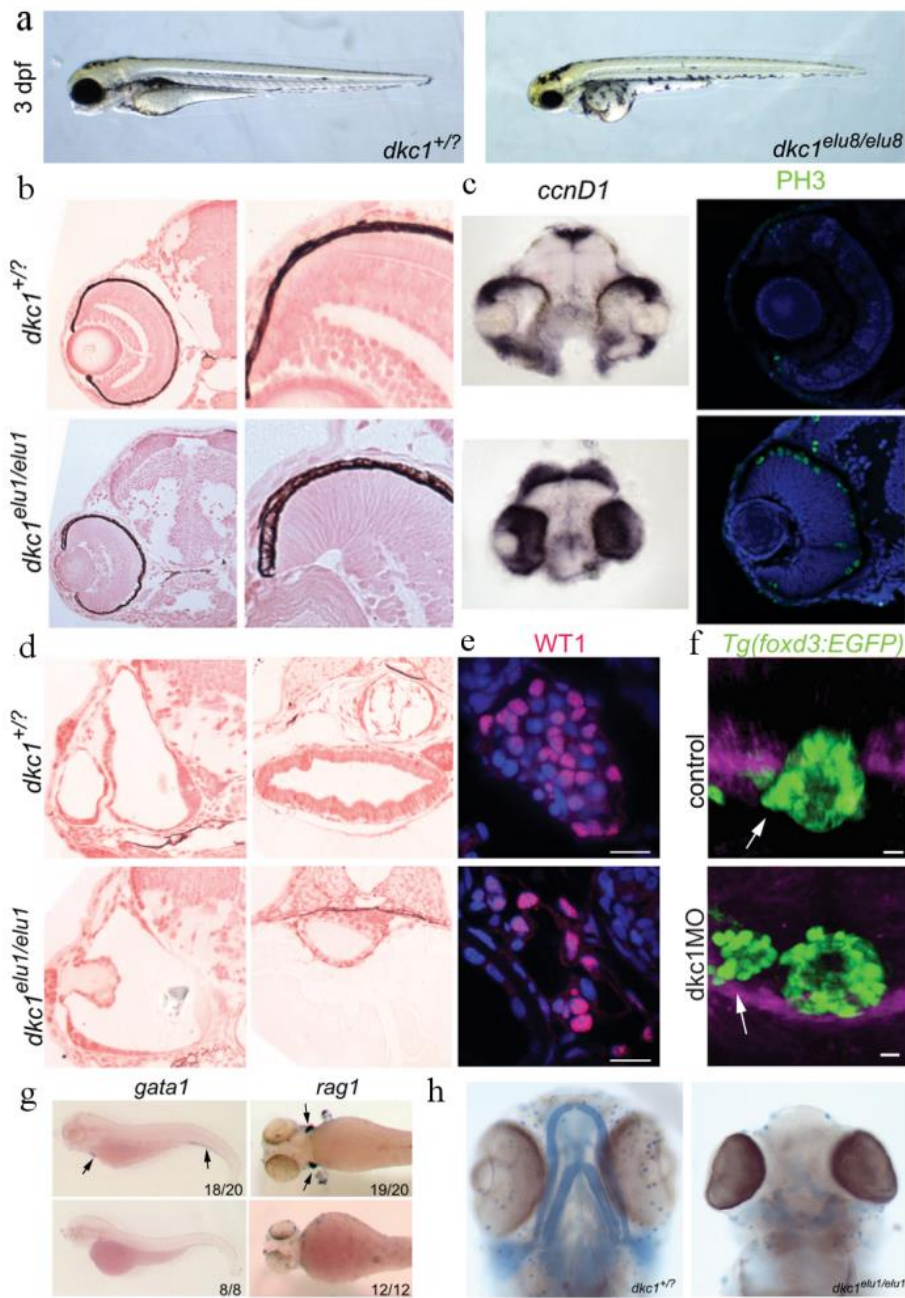
11. ábra: A Glu206Lys diszkerin sejten belüli lokalizációja nem változik meg. Hasonlóképpen a vad és a gyakori veleszületett diszkeratózist okozó mutáns, Ala353Val-hoz, a Glu206Lys diszkerin is a sejtmagban helyezkedik el. Hoechst: sejtmagfestés, dyskerin: Flag-ellenes antitesttel végzett immunfestés, phalloidin: sejtváz-festés, merge: összevont kép.

4.2.3 A CRISPR/Cas9 injektálást követően kiszűrt mutáns zebrahal törzsek

A humán diszkerin Glu206Lys és az Ala353Val ekvivalens variánsait kódoló mutációkat halban nem sikerült létrehozni, mert homológ rekombinációt, hasonlóan más zebrahal-laboratóriumokhoz, nem tudtunk létrehozni. Létrehoztunk azonban több inzerciót és deléciókat a kiváltott nem-homológ vég-a-véghez illesztés (non-homologous end-joining) révén. Alább kerülnek felsorolásra az injektálásokat követő genotipizálás során kiszűrt mutáns zebrahal törzsek (6. táblázat). Létrehoztunk egy, a 11-es exont

érintő, 4 bázis delécióval és egy bázis inzercióval járó mutánst (#5-ös), mely fehérje szinten a Lys374 kiesését és ugyanezen a helyen egy prolin beépülését jelenti. A prolin aminosav markáns hatással szokott bírni a fehérjék másodlagos szerkezetére ⁶⁰. Ezen haltörzset a továbbiakban részletekbe menően nem vizsgáltuk alacsony humán relevanciája miatt. A 7-es exonban sikerült létrehozunk egy 190. kodonba történő valin inzerciót (#8-as), mely a humánnal ekvivalens 201. érintett aminosavtól már nem esik messze, így ennek a halnak részletesen próbáltuk feltérképezni a fenotípusát, de jelen kutatáshoz ez közvetlenül nem tudott kézzelfogható támpontot nyújtani, annak eredményei itt nem kerülnek részletezésre. Mind a 7-es (#17-es/*elu1*), mind a 11-es (#7-es/*elu8*) exonban létrehoztunk egy-egy kereteltolódást okozó mutációt. A #7 (*elu8*)-es és a #17 (*elu1*)-es törzsekben a mutáns allélról átíródó mRNS korai lebomlásra esik át, a nonsense-mediated decay (NMD), az RNS degradációs rendszerek egy típusa révén, így azokról érdemi fehérje-átíródás nem történik ⁶¹

A kiszűrt, null mutáns zebra hal törzsektől származó *elu1* és *elu8* homozigóta mutáns lárvák, valamint itt nem részletezett előkísérletek során vizsgált *dkc1* Morpholino injektált zebra hal lárvák fenotípusa számos tekintetben emlékeztetett a betegek fenotípusára. Makroszkóposan görbült test, rövidebb testhossz, kisebb fej, kisebb, hiperpigmentált szem, szikanyag eloszlási zavar, perikardiális ödéma voltak a szembetűnő eltérések. Szöveti vizsgálatok során abnormális szem- és tektumszerkezetet, lencsehomályt, emelkedett sejtciklus-marker (*ccnD1*, PH3) szinteket, éretlen belső fül- és bélszerkezetet, alacsonyabb WT1-pozitív podocita-számot, kóros tobozmirigy szerkezetet, éretlen csontvelőszövetet (*gata1*, *rag1*) és hipopláziás állkapcsot láttunk. Az érintett halak legkésőbb az ötödik (nagyon ritkán hatodik) megtermékenyítést követő napon elpusztultak. A nullmutáns halak makroszkópos és mikroszkópos fenotípusát az alábbi ábra mutatja (12. Ábra, Dr. Varga Máté által készített felvételek, demonstráció céljából).



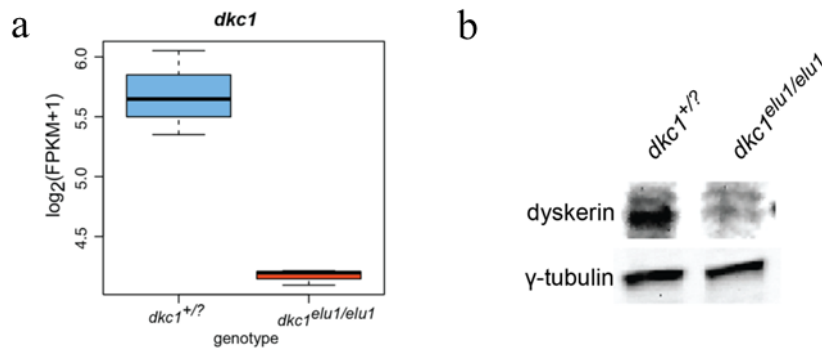
12. ábra: A *dkc1* nullmutáns (*elul8* homozigóta) zebradániók makroszkópos és mikroszkópos fenotípusa. A nullmutáns halak tengelye görbült, szeme kicsi és hiperpigmentált, feje kisebb a megtermékenyítést követő harmadik életnapon a heterozigóta halakhoz képest (a). Szövetteni vizsgálatokkal microphthalmia, cataracta (b), emelkedett sejtciklusmarker (*ccnD1*, PH3)-ráta, mely a sejtciklus zavarára utal (c), a belső fül (három félkörös ívjárat)-és a bél hipopláziája (d), alacsonyabb WT-pozitív podocita-szám, mely a hipopláziás pronephros jele (e), kóros tobozmirigyszerkezet (f),

csontvelő-hipoplázia (g, gata1: erithro-és trombopoiesis transzkripciós faktora, rag1: a T és B sejtek érését elősegítő fehérje) és porchipoplázia (h, az állkapocs hiányzik a nullmutáns halakban, alcian-kék festéssel készült kép) ábrázolódott.

A második megtermékenyítést követő életnapon vett mintákban azt tapasztaltuk, hogy a diszkerin fehérje továbbra is közel normális mennyiségben volt jelen, ami nem felelt meg azzal az elképzelésünkkel, hogy az *elu1/elu8* törzsekben létrehozott mutáció a diszkerin mRNS-ének korai lebomlásával járjon, így vezetve a fehérje teljes hiányához. Ismerve az irodalomból az anyai hatás jelenségét⁶², mely az emlősökben körülbelül a 48. életóráig fennáll (anyai mRNS és az arról átíródó fehérjék formájában), megismételtük a méréseinket negyedik-ötödik életnapos korban, ahol az etikai szabályokon túl a már a null mutáns zebrahalak életképessége is korlátozta a vizsgálatunk lehetőségét. Ebben az időpillanatban a diszkerin fehérje teljes hiányát láttuk a mutáns halakban, melyet az ELTE Genetika Tanszékén kollaboránsaink mRNS szinten is alátámasztottak (13. ábra a,b).

6. táblázat: CRISPR/Cas9 injektálással az ELTE Genetikai Tanszék zebraadánio csoportja által generált, általunk genotipizálással kiszűrt mutáns zebrahal törzsek.

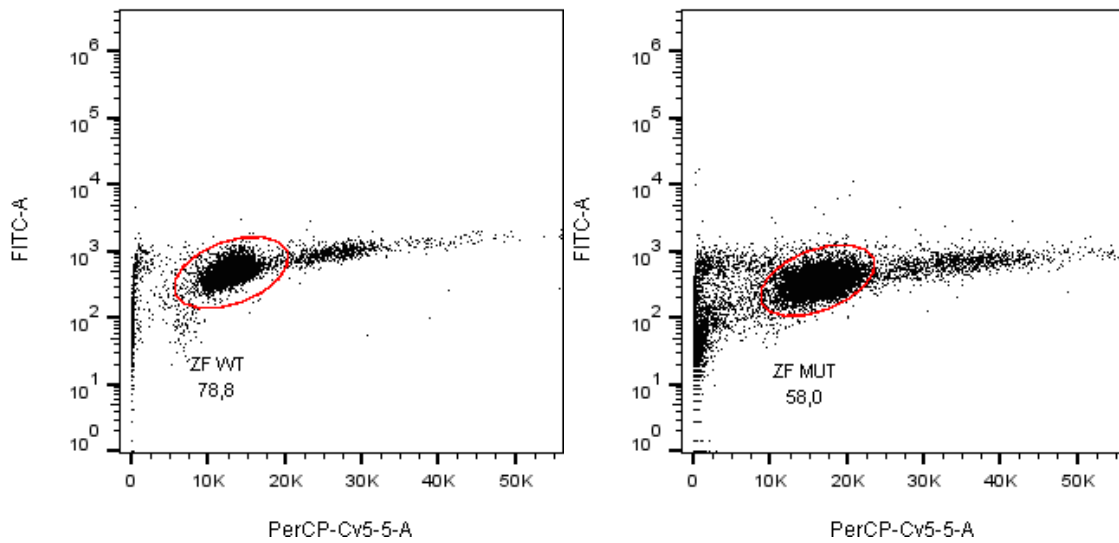
Haltörzs neve (érintett exon)	cDNS mutáció	Kódolt fehérje
#5 (11. exon)	c.1118_1121delGCAAinsC	p.Arg373_Lys374delinsPro
#7 / <i>elu8</i> (11. exon)	c.1117_20delCGCA	p.Arg373Asnfs *13 (NMD)
#8 (7. exon)	c.567_568insGTG	p.Leu189_Arg190insVal
#17 / <i>elu1</i> (7. exon)	c.566_567insTCATGGT	p.Arg190Hisfs*14 (NMD)



13. ábra: A *dkc1* mRNS és a diszkerin fehérje mennyiségi változása *elu1* homozigóta lárvákban. a) A fertilizációt követő harmadik életnapon a nullmutáns lárvákban a *dkc1* mRNS mennyisége jelentős mértékben lecsökken. Az mRNS mennyiségi csökkenésének a hátterében a nonsense-mediated decay (NMD) mechanizmusa feltételezhető ⁶¹. b) A diszkerin fehérjét a fertilizációt követő negyedik életnapon homozigóta *elu1* mutáns lárvák teljes lizátumából már nem tudtuk kimutatni. Fehérje-feltöltési kontroll: gamma-tubulin.

4.2.4 Az áramlási citometriával meghatározott telomerhossz mérések eredményei

Az áramlási citometriás vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy az ötödik fertilizációt követő életnapon a vad és a *dkc1*^{-/-} mutáns zebrahalak telomerhossza nem tért el egymástól (14. ábra). Ebből az következik, hogy nem a megrövidült telomerhossz vezet ebben az életkorban a zebrahalak elpusztulásához.



14. ábra: A telomerhossz meghatározása áramlási citometriával vad és *dkc1*^{-/-} fenotípusú halakban az ötödik megtermékenyítést követő életnapon. A diagramokon a fluoreszcens jelintenzitás ábrázolódik a festett DNS mennyiségének függvényében. Vad (az ábra bal oldala) és *dkc1*^{-/-} mutáns (az ábra jobb oldala) halak esetében ebben az életkorban hasonló telomerhosszot mértünk.

Minden mérés során átlagos fluoreszcencia értéket nyertünk, a három mérés eredményei az alábbi táblázatban kerülnek felsorolásra (7. táblázat a,b).

7. táblázat: Fluoreszcencia jelintenzitás átlagok *dkc1*^{-/-} (a) és vad (b) fenotípusú zebrahalakból készült mintákból.

a)

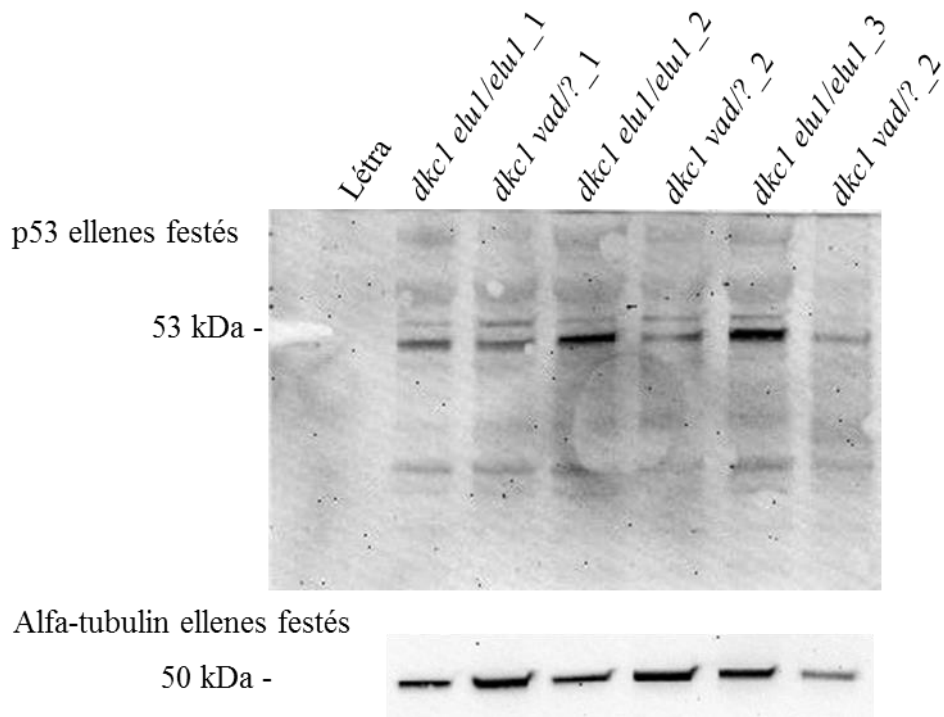
<i>dkc1</i> ^{-/-} mutáns zebrahalakból végzett mérések (n=10 hal/mérés)	Átlagos fluoreszcencia intenzitás
1. mérés	426
2. mérés	390
3. mérés	439

b)

<i>dkc1</i> +/-? normál zebrahalakból végzett mérések (n=10 hal/mérés)	Átlagos fluoreszcencia intenzitás
1. mérés	423
2. mérés	419
3. mérés	395

4.2.5 A *dkc1*^{-/-} zebrahalak p53 szintje

A teljes hosszúságú p53 izoforma szintje a null mutáns lárvák teljes fehérjekivonatában az ötödik megtermékenyítést követő életnapon jelentősen megnőtt (15. ábra). Kereszteltük a *dkc1* mutáns törzset egy *p53* mutáns törzssel, kettős mutáns törzseket hozva létre. A kettős mutáns törzsben (*dkc1*^{-/-} és *p53*^{-/-}) a fenotípus nem volt mentesíthető, amiből arra következtettünk, hogy a súlyos fenotípust nem a p53 szint emelkedése okozza. A p53 fehérjének többféle izoformája létezik, anti-apoptotikus izoformája delta 113p53 néven ismert és 30 kDa molekulatömegű. A p53 számos egyéb szabályozási folyamatban is szerepet játszik, például a regenerációban vagy a kompenzatórikus sejtproliferációban^{63, 64}. Az anti-apoptotikus izoforma molekulatömegének megfelelően észleltünk egy halvány, mennyiségében a teljes méretű p53-hoz hasonló tendenciában változó fehérjesávot, azonban ez az antitest epitóp felismerőhelyének ismeretében nem tekinthető azzal identikusnak (a monoklonális antitest epitópja az N-terminális 20 aminosav, ami kizárja azt, hogy a western blot képen a delta 113 izoformát lássuk⁶⁵), így ennek lehetőségét a Western blotok alapján elvetettük. Ettől független vizsgálatban, az itt részletesen nem bemutatott transzkriptóma-elemzés során 36 órás életkorban láttuk a delta 113p53 antiapoptotikus forma mRNS mennyiségének növekedését, a teljes méretű p53 mRNS mennyiségnek pedig csökkenését. Bár nem áll rendelkezésünkre transzkriptóma adat az ötödik fertilizációt követő életnapról (sem p53 Western blot felvételünk a 36 órás életkorból), ezen eredmények alapján felmerült a teljes méretű p53 stabilitás megnövekedésének lehetősége.



15. ábra: Vad és *dkc1* *-/-* fenotípusú hal lárvákból kivont fehérjemintán végzett Western blot az ötödik megtermékenyítést követő életnapon p53 ellenes festéssel. A diszkerin ebben az időpillanatban a trunkáns mutáció következtében már nem detektálható a *dkc1* *-/-* genotípusú lárvákban, a p53 szintje pedig ugyanezekben az lárvákban megemelkedik. Fehérje-feltöltési kontroll: alfa tubulin.

4.2.6 Az X-kromoszóma inaktivációs mérések eredményei

A vad és az Glu206Lys mutációra specifikus primerek affinitása között *DKCI* cDNS-t tartalmazó pcDNA3.1 Zeo(+) plazmidokon végzett mérésekkel nem találtunk különbséget. A plazmid hígítási sorról nyert C_p értékeket az alábbi táblázatban kerülnek bemutatásra (8. táblázat). A tízszeres hígításoktól azt vártuk, hogy a feltörési ciklusszám (C_p) értékek között három ciklus legyen a különbség, és ez mindkét hígítási sorra teljesült az általunk vizsgált koncentrációtartományokban, valamint a legkisebb és legnagyobb hígításoktól eltekintve hasonló ciklusoknál törtek fel az azonos hígítások fluoreszcens jelei.

8. táblázat: A vad és Glu206Lys diszkerin mutációra specifikus primerekkel végzett kvantitatív PCR és Taqman-próba feltörési ciklusértékei (C_p) az adott cDNS-eket hordozó plazmidokból készült hígítási sorról a primerek affinitásának vizsgálatára. A tízszeres hígítások között a legkisebb és legnagyobb hígításoktól eltekintve, így az általunk vizsgált koncentrációtartományokban a várt három ciklusnyi különbség jelenik meg, valamint az azonos hígítások fluoreszcens jelintenzitásai hasonló ciklusszámoknál törnek fel.

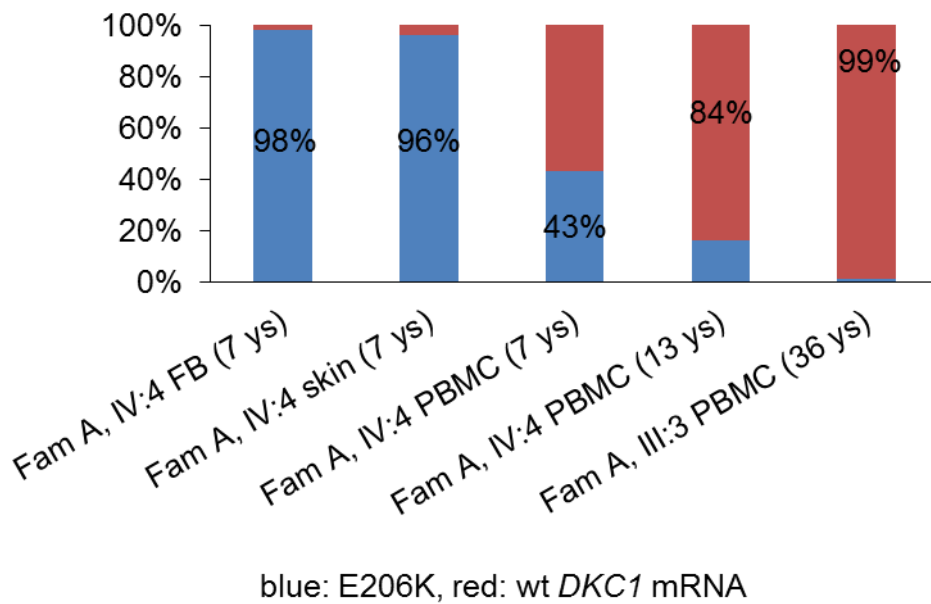
WT	C_p	Glu206Lys	C_p
10^{-1}	16,28	10^{-1}	15,01
10^{-2}	21,7	10^{-2}	22
10^{-3}	26,87	10^{-3}	26,52
10^{-4}	30,24	10^{-4}	30,8
10^{-5}	34	10^{-5}	33,6
10^{-6}	36,46	10^{-6}	34,56

A perifériás mononukleáris sejtekből kivont RNS-en végzett reverz transzkripció, majd Taqman-próbával kombinált kvantitatív PCR eredményeképpen azt láttuk, hogy a mutáns fehérjét expresszáló X-kromoszómák aránya az életkor előrehaladtával a súlyosan érintett hordozó leányban csökkent. Ez a megfigyelés korrelál az irodalomban a *DKCI* mutációk esetén tapasztalt jelenséggel, miszerint a mutáns allélt expresszáló csontvelői sejtek idővel szelektálódnak a véráramból az egészséges allélt expresszáló sejtek javára ⁶⁶. A Glu206Lys mutáns allél a súlyosan érintett leányban 7 éves korban 43%-os arányban fejeződött ki, amely érték 13 éves korára 16%-ra csökkent, a 36 éves édesanyában pedig már gyakorlatilag nem volt kimutatható (16. ábra). A súlyosan érintett leány fibroblasztjaiból és hasbőréből kivont RNS mintákban lényegesen nagyobb arányban, 98 és 96 %-ban expresszálódott a mutáns allél. Kisebb osztódási rátájú sejtekben ez az arány lassabban változik, ezzel megerősítve azt a feltételezésünket, miszerint a leány tünetei súlyosságának hátterében egyenlőtlen X-kromoszóma inaktiváció áll (9. táblázat; 16. ábra).

9. táblázat: A Taqman-próbával kiegészített kvantitatív PCR eredményei az X-kromoszóma inaktivációjának vizsgálatára a súlyosan érintett leányban (IV:4) és édesanyjában (III:3). Az táblázat oszlopai a LightCycler szofver által kalkulált C_p értékek átlaga valamint az ebből általunk kalkulált százalékos arányok. Látható, hogy a súlyosan érintett leány perifériás vérsejtjeiben 7 éves korban még 43%, 13 éves korban pedig csak 16% volt a mutáns allélt expresszáló X-kromoszómák aránya, valamint, hogy a lassabban osztódó fibroblaszt és hasbőr sejtekben 7 éves korban a mutáns X-kromoszóma a perifériás vérhez képest lényegesen nagyobb hányadban, 98 és 96 %-ban volt aktív. Az édesanya perifériás vérsejtjeiből 36 éves korban már gyakorlatilag nem tudtuk kimutatni a mutáns allélt expresszáló X-kromoszómát.

* $100/(2^{\Delta C_p}+1)$, százalékban kapott eredmény, ahol a kisebb C_p értékhez tartozik a magasabb százalékos érték (= nagyobb arányban volt jelen a kiindulási mintában).

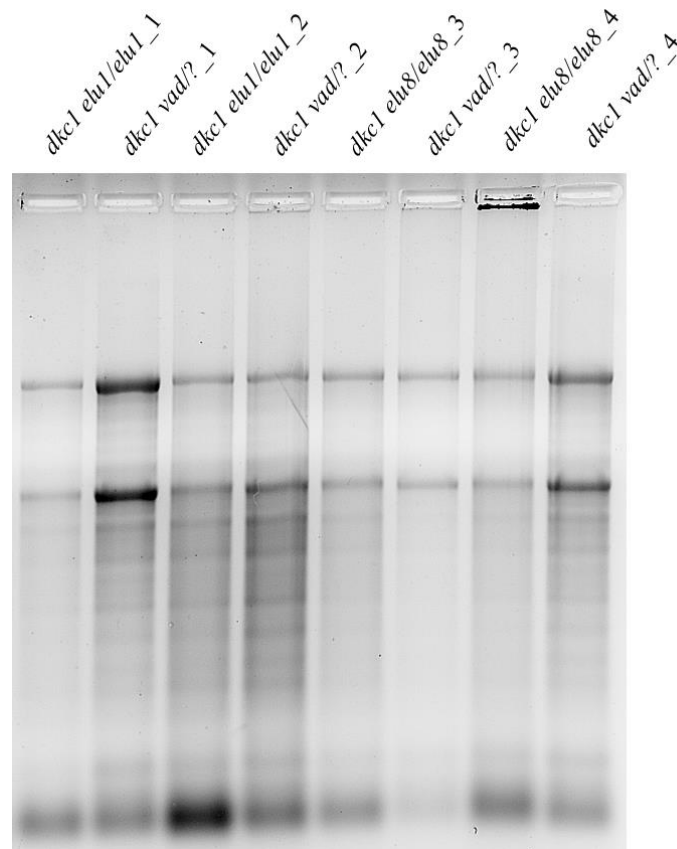
Minta neve (életkor)	C_p átlag E206K	C_p átlag vad	ΔC_p	$2^{\Delta C_p}$	% E206K	% vad
Fibroblaszt IV:4 (7 év)	34,20	39,60	-5,41	0,02	97,70	2,30
Hasbőr IV:4 (7 év)	30,86	35,33	-4,47	0,05	95,68	4,31
PBMC IV:4 (7 év)	33,20	32,80	0,40	1,32	43,11	56,88
PBMC IV:4 (13 év)	30,25	27,87	2,38	5,21	16,11	83,88
PBMC III:3 (36 év)	35,48	28,11	7,36	164,28	0,60	99,40



16. ábra: Az X-kromoszóma inaktiváció százalékos eloszlása a súlyosan érintett, Glu206Lys mutációt hordozó leányban 7 éves korban fibroblasztból, hasbőrből és perifériás vérből valamint édesanyjában 36 éves korban perifériás vérből. A lassan osztódó szövetekben a mutáns allélt expresszáló X-kromoszóma van jelen döntő mennyiségben, a perifériás vérből azonban kisselektálódik a vad allélt expresszáló sejtek javára. A mutációt hordozó édesanya perifériás vérében 36 éves korban gyakorlatilag nincsen jelen mutáns allélt expresszáló X-kromoszóma. A Glu206Lys kék, a vad *DKC1* allél piros színnel került jelölésre.

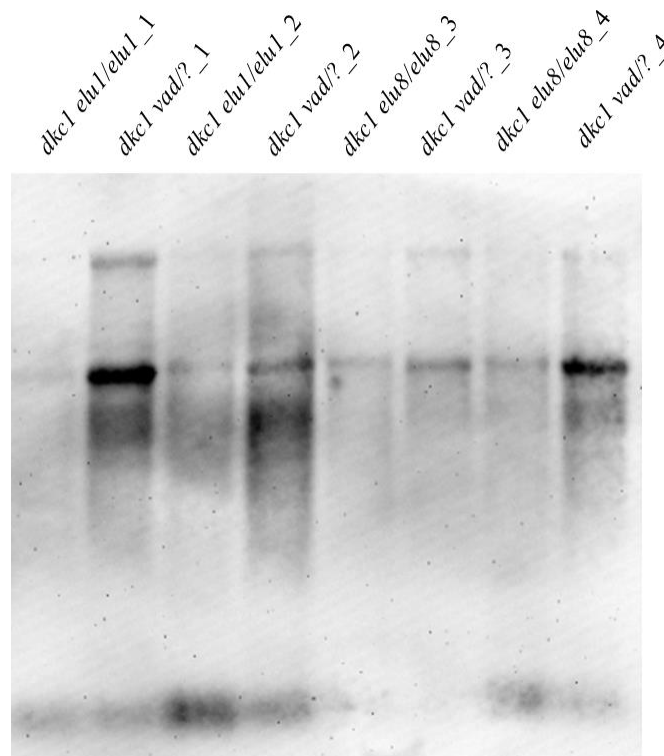
4.2.7 A *dkc1*^{-/-} mutáns zebrahalak riboszomális RNS-pszéoudouridilációja

Homozigóta *dkc1 elu1* és *elu8* hal lárvákból készült RNS minták agaróz gélen való futtatási képét mutatja a 17. ábra.



17. ábra: A *dkc1 elu1* és *elu8* homozigóta trunkáns mutáns és heterozigóta/homozigóta vad genotípusú, négy és fél-ötödik életnapos lárvákból kivont RNS-en végzett Northern blot agaróz gélképe. A 28S és 18S rRNS alegységek, valamint degradált és kisebb (m, tRNS-ek) láthatóak a képen.

Az immuno-blot technika eredményeképpen kemilumineszcens jeleket kaptunk (18. ábra). Az rRNS nagy, 28S alegységének festése technikailag nehezebb volt a kis, 18S alegységénél.

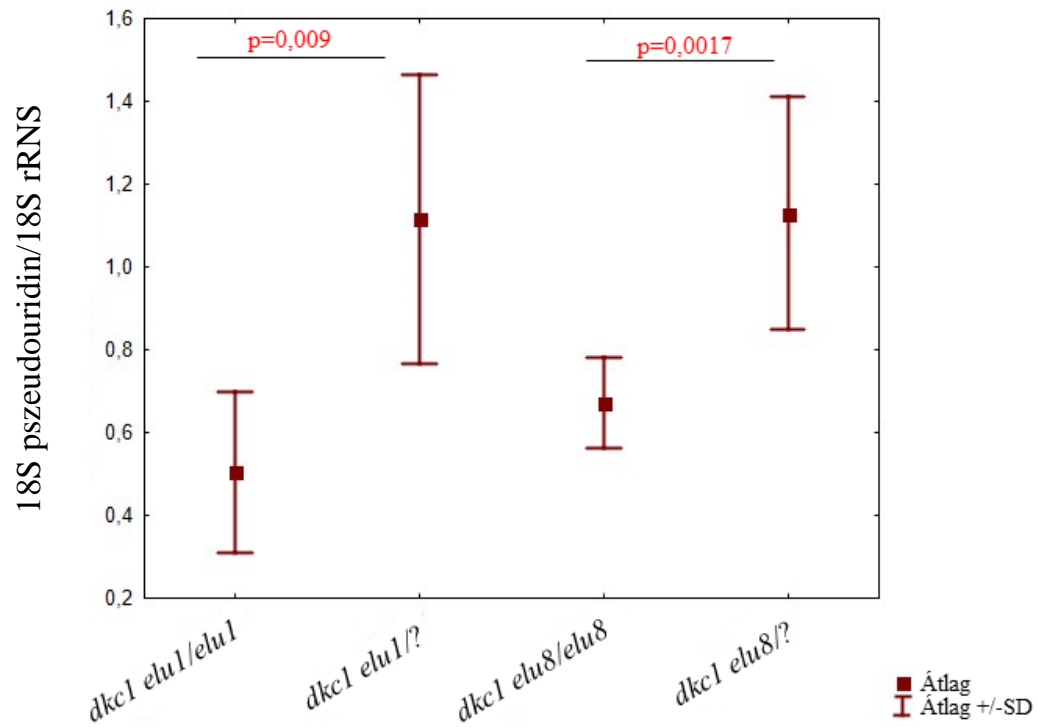


18. ábra: Immuno-northern blot technika eredményeképpen pszeudouridin ellenes festéssel létrejött membrán képe négy és fél-ötödik életnapos homozigóta mutáns (*elu1*: 1-4. sáv; *elu8*: 5-10. sáv) zebrahal lárvákból kivont RNS mintákon. A 28S, a 18S riboszóma alegységek és a degradált RNS látható e festési technikával. A 28S alegységek a 18S-nél kevésbé festődtek. A vad fenotípusú lárvák mintái minden esetben erősebb jelet adtak a mutánsokénál. A számításokhoz a kemiluminszcens jel és az agaróz képen kapott denzitás hányadosát értékeltük, kiküszöbölve az rRNS mennyiségéből fakadó különbségeket.

Az egyes RNS alegységek pszeudouridilációjának a mértékét a denzitometrálok során mért pszeudouridin jelének és az agaróz gélen mért RNS jelének a hányadosaként adtuk meg. Az egyes denzitás értékeket előbb korrigáltuk az adott blot vad mintáinak átlagos denzitására, hogy a különböző blotokról nyert adatok biztonsággal összevethetőek legyenek statisztikai elemzéseink során. Mind a két trunkáns mutáns törzs esetében szignifikáns különbséget észleltünk a 18S alegység pszeudouridiláltságának mértékében (10. táblázat, 19. ábra).

10. táblázat: A 28S és 18S alegységek pszeudouridin (PU) és RNS denzitásának hányadosai négy és fél-ötödik fertilizációt követő életnapos, *dkc1* homozigóta/trunkáns mutáns és heterozigóta/homozigóta vad lárvákban. A 28S halvány PU festése miatt azt két esetben nem tudtuk számszerűsíteni. A 18S alegység pszeudouridilációs értékei a mutáns halakban alacsonyabbak. A 28S alegység esetében ez a tendencia nem észlelhető.

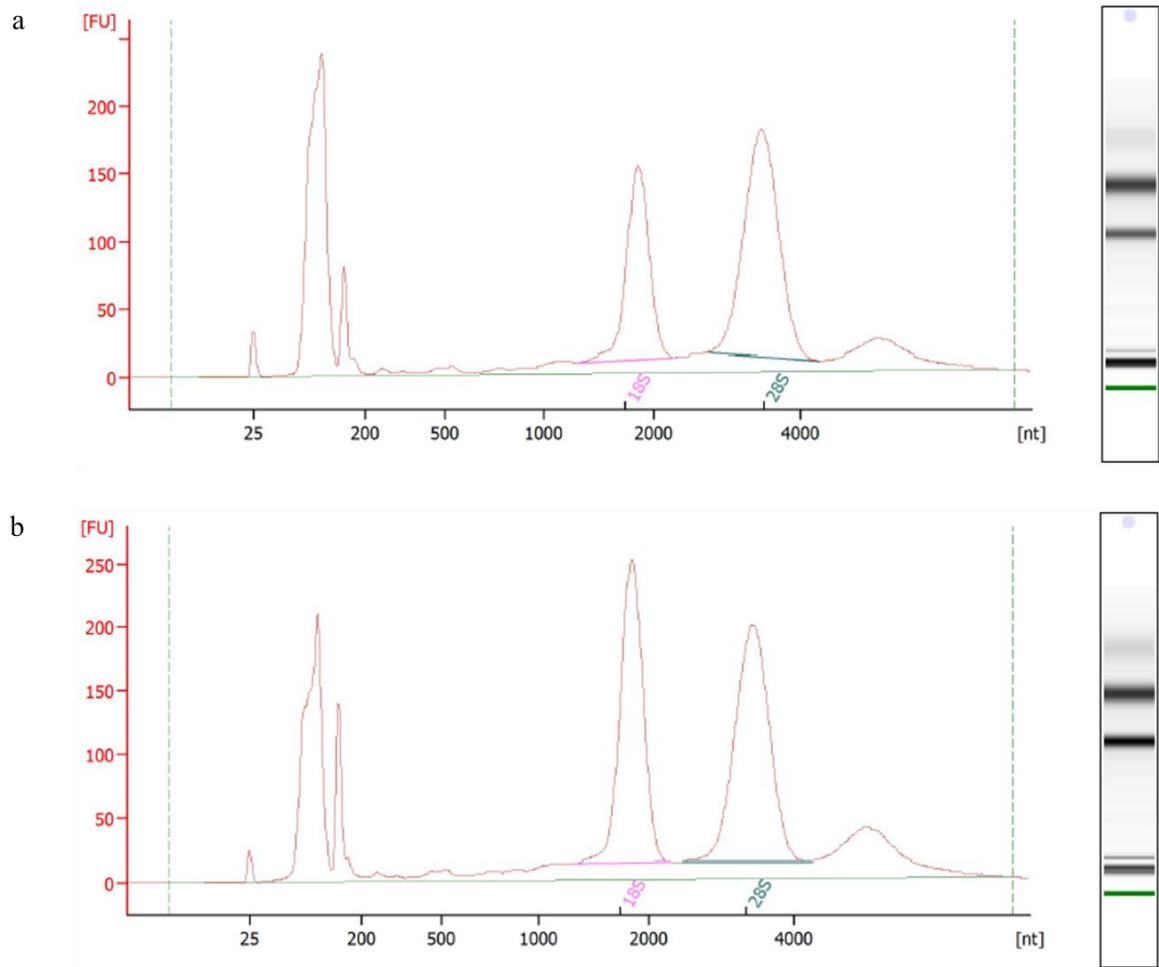
Genotípus	28S PU/RNS	18S PU/RNS
<i>dkc1_elu1/elu1_1</i>	-	0,30
<i>dkc1_vad/?_1</i>	0,20	1,21
<i>dkc1_elu1/elu1_2</i>	0,23	0,62
<i>dkc1_vad/?_2</i>	0,76	0,82
<i>dkc1_elu8/elu8_3</i>	-	0,66
<i>dkc1_vad/?_3</i>	0,19	1,49
<i>dkc1_elu8/elu8_4</i>	0,04	0,83
<i>dkc1_vad/?_4</i>	0,02	1,41



19. ábra: A 18S riboszomális alegység pszeudouridiláltságának összehasonlítása fertilizációt követő négy és fél-ötödik életnapos, homozigóta trunkáns mutáns és heterozigóta/homozigóta vad lárvákban. A mutáns lárvákban a 18S alegység pszeudouridilációja szignifikáns mértékben csökken.

4.2.8 A *dkc1*^{-/-} zebrahalakból kivont RNS-en végzett integritási mérések eredményei

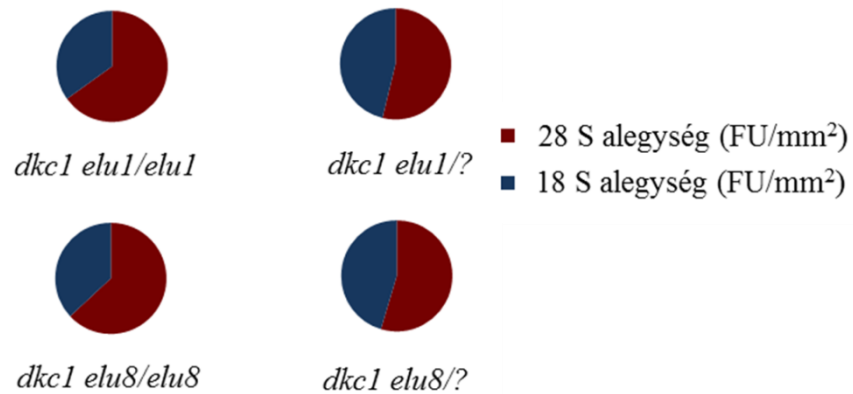
Az Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 Pico kittel végzett méréseink eredményeképpen a riboszomális alegységeket méretük szerint különíthetjük el az ún. elektroferogramon, ahol az RNS mennyiséggel arányos fluoreszcens jelintenzitás ábrázolódik a nukleotidban meghatározott méret függvényében (20. ábra). A méretek pontos megadásához a létra ad támpontot. Amennyiben az RNS nagymértékben degradálódik (a RIN szám csökken), az alapvonal megemelkedik a riboszomális alegység csúcsok rovására, melyek nagyfokú degradáció esetén teljesen el is tűnhetnek. A négy és fél-ötödik életnapos zebrahal lárvákból kivont teljes RNS mintákon a 28S és a 18S riboszomális alegységek arányát vizsgáltuk. A 28S/18S arány a trunkáns mutáns zebrahal lárvákban megemelkedett az egészséges társaikhoz képest. A 28S/18S arány megemelkedésének hátterében a 18S alegység mennyiségének relatív csökkenését észleltük (11. táblázat, 21-22. Ábra).



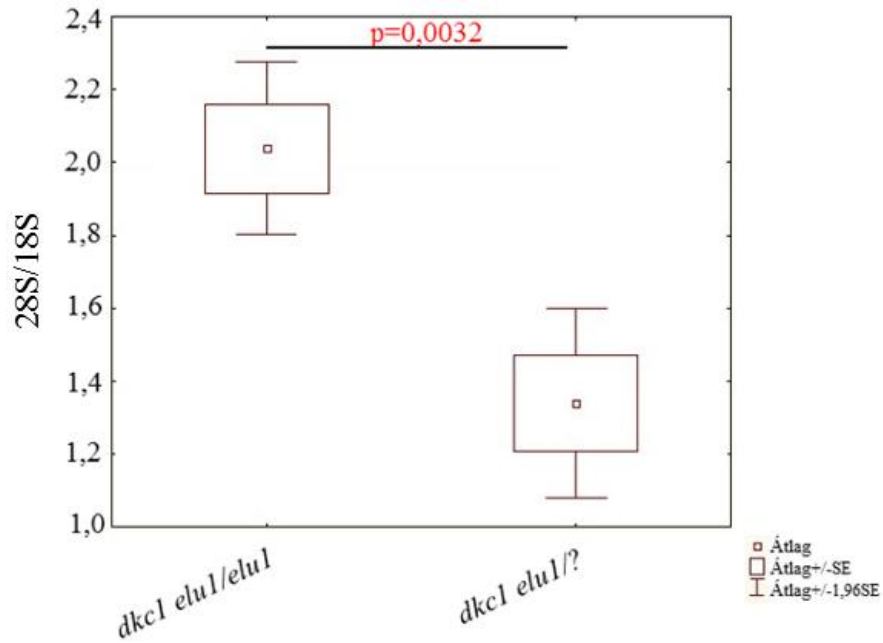
20. ábra: Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 Pico kittel végzett mérések eredményeképpen kapott elektroferogramok. A mennyiséggel egyenesen arányos fluoreszcens jelintenzitás ábrázolódik az RNS alegységek nukleotidban (nt) megadott méretének függvényében. A 200 nt alatti mérettartományokban a kisebb méretű RNS-ek, 25 nukleotidnál a mintafelvívő puffer által generált csúcs láthatóak. A 18S alegység ~1500-2000, a 28S alegység mérete 2500-4000 nt között van. Az *a* ábrarészen egy *dkc1 elu8/elu8* homozigóta mutáns, *b* részén egy *dkc1 elu8/?* heterozigóta vagy homozigóta vad lárva teljes RNS mintájából készült elektroferogram látható, a 18S alegység aránya a mutánsban lecsökken a 28S alegységéhez képest.

11. táblázat: Az egyes, 28S és 18S alegységek görbe alatti területértékeinek (fluoreszcens intenzitás/mm²) összehasonlítása valamint a riboszomális RNS 28S/18S alegységének aránya homozigóta trunkáns mutáns és egészséges fenotípusú, négy és fél-ötödik életnapos lárvákban. A görbe alatti területek méretét a futtatott RNS mennyisége (így a minta koncentrációja) határozza meg.

Haltörzs, amelyből a vizsgált lárvák származtak	Trunkáns mutáns lárvák			Heterozigóta/homozigóta vad lárvák		
	28S (FU/mm ²)	18S (FU/mm ²)	28S/18S	28S (FU/mm ²)	18S (FU/mm ²)	28S/18S
<i>elu1</i>	766,30	418,10	1,83	307,10	320,90	0,96
	790,70	469,20	1,69	578,10	489,30	1,18
	400,40	218,80	1,83	228,10	165,50	1,38
	425,60	231,80	1,84	165,10	118,10	1,40
	144,00	60,70	2,37	193,50	160,30	1,21
	39,60	17,40	2,28			
	207,40	80,60	2,57			
	840,20	435,90	1,93			
Átlag (FU/mm ²)	451,78	241,56	2,04	294,38	250,82	1,22
<i>elu8</i>	98,80	36,80	2,68	183,70	118,90	1,54
	133,60	46,60	2,87	120,90	75,90	1,59
	155,70	68,70	2,27	742,60	606,10	1,23
	949,00	620,10	1,53	814,00	799,90	1,02
	731,40	470,90	1,55	1067,50	832,10	1,28
	646,00	324,60	1,99			
Átlag (FU/mm ²)	452,42	261,28	2,15	585,74	486,58	1,33



21. ábra: A 28S és a 18S alegységek mennyiségi aránya. *dkc1* homozigóta trunkáns mutáns és az egészséges zebrahal lárvákból származó teljes RNS mintákban (Agilent gélelektroforézist követően felvett elektroferogramokon látható görbe alatti területek átlagának egymáshoz való aránya). Piros színnel a 28S, kék színnel a 18S alegységek kerültek ábrázolásra, *elu1* (fenti sor) és *elu8* (alsó sor) haltörzsekből származó mutáns és vad fenotípusú hal lárvákban. A mutáns fenotípusú lárvákban a 18S aránya lecsökken a 28S-hez képest (a 28S/18S arány megnő, $p=0,032$).



22. ábra: *dkcl elu1* homozigóta mutáns és heterozigóta/homozigóta vad négy és fél-ötödik életnapos lárvákból kivont teljes RNS minőségi és mennyiségi elemzésének eredményei. Homozigóta mutáns lárvákban a 28S/18S RNS arány megnő a 18S alegység mennyiségének relatív csökkenése miatt.

5 Megbeszélés

5.1 A podocin-oligomerizáció vizsgálata

A podocin-oligomerizációk fontosságára hívta fel a figyelmünket, hogy az R229Q patogenitása a társuló C-terminális mutációk függvényének bizonyult ¹⁸. Ezen oknál fogva hangsúlyt fektettünk a C-terminális oligomerizáció folyamatának megértésére. Jelen dolgozatban a három természetben előforduló (R286Tfs*17, A317Lfs*31, F344Lfs*4) és egy mesterséges (F344*) C-terminálisukon változó mértékben csonkolt podocin variáns kapcsolatát vizsgáltuk az intakt C-terminális régióval rendelkező vad és R229Q mutáns podocinokkal. Azt tapasztaltuk, hogy azon podocin variáns, mely CTT régióval egyáltalán nem rendelkezik, azaz mindhárom C-terminális helikális régiója hiányzik (R286Tfs*17), nem ad FRET jelet sem a vad, sem az R229Q podocinnal. Ez az észrevétel megcáfolja a podocin korábban az irodalomban leírt, N-terminális dimerizációra való készségét ²⁴.

Az R286Tfs*17 podocin podocitában végzett, itt nem részletezett expressziós vizsgálatait során az a koexpresszált variánsokkal nem kolokalizált, és azok a lokalizációját nem befolyásolta ²³. Ezen megfigyelések tovább erősítették a FRET-méréseken alapuló következtetésünk, hogy a podocin kizárólag a C-terminális régióban oligomerizálódik. A humán podocinnal nagymértékű homológiát mutató stomatin fehérje szintén kizárólag a C-terminális régió révén oligomerizálódik ⁶⁷. A H1 régió megléte (A317Lfs*31) már önmagában elegendő volt a dí/oligomerizációhoz, és a H2, H2-H3 összekötő régió, illetve a teljes CTT régió meglétével összemérhető FRET-jelet adott. A kollaborációban velünk dolgozó MTA-ELTE Fehérjemodellező Kutatócsoport, részben az általunk beállított FRET mérésen alapuló módszerrel elsőként kimutatta, hogy a H1-régió coiled-coil szerkezete révén képes az oligomerizációra ²³. Valamennyi trunkáns mutáns szignifikánsan eltérő kötési erősséget mutatott a vad homooligomerekhez képest, amiből komoly szerkezeti változásokra következtethetünk: a három C-terminális helikális régió jelenléte vagy hiánya erősen befolyásolta a heterooligomerek között mért FRET-hatékonyságot. Ezen, nagyon pontosan reprodukálható méréseket molekuláris dinamikai vizsgálatokkal is alátámasztottuk. Az R229Q erősebben kötötte a vad podocint, mint saját magát, valamint az ismert patogen társulásában (R229Q-F344Lfs*4) más tendenciát mutatott FRET méréseinkben

a vad podocinnal való társuláshoz képest. Az R286Tfs*17 mutáció is több olyan aminosavcserét okoz, melyek önmagukban domináns negatív hatást fejthetnének ki az R229Q podocinnal szemben, az oligomerizáció hiánya azonban magyarázza a domináns negatív hatás elmaradását. Ezidáig az interallelikus interakciók háttérében csak szerkezeti modell alapján tételeztünk fel kóros oligomerizációt. A FRET-mérések igazolták, hogy a podocin kizárólag a C-terminális régióban oligomerizálódik, és mind az R229Q, mind a domináns negatív mutációkat tartalmazó C-terminális hélixek jelentősen befolyásolják az oligomerek szerkezetét. Ezen vizsgálatok megteremtették az alapját a patogén és nem patogén podocin oligomerek későbbi vizsgálatának. A C-terminális oligomerizáció közvetíthet domináns negatív hatást (R229Q-A284V), melynek hatására az R229Q podocin a sejtben reked, de interallelikus komplementációt is (F344Lfs*4 és R238S, *in vitro* kísérlet), melynek hatására az internalizáció megakadályozása révén segíti az egyik variáns a másik membrán-lokalizációját. Podocitákban expresszált podocinok vizsgálatával azt láttuk, hogy a CTT nélküli, hypomorph R286Tfs*17 podocin variáns is képes kijutni a sejtmembránba. Ebből arra következtethettünk, hogy az oligomerizáció nem feltétele a membránlokalizációnak, és a membránba kijutó podocin még CTT hiányában is képes részben ellátni a funkcióját⁶⁸. Felmerült ezért, hogy kóros dimerek képződésének gátlásával a domináns negatív hatás, így esetleg a patogenitás blokkolható lehet az R229Q podocin patogén társulásait hordozó betegekben.

Jelen kísérletek technikai újdonsága, hogy a podocint korábban nem sikerült kivonni natív formában a sejtekből, és így a hetero-oligomerizációját sem lehetett ezidáig *in vitro* vizsgálni. A FRET-mérés lehetőséget adott a heterooligomerek szerkezetének közvetett vizsgálatára.

A vizsgálati eredményünk klinikai szerepe is releváns, ugyanis segít megítélni az eddig ismeretlen R229Q-val való társulások kóros szerepét, összetett heterozigóta egyének genetikai tanácsadását.

5.2 Az új *DKCI* mutáció hatásának vizsgálata

Eddigi ismereteink szerint a *DKCI* (és a *NOPI0*) mutációi következtében a veleszületett diszkeratózis klasszikus tünetegyüttese (leukoplákia, körömdisztrófia, csontvelő elégtelenség, fokozott tumorkockázat) vagy a súlyos Hoyeraal-Hreidaarsson-szindróma

(méhen belüli növekedésbeni elmaradás, mikrocefália, cerebelláris hipoplázia, ataxia, somatomentális retardáció) alakult ki ^{26, 51}, mely kórképek hátterében a telomerszintézis zavara áll. Az irodalomban markánsan más tünetekkel mutakozó betegséget ezen gének mutáció következtében ezidáig nem írtak le. Jelen kutatásban a *DKC1* E206K (és a *NOP10* T16M) új mutációját azonosítottuk egy új, nephrosis szindrómával, cataractával, szenzorineurális halláscsökkenéssel, enterocolitisszel járó szindróma hátterében, mely a veleszületett diszkeratózis és a HH-szindróma tüneteivel csak minimálisan fed át (csontvelő érintettség, cerebelláris hipoplázia, enyhe diszkeratózis). Fiúknban kisgyermekkorban letális, nőkben cataractával, retinitis pigmentosával és halláscsökkenéssel jár. A jelen dolgozatban részletezett E206K mutáció patogenitását számos tény igazolja: (1) a mutáció egy, az archeáig visszamenően konzervált aminosavat érint: mely minden esetben vagy glutaminsav, vagy aszparaginsav, (2) *de novo* alakult ki a családban a betegség megjelenésével egyidejűleg, (3) adatbázisokban, és több száz kontroll személyben nem fordul elő, (4) predikciós programok szerint patogén, és (5) szegregál a betegséggel a csírsejt-mozaikosságnak megfelelően a második generációban, majd szignifikáns LOD értékkel a harmadik és negyedik generációban. Az E206K mutáció elhelyezkedésénél fogva és szerkezeti ismereteink alapján ³¹ szerepet játszik a NOP10 fehérjével való interakcióban és a TERC kötésében, valamint a diszkerin pszeudouridilációért felelős katalitikus doménjében található, ahol mutációk alig ismertek ⁵¹. Előbbiek miatt megvizsgáltuk az E206K diszkerin-NOP10 kötéserősségének változását, ahol a kötés erősödését, a kötőfelszín növekedését, a fehérje dimer struktúrájának rendezetlenné válását, szerkezeti modellekben pedig a pszeudouridiláció katalitikus helyének megváltozását, a szubsztrát uridin katalitikus helytől való eltávolodását láttuk, melyek magyarázzák a mutáció patogenitását. A T16M *NOP10* mutáció esetében ugyan a kötéserősség és a kötőfelszín csökkent, azonban a strukturális heterogenitás jelentősen megnőtt és a szerkezeti modellekben az E206K mutációval azonos hatással bírt. A diszkerin fehérje lokalizációja nem változott meg, az E206K diszkerin is a sejtmagban helyezkedik el.

A család fiú tagjaihoz hasonlóan súlyos mértékben érintett leány (IV:4) állapota hátterében egyenlőtlen X-inaktivációt találtunk. A lassan osztódó szövetekben jelentős eltolódást (96-98 % -ban a mutáns allél aktivitását), a gyorsabban osztódó

leukocitákban már alacsonyabb, 7 éves korban közel 50-50%-os arányt találtunk, mely arány az életkor előrehaladtával a vad javára nőtt. Ennek a csökkenésnek a hátterében a vad allélt expresszáló X-kromoszómákat tartalmazó sejtek pozitív irányú szelekciója áll, mely jól ismert veleszületett diszkeratózist okozó *DKCI* mutációk esetén is ⁶⁶. Zebrahal modellt hoztunk létre trunkáns mutáns haltörzsek generálásával, melyek homozigóta formában súlyos, letális, a humán fenotípushoz sok ponton hasonlító morfológiát mutattak. A homozigóta recesszív hal lárváknak hiperpigmentált szemük, kis állkapcsuk, kisebb, görbült testük, hipopláziás belső fülük és tobozmirigyük, differenciálatlan bélszerkezetük, csontvelő-hipopláziájuk, perikardiális ödémájuk és szikanyag eloszlási zavaruk, hipopláziás pronephrosuk volt, utóbbi a nephrosis szindrómával keresett összefüggésre utalhat. A kis állkapocs vagy madárszerű arc és hypotrophiás küllem a betegekben is jellemző, azonban ezt szubjektív megítélése miatt nem soroltuk a szindróma fő tünetei közé. Ezen lárvák öt napos életkorban meghaltak, normális telomerhossz mellett. Az irodalomban leírt *dkc1* deficiens egér embriók méhen belül elpusztulnak ⁶⁹, a homozigóta *nop10* és *dkc1* mutáns zebrahalak az 5-10 napos kort nem élik túl ^{70, 71}, szintén a telomerhossz rövidülése nélkül, mely más patomechanizmusra irányítja a figyelmet. A riboszomális RNS pszeudouridin festése során azt láttuk, hogy a 18S alegység pszeudouridiláltsága jelentősen lecsökkent, a 28S/18S arány megnőtt. Ezek alapján a korai letalitás hátterében a riboszómák működési zavara állhat, és nem a telomerszintézis zavara. Diszkeratózisban is leírták a riboszómák működési zavarát, de az itt leírtakhoz hasonló tünetegyüttest nem. Az eddig ismert humán *DKCI* mutációk esetében elsősorban a telomerhossz csökkenése és nem a riboszómák működési zavara állt a betegség hátterében ^{72, 73}. Ennek igazolása céljából Varga Máté a zebrahal embriók transzlációját cikloheximiddel gátolta: a *dkc1* trunkáns mutánsokéhoz nagyon hasonló fenotípust észlelt, mely szintén a riboszómák funkcionális zavarának kóroki szerepére utal. Szöveti vizsgálatok során zebrahal lárvákból készített metszeteken a sejtciklus elakadását láttuk. A sejtciklus elakadása miatt vizsgált p53 fehérje szintje megemelkedett, mRNS szinten mennyisége azonban csökkent. A p53 mRNS csökkenése az IRES zavarával magyarázható, mert az arra alkalmas mRNS-ek (így számos antiapoptotikus fehérje) pszeudouridilációjának elmaradása azok csökkent sapka független transzlációjához vezet. A p53 fehérje mennyiségének növekedése mögött az a celluláris stresszben megfigyelt jelenség állhat,

miszerint ilyenkor a p53 fehérje stabilizálódik (ubikvitin mediált degradációja csökken), ami a sejtnövekedésre gátló hatással bír, szükség esetén apoptózist indukál⁷⁴. Ezek mellett a p53 maga aktiválja transzkripciós szinten (annak promoteréhez kötődve) a $\Delta 113p53$ anti-apoptotikus izoformát⁷⁵, mely szintjének emelkedését mRNS szinten mi is észleltük. Az, hogy a súlyos fenotípus p53 mediált sejthalál révén alakulna ki kizárható, mert keresztezett, *dkc1* és p53 depletált halakban a fenotípus nem volt mentesíthető. Brit kollaboránsaink a betegek Southern blottal meghatározott telomerhosszát rövidebbnek találták az egészséges kontrollokénál, a diszkeratózisban megfigyeltekhez hasonló mértékben⁷⁶, azonban a klasszikus DC tünetek ekkor is csak részben voltak jelen. Szerkezeti modellekben a DKC1-NOP10-GAR1-NHP2 ribonukleoprotein komplexben a mutációk elvéve esnek csak a pszeudouridiláció katalitikus helyére, valamint ezen modellekkel a pszeudouridin szintézisének zavarát magyarázó hidrogén-kötések felbomlását, szubsztrát uridin katalitikus D125-től való eltávolodását láttuk, melyek a két mutáció patogenitását magyarázzák és jelen betegségben legalábbis részben a pszeudouridiláció zavara mellett szólnak. Itt nem részletezett, tömegspektrometriás mérések során a súlyosan érintett lány (IV:4) perifériás vérből kivont RNS-ben csökkent pszeudouridin/uridin arány igazolódott 7 éves korban a kontrollokhoz képest, ugyanakkor bőrben és fibroblasztokban ezt nem láttuk, mely utalhat a pszeudouridiláció különböző szövetekben lévő eltérő szerepére. A betegeknek nincsenek érdemi bőrtüneteik.

A számos pszeudouridiláció áteső snRNS, mRNS, rRNS miatt ezen mutációk hatása várhatóan széleskörű és az adott mutációktól függően bizonyos szervek specificitása szóba jön^{41, 77-79}. Az RNS-ek átalakításainak zavara növekvő számú humán betegségből ismert⁸⁰. A nemrégiben Galloway-Mowat szindróma hátterében azonosított KEOPS-komplex például a tRNS-ek modifikációjának zavarát okozza és tünetei között szintén szerepel a nephrosis szindróma⁸¹.

A jelen kutatásban azonosított új szindróma, mely hátterében a *DKC1* és a *NOP10* eddig ismeretlen mutációi állnak, patogenitását elsősorban a pszeudouridiláció és ennek következtében a riboszomális diszgeneszis zavarával magyarázzuk, mely magyarázza a diszkeratózistól különböző megjelenését.

6 Következtetések

1. A podocin kizárólag a C-terminális régióban oligomerizálódik.
2. A podocin C-terminális régiójának mindhárom helikális régiója befolyásolja az oligomerizációt.
3. Az F344Lfs*4 domináns negatív hatását magyarázhatja a frameshift szekvencia által kódolt három aminosav oligomerizációt befolyásoló hatása.
4. A diszkerint kódoló *DKCI* gén Glu206Lys mutációja egy nephrosis szindrómával, halláscsökkenéssel, cataractával és enterocolitisszel járó új szindrómát okoz, mely fiúkban kisgyermekkorban letális, nőkben cataractával, retinitis pigmentosával és halláscsökkenéssel jár.
5. A diszkerin Glu206Lys mutációja a NOP10 fehérjével való kapcsolatot jelentősen torzítja.
6. A diszkerin Glu206Lys mutációja a fehérje lokalizációját nem befolyásolja.
7. Egy fiúhoz hasonló mértékben érintett lány súlyos fenotípusát egyenlőtlen X-kromoszóma inaktiváció okozta. A fehérvérsejtekben a diszkerin Glu206Lys mutáció jelentős negatív szelekcióhoz vezetett az életkor előrehaladtával.
8. A homozigóta *dkc1* nullmutáns zebrahalban a humán fenotípus fenokópiája akkor alakul ki, amikor a telomerhossza még normális, de a 18S rRNS pszeudouridilációja csökken és a 28S/18S rRNS hányadosa már megnő.
9. Az új szindróma nem a telomerhossz csökkenéséből, hanem legalább részben a riboszomális RNS pszeudouridilációjának csökkenéséből fakad.

7 Összefoglalás

A podocin a C-terminális régió révén oligomerizálódik. Interallélikus interakcióit a C-terminális oligomerizáció közvetíti. A C-terminális hélixek a podocin kötéseirősségét és szerkezetét jelentősen befolyásolják, igazolva a podocin-oligomerizációban betöltött szerepüket. Az R229Q patogén társulásaiban a domináns negatív mutációk ezen C-terminális helixekben találhatóak, tovább erősítve azt a feltételezést, hogy kóros oligomerizáció a felelős a domináns negatív hatásért. Mindezek befolyásolják az érintett családok genetikai tanácsadását, továbbá ezek alapján a kóros oligomerizáció gátlása felmerül mint terápiás lehetőség.

A diszkerin mutáció, melyet a vizsgált családban azonosítottunk, egy új, nephrosis szindrómával, cataractával, szenzorineurális halláscsökkenéssel, enterocolitisszel járó kórképet okoz, amely csak kis mértékben mutat átfedést az eddig ismert diszkeratózis-formákkal. Emberben a mutáció fiúgyermekekben letális, nőkben enyhe fenotípussal, cataractával, retinitis pigmentosával, halláscsökkenéssel jár. Egyenlőtlen X-inaktiváció a lányokban is súlyosabb megjelenési formához vezethet. A null mutáció zebrahal modellben homozigóta formában a humán érintettekhez hasonló fenotípust, korai halált okoz normális telomerhossz mellett. Az E206K (halban E201K) a pszeudouridilációért felelős katalitikus doménben helyezkedik el, annak csökkent funkciója révén a riboszómák működésének zavarához vezet. A 18S riboszómális alegység pszeudouridilációjának kifejezett csökkenése a 18S alegység relatív mennyiségi csökkenése révén a 28S/18S arány növekedéséhez vezet. Jelen kórképet elsősorban a pszeudouridilációs és riboszóma diszfunkcióval járó kórképek közé soroljuk ^{26, 31, 51}.

8 Summary

Podocin oligomerizes through its C-terminal region. The R286Tfs*17 frameshift mutant lacking all the three C-terminal helical regions is not able to dimerize, does not influence the localization of other podocin variants and so can not mediate interallelic interactions. While R286Tfs*17 localizes to the podocyte cell membrane it shows, that oligomerization is not prerequisite for membrane targeting. The first C-terminal helical region makes the podocin capable of dimerization. Interallelic interactions, dominant negative effect and interallelic complementation are mediated through the C-terminal helical region via oligomerization. The disruption of pathogenic associations might be in the future a potential therapeutic target. It is important to distinguish pathogenic and benign R229Q-associations. The prediction, if the frequently carried R229Q and other C-terminal mutations are likely to be pathogenic or not has an outstanding clinical significance and should be a part of genetic counselling^{18, 22, 23}.

The identified novel *DKC1* mutation causes nephrotic syndrome, cataracts, sensorineural deafness and enterocolitis, which symptoms just partially overlap with the symptoms of dyskeratosis congenita, the most well known disease associated with the mutations of this gene. This newly described syndrome is lethal in boys, typically before the age of three years, and leads to cataracts and hearing impairment in women. Unequal X-inactivation can lead to severe symptoms in affected girls as well. Homozygous *dkc1* zebrafish mutants recapitulated the human phenotype, and died at an early stage, with a normal telomere length. The E206K dyskerin localises to the catalytic domain putative in pseudouridylation. We observed that *dkc1* mutant zebrafish had impaired pseudouridylation and so a decreased amount of the 18S ribosome subunit, resulting in an increased 28S/18S ratio. We suggest this novel disease to be part of the pseudouridylation defects and ribosomal biogenesis disorders^{26, 31, 51}.

9 Irodalomjegyzék

1. Tan, W., Lovric, S., Ashraf, S., Rao, J., Schapiro, D., Airik, M., Shril, S., Gee, H. Y., Baum, M., Daouk, G., Ferguson, M. A., Rodig, N., Somers, M. J. G., Stein, D. R., Vivante, A., Warejko, J. K., Widmeier, E., and Hildebrandt, F. (2018) Analysis of 24 genes reveals a monogenic cause in 11.1% of cases with steroid-resistant nephrotic syndrome at a single center, *Pediatric nephrology* 33, 305-314.
2. Eddy, A. A., and Symons, J. M. (2003) Nephrotic syndrome in childhood, *Lancet* 362, 629-639.
3. Akchurin, O., and Reidy, K. J. (2015) Genetic causes of proteinuria and nephrotic syndrome: impact on podocyte pathobiology, *Pediatr Nephrol* 30, 221-233.
4. Ha, T. S. (2017) Genetics of hereditary nephrotic syndrome: a clinical review, *Korean J Pediatr* 60, 55-63.
5. Gigante, M., Caridi, G., Montemurno, E., Soccio, M., d'Apolito, M., Cerullo, G., Aucella, F., Schirinzi, A., Emma, F., Massella, L., Messina, G., De Palo, T., Ranieri, E., Ghiggeri, G. M., and Gesualdo, L. (2011) TRPC6 mutations in children with steroid-resistant nephrotic syndrome and atypical phenotype, *Clin J Am Soc Nephrol* 6, 1626-1634.
6. Hsu, Y. J., Hoenderop, J. G., and Bindels, R. J. (2007) TRP channels in kidney disease, *Biochim Biophys Acta* 1772, 928-936.
7. Szabo, T., Ambrus, L., Zakany, N., Balla, G., and Biro, T. (2015) Regulation of TRPC6 ion channels in podocytes - Implications for focal segmental glomerulosclerosis and acquired forms of proteinuric diseases, *Acta Physiol Hung* 102, 241-251.
8. Boyer, O., Nevo, F., Plaisier, E., Funalot, B., Gribouval, O., Benoit, G., Huynh Cong, E., Arrondel, C., Tete, M. J., Montjean, R., Richard, L., Karras, A., Pouteil-Noble, C., Balafrej, L., Bonnardeaux, A., Canaud, G., Charasse, C., Dantal, J., Deschenes, G., Deteix, P., Dubourg, O., Petiot, P., Pouthier, D., Leguern, E., Guiochon-Mantel, A., Broutin, I., Gubler, M. C., Saunier, S., Ronco, P., Vallat, J. M., Alonso, M. A., Antignac, C., and Mollet, G. (2011) INF2 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease with glomerulopathy, *The New England journal of medicine* 365, 2377-2388.
9. Brown, E. J., Schlondorff, J. S., Becker, D. J., Tsukaguchi, H., Tonna, S. J., Uscinski, A. L., Higgs, H. N., Henderson, J. M., and Pollak, M. R. (2010) Mutations in the formin gene INF2 cause focal segmental glomerulosclerosis, *Nat Genet* 42, 72-76.

10. Echaniz-Laguna, A., and Latour, P. (2019) A cryptic splicing mutation in the INF2 gene causing Charcot-Marie-Tooth disease with minimal glomerular dysfunction, *J Peripher Nerv Syst* 24, 120-124.
11. Boute, N., Gribouval, O., Roselli, S., Benessy, F., Lee, H., Fuchshuber, A., Dahan, K., Gubler, M. C., Niaudet, P., and Antignac, C. (2000) NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome, *Nat Genet* 24, 349-354.
12. Yokoyama, H., Fujii, S., and Matsui, I. (2008) Crystal structure of a core domain of stomatin from *Pyrococcus horikoshii* Illustrates a novel trimeric and coiled-coil fold, *J Mol Biol* 376, 868-878.
13. Umlauf, E., Mairhofer, M., and Prohaska, R. (2006) Characterization of the stomatin domain involved in homo-oligomerization and lipid raft association, *The Journal of biological chemistry* 281, 23349-23356.
14. Reiser, J., Polu, K. R., Moller, C. C., Kenlan, P., Altintas, M. M., Wei, C., Faul, C., Herbert, S., Villegas, I., Avila-Casado, C., McGee, M., Sugimoto, H., Brown, D., Kalluri, R., Mundel, P., Smith, P. L., Clapham, D. E., and Pollak, M. R. (2005) TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function, *Nat Genet* 37, 739-744.
15. Grahammer, F., Schell, C., and Huber, T. B. (2013) The podocyte slit diaphragm--from a thin grey line to a complex signalling hub, *Nature reviews. Nephrology* 9, 587-598.
16. Santin, S., Bullich, G., Tazon-Vega, B., Garcia-Maset, R., Gimenez, I., Silva, I., Ruiz, P., Ballarin, J., Torra, R., and Ars, E. (2011) Clinical utility of genetic testing in children and adults with steroid-resistant nephrotic syndrome, *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 6, 1139-1148.
17. Hinkes, B. G., Mucha, B., Vlangos, C. N., Gbadegesin, R., Liu, J., Hasselbacher, K., Hangan, D., Ozaltin, F., Zenker, M., Hildebrandt, F., and Arbeitsgemeinschaft fur Paediatrische Nephrologie Study, G. (2007) Nephrotic syndrome in the first year of life: two thirds of cases are caused by mutations in 4 genes (NPHS1, NPHS2, WT1, and LAMB2), *Pediatrics* 119, e907-919.
18. Tory, K., Menyhard, D. K., Woerner, S., Nevo, F., Gribouval, O., Kerti, A., Straner, P., Arrondel, C., Huynh Cong, E., Tulassay, T., Mollet, G., Perczel, A., and

Antignac, C. (2014) Mutation-dependent recessive inheritance of NPHS2-associated steroid-resistant nephrotic syndrome, *Nat Genet* 46, 299-304.

19. Kapuler, A. M., and Bernstein, H. (1963) A molecular model for an enzyme based on a correlation between the genetic and complementation maps of the locus specifying the enzyme, *J Mol Biol* 6, 443-451.

20. NHLBI Exome Sequencing Project (ESP), E. V. S. <http://evs.gs.washington.edu/EVS/ServletManager?variantType=snp&popID=EuropeanAmerican&popID=AfricanAmerican&SNPSummary.x=55&SNPSummary.y=12>.

21. Machuca, E., Hummel, A., Nevo, F., Dantal, J., Martinez, F., Al-Sabban, E., Baudouin, V., Abel, L., Grunfeld, J. P., and Antignac, C. (2009) Clinical and epidemiological assessment of steroid-resistant nephrotic syndrome associated with the NPHS2 R229Q variant, *Kidney international* 75, 727-735.

22. Miko, A., D, K. M., Kaposi, A., Antignac, C., and Tory, K. (2018) The mutation-dependent pathogenicity of NPHS2 p.R229Q: A guide for clinical assessment, *Hum Mutat* 39, 1854-1860.

23. Straner, P., Balogh, E., Schay, G., Arrondel, C., Miko, A., L'Aune, G., Benmerah, A., Perczel, A., D, K. M., Antignac, C., Mollet, G., and Tory, K. (2018) C-terminal oligomerization of podocin mediates interallelic interactions, *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* 1864, 2448-2457.

24. Huber, T. B., Simons, M., Hartleben, B., Sernetz, L., Schmidts, M., Gundlach, E., Saleem, M. A., Walz, G., and Benzing, T. (2003) Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains, *Human molecular genetics* 12, 3397-3405.

25. Kerti, A., Csohany, R., Szabo, A., Arkossy, O., Sallay, P., Moriniere, V., Vega-Warner, V., Nyiro, G., Lakatos, O., Szabo, T., Lipska, B. S., Schaefer, F., Antignac, C., Reusz, G., Tulassay, T., and Tory, K. (2013) NPHS2 p.V290M mutation in late-onset steroid-resistant nephrotic syndrome, *Pediatric nephrology* 28, 751-757.

26. Heiss, N. S., Knight, S. W., Vulliamy, T. J., Klauck, S. M., Wiemann, S., Mason, P. J., Poustka, A., and Dokal, I. (1998) X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions, *Nat Genet* 19, 32-38.

27. Marrone, A., Walne, A., and Dokal, I. (2005) Dyskeratosis congenita: telomerase, telomeres and anticipation, *Current opinion in genetics & development* 15, 249-257.
28. Knight, S. W., Heiss, N. S., Vulliamy, T. J., Greschner, S., Stavrides, G., Pai, G. S., Lestringant, G., Varma, N., Mason, P. J., Dokal, I., and Poustka, A. (1999) X-linked dyskeratosis congenita is predominantly caused by missense mutations in the DKC1 gene, *American journal of human genetics* 65, 50-58.
29. Wong, J. M., and Collins, K. (2006) Telomerase RNA level limits telomere maintenance in X-linked dyskeratosis congenita, *Genes & development* 20, 2848-2858.
30. Dokal, I. (2000) Dyskeratosis congenita in all its forms, *Br J Haematol* 110, 768-779.
31. Rashid, R., Liang, B., Baker, D. L., Youssef, O. A., He, Y., Phipps, K., Terns, R. M., Terns, M. P., and Li, H. (2006) Crystal structure of a Cbf5-Nop10-Gar1 complex and implications in RNA-guided pseudouridylation and dyskeratosis congenita, *Mol Cell* 21, 249-260.
32. Cong, Y. S., Wright, W. E., and Shay, J. W. (2002) Human telomerase and its regulation, *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 66, 407-425, table of contents.
33. Cohen, S. B., Graham, M. E., Lovrecz, G. O., Bache, N., Robinson, P. J., and Reddel, R. R. (2007) Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells, *Science* 315, 1850-1853.
34. Meyne, J., Ratliff, R. L., and Moyzis, R. K. (1989) Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 7049-7053.
35. Yamaguchi, H., Calado, R. T., Ly, H., Kajigaya, S., Baerlocher, G. M., Chanock, S. J., Lansdorp, P. M., and Young, N. S. (2005) Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia, *The New England journal of medicine* 352, 1413-1424.
36. Vulliamy, T. J., Knight, S. W., Mason, P. J., and Dokal, I. (2001) Very short telomeres in the peripheral blood of patients with X-linked and autosomal dyskeratosis congenita, *Blood cells, molecules & diseases* 27, 353-357.

37. Borie, R., Tabeze, L., Thabut, G., Nunes, H., Cottin, V., Marchand-Adam, S., Prevot, G., Tazi, A., Cadranel, J., Mal, H., Wemeau-Stervinou, L., Bergeron Lafaurie, A., Israel-Biet, D., Picard, C., Reynaud Gaubert, M., Jouneau, S., Naccache, J. M., Mankikian, J., Menard, C., Cordier, J. F., Valeyre, D., Reocreux, M., Grandchamp, B., Revy, P., Kannengiesser, C., and Crestani, B. (2016) Prevalence and characteristics of TERT and TERC mutations in suspected genetic pulmonary fibrosis, *Eur Respir J* 48, 1721-1731.
38. Skvortsov, D. A., Zvereva, M. E., Shpanchenko, O. V., and Dontsova, O. A. (2011) Assays for detection of telomerase activity, *Acta Naturae* 3, 48-68.
39. Aalfs, C. M., van den Berg, H., Barth, P. G., and Hennekam, R. C. (1995) The Hoyeraal-Hreidarsson syndrome: the fourth case of a separate entity with prenatal growth retardation, progressive pancytopenia and cerebellar hypoplasia, *European journal of pediatrics* 154, 304-308.
40. Knight, S. W., Heiss, N. S., Vulliamy, T. J., Aalfs, C. M., McMahon, C., Richmond, P., Jones, A., Hennekam, R. C., Poustka, A., Mason, P. J., and Dokal, I. (1999) Unexplained aplastic anaemia, immunodeficiency, and cerebellar hypoplasia (Hoyeraal-Hreidarsson syndrome) due to mutations in the dyskeratosis congenita gene, *DKC1*, *British journal of haematology* 107, 335-339.
41. Kiss, A. M., Jady, B. E., Bertrand, E., and Kiss, T. (2004) Human box H/ACA pseudouridylation guide RNA machinery, *Molecular and cellular biology* 24, 5797-5807.
42. Darzacq, X., Kittur, N., Roy, S., Shav-Tal, Y., Singer, R. H., and Meier, U. T. (2006) Stepwise RNP assembly at the site of H/ACA RNA transcription in human cells, *J Cell Biol* 173, 207-218.
43. Ge, J., and Yu, Y. T. (2013) RNA pseudouridylation: new insights into an old modification, *Trends Biochem Sci* 38, 210-218.
44. Sumita, M., Desaulniers, J. P., Chang, Y. C., Chui, H. M., Clos, L., 2nd, and Chow, C. S. (2005) Effects of nucleotide substitution and modification on the stability and structure of helix 69 from 28S rRNA, *Rna* 11, 1420-1429.
45. Helm, M. (2006) Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA, *Nucleic acids research* 34, 721-733.

46. Hamma, T., and Ferre-D'Amare, A. R. (2006) Pseudouridine synthases, *Chemistry & biology* 13, 1125-1135.
47. Penzo, M., and Montanaro, L. (2018) Turning Uridines around: Role of rRNA Pseudouridylation in Ribosome Biogenesis and Ribosomal Function, *Biomolecules* 8.
48. Yoon, A., Peng, G., Brandenburger, Y., Zollo, O., Xu, W., Rego, E., and Ruggero, D. (2006) Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita, *Science* 312, 902-906.
49. Komar, A. A., and Hatzoglou, M. (2011) Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states, *Cell Cycle* 10, 229-240.
50. Heiss, N. S., Girod, A., Salowsky, R., Wiemann, S., Pepperkok, R., and Poustka, A. (1999) Dyskerin localizes to the nucleolus and its mislocalization is unlikely to play a role in the pathogenesis of dyskeratosis congenita, *Human molecular genetics* 8, 2515-2524.
51. Vulliamy, T. J., and Dokal, I. (2008) Dyskeratosis congenita: the diverse clinical presentation of mutations in the telomerase complex, *Biochimie* 90, 122-130.
52. Walne, A. J., Vulliamy, T., Marrone, A., Beswick, R., Kirwan, M., Masunari, Y., Al-Qurashi, F. H., Aljurf, M., and Dokal, I. (2007) Genetic heterogeneity in autosomal recessive dyskeratosis congenita with one subtype due to mutations in the telomerase-associated protein NOP10, *Human molecular genetics* 16, 1619-1629.
53. Schay, G., Smeller, L., Tsuneshige, A., Yonetani, T., and Fidy, J. (2006) Allosteric effectors influence the tetramer stability of both R- and T-states of hemoglobin A, *The Journal of biological chemistry* 281, 25972-25983.
54. Saleem, M. A., O'Hare, M. J., Reiser, J., Coward, R. J., Inward, C. D., Farren, T., Xing, C. Y., Ni, L., Mathieson, P. W., and Mundel, P. (2002) A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression, *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 13, 630-638.
55. Strahle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H., and Braunbeck, T. (2012) Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments--a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations, *Reproductive toxicology* 33, 128-132.

56. Alexander, M. S., Kawahara, G., Kho, A. T., Howell, M. H., Pusack, T. J., Myers, J. A., Montanaro, F., Zon, L. I., Guyon, J. R., and Kunkel, L. M. (2011) Isolation and transcriptome analysis of adult zebrafish cells enriched for skeletal muscle progenitors, *Muscle & nerve* 43, 741-750.
57. Link, V., Shevchenko, A., and Heisenberg, C. P. (2006) Proteomics of early zebrafish embryos, *BMC developmental biology* 6, 1.
58. Mishima, E., Jinno, D., Akiyama, Y., Itoh, K., Nankumo, S., Shima, H., Kikuchi, K., Takeuchi, Y., Elkordy, A., Suzuki, T., Niizuma, K., Ito, S., Tomioka, Y., and Abe, T. (2015) Immuno-Northern Blotting: Detection of RNA Modifications by Using Antibodies against Modified Nucleosides, *PLoS One* 10, e0143756.
59. Lipska, B. S., Balasz-Chmielewska, I., Morzuch, L., Wasielewski, K., Vetter, D., Borzecka, H., Drozd, D., Firszt-Adamczyk, A., Gacka, E., Jarmolinski, T., Ksiazek, J., Kuzma-Mroczkowska, E., Litwin, M., Medynska, A., Silska, M., Szczepanska, M., Tkaczyk, M., Wasilewska, A., Schaefer, F., Zurowska, A., and Limon, J. (2013) Mutational analysis in podocin-associated hereditary nephrotic syndrome in Polish patients: founder effect in the Kashubian population, *Journal of applied genetics* 54, 327-333.
60. Khan, S., and Vihinen, M. (2007) Spectrum of disease-causing mutations in protein secondary structures, *BMC Struct Biol* 7, 56.
61. Kurosaki, T., and Maquat, L. E. (2016) Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance, *J Cell Sci* 129, 461-467.
62. Peshkin, L., Wuhr, M., Pearl, E., Haas, W., Freeman, R. M., Jr., Gerhart, J. C., Klein, A. M., Horb, M., Gygi, S. P., and Kirschner, M. W. (2015) On the Relationship of Protein and mRNA Dynamics in Vertebrate Embryonic Development, *Developmental cell* 35, 383-394.
63. Ou, Z., Yin, L., Chang, C., Peng, J., and Chen, J. (2014) Protein interaction between p53 and Delta113p53 is required for the anti-apoptotic function of Delta113p53, *J Genet Genomics* 41, 53-62.
64. Khoury, M. P., and Bourdon, J. C. (2010) The isoforms of the p53 protein, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000927.

65. Lee, K. C., Goh, W. L., Xu, M., Kua, N., Lunny, D., Wong, J. S., Coomber, D., Vojtesek, B., Lane, E. B., and Lane, D. P. (2008) Detection of the p53 response in zebrafish embryos using new monoclonal antibodies, *Oncogene* 27, 629-640.
66. Vulliamy, T. J., Knight, S. W., Dokal, I., and Mason, P. J. (1997) Skewed X-inactivation in carriers of X-linked dyskeratosis congenita, *Blood* 90, 2213-2216.
67. Rungaldier, S., Umlauf, E., Mairhofer, M., Salzer, U., Thiele, C., and Prohaska, R. (2017) Structure-function analysis of human stomatin: A mutation study, *PLoS One* 12, e0178646.
68. Kerti, A., Csohany, R., Wagner, L., Javorszky, E., Maka, E., and Tory, K. (2013) NPHS2 homozygous p.R229Q variant: potential modifier instead of causal effect in focal segmental glomerulosclerosis, *Pediatric nephrology* 28, 2061-2064.
69. He, J., Navarrete, S., Jasinski, M., Vulliamy, T., Dokal, I., Bessler, M., and Mason, P. J. (2002) Targeted disruption of *Dkc1*, the gene mutated in X-linked dyskeratosis congenita, causes embryonic lethality in mice, *Oncogene* 21, 7740-7744.
70. Pereboom, T. C., van Weele, L. J., Bondt, A., and MacInnes, A. W. (2011) A zebrafish model of dyskeratosis congenita reveals hematopoietic stem cell formation failure resulting from ribosomal protein-mediated p53 stabilization, *Blood* 118, 5458-5465.
71. Carneiro, M. C., Henriques, C. M., Nabais, J., Ferreira, T., Carvalho, T., and Ferreira, M. G. (2016) Short Telomeres in Key Tissues Initiate Local and Systemic Aging in Zebrafish, *PLoS genetics* 12, e1005798.
72. Gu, B. W., Apicella, M., Mills, J., Fan, J. M., Reeves, D. A., French, D., Podsakoff, G. M., Bessler, M., and Mason, P. J. (2015) Impaired Telomere Maintenance and Decreased Canonical WNT Signaling but Normal Ribosome Biogenesis in Induced Pluripotent Stem Cells from X-Linked Dyskeratosis Congenita Patients, *PLoS One* 10, e0127414.
73. Penzo, M., Rocchi, L., Brugiare, S., Carnicelli, D., Onofrillo, C., Coute, Y., Brigotti, M., and Montanaro, L. (2015) Human ribosomes from cells with reduced dyskerin levels are intrinsically altered in translation, *FASEB J* 29, 3472-3482.
74. Farley, K. I., and Baserga, S. J. (2016) Probing the mechanisms underlying human diseases in making ribosomes, *Biochem Soc Trans* 44, 1035-1044.

75. Marcel, V., Vijayakumar, V., Fernandez-Cuesta, L., Hafsi, H., Sagne, C., Hautefeuille, A., Olivier, M., and Hainaut, P. (2010) p53 regulates the transcription of its Delta133p53 isoform through specific response elements contained within the TP53 P2 internal promoter, *Oncogene* 29, 2691-2700.
76. Alter, B. P., Baerlocher, G. M., Savage, S. A., Chanock, S. J., Weksler, B. B., Willner, J. P., Peters, J. A., Giri, N., and Lansdorp, P. M. (2007) Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita, *Blood* 110, 1439-1447.
77. Schwartz, S., Bernstein, D. A., Mumbach, M. R., Jovanovic, M., Herbst, R. H., Leon-Ricardo, B. X., Engreitz, J. M., Guttman, M., Satija, R., Lander, E. S., Fink, G., and Regev, A. (2014) Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA, *Cell* 159, 148-162.
78. Carlile, T. M., Rojas-Duran, M. F., Zinshteyn, B., Shin, H., Bartoli, K. M., and Gilbert, W. V. (2014) Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells, *Nature* 515, 143-146.
79. Li, X., Zhu, P., Ma, S., Song, J., Bai, J., Sun, F., and Yi, C. (2015) Chemical pulldown reveals dynamic pseudouridylation of the mammalian transcriptome, *Nat Chem Biol* 11, 592-597.
80. Penzo, M., Guerrieri, A. N., Zacchini, F., Trere, D., and Montanaro, L. (2017) RNA Pseudouridylation in Physiology and Medicine: For Better and for Worse, *Genes (Basel)* 8.
81. Braun, D. A., Rao, J., Mollet, G., Schapiro, D., Daugeron, M. C., Tan, W., Gribouval, O., Boyer, O., Revy, P., Jobst-Schwan, T., Schmidt, J. M., Lawson, J. A., Schanze, D., Ashraf, S., Ullmann, J. F. P., Hoogstraten, C. A., Boddaert, N., Collinet, B., Martin, G., Liger, D., Lovric, S., Furlano, M., Guerrero, I. C., Sanchez-Ferras, O., Hu, J. F., Bosch, A. C., Sanquer, S., Menten, B., Vergult, S., De Rocker, N., Airik, M., Hermle, T., Shril, S., Widmeier, E., Gee, H. Y., Choi, W. I., Sadowski, C. E., Pabst, W. L., Warejko, J. K., Daga, A., Basta, T., Matejas, V., Scharmann, K., Kienast, S. D., Behnam, B., Beeson, B., Begtrup, A., Bruce, M., Ch'ng, G. S., Lin, S. P., Chang, J. H., Chen, C. H., Cho, M. T., Gaffney, P. M., Gipson, P. E., Hsu, C. H., Kari, J. A., Ke, Y. Y., Kiraly-Borri, C., Lai, W. M., Lemyre, E., Littlejohn, R. O., Masri, A., Moghtaderi, M., Nakamura, K., Ozaltin, F., Praet, M., Prasad, C., Prytula, A., Roeder, E. R., Rump,

P., Schnur, R. E., Shiihara, T., Sinha, M. D., Soliman, N. A., Soulami, K., Sweetser, D. A., Tsai, W. H., Tsai, J. D., Topaloglu, R., Vester, U., Viskochil, D. H., Vatanavicharn, N., Waxler, J. L., Wierenga, K. J., Wolf, M. T. F., Wong, S. N., Leidel, S. A., Truglio, G., Dedon, P. C., Poduri, A., Mane, S., Lifton, R. P., Bouchard, M., Kannu, P., Chitayat, D., Magen, D., Callewaert, B., van Tilbeurgh, H., Zenker, M., Antignac, C., and Hildebrandt, F. (2017) Mutations in KEOPS-complex genes cause nephrotic syndrome with primary microcephaly, *Nat Genet* 49, 1529-1538.

10 Saját publikációk jegyzéke

10.1 A disszertációhoz kapcsolódó közlemények jegyzéke

Stráner P¹, **Balogh E**¹, Schay G, Arrondel C, Mikó Á, L'Auné G, Benmerah A, Perczel A, Menyhárd D K, Antignac C, Mollet G, Tory K

C-terminal oligomerization of podocin mediates interallelic interactions

BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR BASIS OF DISEASE

1864: 7 pp. 2448-2457. , 10 p. (2018)

IF: 4,328

Balogh E¹, Chandler J C¹, Varga M¹, Tahoun M¹, Menyhárd D K, Schay G, Goncalves T, Hamar R, Légrádi R, Szekeres Á, Gribouval O, Kleta R, Stanescu H, Bockenbauer D, Kerti A, Williams H, Kinsler V, Di W-L, Curtis D, Kolatsi-Joannou M, Hammid H, Szöcs A, Perczel K, Maka E, Toldi G, Sava F, Arrondel C, Kardos M, Fintha A, Hossain A, D'Arco F, Kaliakatsos M, Koeglmeier J, Mifsud W, Mooseja M, Faro A, Jávorszky E, Rudas G, Saied M H, Marzouk S, Kelen K, Götze J, Reusz G, Tulassay T, Dragon F, Mollet G, Motameny S, Thiele H, Dorval G, Nürnberg P, Perczel A, Szabó A J, Long D A, Tomita K, Antignac C, Waters A M, Tory K

Pseudouridylation defect due to *DKC1* and *NOP10* mutations cause nephrotic syndrome with cataracts, hearing impairment and enterocolitis

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA DOI: 10.1073/pnas.2002328117, 11 p. (2020)

IF: 9,580 (Várható IF érték)

10.2 A disszertációtól független közlemények jegyzéke

Javorszky E, Moriniere V, Kerti A, **Balogh E**, Piko H, Saunier S, Karcagi V, Antignac C, Tory K

QMPSF is sensitive and specific in the detection of NPHP1 heterozygous deletions

CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE 55: 6 pp. 809 816.
(2017)

IF: 3,556

Szabó T, Orosz P, **Balogh E**, Jávorszky E, Mátyus I, Bereczki C, Maróti Z, Kalmár T, Szabó AJ, Reusz G, Várkonyi I, Marián E, Gombos É, Orosz O, Madar L, Balla G, Kappelmayer J, Tory K, Balogh I

Comprehensive genetic testing in children with a clinical diagnosis of ARPKD identifies phenocopies

PEDIATRIC NEPHROLOGY 33: 10 pp. 1713 1721. (2018)

IF: 2,816

Varga M, Ralbovszki D, **Balogh E**, Hamar R, Keszthelyi M T, Tory K

Zebrafish Models of Rare Hereditary Pediatric Diseases

DISEASES 6: 2 Paper: 43, 16 p. (2018)

11 Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Tory Kálmánnal, hogy valóban témavezetőként állt előttem és mellettem az együtt dolgozott immáron 10-11 évben. Emberileg és szakmailag is minden percben tanított és példával járt elől. Humorral ötvözött racionalitásának hála a leghetlenebb szituációk is értelmet nyertek a kutatásban átélt kisebb-nagyobb katasztrófák vagy sikerek ideje alatt. Kutatóként, orvosként, emberként; ilyen témavezetőt kívánok mindenkinek.

Köszönöm Dr. Varga Máténak az elmúlt öt-hat év számos megbeszélését, a közös minta-előkészítések során előforduló rövid beszélgetéseket. Köszönöm a nyitottságát és egyben szkepticizmusát, valamint állandó kutatói érdeklődését a biológia iránt, amelyekkel a földön tartott engem (és minket), amikor az orvosi gondolkodásom már régen elhagyta volna a racionalitás talaját.

Köszönöm Dr. Jávorszky Eszternek, hogy ott volt, amikor még csak 1+0,5+0,5 fős volt a munkacsoport, és hogy a pipettázásában jobban bízhattam, mint a sajátoméban vagy bárki máséban, így bizonytalan helyzetekben mindig segített tiszta vizet önteni a pohárba.

Köszönöm Bernáth Máriának, hogy soha nem mondott nemet, amikor segítséget kértem tőle a labormunkákat illetően, mindig számíthattam rá és teljes mértékben megbízhattam a munkájában. Köszönöm a barátságát is, ami köztünk ez idő alatt születhetett.

Köszönöm Dr. Vannay Ádámnak, hogy az a néhány irányomba intézett, szakmától szűk értelemben véve független mondat, ami elhangzott a 3 év alatt, mindig hordozott valamit, ami gondolkodásra serkentett, és emellett köszönöm módszertani dolgokban adott precíz tanácsait.

Köszönöm Prof. Dr. Tulassay Tivadarnak, hogy felvett a Doktori Iskolába, Prof. Dr. Szabó Attilának pedig, hogy minden lehetőséget megteremtett ahhoz, hogy ezt a kutatást elkezdhessük és végigvihessük.

Köszönöm Dr. Mikó Ágnesnek, hogy része az életemnek és együtt dolgozhatok vele.

Köszönöm Dr. Csohány Rózsa barátságát és szakmai segítségét, segítőkészségét.

Köszönöm munkacsoportunkból Légrádi Reginának, Keszthelyt T. Magdolnának, Dr. Regős Ágnesnek, Dr. Gyulay Katának, Dr. Gerda L'Auné-nak hogy együtt dolgozhattunk és törhettük a fejünket a felmerülő problémákon.

Köszönöm a laborból Dr. Pap Domonkosnak és Veres-Székely Apornak a sok-sok technikai segítséget, és a labor összes többi munkatársának is.

Köszönöm Dr. Schay Gusztávnak és Dr.Karancsiné Dr. Menyhárd Dórának, hogy értenek ahhoz, amihez én nem, hogy ilyen kiváló emberekkel és szakemberekkel dolgozhattam együtt.

Köszönöm Dr. Silhavy Dánielnek, hogy támogatott a Northern blot technika elsajátításában és teret adott annak kivitelezésére.

Hier möchte ich mich auch herzlich bei Christina Engel, Barbara Müller, Dr. Sylvia Hoff, Prof. Dr. Gerd Walz und den Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen der Zentralen Klinischen Forschung (Universitätsklinikum Freiburg) bedanken, die mir die Grundlagen der angewendeten Forschungsmethoden beigebracht haben.

Je remercie Dr. Geraldine Mollet, Christelle Arrondel, Prof. Dr. Corinne Antignac et Olivier Gribouval de leur aide et soutien.

Köszönöm a Szüleimnek, hogy szerettek és elviseltek a hosszú évek alatt amíg ezen a témán dolgoztam.

Köszönöm a barátaimnak, akik biztattak, hogy ne adjam fel.