Genetikai vizsgálatok pigmentációs rendellenességekkel járó ritka genodermatózisokban

A Ph.D. értekezés tézisei

Dr. Fábos Beáta

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Témavezető:

Dr. Nagy Nikoletta Ph.D.

Orvosi Genetikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2017.

TARTALOMJEGYZÉK

KÖZLEMÉNYEK 3

1. BEVEZETÉS 4
1.1. Ritka monogénes bőrbetegségek 4
1.2. Pigmentációs rendellenességekkel járó genodermatózisok 4
1.3. Az okulokután albinizmus 6
1.4. Célkitűzések 6

2. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK 8
2.1. Betegek 8
2.2. Módszerek 8

3. EREDMÉNYEK 9
3.1. Rekurrens patogén és rekurrens benignus variánsok azonosítása a *TYR* génben 9
3.2. Egyetlen rekurrens benignus genetikai variáns azonosítása az *OCA2* génben 9
3.3. Két új patogén mutáció és rekurrens benignus variánsok azonosítása az *SLC45A2* génben 9

4. MEGBESZÉLÉS 11
4.1. A *TYR* gén mutáció a vizsgált magyar OCA betegek közel 75%-ban felelősek a betegség kialakulásáért 11
4.2. Az *OCA2* gén mutációi a vizsgált magyar OCA betegekben nem voltak jelen 12
4.3. Az *SLC45A2* gén két új mutációja, amelyek a magyar OCA betegekben kerültek azonosításra, szokatlan OCA4 fenotípussal társulnak 12

5. ÖSSZEFOGLALÁS 14

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 15

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapját képező tudományos közlemények

I. Tóth L, **Fábos B**, Farkas K, Sulák A, Tripolszki K, Széll M, Nagy N.: Identification of two novel mutations in the SLC45A2 gene in a Hungarian pedigree affected by unusual OCA type 4. *BMC Med Genet.* 2017 Mar 15;18(1):27. **IF: 2,198**

II. **Fábos B,** Farkas K, Tóth L, Sulák A, Tripolszki K, Tihanyi M, Németh R, Vas K, Csoma Z, Kemény L, Széll M, Nagy N.: Delineating the genetic heterogeneity of OCA in Hungarian patients. *Eur J Med Res.* 2017 Jun 19;22(1):20. **IF: 1,414**

Az értekezés alapját képező közlemények impakt faktora: 3,612

Egyéb tudományos közlemények

I. Szabó K, Gáspár K, Dajnoki Z, Papp G, **Fábos B**, Szegedi A, Zeher M.: Expansion of circulating follicular T helper cells associates with disease severity in childhood atopic dermatitis. *Immunol Lett.* 2017 Apr 18. pii: S0165-2478(17)30085-8. **IF: 2,860**

II. Sulák A, Tóth L, Farkas K, Tripolszki K, **Fábos B,** Kemény L, Vályi P, Nagy K, Nagy N, Széll M. One mutation, two phenotypes: a single nonsense mutation of the CTSC gene causes two clinically distinct phenotypes. *Clin Exp Dermatol.* 2016 Mar;41(2):190-5. **IF: 1,315**

III. Nagy N, Vályi P, Csoma Z, Sulák A, Tripolszki K, Farkas K, Paschali E, Papp F, Tóth L, **Fábos B**, Kemény L, Nagy K, Széll M.: CTSC and Papillon-Lefèvre syndrome: detection of recurrent mutations in Hungarian patients, a review of published variants and database update. *Mol Genet Genomic Med.* 2014 May;2(3):217-28.

Az összes tudományos közlemény impakt faktora: 7,787

1. BEVEZETÉS

1.1. Ritka monogénes bőrbetegségek

Az ókortól napjainkig a bőrbetegségek diagnosztizálásának alapvető megközelítése a betegségeknek a látható jelei és tünetei szerinti osztályozása volt. Ez a megközelítés kiemeli, hogy a bőrgyógyászat még mindig nagyon morfológia-orientált specialitás (Shelley *és mtsai.,* 1976; Nagy *és mtsai.,* 2015). Azóta a megfigyelt bőrelváltozások megértésének vágya folyamatosan ösztönzi a bőrgyógyászat fejlődését és az új vizsgálati módszerek beépítését a mindennapi bőrgyógyászati gyakorlatba (Shelley *és mtsai.,* 1976, Nagy *és mtsai.,* 2015).

A mezőgazdasági növények és állatok tenyésztése a genetika pre-Mendeli korszakát jellemezte (Stern *és mtsai.,* 1950; Hansen *és mtsai.,* 2014). Miután a tizenkilencedik században Gregor Mendel megállapította az öröklődés alapvető szabályait (Mendel *és mtsai.,* 1993), számos jelentős felfedezés történt, mint például a DNS, mint az öröklődő információt kódoló anyag megismerése, a genetikai kód és a génexpresszió mechanizmusának megértése, melyek bevezettek a molekuláris genetika korszakába (Watson *és mtsai.,* 1953, Min Jou *és mtsai.,* 1972). Nemrégiben a szekvenálási módszerek és platformok óriási technikai fejlesztése nagymértékű genomikai projekteket eredményezett, amelyek az elmúlt néhány évtizedben elképzelhetetlen mennyiségű adatot kezdtek termelni (Sanger *és mtsai.,* 1977; Stoneking *és mtsai.,* 2011).

Ezeket a felfedezések és technológiai fejlődések nemcsak számos benignus (betegséget nem okozó) genetikai variáns megismeréséhez járultak hozzá, hanem kóroki gének kóroki mutációinak azonosításához is hozzájárultak, elősegítve ezzel a monogénes bőrbetegségek (genodermatózisok) genetikai hátterének megismerését.

A genodermatózisok olyan bőrbetegségek, amelyek előfordulási gyakorisága kevesebb, mint 5 páciens a 10 000-es populációban (Baldovino *és mtsai.,* 2016). Szemben a gyakori betegségekkel, amelyek többnyire multifaktoriális eredetűek, kialakulásukhoz életmódbeli, környezeti és genetikai tényezők is hozzájárulhatnak, a genodermatózisok általában monogénes rendellenességek, és ezeket leginkább egy gén egy adott mutációja eredményezi (Aronson *és mtsai.,* 2006).

Bár a dermatológia és a genetika különálló tudományágaknak tekinthető, e két terület kombinációja már hatalmas fejlődést eredményezett a monogénes bőrbetegségek megértésében (Nagy *és mtsai.,* 2015). A genodermatózásokra vonatkozó vizsgálatok elengedhetetlenek a betegség genetikai hátterének ismeretében, és a kutatás segítheti az érintett családok családtervezését, és a jövőben új terápiás módszert is kínálhat az érintett betegek számára (Aymé *és mtsai.,* 2015). Ez utóbbi szintén nagy jelentőséggel bír, mivel jelenleg az esetek többségében csak tüneti kezelés áll rendelkezésre (Nagy *és mtsai.,* 2015).

A következő klinikai altípusok sorolhatók a genodermatózisok közé: epidermolízis bulloza, keratotikus rendellenességek, bőrszín-rendellenességek, ektodermális diszpláziák, kötőszövethez kapcsolódó genodermatózisok, érrendszeri rendellenességek és fokozott daganatképződési kockázattal járó genodermatózisok (Aymé *és mtsai.,* 2015).

1.2. Pigmentációs rendellenességekkel járó genodermatózisok

A genodermatózisok egyik leginkább klinikailag heterogén csoportja, a pigmentációs rendellenességekkel járó genodermatózisok.

A bőr pigmentációja, kivéve a ritka patológiás eseteket, háromféle pigment vagy kromofor eredmény: a melanociták által termelt melanin, ami lehet barna/fekete (eumelanin) vagy vörös/sárga (feomelanin); a vörösvértestekben lévő hemoglobin és az étkezési karotinoidok (Rees *és mtsai.,* 2003; Chatzinasiou *és mtsai.,* 2015). A melanin, a legfontosabb, ami tirozinból képződik, a tirozináz enzim hatására a melanociták lizoszómához kapcsolódó organelláiban, amit melanoszómának nevezünk. A melanociták dendritikus sejtek, amelyek az embrionális fejlődés során az epidermisz bazális rétegében helyezkednek el. A melanoszómákat egy melanocitából és 36 keratinocitákból álló egység alkotja, mely felelős az epidermális melanin termelődséért (Chatzinasiou *és mtsai.,* 2015).

A genetikának az emberi pigmentáció kialakulásában betöltött szerepének megismerése már régóta foglalkoztatja a kutatócsoportokat. A humán pigmentképződés változása - a bőr, a haj és a szem esetében - az egyik legszembetűnőbb polimorf emberi tulajdonság (Rees *és mtsai.,* 2011; Chatzinasiou *és mtsai.,* 2015). Ma már több, mint 150 gént azonosítottak, amelyek befolyásolják a bőr, a szőrzet és a szem pigmentációját (Chatzinasiou *és mtsai.,* 2015).

A nagyfelbontású, teljes humán genomot átfogó genetikai vizsgálómódszerek elérhetősége, valamint a pigmentációval kapcsolatos genetikai ismereteink együttesen hozzájárultak a bőrpigmentáció mechanizmusának egyre jobb és magasabb szintű megértéséhez (Yamaguchi *és mtsai.,* 2009; Rees *és mtsai.,* 2011) .

A pigmentáció folyamatának számos pontja van, melynek diszfunkciója esetén rendellenes pigmenttermelődés jön létre, mint például az embriogenezis során a melanociták migrációs rendellenességei (Plensdorf *és mtsai.,* 2009; Fistarol *és mtsai.,* 2010). Ezenkívül a melanoszómában a melanin transzferének a környező keratinocitákba való megváltozása, a melanin szintézisének megváltozása és a melanin hibás degradációja vagy eltávolítása is abnormális bőrpigmentációhoz vezethet (Plensdorf *és mtsai.,* 2009; Fistarol *és mtsai.,* 2010). A melanociták immunológiai eredetű pigmentációs diszfunkciója is pigmentációs rendellenességeket eredményezhet (Plensdorf *és mtsai.,* 2009; Fistarol *és mtsai.,* 2010).

A pigmentáció rendellenességei genetikai vagy szerzett betegségként fordulhatnak elő (Plensdorf *és mtsai.,* 2009; Fistarol *és mtsai.,* 2010). Dolgozatomban a genetikai eredetű pigmentációs rendellenességekkel járó genodermatózisok vizsgálatával fglalkoztam.

Ezek a pigmentációs rendellenességek érinthetik a páciens teljes testét, lehetnek generalizáltak, vagy csak egy testrészben nyilvánulhatnak meg, ilyenkor lokalizált rendellenességnek tekinthetők (Chatzinasiou *és mtsai.,* 2015). Az előzőek általában a pigmentáció szabályozásában kulcsszerepet játszó gének csíravonalbeli mutációinak következménye, míg az utóbbiak általában szomatikus mozaikosság következményei. Ezekben az esetekben a mutáció mozaikos formában van jelen, és csak a megváltozott pigmentációval rendelkező testrészre hat. Dolgozatomban a pigmentáció szabályozásában kulcsszerepet játszó gének csíravonalbeli mutációit vizsgáltam.

A pigmentációs rendellenességek járhatnak fokozott pigment termelődéssel, hiperpigmentált elváltozásokat eredményezve, vagy csökkent, vagy akár teljesen hiányzó pigment tartalommal, hipopigmentált léziók kialakulásához vezetve (Chatzinasiou *és mtsai.,* 2015). Dolgozatomban csökkent, vagy akár teljesen hiányzó pigment termelődéssel járó, ritka, monogénes bőrbetegségben, az okulokután albinizmusban végzett genetikai vizsgálati eredményeimet összegeztem.

1.3. Az okulokután albinizmus

Az oculokután albinizmus (OCA) egy ritka monogénes, klinikailag és genetikailag heterogén, betegségcsoport, melyet a bőr, a haj és a szem részleges vagy teljesen hiányzó pigmenttartalma jellemez (Mártinez-García *és mtsai.,* 2013). Az OCA a világon mintegy 20 000 embert érinti; az altípusok prevalenciája azonban változó a különböző populációk között (Gargiulo *és mtsai.,* 2011). Eddig hat gén kóroki szerepét igazolták az izolált OCA formák kialakulásában, és további 24 gén kóroki szerepe merült fel a szindrómás OCA variánsok kapcsán (Simeonov *és mtsai.,* 2013). A tudományos munkámat az izolált (nem szindrómás) OCA-változatok vizsgálatára összpontosítottam, amelyben a haj, a bőr és a szem pigmentációs rendellenességei mellett nincs további érintett szerv.

Négy gén mutációinak tulajdonítanak fontos szerepet a leggyakoribb izolált OCA formák etiológiájában: Az OCA 1-es típusának (OCA1) kialakulásáért a tirozináz gén (*TYR*, OMIM 606933) mutációi felelősek (King *és mtsai.,* 2003; Ghodsinejad Kalahroudi *és mtsai.,* 2014). A 2-es típusú OCA-val (OCA2) az OCA 2 gént (*OCA2*, OMIM 611409) hozzták összefüggésbe (Durham-Pierre *és mtsai.,* 1994). A 3-as típusú OCA-ban (OCA3) a membránhoz kapcsolódó transzporter gén (*SLC45A2*; OMIM 606202) mutációit írták le (Rooryck *és mtsai.,* 2008). A 4-es típusú OCA esetében (OCA4) egy tirozinázzal rokon fehérjét kódoló gén (*TYRP*, OMIM 115501) kóroki szerepe igazolódott (Inagaki *és mtsai.,* 2004). Bár az OCA2 és az OCA4 a kaukázusi populációban jelen van, az OCA1 a leggyakoribb forma, és az OCA3 pedig extrém ritka (Rooryck *és mtsai.,* 2008).

A ritka, izolált OCA variánsok közé tartozik az OCA 5-ös (OCA5), az OCA 6-os (OCA6) és az OCA 7-es típusa (OCA7). Az OCA5-ben a kóroki gén még nem tisztázott, mindeddig csak egy OCA5-ben érintett pakisztáni család ismert az irodalomból (Kausar *és mtsai.,* 2013). Az OCA6 (OMIM 606574) kialakulásáért egy további transzporter gén (*SLC24A5*) mutációi a felelősek, OCA6-ban szenvedő betegeket mindeddig a Feröer-szigetekről publikáltak (Gronskov *és mtsai.,* 2013). Az OCA7 (OMIM 615179) a leucin-gazdag melanocita differenciálódással kapcsolatos fehérjét (LRMDA) kódoló gén (*C10ORF11)* mutációinak következményeként alakul ki, OCA7-et eddig csak egy feröeri családban közöltek (Gronskov *és mtsai.,* 2013).

Mivel az OCA3 a dél-afrikaiakban gyakori és az OCA5, az OCA6 és az OCA7 rendkívül ritka változatok, amelyeket eddig csak néhány beteg esetében publikáltak, dolgozatomban az OCA1, az OCA2 és az OCA4 nem szindrómás változatok vizsgálatára összpontosítottam.

Az OCA1-ben lévő *TYR* gén a tirozináz enzimet kódolja, amely katalizálja a melanin szintézis első és második lépését: a tirozin L-DOPA-hoz történő hidroxilezését és az L-DOPA DOPA-kinon oxidációját (King *és mtsai.,* 2003). Az *OCA2* és az *SLC45A2* gének az OCA2-ben és az OCA4-ben transzporterfehérjéket kódolnak, amelyek részt vesznek a tirozináz melanoszómákba történő transzportjában.

1.4. Célkitűzések

A genodermatózisok nagy kihívást jelentenek az egészségügyi szervezetek számára a betegek kis száma, valamint a ritka betegségekkel kapcsolatosan rendelkezésre álló kevesebb ismeretanyag miatt. A genodermatózisok között az egyik legösszetettebb betegségcsoport a pigmentációs rendellenességek

genodematózisai, ezért az értekezésem ezen genodermatózisok genetikai hátterének tisztázására összpontosít.

A pigmentációs rendellenességekkel járó genodermatózis csoporton belül az OCA vizsgálatára összpontosítottam tudományos munkámat, amelyet változó haj, bőr és okuláris hipopigmentáció jellemez. A vizsgált magyar OCA-betegek (n=12) esetében a háttérben álló kóroki mutációiknak azonosítása érdekében elvégeztem a *TYR, OCA2* és *SLC45A2* gének genetikai vizsgálatát, amelyek a kaukázusiak esetében a leggyakoribb izolált OCA-formák (OCA1, OCA2 és OCA4) kialakulásáért felelősek.

A *TYR*, az *OCA2* és az *SLC45A2* gének genetikai vizsgálata során tudományos munkám fő célkitűzései a következők voltak:

1. az OCA klinikai és genetikai heterogenitásának jobb megértése,
2. a *TYR*, az *OCA2* és az *SLC45A2* gének variánsainak önálló és együttes kóroki szerepének vizsgálata az OCA kialakulásában,
3. a magyar OCA populációban azonosított genetikai variánsok relatív és kumulatív gyakoriságának felmérése.

Eredményeim a vizsgált gének ritka (mutáció) és gyakori (polimorfizmus), újonnan azonosított és rekurrens genetikai változatait azonosították, melyek hozzájárultak a genotípus-fenotípus korrelációk megértéséhez ebben a klinikailag és genetikailag heterogén genodermatózis csoportban. Eredményeim azt is kimutatták, hogy az OCA gének egyidejű elemzése kulcsfontosságú az OCA fenotípusos sokféleségének megismerésében és az OCA gének mutációs spektrumának felmérésében a magyar páciensek körében.

Az általam végzett genetikai, molekuláris biológiai vizsgálatok továbbá hozzájárulhatnak új terápiás célpontok azonosításához és az OCA-ban szenvedő betegek számára a későbbiekben új terápiás lehetőségek kifejlesztéséhez.

Ezek a vizsgálatok összhangban vannak az Európai Unió biomedikai kutatásainak jelenlegi fókuszával, amely támogatja a ritka, úgynevezett "elhanyagolt" betegségek kivizsgálását, mivel a ritka monogén betegségekben kimutatott mechanizmusok elősegíthetik a gyakori, multifaktoriális eredetű betegségek jobb megértését is. Az OCA esetében végzett vizsgálatom további bepillantást adhatnak más gyakori multifaktoriális pigmentációs rendellenességekkel járó bőrbetegségek mechanizmusába, mint például a vitiligo vagy a melasma.

2. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Betegek

A vizsgálatban részt vevő egyének (n=12) a Somogy Megyei Kaposi Mór Oktató Kórházban Kaposváron, a Zala Megyei Kórházban Zalaegerszegen és a a Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika bőrgyógyászati járóbeteg szakrendelésén Szegeden kerültek bevonásra. A vizsgálatba bevont betegek valamennyien teljes pigmenthiánnyal járó izolált OCA-ban szenvednek.

2.2. Módszerek

Az elvégzett genetikai vizsgálatok etikai engedélyezése az Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálatnál történt. Miután mindegyik vizsgált személyről írásos beleegyezést kaptunk, a vizsgált betegektől (n=12) és a velük rokonságban nem lévő, egészséges kontroll egyénektől (n=100) perifériás vérminta vétele történt genetikai vizsgálat céljából. A vérmintákból genomi DNS izolálása történt BioRobot EZ1 munkaállomáson (QIAGEN, Hilden, Németország). A genomiális DNS-t feloldottuk 100 µl desztillált vízben.

A vizsgált *TYR, OCA2* és *SLC45A2* gének kódoló régióit és az azokkal határos intronális szakaszokat amplifikációja polimeráz láncreakcióval (PCR) specifikus primerek segítségével valósult meg. A PCR reakciók 20 µl-es végtérfogatban kerültek összeállításra, amely 4 µl minta DNS-t, 9 µl Dream Taq Green PCR Master keveréket (Fermentas), 4 µl desztillált vizet és 1,5-1,5 µl minden egyes primert tartalmazott. A primerek tervezése az UCSC genomi böngészővel (www.genome.ucsc.edu) és a Primer3 szoftverrel (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) történt. A PCR körülmények a következők voltak: kezdeti denaturációs lépés után 95°C-on 10 percen keresztül 40 ciklusú amplifikáció történt, amely 30 másodpercig 95°C-on (denaturáció), 30 másodpercig a primerek optimális hőkezelési hőmérsékletén (~59°C) és 45 másodpercig 72°C-on (szintézis). A szintézis reakcióideje a reakciótermék hosszának megfelelően került meghatározásra. A szintézist végül egy 10 percig tartó terminális megnyúlási lépést követett 72°C-on egy MyCycler PCR gépben (BioRad).

A PCR-termékek 2% agaróz gélen történő gélfuttatással (SeaKem LE agaróz, Lonza) kerültek ellenőrzésre, a band-ek 2,5 µl GelRed (Biotium) festéssel váltak láthatóvá. A gél BioRad Molecular Imager® GelDoc™ XR gél dokumentációs rendszerrel és a QuantityOne szoftverrel került kiértékelésre.

A vizsgált *TYR, OCA2* és *SLC45A2* gének kódoló régióinak és és az azokkal határos intronális szakaszoknak amplifikálása után azok tisztítása történt meg, majd a kapott termékek szekvenálásra kerültek hagyományos AB-Prism 3100 (Applied Biosystems) szekvenáló géppel Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit-tel (Applied Bio systems). A szekvenálás szolgáltatását a Delta Bio 2000 Kft. végezte (Szeged, Magyarország) tudományos együttműködés keretében.

3. EREDMÉNYEK

A vizsgált magyar OCA-betegek (n=12) esetében a betegségokozó mutáció azonosítása érdekében elvégeztem a *TYR, OCA2* és *SLC45A2* gének genetikai szűrését, amelyek a leggyakoribb izolált OCA-formák (OCA1, OCA2 és OCA4) kialakulásáért felelősek. A magyar OCA betegek molekuláris genetikai vizsgálata minden páciens esetében kóroki mutáció azonosítását eredményezte: öt beteg két heterozigóta patogén mutációt hordozott, míg hét betegben csak egy heterozigóta patogén mutációt azonosítottam. A vizsgált betegek közül hatban a *TYR, OCA2* és *SLC45A2* gének nem patogén változatait is kimutattam. Ezen utóbbi variánsok önmagukban nem elégségesek az OCA kialakulásához, de más pathogén mutációkhoz társulva feltételezhető, hogy van biológiai jelentőségük, ezért ezek a variánsok a későbbi elemzésben is szerepelnek, mivel ezek további bepillantást nyújthatnak a betegségek kialakulásának módosító mechanizmusaiba, és genotípus-fenotípus korrelációk kialakulásához vezethetnek az OCA-ban.

3.1. Rekurrens patogén és rekurrens benignus variánsok azonosítása a *TYR* génben

A *TYR* gén szekvenálása a páciensek mintegy 75%-ban (n=9) azonosított patogén mutációt. A leggyakrabban detektált mutáció a p.Pro406Leu misszensz mutáció volt, amely heterozigóta formában volt jelen a betegek 66%-ában (n=8). Két páciens hordozta a p.Pro406Leu mutációt a p.Arg217Gln misszensz mutációval kombinálva, és egy páciens hordozta a p.Arg402X nonszensz mutációval kombinálva. A p.Pro406Leu mutációt heterozigóta formában hordozó öt betegben nem találtunk további kórokozó mutációt, ezt a *TYR, OCA2* és *SLC45A2* gének szûrésével igazoltuk. Mindazonáltal a p.Pro406Leu patogén mutációt hordozó mind az öt páciens gyakori polimorfizmusokat hordozott, mint például a *TYR* gén p.Arg402Gln polimorfizmusa, az *OCA2* gén p.Arg305Trp változata és az *SLC45A2* gén p.Leu374Phe polimorfizmusa. Ezeket a polimorfizmusokat jóindulatú változatoknak tekintik, amelyek önmagukban nem képesek OCA-t okozni, de hozzájárulhatnak az OCA kialakulásához más patogén mutációkhoz (Simeonov *és mtsai.*, 2013). Egy betegben csak a p.Arg217Gln heterozigóta patogén misszensz mutációt azonosítottam. A *TYR* gén p.Ser192Tyr polimorfizmusa befolyásolja a fehérje rézkötő doménjét; Az összes többi patogén és nem patogén variáns az enzim ismert funkcionális doménjein kívül helyezkedik el.

3.2. Egyetlen rekurrens benignus genetikai variáns azonosítása az *OCA2* génben

A vizsgált OCA egyénekben nem találtam kóroki *OCA2* mutációt. Mindazonáltal egy patogén p.Pro406Leu *TYR* mutációval rendelkező páciens heterozigóta formában hordozza az *OCA2* gén gyakori misszensz p.Arg305Trp polimorfizmusát is. Ez a variáns nem érint semmilyen ismert funkcionális domént az OCA2 fehérjén.

3.3. Két új patogén mutáció és rekurrens benignus variánsok azonosítása az *SLC45A2* génben

Az *SLC45A2* gén szekvenálása a páciensek mintegy 50%-ban (n=6) azonosított patogén vagy benignus mutációt illetve polimorfizmust: két beteg esetében újonnan azonosítottam eddig az irodalomban nem ismert p.Gly411Asp

patogén misszensz mutációt és az új, szintén mineddig nem ismert p.Gln487X nonszensz mutációt. Mindkét páciens a mutációkat heterozigóta formában kombinációban hordozta, feltételezhetően compound heterozigótákról van szó. Ez a két mutáció olyan új mutáció, amelyet korábban nem közöltek a szakirodalomban, ezért részletes fenotípusos leírást adtam a betegekről és részletes elemzését végeztem a kapott eredményeknek.

A két érintett OCA beteg esetében teljesen hiányzik a pigment a hajban, sápadt a bőrük, rózsaszín anyajegyeik vannak és a szemeik kékek, nystagmusa van mindkét páciensnek. Az egyik páciensnél 9 évvel ezelőtt Crohn-betegséget állapítottak meg és 4 éve hipotireózisban is szenved. A másik páciens esetében nincs ismert társbetegség. Az érintett testvérek szülei klinikailag nem érintettek.

A két újonnan azonosított p.Gly411Asp patogén misszensz és a p.Gln487X nonszensz mutáció az SLC45A2 fehérjén (Uniprot: Q9UMX9) egy-egy – a klinecedik és a tizedik - transzmembrán doméneken belül helyezkednek el. Az azonosított mutációk helyét illetően feltételezhető, hogy az SLC45A2 fehérje szállítási funkcióját károsítja. A diszfunkcionális SLC45A2 savas melanoszóma lumenet okozhat, ami a réz helytelen bevitelét eredményezi a tirozináz enzimbe, így a csökkent tirozináz-aktivitást és az OCA-fenotípus kialakulását eredményezve (Bin *és mtsai.,* 2015). A p.Gly411Asp misszensz mutáció a MATP fehérje egy az evolúció során konzervált részét érinti tovább hangsúlyozva annak funkcionális jelentőségét és feltételezett patogén szerepét az érintett betegeknél megfigyelt pigmentációs rendellenességek kialakulásában.

Négy beteg esetében csak a nem pathogén p.Leu374Phe misszensz polimorfizmust detektáltam. Minden észlelt patogén és nem patogén variáns a kódolt fehérje transzmembrán doménjein belül helyezkedik el.

4. MEGBESZÉLÉS

Az elvégzett klinikai és genetikai vizsgálatok során az OCA1, az OCA2 és az OCA4 klinikai és genetikai heterogenitását tanulmányoztam a magyar OCA betegek körében (n=12). Vizsgálati eredményeim hozzájárulnak az OCA heterogenitásának megértése, a *TYR*, az *OCA2* és az *SLC45A2* gének variáns spektrumának bővítéséhez és az OCA klinikai variánsainak relatív és kumulatív gyakoriságának összehasonlításához egy reprezentatív magyar OCA populációban.

4.1. A *TYR* gén mutáció a vizsgált magyar OCA betegek közel 75%-ban felelősek a betegség kialakulásáért

Patogén *TYR* mutációk voltak jelen a betegek 75%-ában (n=9). Ez az eredmény jól korrelál a korábbi eredményekkel, amelyek szerint az OCA1 a leggyakoribb izolált OCA altípus és a *TYR* mutációk teszik ki az izolált OCA esetek több, mint 50%-át (Rooryck *és mtsai.,* 2008; Simeonov *és mtsai.*, 2013). Az eddig azonosított mintegy 320 *TYR* mutáció közül a misszensz mutációk a leggyakoribbak (Ghodsinejad Kalahroudi *és mtsai.,* 2014). Vizsgálatomban négy misszensz és egy nonszensz variáns volt kimutatható a *TYR* génen. Ezen misszensz mutációk közül kettő kórokinak, és kettő pedig benignus polimorfizmusnak tekinthető. Habár Ezzel a p.Arg402Gln gyakori polimorfizmussal kapcsolatban igazolták, hogy az azt hordozó fehérje fiziológiás hőmérsékleten csökkentett tirozináz aktivitást mutat, és hőmérséklet-érzékeny változatnak tekinthető (Tripanthi *és mtsai.,* 1992; Berson *és mtsai.*, 2000; Halaban *és mtsai.,* 2000; Toyofuku *és mtsai.,* 2001). A p.Arg402Gln *TYR* polimorfizmus hozzájárulása az OCA fenotípushoz még nem pontosan ismert. Önmagában ez a változat nem képes OCA-t okozni, azonban egy heterozigóta patogén *TYR* mutációval járó OCA-betegeknél tapasztalt fokozott gyakorisága azt sugallja, hogy hozzájárulhat az OCA kialakulásához (Hutton és Spritz, 2008, Chiang *és mtsai.,* 2009). Egy magyar páciens hordozta a p.Arg402Gln polimorfizmust a p.Pro406Leu patogén variánssal együtt. Korábbi publikációk szerint (Hutton és Spritz, 2008, Chiang *és mtsai.,* 2009) ez a kombináció hozzájárulhat a beteg OCA tüneteinek kialakulásához. Fontos hangsúlyozni, hogy egyes változatok nem okozhatnak elszigetelten a betegség fenotípust, hanem hozzájárulnak a betegség kialakulásához más patogén variánsokkal kombinálva. Az ilyen változatok hatásának felmérése nehézségeket mutat és részletes fenotípusos leírásokkal együtt hozzájárulhat az OCA klinikai és genetikai heterogenitásának jobb megértéséhez.

A kilenc magyar OCA-beteg közül három a *TYR* mutációk két patogén mutáció kombinációját hordozza. A kilenc közül hatban csak egy heterozigóta patogén mutációt azonosítottam. Ezek az eredmények jól illeszkednek az iráni OCA populáció nemrégiben közölt vizsgálati eredményihez, amelyben 30 beteg közül 19-ben két heterozigóta kóroki *TYR* mutációt azonosítottak (Ghodsinejad Kalahroudi *és mtsai.*, 2014). Ebben a vizsgálatban hat beteg csak egyetlen egy heterozigóta patogén *TYR* mutáció volt jelen, és öt betegben semmilyen *TYR* mutáció nem volt detektálható (Ghodsinejad Kalahroudi *és mtsai.,* 2014).

A magyar OCA-betegekben kimutatott összes patogén *TYR* mutációt korábban azonosították különböző etnikai származású OCA-betegekben. A p.Pro406Leu mutációt kimutatták iráni páciensekben, a pArg217Gln mutációt az Amerikai Egyesült Államokból, Kanadából és Észak-Európából származó páciensekben, és a p.Arg402X mutációt libanoni OCA betegekben (Hutton és Spritz, 2008; Simeonov *és mtsai.,* 2013). A patogén mutációk gyakorisága különbözik a

különböző populációkban, ezért ezek a populációk bizonyos betegségekben genetikai érzékenységükben változhatnak. Eredményeink és a korábbi vizsgálatok eredményei alapján az azonosított patogén *TYR* mutációk nem specifikusak a magyar lakosság szempontjából, mivel az OCA betegek körében világszerte kimutatták őket (Hutton és Spritz, 2008; Simeonov *és mtsai.,* 2013).

4.2. Az *OCA2* gén mutációi a vizsgált magyar OCA betegekben nem voltak jelen

A vizsgált magyar egyénekben nem volt kóroki *OCA2* mutáció detektálható, bár egy páciens heterozigóta formában hordozott a jóindulatú p.Arg305Trp polimorfizmust. Ez a változat az emberi szem színéhez kötődik, és a bőrdaganat kockázatának öröklött biomarkere lehet (Rebbeck *és mtsai.,* 2002; Jannot *és mtsai.,* 2005). Ez azt is sugallja, hogy a *TYR* és az *SLC45A2* gének genetikai szűrése megelőzheti az *OCA2* gén genetikai vizsgálatát, mivel az eredményeim alapján e gén mutációja valószínűleg ritkábbak, mint a *TYR* és az *SLC45A2* gének mutációi a magyar OCA betegek.

4.3. Az *SLC45A2* gén két új mutációja, amelyek a magyar OCA betegekben kerültek azonosításra, szokatlan OCA4 fenotípussal társulnak

A vizsgált OCA betegek közül két olyan beteg volt, akik két új heterozigóta patogén variánst hordoznak az *SLC45A2* génen: a p.Gly411Asp misszensz és a p.Gln487X nonszensz mutációkat. Az érintett betegek OCA4 tünetei nagy valószínűséggel az *SLC45A2* gén azonosított mutációinak következményei. Azonban még nem ismert, hogy a vizsgált OCA páciens társbetegségei (9 éve fennálló Crohn betegség és 4 éve fennálló hipotireózis) összefüggenek-e az azonosított *SLC45A2* mutációkkal. A Crohn betegségre vonatkozóan egy korábbi tanulmány foglalkozott az irodalomban, amely egy kanadai beteget közölt, aki mind az OCA4-ben, mind Crohn betegségben szenvedett (Fernandez *és mtsai.,* 2012). A kanadai páciens újgenerációs szekvenálással végzett teljes genom szintű genetikai vizsgálata két patogén homozigóta mutációt azonosított, az egyik az *SLC45A2* génben és egy másik a *G6PC3* génben, amely a glükóz-6-foszfatáz enzim harmadik alegységét kódolja (Fernandez *és mtsai.,* 2012). A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a beteg két különböző betegségben szenved: az OCA4-ben és a súlyos 4-es típusú veleszületett neutropeniában (SCN4). A páciens Crohn betegségét az SCN4 megnyilvánulásaként interpretálták (Fernandez *és mtsai.,* 2012). A vizsgált magyar OCA-betegek esetében az SCN4-gén mutáció szűrését nem végeztem el, mivel klinikai tüneteik nem támogatják ezt a diagnózist. Feltételezzem azonban, hogy a beteg társbetegségei (Crohn betegség és hipotireózis) nem kapcsolódnak az azonosított *SLC45A2* mutációkhoz.

Az *SLC45A2* gén mutációi akár teljes, akár részleges pigmentációvesztést okozhatnak, és így számos különböző OCA fenotípus kialakulásához járulhatnak hozzá (Simeonov *és mtsai.,* 2013). Az *SLC45A2* mutációk és a betegek klinikai tüneteinek összehasonlításával azonban OCA4-ben mindeddig genotípus-fenotípus összefüggések nem vltak ismertek (Simeonov *és mtsai.,* 2013). Az *SLC45A2* gén mutációi jellemzően az úgynevezett "barna OCA" fenotípushoz kapcsolódnak, amely az érintett betegekben a pigmentartalom részleges elvesztését jelzi (Kamaraj *és mtsai.,* 2014). Ezzel ellentétben itt két olyan magyar OCA-betegről számolunk be, akiknek szokatlan OCA4 fenotípusuk van, mivel a vizsgált betegek teljesen hiányozik a pigmentáció, ami gyakoribb az OCA1-ben, melyet a *TYR* gén mutációi

okoznak. Annak érdekében, hogy kizárjak bármely más feltételezett genetikai módosító változatot, amely felelős lehet a szokatlan fenotípusért, a *TYR* és az *OCA2* gének mutáció szűrése is megtörtént, de mutációt ezekben a génekben nem azonosítottam, mindkét páciens hordozza azonban a p.Ser192Tyr gyakori polimorfizmust a *TYR* génen, mely önmagában nem patogén genetiaki variáns, azonban ha patogén *SLC45A2* mutációk vannak jelen, akkor fenotípus módosító szerepet tölthet be. Vizsgálataim nemcsak az *SLC45A2* gén mutációs spektrumához járul hozzá, hanem a megfigyelt szokatlan klinikai tünetek spektrumához is, és remélhetőleg hozzájárul az OCA4 genotípus-fenotípus összefüggéseinek megismeréséhez.

Az OCA-t sok éven át, mint gyógymód nélküli monogénes ritka betegségcsoportot tekintették. Az OCA4 esetében azonban a betegség alapjául szolgáló mechanizmusra vonatkozó ismeretek felhalmozódása megváltoztathatja ezt a nézőpontot. Az MNT-1 sejtlizátumokban a közelmúltban kimutatták, hogy az *SLC45A2* csendesítésével indukált csökkentett tirozináz-aktivitás exogén bevezetett réz kezeléssel helyre állítható (Bin *és mtsai.,* 2015).

Összefoglalva, két új, heterozigóta mutációt detektáltam az SLC45A2 génben az OCA4 által érintett két magyar betegben. A mutációk elhelyezkedése és a misszensz mutáció helyének evolúciós konzerváltsága arra utal, hogy feltételezhetően patogén szerepet játszanak az OCA4 kialakulásában a vizsgált betegekben. Vizsgálataim tovább bővítik az OCA4 genetikai hátterével kapcsolatos ismereteket és a későbbiekben új terápiás megközelítések kidolgozásának alapjául szolgálhat az OCA4 betegek számára.

A fent leírt patogén *SLC45A2* mutációk (p.Gly411Asp misszensz és p.Gln487X nonszensz mutációk) mellett a gén p.Leu374Phe polimorfizmusát kilenc magyar OCA-betegben detektáltam. Ez utóbbi variáns feltűnő népességeloszlással rendelkezik, és szinte kizárólag az európaiaknál létezik (Graf *és mtsai.,* 2005). Ez a változat továbbá szerepet játszik a haj, a bőr és a szem színének különböző árnyalataiban (Graf *és mtsai.,* 2005).

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Tudományos munkám során célul tűtem ki, hogy felderítsem egy klinikailag és genetikailag heterogén genodermatózis-csoport, az OCA genetikai hátterét. Az OCA-t csökkent pigmentáció vagy a pigmentáció teljes elvesztése jellemzi a bőrön, a szőrzeten és a szemeken. Teljes klinikai és genetikai feldolgozást végeztem, és összefoglaltam vizsgálataim eredményeit. A genetikai vizsgálataimat, mivel minden a vizsgálatba bevont beteg nem szindrómás OCA-variánsban szenved, *TYR, OCA2* és *SLC45A2* gének egyidejű elemzésével végeztem, amelyek az izolált OCA-változatok többségében érintettek. A vizsgálatba 12 OCA-ban érintett beteg került bevonásra. A bevnt páciensek száma kevésnek tűnhet, de figyelembe véve, hogy az OCA ritka betegség, 12 hasonló klinikai fenotípusú személy bevonása óriási munkát jelentett.

Vizsgálataim során szeretném kiemelni, hogy két új, *SLC45A2* mutációt azonosítottam két magyar OCA-betegben, akiknél az OCA4 szokatlan fenotípusa (Tóth *és mtsai.,* 2017). Ezek az új heterozigóta mutációk a következők voltak: egy misszensz (p.Gly411Asp) és egy nonszensz (p.Gln437X) mutáció. Ezek a mutációk mindkét betegben jelen voltak, ami arra utal, hogy compound heterozigóta állapotban vannak. Az azonosított új mutációk befolyásolják a fehérje transzmembrán doménjeit, ami azt sugallja, hogy csökkenthetik a transzport funkcióját, ami csökkent melanoszóma pH-értéket és csökkent tirozináz aktivitást eredményez. Vizsgálataim új eredményekkel járultak hozzá az OCA4 genetikai hátterének megismeréséhez, továbbá egy szokatlan OCA4 fenotípust is bemutatva hozzájárulhatnak későbbi genotípus-fenotípus összefüggések feltárshoz OCA4-ben.

Az új mutációk azonosítása mellett a tanulmány további jelentős eredményei a következők: Bár a vizsgált magyar OCA betegek (n= 2) klinikai jellemzői azonosak voltak, a molekuláris genetikai adatok kilenc esetben OCA1 altípust, három esetben OCA4 altípust igazoltak (Fábos *és mtsai.,* 2017). Öt betegben két különböző heterozigóta patogén mutáció mutatkozott, míg hét betegnek csak egy patogén mutációja és nem patogén variánsok voltak detektálhatóak (Fábos *és mtsai.,* 2017). Ezért az eredmények azt mutatják, hogy a nem patogén variánsok - amelyek önmagukban nem okoznak OCA betegséget, patogén variánssal együtt szintén fontosak és klinikai jelentőséggel bírhatnak (Fábos és mtsai., 2017).

Tudományos munkám eredményei elősegítették az OCA heterogenitásának megértését, értékelték a *TYR, OCA2* és *SLC45A2* gének variánsainak független és összesített hozzájárulását az OCA kialakulásához, és összehasonlították a klinikai és kumulatív gyakoriságokat az OCA variánsoknak egy reprezentatív magyar OCA populációban.

Eredményeim megerősítik, hogy az OCA gének egyidejű elemzése kulcsfontosságú, és új felismeréseket biztosíthatnak az OCA fenotípusos sokféleségének és hozzájárulhatnak az OCA gének mutációs spektrumának bővítéséhez a magyarországi OCA betegek körében.

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először is szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Nagy Nikolettának értékes tanácsaiért és irányításáért.

Továbbá köszönettel tartozom Dr. Széll Márta Professzor Asszonynak, aki lehetőséget nyújtott számomra, hogy csatlakozhassak a szegedi Orvosi Gentikai Intézetben folyó tudományos munkához.

Külön köszönet minden munkatársamnak a szegedi Orvosi Gentikai Intézetben, aki hozzájárult tudományos munkám elkészítéséhez.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani a családomnak, hogy támogattak és bátorítottak a tudományos munkám elvégzésében.

Ezeket a vizsgálatokat a magyar TÁMOP-4.2.2.A-11/1 / KONV-2012-0035, TÁMOP-4.2.4.A / 2-11-1-2012-0001, TÁMOP-4.2.2.A3 és GINOP-2.3.2-15-2016-00039 pályázatok támogatása révén valósíthattam meg.