

**Genetikai, haplotípus és funkcionális vizsgálatok  
ritka monogénes betegségekben**

A Ph.D. értekezés tézisei

**Farkas Katalin**



Szeged

2016

**Genetikai, haplotípus és funkcionális vizsgálatok  
ritka monogénes betegségekben**

A Ph.D. értekezés tézisei

**Farkas Katalin M.Sc.**

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola  
Szegedi Tudományegyetem

Témavezető:

Dr. Nagy Nikoletta Ph.D.

Orvosi Genetikai Intézet  
Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika  
MTA-SZTE Dermatológiai Kutatócsoport  
Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2016

## KÖZLEMÉNYEK

### Az értekezés alapját képező közlemények

I. Nemes E\*, **Farkas K\***, Kocsis-Deák B, *et al.* Phenotypical diversity of patients with LEOPARD syndrome carrying the worldwide recurrent p.Tyr279Cys PTPN11 mutation. *Arch Derm Res* 2015; 307(10):891-895. **IF: 1,902**

\*E. Nemes and K. Farkas contributed equally to this work.

II. **Farkas K**, Kocsis-Deák B, Sánchez LC, *et al.* The CYLD p.R758X worldwide recurrent nonsense mutation detected in patients with multiple familial trichoepithelioma type 1, Brooke-Spiegler syndrome and familial cylindromatosis represents a mutational hotspot in the gene. *BMC Genet* 2016; 17(1):36. **IF: 2,397**

### Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények

I. Nagy N, **Farkas K**, Kinyo A, *et al.* A novel missense mutation of the CYLD gene identified in a Hungarian family with Brooke-Spiegler syndrome. *Exp Dermatol* 2012; 21(12):967-969.

II. Nagy N, Rajan N, **Farkas K**, *et al.* A Mutational Hotspot in CYLD Causing Cylindromas: A Comparison of Phenotypes Arising in Different Genetic Backgrounds. *Acta Derm-Venereol* 2013; 93(6):743-745.

III. Nagy N, **Farkas K**, Tripolszki K, *et al.* A cylindromatosis gén mutációi által okozott genodermatosisok. *Bőr Vener Szemle* 2014; 90:(5) 185-193.

IV. Nagy N, **Farkas K**, Kemény L, Széll M. Phenotype-genotype correlations for clinical variants caused by CYLD mutations. *Eur J Med Genet* 2015; 58(5):271-278. **IF: 1,466**

V. Nagy N, **Farkas K**, Kemeny L, Szell M. Knowledge explosion for monogenic skin diseases. *World J Dermatol* 2015; 4(1):44-49.

### Egyéb közlemények

- I. **Farkas K**, Nagy N, Kinyo A, *et al.* A newly identified missense mutation of the HR gene is associated with a novel, unusual phenotype of Marie Unna Hereditary Hypotrichosis 1 including limb deformities. *Arch Derm Res* 2012; 304(8):679-681. **IF: 2,708**
- II. **Farkas K**, Paschali E, Papp F, *et al.* A novel seven-base deletion of the CTSC gene identified in a Hungarian family with Papillon-Lefèvre syndrome. *Arch Derm Res* 2013; 305(5):453-455. **IF:2,270**
- III. Nagy N, **Farkas K**, Bacsa S, *et al.* NRP1 Activates NF-κB Signaling Pathway and Initiates Proliferation in Keratinocytes. *Int J Genomic Med* 2013; 1:102.
- IV. Fazekas B, Polyánka H, Bebes A, Tax G, Szabó K, **Farkas K**, *et al.* UVB-dependent changes in the expression of fast-responding early genes is modulated by huCOP1 in keratinocytes. *J Photochem Photobiol B-Biology* 2014; 140:215-222. **IF:2,803**
- V. Horvath E, **Farkas K**, Herczegfalvi A, *et al.* Identification of a novel missense GLRA1 gene mutation in hyperekplexia: a case report. *J Med Case Rep* 2014; 8(1):233.
- VI. Kinyo A, Valyi P, **Farkas K**, *et al.* A newly identified missense mutation of the EDA1 gene in a Hungarian patient with Christ–Siemens–Touraine syndrome. *Arch Derm Res* 2014; 306(1):97-100. **IF:2,270**
- VII. Nagy N, **Farkas K**, Kinyó Á, *et al.* A synonymous polymorphism of APCDD1 affects translation efficacy and is associated with androgenic alopecia. *J Life Sci (Libertyville)* 2014; 8(2):106-114.
- VIII. Nagy N, Valyi P, Csoma Z, Sulak A, Tripolszki K, **Farkas K**, *et al.* CTSC and Papillon–Lefèvre syndrome: detection of recurrent mutations in Hungarian patients, a review of published variants and database update. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 2014; 2(3):217-228.
- IX. Vályi P, **Farkas K**, Tripolszki K, *et al.* Rekurrens európai misszensz mutáció egy magyar Papillon-Lefèvre szindrómában szenvedő családban. *Fogorvosi Szemle* 2014; 107(3):87-92.
- X. Gajda A, Horvath E, Hortobagyi T, Gergev G, Szabo H, **Farkas K**, *et al.* Nemaline Myopathy Type 2 (NEM2): Two Novel Mutations in the Nebulin (NEB) Gene. *J Child Neurol* 2015; 30(5):627-630. **IF:1,666**
- XI. Hamon Y, Legowska M, Fergelot, Nagy N, **Farkas K**, *et al.* Analysis of urinary cathepsin C for diagnosing Papillon-Lefèvre syndrome. *FEBS J* 2016; 283(3):498-509. **IF: 4,001**
- XII. Sulak A, Toth L, **Farkas K**, *et al.* One mutation, two phenotypes: a single nonsense mutation of the CTSC gene causes two clinically distinct phenotypes. *Clin Exp Dermatol* 2016; 41(2):190-195. **IF: 1,092**
- XIII. Tripolszki K, Knox R, Parker V, Semple R, **Farkas K**, *et al.* Somatic mosaicism of the PIK3CA gene identified in a Hungarian girl with macrodactyly and syndactyly. *Eur J Med Genet* 2016; [Epub ahead of print] **IF: 1,466**

## 1. BEVEZETÉS

Az Európai Unió meghatározása szerint ritka betegségnek számít az a betegség, amelynek előfordulási aránya 1:2000 vagy kevesebb. Ezen betegségek jelentősen ronthatják az életminőséget, stigmatizációt és szocializációs nehézségeket okozva. A ritka betegségek általában monogénes betegségek, ami azt jelenti, hogy egy meghatározott genetikai eltérés, egy gén defektusa és következményesen egy fehérje hibája döntő hatású a betegség megjelenése szempontjából. Dolgozatomban igen stigmatizáló ritka kórképek - a LEOPARD szindróma (LS), a familiáris trichoepitheliomatózis 1-es típus (MFT1), a familiáris cilindromatózis (FC) és a Brooke-Spiegler szindróma (BSS) - kapcsán végzett genetikai és funkcionális vizsgálatainak eredményeit mutatom be.

### 1.1. LEOPARD szindróma

A LEOPARD szindróma (MIM 151100) egy autoszómális domináns öröklésmenetet mutató kórkép, mely a neuro-kardiofacio-kután szindrómák családjába tartozik. A név a főbb tünetek akronimájaként tevődik össze: **L**entigok, **E**lektrokardiográfiás rendellenességek, **O**kuláris hipertelorizmus, **P**ulmonáris stenosis, **A**bnormális genitáliák, **R**etardált növekedés és neuroszenzoros sükettség (**D**eafness). A betegség kialakulásának hátterében a 11-es nem-receptor típusú protein-tirozin foszfatáz (*PTPN11*) gén mutációi állnak.

### 1.2. Multiplex familiáris trichoepitheliomatózis 1-es típus

A multiplex familiáris trichoepitheliomatózis 1-es típusa (MIM 601606) autoszómális domináns öröklődésű betegség. Klinikai tünetei közé tartoznak a trichoepitheliómák, melyek lassan növekvő bőrszínű papulák. Ezek kicsi, jóindulatú tumorok, melyek elsősorban az arc középső részén, az orr körül és a nasolabialis redőben jelennek meg.

### 1.3. Familiáris cylindromatózis

A familiáris cylindromatózis (MIM 132700) is autoszómális domináns öröklésmenetet mutató kórkép. Jellemzősége a bőrön megjelenő cylindrómák, melyek szintén lassan növekvő jóindulatú tumorok a hajas fejbőrön, valamint az arcon. Gyakran multiplex, turbánszerű elrendeződést mutatnak, az így kialakuló klinikai kép kapcsán a betegség turbántumor szindróma néven is ismeretes.

#### 1.4. Brooke-Spiegler szindróma

A Brooke-Spiegler szindróma (MIM 605041) is egy ritka monogénes bőrbetegség, melyre jellemző a jóindulatú bőrfüggelék tumorok nagyszámú és változatos kialakulása, nevezetesen trichoepitheliómák, cylindrómák és/vagy spiradenómák. A spiradenómák nódusokként jelennek meg a törzsön és a végtagokon.

A MFT1-t, a FC-t és a BSS-t kutatócsoportok egymástól függetlenül térképezték a 16q12-q13 kromoszómára. Ezen kromoszómaregióban a *cylindromatózis* (*CYLD*) gént kóroki géneként azonosították, mely mutációi felelősek a három betegség kialakulásáért. Tekintettel az átfedő klinikai tünetekre és az azonos genetikai háttérre az FC, MFT1 és BSS genodermatózisokat ma már nem önálló entitásoknak, hanem ugyanazon kórkép eltérő súlyosságú variánsainak tekintjük.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Dolgozatomban elsődleges céлом volt összefoglalni a genetikai és funkcionális vizsgálataim eredményeit súlyos, stigmatizáló ritka monogénes betegség kapcsán, mint a *PTPN11* gén mutációi által okozott LS és a *CYLD* gén mutációk által okozott BSS, FC és MFT1.

Egy 51 éves, LS-ben szenvedő férfibeteg esetében célul tűztem ki a háttérben álló kóroki genetikai eltérés azonosítását. Emellett, célkitűzéseim között szerepelt összehasonlítani az irodalomból ismert klinikai tüneteket és a kóroki mutációkat genotípus-fenotípus összefüggések felállítása céljából.

A *CYLD* mutációk okozta betegségek esetében familiáris és sporadikus MFT1, FC és BSS esetek vizsgálatát végeztem el a betegség háttérében álló kóroki mutáció azonosítása céljából. Továbbá céljaim között szerepelt haplotípus analízis elvégzése, hogy meghatározzam, vajon ugyanazon vagy eltérő alapító hatás hozta e létre ugyanazon kóroki mutációt a *CYLD* mutációt hordozó, különböző fenotípussal rendelkező sporadikus esetek és családok esetében. Új mutációk azonosítása kapcsán céljaim között funkcionális vizsgálatok elvégzése szerepelt, hogy igazoljam az azonosított új mutáció valóban képes befolyásolni a *CYLD* gén által kódolt CYLD enzim aktivitását és ezáltal igazoljam a mutáció kóroki szerepét. Emellett fenotípus-genotípus összefüggések feltárását és populáció specifikus mutációs adatbázis összeállítását tűztem ki célul.

### **3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK**

#### **3.1. LEOPARD szindrómában szenvedő magyar család**

Az 51 éves magyar férfibeteg az LS jellegzetes tüneteit mutatja, úgymint arc anomáliák, pigmentációs rendellenességek, kardiovaszkuláris és urológiai tünetek. A páciens süketnéma és közepes termetű. Házasságon kívül született. Más klinikailag tünetes hozzátartozó nem ismert, sem az apai, sem az anyai családtagok között.

#### **3.2. Multiplex familiáris trichoepitheliomatózis 1-es típusban szenvedő spanyol család**

A 62 éves spanyol férfi bőrén a nasolabialis redőben, a homlokon, a szemöldök körül, és kisebb mértékben a fül régióban, a tarkón és a háton multiplex bőrszínű papulák vannak. A páciens egyetlen gyermeke, a 33 éves lánya hasonló, de kevesebb tünettől rendelkezik. Léziói először a nasolabialis redőben jelentkeztek, később megjelentek a homlokon, a halántékon, a füleken és a hajas fejbőrön. Más tünetes családtag nincs a családban.

#### **3.3. Familiáris cylindromatózisban szenvedő holland egyének**

A vizsgált holland páciensek klinikai tüneteit korábban Van den Ouweland *és mtsi.* fogalalták össze.

#### **3.4. Brooke-Spiegler szindrómában szenvedő osztrák egyén**

A vizsgált osztrák páciens klinikai tüneteit korábban Grossmann *és mtsi.* mutatták be.

#### **3.5. Brooke-Spiegler szindrómában szenvedő szekszárdi család**

A hét generációs magyar családban 21 tünetes családtag volt azonosítható. A klinikailag tünetes egyéneknél a bőrfüggelék tumorok súlyos formája volt jelen. Néhányuknak cylindrómáik alakultak ki a hajas fejbőrön és trichoepitheliómák az arcon. A tumorok a betegek hátán és végtagjain is megjelentek.

#### **3.6. Brooke-Spiegler szindrómában szenvedő angol család**

Az öt generációs angol családban 8 klinikailag tünetes egyént diagnosztizáltak. A tünetes családtagok viszonylag enyhébb fenotípussal rendelkeztek. Cylindrómák és spiradenómák alakultak ki a hajas fejbőrön és az arcon.

### **3.7. Brooke-Spiegler szindrómában szenvedő szegedi család**

A két generációs magyar családban 2 tünetes és 5 tünetmentes családtag volt elérhető. Az egyik tünetes egyén egy 60 éves férfibeteg számos puha, szörtelen bőrszínű papulával az orra körül, a fülein, a hajas fejbőrön és a vállain. A másik tünetes családtagnak, a férfi 35 éves lányának, enyhébb tünetei vannak.

### **3.8. Módszerek**

A genetikai vizsgálatokhoz perifériás vérminta vétel történt a klinikailag tünetes betegektől, a tünetmentes családtagoktól és egészséges kontroll egyénektől. Genomi DNS izolálást követően, PCR reakció során felszaporítottam a vizsgált gének kódoló és az azokkal határos intronális szakaszait, majd a mintákat megszekvenáltattam. Haplotípus analízis során a mutációtól 5' és 3' irányban elhelyezkedő környező polimorfizmusok meghatározása direkt szekvenálással történt. Funkcionális analízis elvégzéséhez immunprecipitációt követően Western blott analízist végeztem.

## **4. EREDMÉNYEK**

### **4.1. A *PTPN11* gén genetikai vizsgálata**

A LS-ben szenvedő páciens esetében a *PTPN11* gén vizsgálata során egy misszensz mutációt (c.836A/G; p.Tyr279Cys) azonosítottam a gén 7. exonjában. A mutáció az irodalomból ismert, az egyik leggyakrabban előforduló heterozigóta mutáció, melyet a klinikailag tünetes egyén heterozigóta formában hordozott, míg a tünetmentes családtagok és kontroll egyének esetében vad típusú szekvencia volt detektálható.

### **4.2. A *CYLD* gén genetikai, haplotípus és funkcionális vizsgálatai**

#### **4.2.1. A spanyol család genetikai vizsgálata**

A gén kódoló régióinak (exon 9-20), valamint a szomszédos intronális szakaszok szekvenálása során egy már ismert nonszensz mutációt (c.2272C/T, p.Arg758X) azonosítottam a *CYLD* gén 17. exonjában. A vizsgált egyének a mutációt heterozigóta formában hordozták, míg a tünetmentes családtagok és kontrollok vad típusú szekvenciát hordoztak.



#### 4.2.2. Spanyol, holland és osztrák egyének haplotípus vizsgálata

Az irodalomból már ismert holland és osztrák esetek ugyanazt a mutációt hordozták, mint az általam vizsgált spanyol család (c.2272C>T, p.Arg758X). A spanyol MFT1, a holland FC páciensek és egy osztrák BSS egyén esetében haplotípus analízist végeztem annak eldöntésére, hogy megállapítsam, hogy ugyanaz vagy eltérő mutációs események felelősek-e a betegség kialakulásáért. A vizsgálat eredményei alapján megállapítható, hogy a spanyol és a holland pedigre ugyanazt, míg az osztrák egyén eltérő haplotípust hordoz. Így feltételezhető, hogy különböző mutációs események állnak az osztrák eset és a spanyol és holland esetek kialakulásának hátterében.

#### 4.2.3. A szekszárdi család genetikai vizsgálata

A szekvenálás eredményeként a *CYLD* gén 20. exonjában egy, az irodalomból már ismert nonszensz mutációt (c.2806C>T, p.Arg936X) azonosítottam. Míg a tünetes családtagok esetében heterozigóta formában volt jelen a mutáció, addig a tünetmentes családtagok és kontroll egyének vad típusú szekvenciát hordoztak.

#### 4.2.4. A szekszárdi és angliai család haplotípus analízise

Az irodalmi adatok áttekintésekor fény derült arra, hogy egy észak-angliai BSS-ben szenvedő család is ugyanazt a mutációt (c.2806C>T, p.Arg936X) hordozza, mint a szekszárdi BSS család. Így felmerült a kérdés, hogy vajon ezen, két földrajzilag távoli család esetében a mutációt egyazon alapító hatás, vagy egymástól független mutációs események hozták-e létre. A haplotípus vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a szekszárdi BSS család esetében két polimorfizmus kapcsolatosan öröklődött a *CYLD* génen azonosított mutációval a család tünetes tagjaiban, míg az angliai család haplotípusa ettől eltérő volt. Így elmondható, hogy az angolszász és a szekszárdi család esetében ugyanazon nonszensz mutációt két, egymástól független mutációs esemény hozhatta létre. Mindezek alapján felmerül annak lehetősége, hogy a 2806-os pozíció a *CYLD* cDNS-en egy mutációs forráspont lehet.

#### 4.2.5. A szegedi család genetikai vizsgálata

A *CYLD* gén mutációs analízise során egy új misszensz mutációt (c.2613C>G p.His871Gln) azonosítottam a gén 19. exonjában, mely a tünetes páciensek esetében heterozigóta formában van jelen. A mutáció nem volt detektálható a vizsgált tünetmentes családtagok és a kontroll egyének esetében.

#### 4.2.6. A szegedi család funkcionális vizsgálata

További célkitűzéseim között szerepelt annak megválaszolása, hogy a *CYLD* génen azonosított új misszensz mutáció (c.2613C>G, p.His871Gln) hogyan járul hozzá a betegség kialakulásához. Funkcionális vizsgálataimat a szegedi BSS család tünetes és tünetmentes tagjainak bőrbioptziás mintáiból izolált fibroblaszt sejteken végeztem. A fibroblaszt sejtekből immunprecipitációval kivontam a NEMO fehérjét. Western blott technika segítségével, azonos mennyiségű NEMO fehérje felvitele után, a NEMO fehérjéken lévő ubiquitin fehérjék mennyiségi összehasonlítását végeztem el és megállapítottam, hogy a *CYLD* mutációt hordozó fibroblasztokból immunprecipitált NEMO fehérjén nagyobb mennyiségben volt jelen ubiquitin fehérje, mint a kontroll minták esetében. Mivel az irodalomból ismert, hogy a NEMO fehérje ubiquitinációjában a *CYLD* deubiquitináz enzim jelentős szerepet játszik, feltételezhető, hogy az új misszensz *CYLD* mutáció csökkent deubiquitinációs aktivitást eredményez.

### 5. KÖVETKEZTETÉSEK

#### 5.1. A LEOPARD szindrómában szenvedő eset és az irodalmi adatok összehasonlítása

Egy 51 éves LS-ben szenvedő férfibeteg esetében a *PTPN11* gén vizsgálata során az egyik leggyakoribb misszensz mutációt (c.836A/G; p.Tyr279Cys) azonosítottam heterozigóta formában. A p.Tyr279Cys mutációt az irodalomban 47 különböző LS páciens kapcsán leírták, köztük olasz, francia, spanyol, német, észt, bosnyák, kínai, dél-kórei, japán és ausztrál egyénekben. LS kapcsán a leggyakrabban előforduló tünetek a lentigók voltak, melyeket 48 esetből 46-ban (96%) diagnosztizáltak. Tejeskávé foltok csak 22 esetben (46%) voltak megfigyelhetők. Okuláris hipertelorizmust 40 (83%), a szemhéj lógást 32 (67%) és minor fül fejlődési anomáliákat 31 (65%) páciens esetében azonosítottak. Emellett kardiovaszkuláris eltérések is kialakulhatnak: hipertrófikus kardiomiopátiát 25 (52%) esetben diagnosztizáltak. Alacsony testmagasság csak 19 (40%) betegnél volt jelen. A p.Tyr279Cys mutációt kevés esetben hozták összefüggésbe hallásvesztéssel, 12 (25%) egyén esetében írták le. Irodalmi adatok alapján bizonyos tüneteket – például rejtett heréjűség, makrocefália, vese rendellenesség, mielodiszplázia és umbilikális hernia – csak ritkán hozták összefüggésbe a p.Tyr279Cys fenotípussal. A megfigyelt különbségek az ugyanazt a mutációt hordozó 48 beteg klinikai tüneteit illetően jól mutatják a kórkép széles fenotípusos diverzitását és változó expresszivitását.

## **5.2. A rekurrens nonszensz p.Arg758X *CYLD* mutációt hordozó betegek haplotípus vizsgálata mutációs forrópontot igazolt a génen**

Egy spanyol, két tünetes családtaggal (apa és lánya) rendelkező MFT1 család esetében szekvenálással egy rekurrens nonszensz mutációt (c.2272C/T, p.Arg758X) detektáltam a *CYLD* gén 17. exonjában. A p.Arg758X nonszensz mutációt már korábban leírták BSS, FC és MFT1 kórképpel diagnosztizált betegek kapcsán is. Továbbá, a mutációt különböző népcsoportokban azonosították, köztük hollandok és osztrákok. A korábban leírt holland és osztrák esetek genetikai vizsgálatát is elvégeztem, hogy meghatározzam azt, hogy a világszerte előforduló rekurrens p.Arg758X mutáció vajon egy vagy több független mutációs esemény eredménye. Ezért haplotípus vizsgálatot végeztem, melynek eredménye azt demonstrálja, hogy habár a spanyol és holland egyének ugyanazt a haplotípust hordozzák, a klinikai megjelenésüket illetően eltérnek, hiszen MFT1-ben és FC-ben szenvednek. Ezen eredmények felvetik annak a lehetőségét, hogy genetikai és környezeti módosító faktorok vesznek részt a különböző fenotípusok kialakításában. Ezzel szemben, az osztrák páciens eltérő haplotípust hordoz. Így feltehetően ugyanazon mutáció jelenléte különböző mutációs események következménye. Ezen adatok alapján a p.Arg758X nonszensz mutáció a *CYLD* gén mutációs forrópontjában helyezkedik el.

## **5.3. A rekurrens nonszensz p.Arg936X *CYLD* mutációt hordozó betegek haplotípus vizsgálata mutációs forrópontot igazolt a génen**

Egy hétgenerációs magyar BSS család genetikai vizsgálata során egy nonszensz mutációt (c.2806C>T, p.Arg936X) azonosítottam a *CYLD* génen. Ez a nonszensz p.Arg936X mutáció jelen van egy angol-szász BSS családban is, ezért haplotípus analízist végeztem, annak eldöntésére, hogy a mutáció ugyanazon vagy két egymástól független mutációs esemény eredménye-e. Vizsgálataim alapján ugyanazt a mutációt két független mutációs esemény eredményezte a két családban. Feltételezhetően ez a pont egy mutációs forrópont a *CYLD* génen.

## **5.4. Az újonnan azonosított misszensz mutáció funkcionális vizsgálata kóroki mutációt igazolt a *CYLD* génen**

A genetikai vizsgálat elvégzése során azonosítottam egy új misszensz mutációt (c.2613C>G, p.His871Gln), amely a *CYLD* gén 19. exonjában helyezkedik el. A *CYLD* deubiquitináz enzim számos jelátviteli útvonal regulációjában vesz részt, mint például az NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonalban, egyik interakciós partnere, a NEMO fehérje deubiquitinációja

révén. Vizsgálataim során a NEMO fehérje ubiquitináltságát vizsgáltam, amelynek eredményeként elmondható, hogy a mutáció jelenléte megnöveli a NEMO fehérje ubiquitináltságának szintjét, ezáltal lecsökkenti a génexpressziót, így hatással lehet az NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonalra. Azonban további vizsgálatok szükségesek a BSS tüneti kialakulásának pontos mechanizmusának tisztázáshoz.

### 5.5 A *CYLD* gén mutációinak jellemzése

Mindeddig mintegy 95 különböző kóroki mutációt azonosítottak a *CYLD* génen. Az eddig azonosított mutációk 98%-a a gén kódoló szakaszain, az exonok területén helyezkedik el. A mutációk eloszlása a kódoló szakaszokban nem egyenletes, a mutációk mintegy 99%-a a 9. és 20. exonok által határolt régióban helyezkedik el. Az azonosított mutációk között leírtak frameshift (48%), nonszensz (27%), misszensz (12%) vagy splice-site (11%) mutációkat is, sőt 2 in-frame deléció is detektáltak.

A *CYLD* mutációk mintegy fele (48%) ún. frameshift mutáció, mely kisszámú nukleotidok deléciója vagy inszerciója révén a leolvasási keret eltolódását és emiatt rövidebb, diszfunkcionális *CYLD* fehérje keletkezését eredményezi. A frameshift mutációk eloszlása a *CYLD* génen nem egyenletes. A 17. exon mutációs forrópontnak tekinthető, hiszen az azonosított frameshift mutációk 20%-a itt helyezkedik el. A frameshift mutációknak csak negyede (27%) rekurrens.

A nonszensz mutációk által trunkált fehérjetermék keletkezik, mely a *CYLD* fehérje diszfunkciójához vezet. Az azonosított mutációk mintegy negyede (27%) tartozik ide. A nonszensz mutációk eloszlása a *CYLD* génen szintén nem egyenletes. Ezen mutációk közel fele (40%) rekurrens mutáció.

Az azonosított mutációk 12%-a misszensz mutáció. A misszensz mutációk eloszlása a *CYLD* génen nem egyenletes. Az összes eddig leírt misszensz mutáció a gén 12-20 exonjai között helyezkedik el. Ezen mutációk negyede (27%) rekurrens.

Az összes mutációnak 11%-át teszik ki a splice-site mutációk. A splice-site mutációk eloszlása a *CYLD* génen szintén nem egyenletes: mindegyik a gén 10-18 exonjai által határolt régióban lokalizálódik. Kevesebb, mint egy negyedük (18%) rekurrens.

Továbbá 2 in-frame deléció is leírásra került a génen, amelyek a 19. és 20. exonokban helyezkednek el. Mindkét mutáció FC kapcsán került leírásra.

## 5.6. A mutációk eloszlása a CYLD fehérjén

A *CYLD* gén által kódolt fehérje deubiquitináz aktivitással rendelkezik. A *CYLD* fehérje N-terminálisa három citoszkeletonhoz kapcsolt glicin gazdag domént (CAP-GLY) tartalmaz, melyek a *CYLD* fehérje mikrotubulusokhoz történő kapcsolódásában játszanak szerepet. A *CYLD* fehérje enterminálisa két szakaszra bontható: az exon 4-5 által kódolt szakaszán mutáció mindeddig nem fordult elő, míg az exon 5-11 által kódolt szakaszon az eddig detektált mutációk mindössze 18% található meg. Ebben a régióban csak frameshift, nonszensz és splice-site mutációk fordulnak elő. A frameshift mutációk valamennyi CAP-GLY domén körül előfordulnak, míg a legtöbb nonszensz és splice-site mutációk a harmadik CAP-GLY domén körül halmozódnak. Misszensz mutációk a fehérje N-terminálisában nem fordulnak elő.

A *CYLD* deubiquitináz aktivitásáért felelős doménje a fehérje C-terminálisában helyezkedik el, kialakításában a 12. és a 20. exonok között elhelyezkedő kódoló szakaszok vesznek részt. Ebben a régióban helyezkedik el a detektált mutációk 82%-a. A gyakoribb mutáció típusok közül a frameshift mutációk mintegy 72%-a, a nonszensz mutációk 72%-a, a splice-site mutációk 81%-a és a misszensz mutációk 100%-a. A 12. és a 20. exonok által határolt régióban elhelyezkedő mutációk tehát a *CYLD* fehérje deubiquitinációs aktivitását befolyásolják. Funkcionális vizsgálatok eredményei alapján a mutáció hordozása a *CYLD* fehérje deubiquitinációs aktivitásának csökkenését eredményezi.

## 5.7. Genotípus és fenotípus összefüggések a *CYLD* gén mutációit hordozó betegek esetében

Genotípus-fenotípus összefüggések felállítása meglehetősen nehéz, hiszen a *CYLD* génen azonosított mutációk mindegyik típusa - frameshift, nonszensz, misszensz és splice-site - kialakíthatja az összes klinikai variánst - BSS, MFT1, FC - a betegség spektrumon belül.

Frameshift mutációkat mindegyik betegség kapcsán azonosítottak a *CYLD* gén által okozott kórképek spektrumában. Ezen mutációk főként a 17. exonban lokalizálódnak.

Nonszensz mutációk mutatják a legnagyobb fenotípusos diverzitást. Néhány mutációt detektáltak BSS, MFT1 és FC betegek esetében is. Mivel a legtöbb rekurrens nonszensz mutáció *de novo* események eredménye, így frekvenciájuk és elhelyezkedésük mutációs forrópontot jelöl a *CYLD* génen. Eltérő mutációs események által kialakult, azonos mutációt hordozó betegek klinikai képei között extrém különbségek lehetnek. Valamint a nonszensz mutációk okozzák a legváltozatosabb expressziót családon belül is. Ezen

különbségek felvetik jelenleg még nem ismert genetikai és/vagy környezeti tényezők módosító hatását is.

A *CYLD* gén misszensz mutációi főként MFT1 (73%) kialakulását eredményezi és ezen esetben is fenotípusbeli különbségek lehetnek. Ezt a megfigyelést alátámaszthatja az a tény, hogy a misszensz mutációk csak a 12-20. exonok körül helyezkednek el, és egyáltalán nincsenek jelen a gén 5' végén. Általánosságban elmondható, hogy a misszensz mutációk kis fenotípusos diverzitást mutatnak, és főként MFT1 fenotípust eredményeznek.

Splice-site mutációk mindhárom klinikai variánst eredményezhetik, azonban fenotípusos szignifikanciája kevésbé ismert.

### 5.8. A *CYLD* gén által okozott klinikai variánsok földrajzi előfordulása

*CYLD* gén mutációkat ír, japán, spanyol, német, algériai, török, magyar, szlovák, olasz, skandináv, tajvani, kanadai és afrikai populációban is leírtak. Azonban a publikált mutációk többségét az UK-ban, az USA-ban és Kínában azonosították. Összehasonlítva a népeiségeket és az allélvariánsokat, földrajzi különbségek figyelhetők meg. MFT1 klinikai fenotípust afrikai, afro-amerikai, tajvani, algériai, török, olasz és spanyol betegekben figyeltek meg, bár a legtöbbjüket Kínában azonosították. FC klinikai variáns holland, olasz és ír páciensekben volt jelen, azonban legtöbbjüket az UK-ban és az USA-ban írták le. BSS fenotípust magyar, szlovák, osztrák, olasz, skandináv, spanyol, kanadai betegekben detektáltak és legtöbbjüket - hasonlóan FC-hez - az UK-ban és az USA-ban írták le.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Dolgozatomban genetikai és funkcionális vizsgálatok eredményeit foglalom össze olyan stigmatizáló ritka betegség kapcsán, mint az LS vagy az MFT1, FC és BSS, mely utóbbiak ugyanazon kórkép eltérő súlyosságú klinikai variánsai.

Az LS egy ritka monogénes betegség, mely stigmatizáló bőrgyógyászati tünete a testszerte jelentkező lentigók kialakulása. A betegség további gyakori tünetei közé tartozik: az EKG rendellenességek, okuláris hipertelorizmus, pulmonáris stenosis, abnormális genitáliák, retardált növekedés és hallásvesztés. Az LS a *PTPN11* gén mutációinak következményeként alakul ki. A vizsgált 51 éves férfibeteg esetében elvégeztem a *PTPN11* gén kódoló régióinak szekvenálását, mely során egy rekurrens misszensz mutációt (c.836A/G; p.Tyr279Cys) azonosítottam. Ezt a mutációt eddig 47 LS-ben szenvedő betegben írták le. Összehasonlítva a

vizsgált beteg klinikai fenotípusát az irodalomban leírtakkal, az azonos genotípus ellenére nagy fenotípusos diverzitást figyeltem meg.

Egy MFT1-ben szenvedő spanyol család esetében, genetikai vizsgálataim során a *CYLD* gén kódoló régióinak mutáció szűrését végeztem el. Vizsgálati eredményeim alapján egy rekurrens heterozigóta nonszensz mutációt (c.2272C/T, p.Arg758X) detektáltam. Ezt a mutációt már mindhárom klinikai variás – BSS, FC és MFT1 – kapcsán leírták. Haplotípus vizsgálatot végeztem spanyol MFT1, holland FC és osztrák BSS ugyanazt a heterozigóta nonszensz p.Arg758X *CYLD* mutációt hordozó beteg esetében. Eredményeim alapján különböző mutációs események felelősek az osztrák, valamint a spanyol és holland esetek kialakulásáért. Eredményeim mutációs forráspontot feltételeznek a gén ezen pozíciójában, illetve az is megállapítható, hogy az ugyanazon mutációt hordozó betegek között a klinikai tünetek esetében nagyfokú változatosság figyelhető meg.

Egy BSS-sel diagnosztizált, bukovinai székely származású, magyar család esetében is elvégeztem a *CYLD* gén kódoló régióinak mutáció szűrését. A szekvenálás során a *CYLD* gén 20. exonjában egy nonszensz mutációt (c.2806C>T, p.Arg936X) azonosítottam. Mivel ezt a mutációt egy angol-szász családban is azonosították, így haplotípus vizsgálatot végeztem a földrajzilag távoli két családban és megállapítottam, hogy különböző mutációs események felelősek a mutáció kialakulásáért. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy ez a pont egy mutációs forráspont a *CYLD* génen. Ugyanazt a mutációt hordozó két család között óriási fenotípusos különbségek figyelhetők meg, amelyek eddig még nem ismert moduláló faktorok jelenlétét feltételezik.

Egy szintén BSS-ben szenvedő szegedi család vizsgálata során, egy új misszensz mutációt (c.2613C>G; p.His871Gln) azonosítottam a *CYLD* gén 19. exonjában, a kódolt fehérje ubiquitin specifikus proteáz domén területén. Vizsgálatokat végeztem, hogy megállapítsam ezen új mutáció funkcionális szerepét. Eredményeim arra utalnak, hogy az új *CYLD* mutáció jelenléte megnöveli a NEMO fehérje ubiquitináltságának szintjét, ezáltal lecsökkenti a génexpressziót, így hatással lehet az NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonalra.

Ezeknek a vizsgálatoknak nagy jelentőségük van, hiszen a betegség kialakulásáért felelős kóroki mutáció azonosítása lehetőséget nyújt prenatális diagnosztika végzésére, és ezáltal befolyásolhatja a családtervezést ezekben az igen stigmatizáló kórképekben. Vizsgálataink ugyanakkor a kóroki eltérés azonosításával alapjául szolgálhatnak további új kezelési stratégiákat, génkorrekciós, génterápiás eljárásokat kidolgozó kutatásoknak, amelyek specifikusabbak és hatékonyabbak a tüneti kezeléseknél.

## 7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Nagy Nikoletta adjunktusnőnek, az értekezés elkészítésében és a vizsgálatok kivitelezésében nyújtott segítségéért.

Köszönöm Prof. Dr. Széll Mártának és Prof. Dr. Kemény Lajosnak, hogy az értekezés alapjául szolgáló munka elvégzéséhez megfelelő körülményeket biztosítottak az SZTE ÁOK Orvosi Genetikai Intézet és a Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika molekuláris biológiai laboratóriumában.

Köszönet illeti Dr. Kinyó Ágnes adjunktusnőt és Polyánka Hildát a vizsgálatok kivitelezésében végzett segítségükért.

Hálás vagyok a betegek kezelőorvosainak, Dr. Németh Istvánnak, Dr. Varga Jánosnak, Dr. Kis Erikának, Dr. Bajor Klárának, Dr. Karagity Elizának, Dr. Neil Rajannak, Dr. Raquel Rodríguez Lópeznek, Dr. Tomas Vaneceknek, Dr. Joan N. R. Kromosoetonnak a bőrgyógyászati vizsgálatokban végzett tevékenységéért és a betegek vizsgálatba történő bevonásáért.

Végül szeretném hálámat kifejezni mind az Orvosi Genetikai Intézetben, mind az MTA-SZTE Dermatológiai Kutatócsoportban, mind pedig a Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikán dolgozó összes kedves kollégámnak kitartó segítségükért.