

Genetikai vizsgálatok ritka monogénes betegségekb

A Ph.D. értekezés tézisei

Sulák Adrienn



Szeged

2017

Genetikai vizsgálatok ritka monogénes betegségekben

A Ph.D. értekezés tézisei

Sulák Adrienn M.Sc.

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem

Témavezető:

Dr. Nagy Nikoletta Ph.D.

Orvosi Genetikai Intézet
Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2017

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapját képező közlemények

- I. **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; 41(2):190-195. **IF: 1.315**
- II. Tripolszki K, Knox R, Parker V, Semple R, Farkas K, **Sulák A**, Horváth E, Széll M, Nagy N. Somatic mosaicism of the *PIK3CA* gene identified in a Hungarian girl with macrodactyly and syndactyly. *Eur J Med Genet* 2016; 59(4):223-226. **IF:1.81**
- III. Tripolszki K, Farkas K, **Sulák A**, Szolnok G, Duga B, Melegh B, Knox RG, Parker VER, Semple RK, Kemény L, Széll M, Nagy N. Atypical neurofibromatosis type 1 with unilateral limb hypertrophy mimicking overgrowth syndrome. *Clin Exp Dermatol* 2017; doi: 10.1111/ced.13154. [Epub ahead of print] **IF: 1.315**

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó közlemények

- I. Nagy N, Vályi P, Csoma Z, **Sulak A**, Tripolszki K, Farkas K, Paschali E, Papp F, Toth L, Fabos B, Kemeny L, Nagy K, Szell M. *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.
- II. Vályi P, Farkas K, Tripolszki K, **Sulák A**, Széll M, Nagy N, Nagy K. Rekurrens európai misszensz mutáció egy magyar Papillon-Lefèvre szindrómában szenvedő családban. *Fogorvosi Szemle* 2014; 107:(3) 87-92.

Az értekezés alapját képező tudományos közlemények összesített impakt faktora: 4.44

Egyéb közlemények

- I. Nagy N, Farkas K, Tripolszki K, **Sulák A**, Kemény L, Széll M. A cylindromatosis gén mutációi által okozott genodermatosisok. *Bőr Vener Szemle* 2014; 90:(5) 185-193.
- II. Nemes E, Farkas K, Kocsis-Deák B, Drubi A, **Sulák A**, Tripolszki K, Dósa P, Ferenc L, Nagy N, Széll M. Phenotypical diversity of patients with LEOPARD syndrome carrying the worldwide recurrent p.Tyr279Cys *PTPN11* mutation. *Arch Dermatol Res* 2015; 307(10):891-895. **IF: 2.327**
- III. 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; 18(1):27. **IF: 2.198**
- IV. Tripolszki K, Török D, Goudenège D, Farkas K, **Sulák A**, Török N, Engelhardt JI, Klivényi P, Procaccio V, Nagy N, Széll M. High-throughput sequencing revealed a novel *SETX* mutation in a Hungarian patient with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Behav* 2017; 7(4):e00669. **IF: 2.157**
- V. 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; 19;22(1):20. **IF: 1.414**

1. BEVEZETÉS

Az Európai Unió meghatározása szerint ritka betegségeknek számítanak azon életveszélyes, vagy krónikusan károsító állapotok, amelyek előfordulási gyakorisága alacsonyabb, mint 5 : 10 000. Napjainkban több, mint 8000 különböző ritka betegség létezik és az európai populáció 6-8% érintett valamely ritka kórképben életük bizonyos pontján. A ritka betegségek általában monogénes rendellenességek, vagyis egy meghatározott genetikai eltérés, egy gén defektusa és következményesen egy fehérje hibája döntő hatású a betegség megjelenése szempontjából.

Dolgozatomban olyan ritka, stigmatizáló monogénes kórképek, mint a Papillon-Lefèvre szindróma, Haim-Munk szindróma, atipikus 1-es típusú neurofibromatózis, valamint az egyoldali macrodaktília kapcsán végzett genetikai vizsgálati eredményeimet foglalom össze.

1.1. A CTSC mutációk által okozott betegség spektrum

1.1.1. Papillon-Lefèvre szindróma

A Papillon-Lefèvre szindróma (PLS; OMIM 245000) egy ritka, autoszomális recesszív öröklődésű kórkép, melynek legjellemzőbb tünete a tenyéri-talpi hyperkeratózis, valamint a súlyos periodontitis, amely akár a fogak elvesztéséhez is vezethet. Ezen súlyos tünetek mellett a PLS-ben szenvedő betegeknél kísérő tünetként enyhe mentális retardáció, a dura mater meszesedése, hyperhidrózis és a fertőzésekre való fogékonyság megnövekedése is jelentkezhet. A betegség előfordulása meglehetősen ritka, hozzávetőleg 4 : 1000 000 és napjainkig mintegy 300 esetet közöltek világszerte.

1.1.2. Haim-Munk szindróma

A Haim-Munk szindróma (HMS; OMIM 245010) a PLS főbb bőrgyógyászati és fogászati tüneteivel - mint a tenyéri-talpi hyperkeratózis, valamint a súlyos periodontitis - jelentős átfedést mutató kórkép. A HMS klinikai megjelenésének további jellegzetessége a pes planus, az arachnodaktília, az acrooszteolízis és az onychogryphózis. A HMS előfordulása megközelítőleg 1 : 1000 000 és kevesebb, mint 100 esetről számoltak be az irodalomban napjainkig.

1.1.3. Az agresszív periodontitis 1-es típusa

Az agresszív periodontitis 1-es típusát (AP1; OMIM 170650) súlyos periodontális gyulladás jellemzi, amely akár a tejfogak és a maradandó fogak elvesztéséhez is vezethet. A betegség előfordulása alacsonyabb, mint 1 : 1000 000 és mostanáig csupán néhány esetről számoltak be az irodalomban.

1.1.4. Genetikai háttér

A PLS, HMS és az AP1 autoszomális recesszív öröklődésű kórképek, melyek kialakulásának hátterében a *cathepszin C (CTSC)* gén mutációi ismertek. Ezidáig 79 különböző mutációt azonosítottak a *CTSC* génen, melyek többségét PLS betegekben detektálták és csupán néhány mutációt írtak le HMS vagy AP1 betegekkel összefüggésben. Tekintettel az átfedő klinikai tünetekre és azok családon belül is változatos manifesztációjára, a PLS, HMS és az AP1 esetében feltételezhetjük, hogy nem különböző entitásoknak, hanem egyazon kórkép eltérő súlyosságú variánsainak tekinthetők.

1.2. *PIK3CA*-kapcsolt túlnövekedési spektrum

A *foszfatidilinozitol 3-kináz enzim katalitikus alfa* alegységet kódoló (*PIK3CA*) gén szomatikus mutációi szegmentális túlnövekedési rendellenességeket okozhatnak. Ezen *PIK3CA*-kapcsolt túlnövekedési betegségek közé sorolhatók a rostos kötőszövetet és zsírszövetet érintő hyperplázia illetve további nehezen besorolható betegségek, melyek általános jellemzője az izmok, a csontok és a zsírszövet túlnövekedése. Ez utóbbiakra példák a veleszületett zsírszöveti túlnövekedéssel, érmalformációkkal, epidermális névusszal és csontváz rendellenességgel járó CLOVES szindróma, a makrodaktília, a multiplex zsírszöveti lézióval járó hemihyperplázia és az agy túlnövekedésével járó betegségek, mint az érmalformációkkal társuló megalencephália és a megalencephália-polymikrogyria-hidrocephalus szindróma (MPPH). Az előbbieken felsorolt betegségek átfedő klinikai tünetekkel rendelkeznek és szintén ugyanazon spektrum különböző részeit reprezentálják.

1.2.1. Makrodaktília

A makrodaktília (OMIM 155500) olyan ritka, veleszületett rendellenesség, amely 100 000 születésből körülbelül egy esetben fordul elő, és amelyet az ujjak - beleértve a lágy szöveteket, valamint a csontokat, ereket, idegeket és bőrt érintő struktúrákat - méretének túlnövekedése jellemez. Jellemzően az ujjak terminális részeit érinti, az ugyanazon ideg által beidegzett területen és a területet beidegző perifériás ideg is mutathat megnagyobbodást, vagy megnyúlást. A közelmúltban a makrodaktília is a túlnövekedéssel járó szindrómák közé került besorolásra.

1.3. Neurofibromatózis 1-es típusa

A neurofibromatózis 1-es típusa (NF1; OMIM 162200) egy ritka, autoszomális domináns öröklődésű monogénes betegség, melynek hátterében a *neurofibromin gén (NF1)* mutációi állnak. Jellemző klinikai tünetei közé tartoznak a pigmentációs rendellenességek, mint például a tejeskávé foltok és a hónalji szeplősödés, a bőrön kialakuló fibrómák, és a szemet érintő hamartómák, melyek Lisch csomókként is ismertek. Ezen tünetek mellett központi idegrendszeri és szkeletáris rendellenességek (főként scoliosis, a tibia pszeudoarthrózisa, makrocephália és alacsony növés) is előfordulhatnak. Gyakran kialakuló tünetek még az érmalformációk, melyek leggyakrabban a cerebrális, gasztrointesztinális és renális erek diszpláziáját eredményezik és akár renovaszkuláris eredetű magasvérnyomást is okozhatnak. A NF1 az egyik leggyakrabban előforduló monogénes betegség világszerte, prevalenciája 1 : 3000-hez.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A ritka betegségek nagy kihívást jelentenek az egészségügyi szervezetek számára, köszönhetően a betegek kis száma, valamint a betegségek releváns ismereteinek és szakértelmének hiánya miatt. Dolgozatomban súlyos, stigmatizáló, ritka monogénes betegségek kialakulásának hátterében álló genetikai eltérések vizsgálatait foglalom össze. Ezen, általam vizsgált ritka betegségek a *CTSC*, *PIK3CA* és az *NF1* mutációk által okozott betegség spektrumok csoportjába sorolhatók. Az elvégzett genetikai és haplotípus vizsgálatok során az volt a célom, hogy a betegségek hátterében álló kóroki mutációkat azonosítsam. Bár az általam vizsgált betegségek ritkák, tüneteik az érintett betegek számára élethosszig

tartó terhet jelentenek mind fizikailag, mind pedig pszichésen. Az általam végzett genetikai, molekuláris biológiai vizsgálatok a betegségek pontosabb megértése révén hozzájárulhatnak új terápiás célpontok azonosításához, majd pedig új terápiás lehetőségek kialakításához ritka betegségben szenvedő pácienseknél. Jelen vizsgálataink az Európai Unió orvosbiológiai kutatásának jelenlegi tendenciáival összhangban lettek elvégezve, amely a ritka, úgynevezett “elhanyagolt” betegségek vizsgálatát is támogatja, mivel ezen ritka betegségek genetikai hátterének pontosabb ismerete egyúttal a gyakori betegségek pontosabb megértéséhez is vezethetnek. Vizsgálataim Papillon-Lefèvre, Haim-Munk szindrómákban, a neurofibromatózis 1-es típusában, valamint unilaterális makrodaktíliában szenvedő betegekben további bepillantást eredményezhetnek a palmoplantáris hyperkeratózis és a túlnövekedési szindrómák molekuláris mechanizmusainak pontosabb megértéséhez.

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Egy magyar Haim-Munk szindrómában szenvedő beteg

Egy 39 éves magyar nőbeteg a HMS jellegzetes tüneteit mutatja, enyhe hyperkeratotikus plakkok figyelhetők meg szimmetrikusan a tenyereken és a talpakon. Onychogryphózis és arachnodaktília észlelhető az ujjakon, valamint pes planus a talpakon. A beteg az összes maradandó fogát elvesztette és állandó fogászati protézist visel. A páciens nevelőintézetben nőtt fel, gyermekei, férje nincsenek. Egyetlen hozzátartozóját sem ismeri.

3.2. Egy magyar Papillon-Lefèvre szindrómában szenvedő beteg

Egy 25 éves magyar férfibeteg a PLS jellegzetes tüneteivel rendelkezik. A tenyéri-talpi hyperkeratózis súlyosabb formában jelentkezett nála, mint a nőbeteg esetében. Onychogryphózis, arachnodaktília és pes planus nem tapasztalható esetében. A beteg az összes maradandó fogát elvesztette és állandó fogászati protézist visel. Szülei, valamint felesége klinikailag tünetmentesek. Gyermeke nincs. Más, klinikailag tünetes hozzátartozót nem ismer.

3.3. Egy makrodaktíliában és szindaktiliában szenvedő magyar kislány

Egy négy éves magyar lánygyermek esetében genetikai vizsgálatra a bal kéz harmadik és negyedik ujjának túlnövekedése és összenövése miatt került sor. Az elvégzett röntgenfelvétel alátámasztotta, hogy a betegséget nem csupán a lágszövetek túlnövekedése, hanem az érintett ujjak csontjainak túlnövekedése is jellemzi. A makrodaktília és szindaktilia már a gyermek születésekor jelentkezett és annak növekedésével lassan progrediált. A vizsgálatok során érrendszeri rendellenesség nem volt detektálható. A belső szervekben rendellenesség nem került kimutatásra. Más testrészei szimmetrikusak és egyenlően fejlődtek. A beteg szülei klinikailag tünetmentesek és nem tudnak olyan családtagokról, akik makrodaktíliában vagy szindaktiliában szenvednek.

3.4. Bal láb túlnövekedésben és neurofibromatózis 1-es típusában szenvedő magyar beteg

Az 52 éves nőbeteg esetében az NF1 tipikus klinikai tünetei és a bal lábat érintő túlnövekedés miatt történt genetikai vizsgálat. A beteget az NF1 tipikus bőrtünetei jellemezték, a testszerte jelentkező neurofibromák mellett, tejeskávés foltok és hónalji szeplősödés volt megfigyelhető. A betegnél elvégzett szemészeti szakvizsgálat Lisch csomókat igazolt. Az elvégzett képalkotó vizsgálatok központi idegrendszeri malignus daganatok fennállását nem igazolták. Csontrendszeri rendellenességek, scoliosis, a tibia pseudoarthrózisa, alacsony testmagasság és macrocephália nem jelentkeztek. A klinikai tünetek alapján a páciensnél NF1 betegség került megállapításra. A fent leírt klinikai tünetek mellett a páciens bal lábának hipertrófiáját is észlelték, amely jelentős eltérést eredményezett a lábának kerületében és hosszában. Bal lábának ezen rendellenessége már születésük óta jelen van. Képalkotó vizsgálatok unilaterális osteohipertrófiát igazoltak. Más klinikailag tünetes hozzátartozót nem ismer.

3.5. Módszerek

A genetikai vizsgálatokhoz perifériás vérminta vétel történt a klinikailag tünetes betegektől, tünetmentes családtagjaiktól és egészséges kontroll egyénektől. A vizsgált betegek esetében az érintett bőrterületek, lágyrészek esetében biopsziás mintavétel is megvalósult. DNS izolálást követően PCR során felszaporítottam a vizsgálni kívánt 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. A *PIK3CA* gén mutációinak vizsgálatához PCR-alapú restrikciós fragment assay-t alkalmaztunk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A *CTSC* gén genetikai és haplotípus vizsgálatai

A PLS-ben és HMS-ben szenvedő páciensek esetében a *CTSC* gén vizsgálata során ugyanazon nonszensz mutációt (c.748C/T, p.Arg250X) azonosítottam a gén 5. exonjában. A betegek a mutációt homozigóta formában hordozzák, amíg a tünetmentes családtagok és a kontroll egyének esetében (n=100) vad típusú szekvenciát detektáltunk. Ugyanazon homozigóta nonszensz mutáció jelenléte felvetette a két beteg között fennálló rokoni kapcsolat lehetőségét. Ennek vizsgálatára haplotípus analízist végeztünk az azonosított mutációtól 5' és 3' irányban elhelyezkedő polimorfizmusok meghatározásával. A vizsgált betegek az összes azonosított polimorfizmust homozigóta formában hordozták és ugyanazon haplotípust mutatják.

4.2. A *PIK3CA* gén genetikai vizsgálata

A túlnövekedést mutató beteg esetében sem a perifériás vérmintából, sem az érintett területekről vett szövetmintából izolált genomi DNS-en *PIK3CA* gén mutáció nem volt detektálható hagyományos kapilláris szekvenálással. Az unilaterális makrodaktíliában szenvedő páciens esetében az elvégzett PCR-alapú restrikciós fragment analízissel az érintett szövetből izolált genomi DNS-en a *PIK3CA* gén 542-es kodonjának szomatikus mutációját (c.1624 G/A, p.Glu542Lys) detektáltuk, melyet az érintett szövet mintegy 4 %-a hordozott. A genetikai vizsgálat alátámasztotta, hogy a vizsgált beteg bal kezének harmadik- negyedik ujjainak összenövését a *PIK3CA* gén p.Glu542Lys szomatikus misszensz mutációja eredményezte. A vizsgált másik NF1 klinikai tüneteit és bal láb túlnövekedést mutató páciens esetében a túlnövekedésért felelős szomatikus mutáció 50 onkogén és tumorszupresszor gén célzott új generációs szekvenálását követően sem került azonosításra.

4.3. A *NF1* gén genetikai vizsgálata

A *NF1* klinikai tüneteit és bal láb túlnövekedést mutató beteg perifériás vérmintájából izolált genomi DNS direkt szekvencia analízise során az *NF1* génen egy új, az irodalomból eddig még nem ismert frameshift mutációt (c.5727insT, p.V1909fsX1912) detektáltunk a gén 39. exonjában. A páciens a mutációt heterozigóta formában hordozza, míg a kontroll egyénenél (n=50) vad típusú szekvenciát detektáltunk. A páciens esetében a *PIK3CA* gén és további 50 onkogén és tumorszupresszor gén célzott új generációs szekvenálásával sem detektáltunk a bal láb túlnövekedéséért felelős csírasejt vagy szomatikus mutációt. A páciens esetében ezért a túlnövekedési szindróma diagnózisa helyett a páciens gondozását végző klinikusokkal egyetértésben az atípusos *NF1* betegség diagnózisa igazolódott, melyben a bal láb eltérő csont és lágyrész méreteit az *NF1* betegség ritkán jelentkező fenotípusbeli variációjának tekintjük.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

5.1. A *CTSC* gén ugyanazon nonszensz mutációja két eltérő fenotípust eredményez

Két magyar, PLS és HMS szindrómában szenvedő beteg esetében a *CTSC* gén ugyanazon nonszensz mutációját (c.748C/T; p.Arg250X) detektáltuk homozigóta formában. Annak eldöntésére, hogy a két beteg között esetleg valamilyen fokú rokonsági kapcsolat áll-e fent, valamint, hogy a két beteg eltérő fenotípusának kialakulását milyen esetleges genetikai módosító faktorok eredményezik, haplotípus vizsgálatot végeztem az általam detektált mutációt határoló polimorfizmusok genotipizálása révén.

A detektált p.Arg250X homozigóta nonszensz mutáció a *CTSC* gén 5. exonjára lokalizálódik, amely a cathepsin C fehérje nehéz láncának régióját kódolja. Ezen p.Arg250X mutáció egy csonkolt fehérje kialakulását eredményezi, ami végső soron jelentősen csökkent enzimaktivitáshoz vezet. Ez a hipotézis jól korrelál előzetes tanulmányokkal, melyek szerint a *CTSC* gén kóros változásai olyan funkcióvesztéses mutációk, melyek az enzimaktivitás inaktivációját és az immunválasz megváltozott szabályozását eredményezik, melyek végső soron megnövelik a periodontitis, valamint a bőrfertőzések kialakulásának kockázatát.

A p.Arg250X nonszensz mutációt előzőleg már azonosították PLS szindrómában szenvedő betegeknél; habár jelen, az általam végzett vizsgálat az első, amely HMS szindrómában szenvedő páciens esetében detektálta. A p.Arg250X mutáció korábban török PLS betegeknél került leírásra, akik szintén homozigóta formában hordozták.

További érdekes vizsgálat lenne a homozigóta p.Arg250X *CTSC* mutációt hordozó török és magyar PLS és HMS betegek haplotípusának vizsgálata, mellyel megállapítható lenne, hogy az ugyanazon homozigóta mutáció kialakulása a földrajzilag távoli betegekben egyazon alapító hatás következménye-e.

A két vizsgált magyar beteg a *CTSC* mutációk okozta betegség spektrum eltérő fenotípusos variánsait hordozzák (PLS és HMS). Bár a genetikai vizsgálat mindkét beteg esetében ugyanazon homozigóta nonszensz mutáció p.Arg250X jelenlétét igazolta a *CTSC* génen, a két beteg esetében a klinikai tünetek közötti különbségek (PLS és HMS fenotípus) jelentősek voltak. Az elvégzett haplotípus vizsgálat a két beteg esetében azonos haplotípust igazolt, megerősítve a rokonsági kapcsolat lehetőségét. Habár a betegek az anamnézis felvételekor nem tudtak ilyen kapcsolatról. A HMS-ben szenvedő nőbeteg nevelőintézetben nőtt fel és nem ismeri egyetlen hozzátartozóját sem. A PLS-ben szenvedő férfitbetegnek nem volt tudomása családon belüli házasságról a rokonság esetében, ami a detektált homozigóta mutáció (p.Arg250X) kialakulásának kedvezhetett volna. Habár haplotípus vizsgálati eredményeim és az a tény, hogy azonos családi névvel rendelkeznek, erősen utalnak a két beteg közötti lehetséges rokonsági kapcsolatra.

Mivel a vizsgált PLS és HMS betegek ugyanazon homozigóta kóroki mutációt hordozzák, valamint ugyanazon haplotípust is, lehetőség nyílt a fenotípusos különbségek kialakulásáért felelős *CTSC* génen belüli genetikai variánsok vizsgálatára. További genetikai vizsgálataink során azonban nem azonosítottunk ilyen genetikai variánsokat a *CTSC* génen és az azt határoló régiókban sem. Ezért azt feltételezzük, hogy ezek az esetleges genetikai fenotípust módosító faktor(ok), amely(ek) a két beteg közötti eltérő fenotípust eredményezi(k), nem a *CTSC* génen helyezkedhetnek el. Továbbá annak a lehetőségét sem tudjuk kizárni, hogy a fenotípusbeli különbségeket esetlegesen nem-genetikai faktorok okozzák, mint például környezeti- vagy életmódbeli tényezők.

Továbbá, eredményeink alátámasztják azt a feltételezést, hogy a PLS és a HMS nem két különböző entitás, hanem egyazon betegség eltérő klinikai megjelenési formái és kialakulásuk hátterében a kóroki *CTSC* gén mutációkon túl valamilyen genetikai, életmódbeli vagy környezeti módosító faktorok lehetnek a felelősek. Ezen megfigyelések rávilágítanak a genetikai vizsgálatok jelentőségére és a genotípus-fenotípus összefüggések megértésének fontosságára is.

5.2. A *PIK3CA* gén szomatikus p.Glu542Lys mutációja nagymértékű fenotipikus diverzitást mutat túlnövekedési szindrómákban szenvedő páciensek esetében

Egy négy éves, a bal kéz harmadik - negyedik ujjainak túlnövekedését és összenövését mutató páciens genetikai vizsgálatát végeztük el, mely során a *PIK3CA* gén egy szomatikus heterozigóta misszensz mutációját (p.Glu542Lys) detektáltuk. Ez a mutáció a PI3K fehérje p110 α katalitikus alegységének helikális doménjét érinti. Ezen mutációt korábban összesen nyolc, különböző túlnövekedési szindrómákban szenvedő betegben detektálták. Előzetes funkcionális vizsgálatok rámutattak, hogy a p.Glu542Lys variáns az AKT hiperaktivációját okozza, ami a PI3K fehérje down-stream szabályozója az idegsejtekben. A *PIK3CA* gén p.Glu542Lys mutációját hordozó betegek nagyfokú fenotípusos diverzitást mutatnak, Kurek és mtsai. (2012) például két, CLOVES szindrómában szenvedő férfi és nőbeteg esetét írta le. A makrodaktílián kívül mindkét beteg esetében a törzs, a végtagok zsírszöveti túlnövekedése és érrendszeri rendellenességek – beleértve a nyirok-, kapilláris- és vénás elváltozásokat – alakultak ki. Az érintett nőbetegnek hipoplasztikus jobb veséje is volt. Egy későbbi vizsgálatban a CLOVES szindróma prenatális igazolását közölték egy 27 hetes magzatnál, amely a *PIK3CA* gén ugyanezen (p.Glu542Lys) mutációját hordozta. A születéskor megfigyelt klinikai tünetek közé tartoztak aszimmetrikus mellkas és has, kétoldali multicisztás rendellenességek és a bal láb aszimmetrikus növekedése, a bal lábfej makrodaktíliájával és az első és második lábujj közötti részleges összenövés (sandal gap). Rios és mtsai. (2013) két, ugyanezen p.Glu542Lys mutációt hordozó beteg esetéről számoltak be; mintkét beteg esetében makrodaktília volt megfigyelhető. A két vizsgált páciens közül az egyik a makrodaktília mellett az izomzat hipertrófiája is jelentkezett, mely kialakulását a szerzők szintén a szomatikus p.Glu542Lys *PIK3CA* mutáció jelenlétének tulajdonították. Egy másik tanulmány további három faciális intiltráló lipomatózisban szenvedő beteg esetéről számolt be, amely szintén a szomatikus p.Glu542Lys mutáció jelenlétével volt magyarázható. Ezen betegek esetében makrodaktília nem alakult ki.

A *PIK3CA* gén szomatikus p.Glu542Lys mutációval kapcsolt nagymértékű fenotípusos diverzitást az embriogenezis különböző időpontjaiban végbemenő mutációs eseményeknek tulajdonítják. A CLOVES szindrómában szenvedő betegek esetében feltehetőleg az embriogenezis során korábban alakulhatott ki ugyanazon szomatikus p.Glu542Lys mutáció, mint a fokális túlnövekedési kórképekben szenvedő páciensek esetében (makrodaktília vagy faciális intiltráló lipomatózis).

A genetikai vizsgálatok hatalmas jelentőséggel bírnak ezen betegekénél, hiszen a háttérben álló kóroki genetikai eltérések pontos meghatározása lehetőséget nyújt későbbi új terápiás beavatkozások fejlesztésére. Jelenleg a *PIK3CA* mutációk okozta túlnövekedési betegségek esetében nincs oki terápia az érintett páciensek számára, habár a PI3K-AKT-mTOR jelátviteli útvonal inhibitorai hatásos terápiás alternatívák lehetnének az érintett betegek számára. A rapamycin (sirolimus) közvetlenül a PI3K-t célozza meg és hatásos lehetne akár a makrodaktília kezelésében is. Emellett a rapamycinnel kapcsolatban az irodalmi adatok alapján beszámoltak arról, hogy hatásos egy-egy izolált eset kezelésében és a későbbiekben akár áttörést jelenthet a makrodaktíliában és túlnövekedési szindrómákban szenvedő betegek számára. Azonban a *PIK3CA*-kapcsolt túlnövekedéssel kapcsolatos kezelések hosszú-távú kezelésének megbízhatósági adatai jelenleg még hiányosak és ez is jelzi, hogy szükség van klinikai vizsgálatokra a biztonság és hatékonyság elérésének érdekében. A jelenlegi helyzet fényében nagy jelentőséggel bírnak a részletes genetikai vizsgálatok, valamint ezen, ritka esetek bemutatása.

5.3. Az *NF1* gén újonnan azonosított mutációja atípusos fenotípust eredményez

Az *NF1* klinikai tüneteit és a bal lábat érintő lágyrészt és csont hypertrófiát mutató magyar nőbeteg genetikai vizsgálatát végeztem el. Az *NF1* olyan, atipikus klinikai formája, mely unilaterális végtagi hypertrófiájával jár, korábban még nem volt ismert. Bár a ‘vaszkuláris neurofibromatózis fenotípus’ jelensége kapcsán az *NF1* és a vaszkuláris diszplázia viszonylag gyakori társulását korábban már leírták az irodalomban. Az *NF1*-et csontrendszeri rendellenességek is kísérhetik, mint például az ékcsont szárnyának diszpláziája, makrocephália, scoliózis, porckorong rendellenesség, a tibia pseudoarthrózisa és az alacsony termet. A klinikai tünetek alapján felmerült a lehetősége, hogy a beteg két független ritka betegségben szenved (*NF1* és bal láb túlnövekedés) vagy pedig a bal láb hypertrófiája egy atípusos, az *NF1* érrendszeri és szkeletáris manifesztációjának tekinthető.

Genetikai vizsgálataink eredményeként egy új, heterozigóta, egyetlen nukleotidot érintő inszerciót mutattunk ki az *NF1* génben, amely kereteltolódást okoz és egy korai STOP kodon kialakulását eredményezi (c.5727insT, p.V1909fsX1912). Mivel ez a mutáció a beteg perifériás vérmintájából izolált genomi DNS-ében volt jelen, úgy véljük, hogy ez egy csírvonalbeli mutáció. A beteg bal lábából vett szöveti mintából izolált DNS-en további *NF1* gén mutációt nem detektáltunk. Az érintett végtag DNS mintájának vizsgálatakor a *PIK3CA*

gén és további 50 onkogén és tumorszupresszor gén célzott új generációs szekvenálásával sem detektáltunk a bal láb túlnövekedéséért felelős mutációt.

Tekintettel arra, hogy nincs más, klinikailag tünetes hozzátartozó az érintett beteg családjában, és az NF1 betegség autoszomális domináns öröklődésmenetet mutat, azt feltételezzük, hogy az általunk azonosított mutáció az *NF1* gén *de novo* mutációja. A genotípus-fenotípus összefüggések magyarázata meglehetősen szegényes az NF1 tekintetében, kivéve az *NF1* gén nagy delécióit hordozó betegek esetében, amelyek általában súlyos fenotípussal rendelkeznek. Az *NF1* mutációk általában a tumorszupresszor funkció elvesztését eredményezik, megzavarva a neurofibromin fehérje azon képességét, hogy a proto-onkogén RAS-t inaktív formában tartsa. Azt feltételezzük, hogy ezen új *NF1* mutáció az NF1 kialakulásáért felelős kóroki mutációja, és a beteg esetében megfigyelt unilaterális végtagi hipertrófia jelenléte is ezen mutáció következménye lehet.

Összegzésként megállapíthatjuk, hogy a páciens nem két független ritka betegségben szenved, hanem az NF1 szokatlan klinikai fenotípusát mutatja. Tudomásunk szerint jelen vizsgálatunk az első, ami tisztázza a genetikai hátterét egy ilyen komplex esetnek, továbbá valószínűsíti az *NF1* gén mutációjának kóroki szerepét unilaterális végtagi hipertrófia kialakulásában.

6. ÖSSZEGZÉS

PhD disszertációmban genetikai és haplotípus vizsgálataim eredményeit foglalom össze olyan ritka betegségben szenvedő páciensek vizsgálata kapcsán, mint a PLS, HMS, az egyoldali makrodaktília és az atipikus NF1.

A *CTSC* gén mutáció analízise két, PLS-ben és HMS-ben szenvedő magyar beteg vizsgálata során ugyanazon homozigóta nonszensz mutációt (c.748C/T; p.Arg250X) eredményezte. Az elvégzett haplotípus analízis igazolta, hogy ugyanazon haplotípust hordozzák, és ezzel a rokonsági kapcsolat nem zárható ki. Eredményeink alátámasztják azt a feltételezést is, hogy a PLS és a HMS ugyanazon betegség fenotípusos változatai és emellett kizárják egy feltételezett módosító faktor meglétét a *CTSC* génen belül, amely felelős lenne a két fenotípus kialakításáért. Feltételezzük, hogy ezen lehetséges módosító faktorok a *CTSC* génen kívül helyezkednek el, vagy pedig a különböző fenotípusok kialakulása eltérő környezetbeli- vagy életmódbeli tényezők következménye.

Egy magyar makrodaktília és szindaktilia tüneteivel rendelkező beteg genetikai vizsgálata során a *PIK3CA* gén szomatikus mutációját (c.1624G/A, p.Glu542Lys)

detektáltunk az érintett ujjak szövetmintából izolált DNS-en, míg perifériás vérmintából izolált DNS-en a mutációt nem sikerült kimutatni. Mostanáig ezen szomatikus mutációt mindösszesen nyolc, a túlnövekedési szindrómák valamely típusában szenvedő páciensnél írták le. Az ugyanazon p.Glu542Lys mutációt hordozó általunk vizsgált magyar beteg és az előzetesen közölt esetek jelentős fenotípusos különbségeket mutatnak, melyet feltehetően az embriogenezis különböző időpontjaiban végbemenő mutációs eseményeknek tulajdoníthatunk. A *PIK3CA* kóroki mutációk azonosítása a későbbiekben potenciálisan új terápiás lehetőségeket biztosít az érintett betegek számára a PI3K-AKT-mTOR jelátviteli útvonal inhibitorainak alkalmazása révén.

Az NF1 klinikai tüneteit, valamint egyoldali, a teljes bal lábat érintő hypertrófiát mutató magyar nőbeteg genetikai vizsgálatát végeztük el. Ezen szokatlan fenotípus az NF1 atipikus megjelenési formáját, vagy az NF1 és egy túlnövekedési szindróma együttes jelenlétét vetette fel. A beteg perifériás vérmintájából izolált genomi DNS direkt szekvenálása során az *NF1* génen egy új, az irodalomból eddig még nem ismert frameshift mutációt (c.5727insT, p.V1909fsX1912) detektáltunk. A beteg bal lábából vett szöveti mintából izolált DNS-en további *NF1* gén mutációt nem detektáltam. Az érintett végtag DNS mintájának vizsgálatakor a *PIK3CA* gén és további 50 onkogén és tumorszupresszor gén célzott új generációs szekvenálásával sem detektáltunk a bal láb túlnövekedéséért felelős mutációt. Ezen eredményeim alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a beteg nem két ritka betegségben szenved (NF1 és túlnövekedési szindróma), hanem az NF1 egy szokatlan megjelenési formája által érintett, és a bal láb túlnövekedése az azonosított c.5727insT NF1 mutáció következménye lehet.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

Hálásan köszönöm Prof. Dr. Széll Mártának, hogy az értekezés alapjául szolgáló munka elvégzéséhez lehetőséget biztosított az SZTE ÁOK Orvosi Genetikai Intézet molekuláris biológiai laboratóriumában.

Hálás vagyok a betegek kezelőorvosainak, Dr. Fábos Beátának és Dr. Szolnoky Gyözőnek a bőrgyógyászati vizsgálatokban végzett tevékenységükért és a betegek vizsgálatba történő bevonásáért.

Köszönet illeti Prof. Dr. Melegh Bélát, Dr. Duga Balázst, Dr. Victoria Parkert, Dr. Robert Semplet és Rachel Knoxot a vizsgálatok kivitelezésében nyújtott együttműködésükért.

Szeretném hálámat kifejezni az Orvosi Genetikai Intézetben dolgozó összes kedves kollégámnak az évek során nyújtott kitartó segítségükért.

Végül, de nem utolsó sorban, különös hálával tartozom a családomnak: a szüleimnek és a testvéremnek, akik mindvégig támogattak és bíztattak ezekben az években.

Jelen munka az Európai Unió és Magyarország Kormánya által támogatott, és az Európai Szociális Alap által társfinanszírozott TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 'Nemzeti Kiválóság Program', valamint az alábbiakban felsorolt támogatások révén valósulhatott meg: TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035, TÁMOP-4.2.2/B-10/1/KONV-2010-0012, TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001, TÁMOP-4.2.2.A3 és GINOP-2.3.2-15-2016-00039. Dr. Nagy Nikoletta kutatását az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA) PD104782-2012-2015 támogatta.

NYILATKOZAT

Alulírott Dr. Nagy Nikoletta, mint felelős szerző nyilatkozom arról, hogy Sulák Adrienn PhD hallgató munkája nagymértékben hozzájárult az eredmények létrejöttéhez az alább felsorolt tudományos közlemény kapcsán.

Tripolszki K, Knox R, Parker V, Semple R, Farkas K, **Sulák A**, Horváth E, Széll M, Nagy N. Somatic mosaicism of the *PIK3CA* gene identified in a Hungarian girl with macrodactyly and syndactyly. *Eur J Med Genet* 2016; 59(4):223-226. **IF:1.81**

Tripolszki K, Farkas K, **Sulák A**, Szolnoky G, Duga B, Melegh B, Knox RG, Parker VER, Semple RK, Kemény L, Széll M, Nagy N. Atypical neurofibromatosis type 1 with unilateral limb hypertrophy mimicking overgrowth syndrome. *Clin Exp Dermatol* 2017; doi: 10.1111/ced.13154. [Epub ahead of print] **IF: 1.315**

Szeged, 2017. június 20.

.....
Dr. Nagy Nikoletta