

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

GENOTÍPUS-FENOTÍPUS ÖSSZEFÜGGÉSEK FELTÁRÁSA,
FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATOK ÉS
TERÁPIÁS FEJLESZTÉSEK
MONOGÉNES BŐRBETEGSÉGEKBEN

Dr. Nagy Nikoletta

Szegedi Tudományegyetem

SZTE ÁOK Orvosi Genetikai Intézet

MTA-SZTE Dermatológiai Kutatócsoport

Szeged, 2020

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	6
1.1. A ritka, monogénis bőrbetegségek általános jellemzői.....	6
1.2. A vizsgált ritka monogénis bőrbetegségek bemutatása.....	7
1.2.1. Teleangiectasiával társuló familiáris oropharyngeális daganat szindróma.....	7
1.2.2. Clericuzio típusú poikiloderma	7
1.2.3. Recesszív disztrófiás epidermolízis bulloza	7
1.2.4. Hereditér angioneurotikus ödéma III-as típusa.....	7
1.2.5. Lokalizált kután amyloidosis.....	8
1.2.6. Schöpf-Schulz-Passarge szindróma	8
1.2.7. Brooke-Spiegler szindróma	8
1.2.8. Papillon-Lefèvre szindróma	8
1.2.9. Okulokután albinizmus	9
1.2.10. Pityriasis rubra pilaris	9
2. Célkitűzések.....	9
2.1. Genotípus-fenotípus összefüggések feltárása.....	9
2.1.1. A TAFOCS betegség klinikai tüneteinek leírása, genetikai hátterének vizsgálata	9
2.1.2. A CPN genetikai hátterének vizsgálata, kóroki gén azonosítása	9
2.1.3. RDEB-ben szomatikus mozaicizmus genetikai hátterének vizsgálata	9
2.1.4. HAEIII-ban kóroki mutáció azonosítása és haplotípus vizsgálat.....	10
2.1.5. Az FPLCA genetikai hátterének vizsgálata	10
2.1.6. A <i>WNT10A</i> gén mutációihoz kapcsolt fenotípus spektrum vizsgálata	10
2.1.7. A <i>CYLD</i> gén mutációihoz kapcsolt fenotípus spektrum vizsgálata, haplotípus vizsgálatok és fenotípus-módosító genetikai variánsok azonosítása.....	10
2.1.8. A <i>CTSC</i> gén mutációihoz kapcsolt fenotípus spektrum vizsgálata, haplotípus vizsgálatok és fenotípus-módosító genetikai variánsok azonosítása.....	11
2.1.9. Az OCA1, OCA2 és OCA4 genetikai vizsgálata	11
2.1.10. PRP genetikai hátterének vizsgálata	11
2.2. Funkcionális vizsgálatok végzése.....	11
2.2.1. A TAFOCS betegség patomechanizmusának vizsgálata.....	11
2.2.2. Az FPLCA pathomechanizmusának vizsgálata	12
2.2.3. Az újonnan azonosított <i>CYLD</i> mutáció funkcionális vizsgálata.....	12
2.2.4. Funkcionális vizsgálatok PRP-ben	12
2.2.5. Szabályozó RNS molekulák vizsgálata	12
2.3. Terápiás fejlesztések	12
2.3.1. Allogén fibroblaszt injekciók hatásmechanizmusának vizsgálata	12

3. Betegek és módszerek.....	13
3.1. Betegek.....	13
3.1.1. TAFOCS-ban szenvedő amerikai család.....	13
3.1.2. CPN-ben szenvedő marokkói család.....	13
3.1.3. Az RDEB-ben szenvedő betegek.....	13
3.1.4. HAEIII-ban szenvedő brit család.....	13
3.1.5. FPLCA-ban szenvedő családok bemutatása.....	13
3.1.6. Az SSPS szenvedő brit páciens és SSPS/OODD fenotípusú brit család bemutatása.....	13
3.1.7. BSS-ben és MFT1-ben érintett családok bemutatása.....	14
3.1.8. A PLS-ben és HMS-ben érintett páciensek bemutatása.....	14
3.1.9. Vizsgált OCA páciensek bemutatása.....	14
3.1.10. A vizsgált PRP páciensek bemutatása.....	15
3.1.11. A vizsgált psoriasisban szenvedő páciensek bemutatása.....	15
3.2. Módszerek.....	15
3.2.1. A betegség hátterében álló kóroki gén és kóroki mutáció azonosítása.....	15
3.2.2. Ismert kóroki gén esetén a betegség hátterében álló novum és rekurrens mutációk azonosítása.....	16
3.2.3. Fenotípus-módosító genetikai variánsok azonosítása.....	17
3.2.4. Bőrbíopsziás minták vétele, keratinociták, fibroblasztok izolálása és tenyésztése.....	17
3.2.5. RNS izolálás.....	17
3.2.6. Gén-specifikus csendesítés.....	18
3.2.7. Génexpressziós vizsgálatok.....	18
3.2.8. Immunofluoreszens vizsgálatok.....	18
3.2.9. Immunhisztokémiai vizsgálatok.....	18
3.2.10. Immunprecipitáció és Western blot analízis.....	19
3.2.11. Statisztika és bioinformatikai elemzések.....	19
4. Eredmények.....	20
4.1. Genotípus-fenotípus összefüggések feltárása.....	20
4.1.1. A kután teleangiectasiával társuló familiáris oropharyngeális daganat szindróma (TAFOCS) hátterében az ataxia teleangiectasia és Rad3-kapcsolt (<i>ATR</i>) gén novum mutációját azonosítottuk.....	20
4.1.2. A Clericuzio típusú poikiloderma (CPN) betegség hátterében 16-os kromoszóma nyitott leolvasási keret 57 (<i>C16orf57</i>) gén novum mutációját azonosítottuk.....	20
4.1.3. A recesszív disztrófiás epidermolízis bullozában (RDEB) szenvedő páciens szomatikus mozaicizmusáért a keratinocitákban kialakult a 7-as típusú kollagén gént (<i>COL7A1</i>) gént érintő egyszeri intragenikus kereszteződés a felelős.....	21
4.1.4. A hereditær angioneurotikus ödéma III-as típusa (HAEIII) hátterében recurrens misszensz mutációt azonosítottunk a koagulációs faktor 12 (<i>F12</i>) génen.....	21

4.1.5. Öt, a familiáris lokálizált kután amyloidosisban (FPLCA) szenvedő család esetében két novum és egy rekurrens misszensz mutációt azonosítottunk az onkostatin M receptor (<i>OSMR</i>) génen	22
4.1.6. A WNT család 10A gén (<i>WNT10A</i>) homozigóta nonszensz mutációja Schöpf-Schulz-Passarge szindróma (SSPS), míg compound heterozigóta misszensz és nonszensz mutációi és homozigóta misszensz mutációja odonto-onycho-dermális diszplázia (OODD) kialakulását eredményezi	22
4.1.7. A <i>CYLD</i> génen egy novum misszensz és két rekurrens nonszensz mutációt azonosítottunk, utóbbiak eltérő klinikai variánsok – familiáris cylindromatózis (FC), multiplex familiáris trichoepitheliomatózis (MFT1) és Brooke-Spieger szindróma (BSS) -kialakulását eredményezik ..	22
4.1.8. A cathepsin C (<i>CTSC</i>) génen egy novum deléció és egy rekurrens nonszensz mutációt azonosítottunk, amely utóbbi eltérő klinikai variánsok – Papillon-Lefèvre szindróma (PLS) és Haim-Munk szindróma (HMS) - kialakulását eredményezi	23
4.1.9. Okulokután albinizmusban (OCA) két novum mutációt azonosítottunk a membránhoz kötött transzportfehérje génen (<i>SLC45A2</i>) és 11 rekurrens variánst a tirozináz (<i>TYR</i>), okulokután albinizmus 2 (<i>OCA2</i>) és <i>SLC45A2</i> géneken	24
4.1.10. A vizsgált 19 pityriasis rubra pilarisban (PRP) szenvedő páciensből 8 hordozott olyan kaszpáz felvétel domént tartalmazó fehérje 14 (<i>CARD14</i>) gén variánst, amelyet korábban pikkelysömörben szenvedő páciensekben is detektáltak	25
4.2. Funkcionális vizsgálatok eredményei	25
4.2.1. A TAFOCS szindrómában szenvedő páciensek ATR mutációt hordozó fibroblasztjaiban a p53 mennyisége csökkent az egészséges egyének fibroblasztjainak p53 szintjéhez képest	25
4.2.2. Az FPLCA-ban kialakuló lichenifikáció és pruritus hátterében álló gén expressziós eltérések azonosítása	26
4.2.3. A <i>CYLD</i> gén újonnan azonosított misszensz mutációját (p.His871Gln) hordozó fibroblasztokban a NEMO fehérje fokozott ubikvitináltságot mutatott az egészséges egyének fibroblasztjaiból immunprecipitált NEMO fehérjéhez képest	26
4.2.4. A korábban pikkelysömör kialakulására hajlamosító genetikai tényezőként azonosított <i>CARD14</i> variánsok fokozott NF- κ B aktivitás révén járulnak hozzá a PRP betegség kialakulásához	26
4.2.5. Az interferon α indukált fehérje 6 (G1P3) és fibroblaszt növekedési faktor receptor 2 (FGFR2) fehérjék szabályozó RNS-molekulák potenciális targetjei a bőrben	27
4.3. Terápiás fejlesztések	28
4.3.1. Az allogén fibroblaszt injekciók terápiás mechanizmusának hátterében a HB-EGF indukálta COL7A1 expresszió állhat	28
5. Megbeszélés	29
5.1. Genotípus-fenotípus összefüggések feltárása	29
5.1.1. A TAFOCS betegség - a munkacsoportunk által leírt, új, familiáris daganatszindróma – hátterében az <i>ATR</i> gén novum, heterozigóta, misszensz mutációja áll	29
5.1.2. A CPN betegség hátterében a <i>C16orf57</i> gén egy, az irodalomból eddig nem ismert homozigóta delécióját azonosítottunk.....	29
5.1.3. Az RDEB-ben detektált szomatikus mozaicizmusért a páciens keratinocitáiban kialakult egyszeri intragenikus kereszteződés állhat	30

5.1.4. Az európai HAEIII páciensek ugyanazon misszensz <i>F12</i> mutációt és ugyanazon haplotípust hordozzák, a betegség Európában detektálható eseteiért feltehetően ugyanazon alapító hatás a felelős	30
5.1.5. FPLCA-ban két novum, heterozigóta misszensz mutációt és egy rekurrens misszensz mutációt azonosítottunk az <i>OSMR</i> génen.....	31
5.1.6. A <i>WNT10A</i> gén homozigóta nonszensz mutációja SSPS, míg compound heterozigóta misszensz és nonszensz mutációi és homozigóta misszensz mutációja ODD klinikai variáns kialakulását eredményezi.....	31
5.1.7. A <i>CYLD</i> génen egy novum misszensz és két rekurrens nonszensz mutációt azonosítottunk, illetve igazoltuk, hogy ugyanazon mutáció eltérő klinikai variánsok – FC, MFT1 és BSS - kialakulását eredményezhetik, továbbá potenciális fenotípus módosító genetikai faktorokat azonosítottunk, melyek magyarázhatják a fenotípus diverzitást az ugyanazon mutációt hordozó páciensekben	31
5.1.8. A <i>CTSC</i> génen egy novum deléciót és egy rekurrens nonszensz mutációt azonosítottunk, illetve igazoltuk, hogy ugyanazon mutáció eltérő klinikai variánsok – PLS és HMS - kialakulását eredményezhetik, továbbá potenciális fenotípus módosító genetikai faktorokat azonosítottunk, melyek magyarázhatják a fenotípus diverzitást az ugyanazon mutációt hordozó páciensekben ..	32
5.1.9. OCA-ban két novum mutációt azonosítottunk az <i>SLC45A2</i> génen és 11 rekurrens variánst a <i>TYR</i> , <i>OCA2</i> és <i>SLC45A2</i> géneken	32
5.1.10. CARD14-asszociált papuloszkvamózus eruptióval járó betegségspektrum magába foglalja mind a PRP-t, mind a psoriasist.....	33
5.1.11. A genotípus-fenotípus összefüggések megismerésének jelentősége	33
5.2. Funkcionális vizsgálatok	34
5.2.1. A TAFOCS betegség pathomechanizmusa p53 mediált.....	34
5.2.2. FPLCA-ban azonosítottuk a főbb tünetek, mint a pruritus és a lichenifikáció kialakulásának hátterében álló génexpressziós eltéréseket	34
5.2.3. A <i>CYLD</i> gén novum misszensz mutációja feltehetően a deubikvitációs aktivitás csökkenése révén eredményezi a BSS betegség kialakulását.....	34
5.2.4. CARD14-asszociált papuloszkvamózus eruptióval járó betegségspektrum magába foglalja mind a PRP-t, mind a psoriasist.....	35
5.2.5. A szabályozó RNS-molekulák target fehérjéinek meghatározása bőrben	35
5.2.6. A funkcionális vizsgálatok jelentősége	35
5.3. Terápiás fejlesztések	36
5.3.1. Az RDEB-ben alkalmazott allogén fibroblaszt injekciók hatékonyságának mechanizmusának hátterében a páciens saját C7 termelésének fokozódása állhat, melyet feltehetően az injekciók által kiváltott HB-EGF emelkedés indukál	36
5.3.2. A terápiás fejlesztések jelentősége	37
6. Összefoglalás és saját megállapítások	38
7. Eredmények jövőbeni hasznosíthatósága	42
7.1. A genotípus-fenotípus összefüggések jövőbeni hasznosíthatósága.....	42
7.2. A funkcionális vizsgálatok jövőbeni hasznosíthatósága.....	43

7.3. A terápiás fejlesztések jövőbeni hasznosíthatósága	43
8. Publikációs lista	45
8.1. A doktori értekezés alapját képező 'in extenso' saját közlemények.....	45
8.2. A doktori értekezés témakörében megjelent 'in extenso' saját közlemények	46
8.3. A doktori értekezés témaköréhez nem kapcsolódó 'in extenso' saját közlemények	47
9. Szabadalom	49
10. Köszönetnyilvánítás.....	50

1. Bevezetés

1.1. A ritka, monogénis bőrbetegségek általános jellemzői

Az örökletes bőrbetegségek (genodermatózisos) többsége monogénis megbetegedés, azaz a klasszikus Mendeli szabályok szerint öröklődő kórkép. Ezen betegségek az ún. ritka betegségekhez tartoznak, amelyek előfordulási gyakorisága 1/2000 fő vagy kevesebb. Jelenlegi ismeretek szerint a humán monogénis betegségek számát mintegy 10000-re becsülik, a WHO adatai alapján a monogénis betegségek globális prevalenciája születéskor megközelítőleg 10/1000 fő.

Monogénis betegségek csoportján belül az ismert ritka, bőrgyógyászati monogénis betegségek száma 1991-ben 90, 2007-ben 580 volt, az azóta eltelt időben a lezajlott technológiai fejlődéseknek köszönhetően ez a szám tovább növekedett. Mindezek alapján arra a következtetésre juthatunk, hogy az ismert ritka, bőrgyógyászati monogénis betegségek univerzuma egyre bővül. Valóban így van ez? A következőkben genodermatózisos vizsgálatok kapcsán kapott eredmények révén tájékozódhatunk a genodermatózisos univerzumában.

A genodermatózisos kisebb hányadában a páciensek csak a bőrre lokalizált tüneteket mutatnak. Ezekben a betegségekben, más szervi vagy szöveti érintettség nem alakul ki, ilyen genodermatózis például a Brooke-Spiegler szindróma, melyben a bőr jóindulatú függeléktumori dominálják a klinikai képet. A betegség hátterében álló cylindromatózis gén ugyan számos szervben és szövetben kifejeződik, a bőrtünetek mellett azonban semmilyen más szerv vagy szövet érintettsége nem alakul ki. A genodermatózisos többségében a páciensek heterogén klinikai tüneteket mutatnak és esetükben a bőr mellett más szervek, szervrendszerek, illetve szövetek érintettsége is kialakul. Ez utóbbiakra példa az oculokután albinizmus, melyben a bőrtünetek mellett szemészeti eltérések is kialakulnak, vagy a Papillon-Lefèvre szindróma, melyben a bőrtünetek kialakulását megelőzően jellegzetes fogászati eltérések jelennek meg vagy az odonto-onycho-dermális diszplázia, melyben szintén fogászati eltérések találhatók a bőrtünetek mellett. Vizsgálataink során izolált, illetve több szervi érintettséggel társuló genodermatózisos hátterében is tártunk fel genotípus-fenotípus összefüggéseket, végeztünk funkcionális vizsgálatokat és terápiás fejlesztéseket.

A genodermatózisos a gyakori bőrbetegségekhez képest kevés pácienset érintenek, és meglehetősen heterogének, azonban az értekezésben bemutatott vizsgálatok és eredmények révén igazoljuk, hogy a genodermatózisos diagnosztikája, kutatása és az érintett páciensek számára végzett genetikai tanácsadás végzése rendkívüli jelentőséggel bír.

A genodermatózisos esetében funkcionális vizsgálatokhoz, az érintett páciensek beegyezésével és érintett páciensektől relatív könnyű mintát venni. Az értekezésben bemutatott páciensek esetében is számos esetben történt punch biopszia, majd a molekuláris biológiai vizsgálatok széles skáláját végeztük el, melyek nagymértékben hozzájárultak a vizsgált betegség kialakulási mechanizmusának feltérképezéséhez, illetve jobb megismeréséhez.

Számos genodermatózis esetében áll rendelkezésre állatmodell a vizsgálatok elvégzéséhez, ami szintén nagy segítséget jelent az általános biológiai mechanizmusok tanulmányozásában, illetve következtetések levonásában humán biológiai mechanizmusokra vonatkozóan.

A genodermatózisos esetében a sejt- és génterápiás kísérletek is viszonylag könnyen kivitelezhetők. Az értekezésben a későbbiekben részletesen bemutatásra kerülnek recesszív disztófiás epidermolízis bullozában szenvedő páciensek esetében végzett sejterápiás vizsgálataink, melyek hatékonyan állították helyre a beteg fenotípust. A sejterápia hatékonyságának hátterében álló mechanizmus feltárása kapcsán végzett munkánkból,

melynek célja a sejterápia gyógyszeres kezelésre váltása volt, pedig nemzetközi szabdalom is született.

A ritka monogénes bőrbetegségek közül számos kórkép igen súlyos, akár az érintett páciensek várható élettartamát is csökkentheti, illetve vannak kevésbé súlyosak, amelyek között azonban számos igen stigmatizáló tünetekkel jár az érintettek számára, ezért a preimplantációs genetikai diagnosztika (PGD), illetve a terhesség során végzett anyai és magzati genetikai vizsgálatoknak végzésének igen nagy jelentősége lehet. Ezekre a genetikai vizsgálatokra azonban csak a háttérben álló kóroki eltérés ismeretében kerülhet sor. Vizsgálatink jelentős mértékben hozzájárultak egészséges utódok születéséhez az érintett családokban.

A fentiek nagyon jól tükrözik, hogy miért fontos mind diagnosztikai, mind kutatási szempontokból is a genodermatózisok beható tanulmányozása. Dolgozatomban, a címben is jelölt bontásban – genotípus-fenotípus összefüggések feltárása, funkcionális vizsgálatok, valamint terápiás fejlesztések – mutatom be a témában kapott eredményeket. A következőkben, a vizsgált betegségek kerülnek részletesen bemutatásra.

1.2. A vizsgált ritka monogénes bőrbetegségek bemutatása

1.2.1. Teleangiectásiával társuló familiáris oropharyngeális daganat szindróma

A kután teleangiectásiával társuló familiáris oropharyngeális daganat szindróma (TAFOCS, OMIM 614564), egy autoszómális domináns öröklődésmentet mutató ritka betegség, jellegzetes klinikai tünetei a bőrön kialakuló teleangiectasia, a haj, fog és köröm rendellenességek és a malignus daganat kialakulásának fokozott kockázata, mely leggyakrabban az oropharynx területére lokalizált. Ez a familiáris daganatszindrómák csoportjába tartozó ritka betegség mindeddig nem volt ismert, munkacsoportunk írta le elsőként. A klinikai tünetek részletes dokumentálása mellett a betegség háttérében álló kóroki gén azonosítása, kóroki mutáció azonosítását is munkacsoportunk végezte el először.

1.2.2. Clericuzio típusú poikiloderma

A neutropeniával társuló Clericuzio típusú poikiloderma (CPN, OMIM 604173), a congenitális poikiloderma szindrómák csoportjába tartozó, autoszómális recesszív öröklődésmentet mutató betegség. A CPN leggyakoribb klinikai tünetei a poikiloderma triász mellett – a bőr atrophája, hipo- és hiperpigmentációja és teleangiectásiája – a palmoplantáris keratoderma, a köröm rendellenesség, a rekurrens infekciók és a neutropénia. A CPN-ben érintett kiterjedt családok klinikai tüneteinek részletes leírása szerepel az irodalomban, azonban a CPN kialakulásának genetikai háttere mindeddig nem volt ismert. A betegség háttérében álló kóroki gén azonosítását ugyanabban az évben (2010), két egymástól független munkacsoport végezte el először, munkacsoportunk volt az egyik és egy olasz munkacsoport a másik.

1.2.3. Recesszív disztrófiás epidermolízis bulloza

A recesszív disztrófiás epidermolízis bulloza (RDEB, OMIM 226600) a mechano-bullosus, azaz mechanikai traumát követően vagy látszólag spontán a bőrön és/vagy a nyálkahártyán hólyagképződéssel járó, genodermatózisok csoportjába tartozó betegség. Az RDEB autoszómális recesszív öröklődésmentet mutat és háttérében a kollagén 7-es típus $\alpha 1$ gén (*COL7A1*) mutációit azonosították. A *COL7A1* a dermo-epidermális junctionban (DEJ) elhelyezkedő VII-es típusú kollagént (C7) kódolja.

1.2.4. Herediter angioneurotikus ödéma III-as típusa

A herediter angioneurotikus ödéma (HAE) egy autoszómális domináns öröklődésmentet mutató betegségcsoport, melynek jellegzetessége a kután és a szubkután szövetek rohamokban jelentkező duzzanata, mely ha a garat vagy gége képleteit érinti, akkor a légutak

elzáródása révén akár fatális kimenetelű is lehet. A HAE klasszikus I-es és II-es típusai (HAEI és HAEII, OMIM 106100), melyek a C1 inhibitor kódoló gén (*SERPINC1*) mutációinak a következtében alakulnak ki és C1 inhibitor deficienciával járnak, jól ismertek. A HAEI és HAEII férfiakat és nőket egyaránt érint. A HAE III-as típusa (HAEIII, OMIM 610618), melyben a visszatérően jelentkező angioneurotikus ödéma csak nőket érint és a rohamok kialakulása magas ösztrogén szinttel járó állapotokhoz társul, azonban kevésbé ismert. A HAEIII kialakulásáért a koagulációs faktor 12 (*F12*) gén mutációi a felelősek.

1.2.5. Lokalizált kután amyloidosis

A familiáris lokalizált kután amyloidosis (FPLCA) az extracelluláris térben lerakódott, kóros 'folding' miatt inszolubilisá vált fibrillumok következtében kialakuló heterogén betegségcsoport, mely a bőr viszketésével és lichenifikációjával jár. Az FPLCA 1-es és 2-es klinikai típusai (FPLCA1, OMIM 105250; FPLCA2 OMIM 613955) autoszómális domináns, míg 3-as típusa (FPLCA3, OMIM 617920) autoszómális recesszív öröklődésmentet mutat. Az autoszómális domináns öröklődésű klinikai formák esetében az FPLCA1 hátterében az oncostatin M receptor gén (*OSMR*) mutációi ismertek, míg az FPLCA2 kialakulásában az interleukin 31 receptor A gén (*IL31RA*) mutációi játszanak szerepet. Az autoszómális recesszív öröklődésű FPLCA3 kialakulását a glycoprotein NMB (*GPNMB*) gén mutációival hozták összefüggésbe.

1.2.6. Schöpf-Schulz-Passarge szindróma

A Schöpf-Schulz-Passarge szindróma (SSPS, OMIM 224750) egy autoszómális recesszív öröklődésmentet mutató, az ektodermális diszpláziák csoportjába tartozó ritka, monogénes bőrbetegség, melynek legfontosabb klinikai tünetei a szemhéjakon kialakuló számos, néhány mm-es ciszta, a palmoplantáris keratoderma, a fogak csökkent száma, fokozott izzadás, csökkent szőrzet mennyiség és köröm rendellenesség. Az SSPS kialakulásáért a WNT család 10A (*WNT10A*) gén mutációi a felelősek. A gén egy szignál molekulát kódol, mely számos fejlődési folyamat szabályozásában játszik fontos szerepet. Az SSPS mellett a *WNT10* gén mutációit más, klinikailag átfedő tüneteket mutató ritka, monogénes betegségben, az odonto-onycho-dermális diszpláziában (OODD, OMIM 277980) is azonosították. A számos átfedő klinikai tünet mellett a kórképek klinikai diagnosztizálását segíti a szemhéj ciszták jelenéte, melyet az SSPS jellegzetességének tartanak.

1.2.7. Brooke-Spiegler szindróma

A Brooke-Spiegler szindróma (BSS, OMIM 605041) egy autoszómális domináns öröklésmentet mutató, bőrfüggelék tumorokkal, cylindrómákkal, trichoepitheliómákkal és spiradenómák kialakulásával járó kórkép. A BSS kialakulásáért a cylindromatózis gén (*CYLD*) mutációi a felelősek. A génen eddig mintegy 95 különböző kóroki mutációt azonosítottak. A *CYLD* gén egy deubikvitináz enzimet kódol, amely a nukleáris faktor κ B (NF- κ B) jelátviteli útvonal ismert negatív regulátora. A BSS mellett a *CYLD* gén mutációit más bőrfüggelék tumorok kialakulásával járó kórképekben is leírták, mint a familiáris cylindromatózis (FC, OMIM 132700) és az 1-es típusú multiplex familiáris trichoepitheliomatózis (MFT1, OMIM 601606). Az FC esetében főként cylindrómák, az MFT1 esetében pedig főként trichoepitheliómák dominálják a klinikai tüneteket.

1.2.8. Papillon-Lefèvre szindróma

A Papillon-Lefèvre szindróma (PLS, OMIM 245000) egy autoszómális recesszív öröklődésmentet mutató, tenyéri-talpi fokozott elszarusodással és súlyos periodontitis kialakulásával járó kórkép. A PLS kialakulásáért a cathepsin C gén (*CTSC*) mutációi a felelősek. A génen eddig mintegy 75 különböző kóroki mutációt azonosítottak. A *CTSC* gén egy lizoszómális

exo-cisztein proteinázt kódol, mely a C1 peptidáz családba tartozik és szerin proteinázok zimogén aktiválásában vesz részt. A PLS mellett a *CTSC* gén mutációit a Haim-Munk szindrómában (HMS, OMIM 245010) is azonosították, mely jellegzetes klinikai tünetei a PLS-sel átfedést mutató palmoplantáris keratoderma és periodontitis mellett az ujjak és körmök deformitása, az akrális csontok károsodása és a lábak boltozatainak süllyedése.

1.2.9. Okulokután albinizmus

Az okulokután albinizmus (OCA) egy klinikailag és genetikailag is heterogén betegségcsoport, mely általános jellegzetessége a haj, a bőr és a szem hipopigmentációja. Az izolált OCA formák (OCA 1-7) hátterében mindeddig 6 különböző kóroki gént és a 4q24 lókuszt kóroki szerepét igazolták. A kaukázusiak esetében a tirozináz gén (*TYR*) mutációi következtében kialakuló OCA1 (1A altípus OMIM 203100, 1B altípus OMIM 606952), az okulokután albinizmus 2 gén (*OCA2*) mutációinak tulajdonított *OCA2* (OMIM 203200) és a membránhoz kötött transzportfehérje gén (*SLC45A2*) mutációihoz kapcsolt *OCA4* (OMIM 606574) fordul elő a leggyakrabban.

1.2.10. Pityriasis rubra pilaris

A pityriasis rubra pilaris (PRP) egy ritka, krónikus papulosquamosus bőrbetegség, melynek klinikai tünetei a pikkelysömörre (psoriasis) emlékeztetnek. A PRP jellegzetessége a follikuláris hiperkeratózis és a normál bőrszigeteket magába foglaló, jellegzetesen narancsvörös, hámló dermatitisz. Az esetek többsége sporadikus, azonban mintegy 6,5%-uk esetében található pozitív családi anamnézis (OMIM 173200). Ezen családi halmozódást mutató eseteket elsősorban autoszómális domináns öröklődés jellemzi, és a betegség kialakulásának hátterében a kaszpáz felvétel domént tartalmazó fehérje 14 (*CARD14*) gén mutációit azonosították (OMIM 607211). A *CARD14* variánsokat (polimorfizmusokat és mutációkat is) a PRP mellett még psoriasis kialakulásával is összefüggésbe hozták. A psoriasis és a PRP, a kialakulásukban szerepet játszó genetikai tényezők hasonlósága mellett, a fenotípusukban is nagy hasonlóságot mutatnak.

2. Célkitűzések

2.1. Genotípus-fenotípus összefüggések feltárása

2.1.1. A TAFOCS betegség klinikai tüneteinek leírása, genetikai hátterének vizsgálata

A TAFOCS, egy a familiáris daganatszindrómák csoportjába tartozó ritka betegség mindeddig nem volt ismert, munkacsoportunk a betegség első leírója. A betegséget egy 5 generációs, 24 érintett családtagot tartalmazó amerikai családban figyeltük meg először.

A klinikai tünetek részletes dokumentálása mellett a betegség hátterében álló kóroki gén, valamint a kóroki mutáció azonosítása is volt munkacsoportunk célja.

2.1.2. A CPN genetikai hátterének vizsgálata, kóroki gén azonosítása

Egy marokkói CPN-ben szenvedő család vizsgálata kapcsán - akiknél a klinikai tünetek már korábban publikálásra kerültek, azonban a betegség genetikai háttere mindeddig nem került felderítésre - célul tűztük ki a betegség hátterében álló kóroki gén és kóroki mutáció azonosítását.

2.1.3. RDEB-ben szomatikus mozaicizmus genetikai hátterének vizsgálata

RDEB-ben szenvedő férfibetegünk esetében a bőrgyógyászati szakvizsgálatok során detektáltunk két olyan csecsemőtenyéryn timeri bőrfelületet, amelyek a páciens elmondása alapján, illetve klinikai megfigyeléseink alapján korábban nem mutattak hólyagképződést vagy sebződést sem minor traumára, sem látszólag spontán. Ez a megfigyelés felvette a szomaikus mozaicizmus lehetőségét.

Vizsgálataink során célul tűztük ki az RDEB-ben szenvedő férfibetegnél a szomatikus mozaicizmus vizsgálatát és az esetleges háttérben álló genetikai korrekció mechanizmusának felderítését.

2.1.4. HAEIII-ban kóroki mutáció azonosítása és haplotípus vizsgálat

A HAEIII egy olyan ritka formája a HAE-nek, mely csak nőket érinti és a rohamok kialakulása magas ösztrogén szinttel járó állapotokhoz társul. Vizsgálataink során célul tűztük ki egy HAEIII-ban szenvedő család genetikai vizsgálatát, a háttérben álló *F12* gén mutáció azonosítását.

A vizsgált család esetében az azonosított mutáció egy, az irodalomból már jól ismert rekurrens mutáció volt, ezért haplotípus vizsgálatot végeztünk, annak igazolására, hogy az európai HAEIII páciensek - akik ugyanezen mutációt hordozzák - egy azon alapító hatás eredményeként vagy pedig egymástól független mutációs események eredményeként hordozzák ugyanazon mutációt.

2.1.5. Az FPLCA genetikai háttérének vizsgálata

Öt autoszómális domináns öröklődést mutató FPLCA-ban szenvedő család genetikai vizsgálatát végeztük el. Elsődleges célkitűzésünk volt az *OSMR* és az *IL31RA* gének mutáció szűrése, az azonosított mutációk vizsgálata, genotípus-fenotípus összefüggések feltárása.

2.1.6. A *WNT10A* gén mutációihoz kapcsolt fenotípus spektrum vizsgálata

Egy angliai SSPS-ben szenvedő páciens és egy olyan, az előbb említett pácienssel nem rokon, angol család genetikai vizsgálatát végeztük el, amelyben a családon belül egyes tünetes családtagok SSPS-nek, mások pedig OODD-nek megfelelő klinikai tüneteket mutatnak. Elsődleges célkitűzésünk volt a *WNT10A* gén mutáció azonosítása és az azonosított mutációk vizsgálata, genotípus-fenotípus összefüggések feltárása.

2.1.7. A *CYLD* gén mutációihoz kapcsolt fenotípus spektrum vizsgálata, haplotípus vizsgálatok és fenotípus-módosító genetikai variánsok azonosítása

Egy szegedi BSS-ben szenvedő család, egy Szekszárd környéki BBS-ben érintett család és egy spanyol MFT1-ben szenvedő család genetikai vizsgálatát végeztük el. Elsődleges célkitűzésünk volt a *CYLD* gén mutáció szűrése a *CYLD* gén mutációs spektrumának feltérképezése céljából, továbbá genotípus-fenotípus összefüggések feltárása.

A Szekszárd környéki BBS-ben szenvedő és a spanyol MFT1-gyel diagnosztizált családok esetében az irodalomból már jól ismert rekurrens mutációkat azonosítottunk.

A Szekszárd környéki BBS-ben szenvedő család által hordozott nonszensz mutációt egy angliai BSS család érintett tagjai is hordozzák. Haplotípus vizsgálatot végeztünk annak igazolására, hogy az angol és magyar BSS páciensek, akik ugyanezen mutációt hordozzák, egy azon alapító hatás eredményeként vagy pedig egymástól független mutációs események eredményeként hordozzák ugyanazon mutációt. Vizsgálataink további érdekessége, hogy ugyanazon kóroki mutáció hordozása ellenére, az angliai és magyar páciensek klinikai tünetek között jelentős különbségek mutatkoztak a tünetek súlyosságát és diverzitását illetően.

A spanyol MFT1-ben szenvedő család esetében egy olyan nonszensz mutációt azonosítottunk a *CYLD* génen, melyet korábban már BBS-ben szenvedő osztrák páciensben és FC-vel diagnosztizált holland családban is detektáltak. Haplotípus vizsgálatot végeztünk annak igazolására, hogy a spanyol, a holland és az osztrák páciensek, akik ugyanezen mutációt hordozzák, egy azon alapító hatás eredményeként vagy pedig egymástól független mutációs események eredményeként hordozzák ugyanazon mutációt. Vizsgálataink további érdekessége, hogy ugyanazon kóroki mutáció hordozása ellenére, a spanyol beteg MFT1-ben, a holland beteg FC-ben az osztrák páciens pedig BSS-ben szenved.

A Szekszárd környéki BBS-ben szenvedő család által hordozott nonszensz mutációt egy angliai BSS család érintett tagjai is hordozzák, azonban ugyanazon kóroki mutáció hordozása ellenére, az angliai és magyar páciensek klinikai tünetek között jelentős különbségek mutatkoztak a tünetek súlyosságát és diverzitását illetően. További célkitűzésünk volt fenotípus-módosító genetikai variánsok azonosítása teljes exom szekvenálással (WES).

2.1.8. A *CTSC* gén mutációihoz kapcsolt fenotípus spektrum vizsgálata, haplotípus vizsgálatok és fenotípus-módosító genetikai variánsok azonosítása

Egy PLS-ben szenvedő szegedi család, egy PLS-sel diagnosztizált kaposvári beteg és egy HMS-ben érintett kaposvári páciens genetikai vizsgálatát végeztük el. Elsődleges célkitűzésünk volt a *CTSC* gén mutáció szűrése, az azonosított mutációk vizsgálata, genotípus-fenotípus összefüggések feltárása. A PLS-ben szenvedő szegedi család esetében egy az irodalomból még nem ismert, 7 bázist érintő homozigóta deléciót azonosítottunk a *CTSC* génen. A PLS-ben és HMS-ben szenvedő kaposvári páciensekben az elvégzett genetikai vizsgálatok ugyanazon homozigóta nonszensz mutációt detektálták.

Mivel a PLS-ben és HMS-ben szenvedő kaposvári páciensekben ugyanazon homozigóta nonszensz mutációt detektáltuk, haplotípus vizsgálatot végeztünk annak igazolására, hogy a két páciens ugyanazon mutációt egy azon alapító hatás eredményeként vagy pedig egymástól független mutációs események eredményeként hordozzák. Vizsgálataink további érdekessége, hogy ugyanazon kóroki mutáció hordozása ellenére az egyik páciens PLS-ben, a másik páciens HMS-ben szenved.

Mivel a PLS-ben és HMS-ben szenvedő kaposvári páciensekben ugyanazon homozigóta nonszensz mutációt detektáltuk, további célkitűzésünk volt fenotípus-módosító genetikai variánsok azonosítása WES-sel.

2.1.9. Az *OCA1*, *OCA2* és *OCA4* genetikai vizsgálata

Vizsgálatainkba 13 olyan magyar OCA páciens került bevonásra, akik mindegyike hipopigmentált bőrrel, szinte hófehér hipopigmentált hajjal és kék szemmel rendelkeztek. Mivel a kaukázusiak között az *OCA1*, *OCA2* és *OCA4* izolált formák fordulnak elő a leggyakrabban, elsődleges célkitűzésünk volt a *TYR*, *OCA2* és *SCL45A2* gének mutáció szűrése, az azonosított mutációk vizsgálata, genotípus-fenotípus összefüggések feltárása.

2.1.10. PRP genetikai hátterének vizsgálata

Egy PRP-ben szenvedő magyar nőbeteg vizsgálatát végeztük el, akinél ugyan másik PRP-vel diagnosztizált beteg nincs a családban, de lánya és unokája psoriasis miatt rendszeres bőrgyógyászati kezelés alatt áll. Ennél a páciensnél elsődleges célkitűzésünk a *CARD14* gén mutáció szűrése, genotípus-fenotípus összefüggések feltárása és funkcionális vizsgálatok végzése volt. A vizsgált nőbeteg mellett további 18 PRP-ben szenvedő magyar páciens esetében is elvégeztük a *CARD14* gén mutáció szűrését, a *CARD14* gén mutációs spektrumának bővítése és genotípus-fenotípus összefüggések feltárása céljából.

2.2. Funkcionális vizsgálatok végzése

2.2.1. A TAFOCS betegség patomechanizmusának vizsgálata

A TAFOCS, egy a familiáris daganatszindrómák csoportjába tartozó ritka betegség, melynek munkacsoportunk az első leírója. A háttérben álló kóroki mutáció azonosítását követően további célkitűzésünk volt funkcionális vizsgálatok végzése: a kóroki gén által kódolt fehérjének és interakciós partnereinek expresszióját hasonlítottuk össze az érintett páciensektől és egészséges egyénektől vett bőrbioptziás mintákból izolált fibroblasztokban, a betegség kialakulási mechanizmusának megismerése céljából.

2.2.2. Az FPLCA pathomechanizmusának vizsgálata

Habár ma már ismert, hogy az FPLCA genetikai háttere heterogén és a háttérben álló kóroki gének egy része is azonosításra került, a betegség kialakulásának pathomechanizmusa mindeddig kevésbé tisztázott. További célkitűzésünk volt az FPLCA pathomechanizmusának feltárása lézionális és egészséges bőrbioptis minták teljes transzkriptom mintázatának összehasonlítása révén.

2.2.3. Az újonnan azonosított *CYLD* mutáció funkcionális vizsgálata

A BSS-ben szenvedő szegedi család esetében egy, az irodalomból még nem ismert, novum, heterozigóta misszensz mutációt azonosítottunk a *CYLD* génen. Célul tűztük ki funkcionális vizsgálatok végzését, melyekkel igazolható, hogy ezen újonnan azonosított mutáció valóban befolyásolja a *CYLD* enzim deubikvitináz aktivitását és ezzel hozzájárulhat a BSS betegség tüneteinek kialakulásához a vizsgált BSS-ben szenvedő szegedi család érintett tagjaiban.

2.2.4. Funkcionális vizsgálatok PRP-ben

Az azonosított variánsok kapcsán funkcionális vizsgálatokat végeztünk. Annak tisztázására, hogy a *CARD14* gén detektált mutációk és polimorfizmusok hozzá járulhatnak-e a PRP vagy pikkelysömör kialakulásához az NF- κ B jelátviteli útvonal aktivitását vizsgáltuk meg. Továbbá célul tűztük ki annak tisztázását, hogy a *CARD14* variánsok milyen szerepet játszanak a PRP-psoriasis fenotípus spektrumában. Célul tűztük ki annak tisztázását, hogy a *CARD14* variánsok milyen szerepet játszanak a PRP és/vagy a pikkelysömör kialakulásában, illetve, hogy kifejezetten a PRP kialakulásáért felelős specifikus genetikai variánsok-e vagy esetleg inkább a krónikus gyulladás indikátorai.

2.2.5. Szabályozó RNS molekulák vizsgálata

A génexpresszió szabályozásában a nem transzlálódó RNS-molekulák szerepe egyre jobban feltérképezett. Azonban a téma komplexitását jól mutatja, hogy egy-egy ilyen szabályozó molekula több száz különböző fehérje kifejeződését befolyásolhatja, illetve egy-egy fehérje kifejeződése is számos RNS-molekula szabályozó hatása alatt állhat. Folyamatosan zajlik annak feltérképezése, hogy az egészséges bőrben, illetve különböző bőrbetegségekből milyen szabályozó RNS-molekulának van jelentősége. Vizsgálataink során célul tűztük ki a bőrben azonosított szabályozó RNS-molekulák esetében azok target fehérjeinek azonosítását, lehetséges működési mechanizmusuk tisztázását.

2.3. Terápiás fejlesztések

2.3.1. Allogén fibroblaszt injekciók hatásmechanizmusának vizsgálata

Az RDEB-ben korábbi klinikai megfigyelések igazolták, hogy az intradermális allogén fibroblaszt injekciók az injektált területen a bőr fragilitását csökkentik, és - ugyan időszakosan, és részlegesen - de jelentősen javítják, illetve helyreállítják a C7 mennyiségét a DEJ-ben.

Célkitűzésünk volt annak vizsgálata, hogy az intradermális allogén fibroblaszt injekciókat követően a C7 mennyiségének emelkedését a DEJ-ben az injektált fibroblaszt sejtekből származó C7 vagy az RDEB páciensek saját keratinocitái és/vagy fibroblasztjai által termelt C7 termelésének emelkedése eredményezi-e, valamint hogy a C7 mennyiség időszakos javulása milyen időtartamot foglal magába. Vizsgáltuk azt is, hogy az alkalmazott allogén fibroblaszt injekciók kiválthatóak-e valamilyen gyógyszeres kezeléssel, ami a sejtekhez hasonlóan szintén javítja a C7 mennyiségét a DEJ-ben.

3. Betegek és módszerek

3.1. Betegek

3.1.1. TAFOCS-ban szenvedő amerikai család

Vizsgálatainkat egy TAFOCS-ban érintett, 5 generációs, amerikai (Indiana állam) családban végeztük el. A betegség két fő klinikai tünetének, a teleangiectasiának és az oropharyngeális daganat kialakulásának eloszlását a családfa szemlélteti. Az érintett családban összesen 24 érintett családtag van, akik a 2., 3., 4. és 5. generációkban helyezkednek el. Genetikai vizsgálatainkat 7 tünetes és 5 tünetmentes családtagon végeztük el.

3.1.2. CPN-ben szenvedő marokkói család

Vizsgálatainkat egy CPN-ben érintett, összesen 4 generációs, a 3. generációban rokonházasságot tartalmazó marokkói családban végeztük el. Az érintett családban összesen 3 érintett családtag van a 4. generációban. Az érintett páciensek klinikai tünetei a betegség típusos tüneteit mutatták: poikiloderma, palmoplantáris keratoderma, köröm rendellenességek, rekurrens infekciók és neutropénia. Genetikai vizsgálatainkat a 3. generáció mindkét tagján és a 4. generáció négy tagján végeztük el.

3.1.3. Az RDEB-ben szenvedő betegek

3.1.3.1. A szöveti mozaikosságot mutató brit páciens vizsgálata

A RDEB-ben szenvedő brit férfibeteg hosszú ideje észlelt két bőrterületet a bal csuklón és a jobb lábszáron, melyek nem vagy csak nagyon ritkán mutattak hólyagképződést vagy kisebesedést. Ezen bőrterületek esetében felmerült a szöveti mozaikosság lehetősége. Vizsgálataink során a két kevésbé fragilis bőrterületből és tünetes környezetükből vettünk bőrbioopsziás mintákat a szövettani és genetikai vizsgálatok elvégzéséhez.

3.1.3.2. A brit páciens kezelése allogén fibroblaszt injekcióval

Az allogén fibroblaszt injekciós kezelés hatásainak vizsgálata céljából egy RDEB-ben érintett brit férfibeteg került bevonásra. A páciens esetében a jobb vállon lévő csecsemőtenyéryn, alsó pólusánál hámfosztott terület allogén fibroblaszt injekciós kezelését végeztük el.

3.1.4. HAEIII-ban szenvedő brit család

Vizsgálatainkat egy HAEIII-ban érintett, összesen 3 generációs brit családban végeztük el. Az érintett családban összesen 3 érintett családtag van, egy-egy angioneurotikus ödémás rohamokat mutató családtag mindhárom generációban. Genetikai vizsgálatainkat a 1. generáció 1-es tagja kivételével minden családtagon elvégeztük.

3.1.5. FPLCA-ban szenvedő családok bemutatása

Öt autoszómális domináns öröklődést mutató, FPLCA-ban szenvedő család genetikai vizsgálatát végeztük el. Az öt vizsgált család között két holland (Család 1. and 2.), két brit (Család 3. és 4.) és egy dél-afrikai (Család 5.) család volt, a vizsgált páciensek klinikai tünetei a betegség típusos megjelenését mutatták: pruritus és lichenifikáció.

3.1.6. Az SSPS szenvedő brit páciens és SSPS/OODD fenotípusú brit család bemutatása

3.1.6.1. Az SSPS-ben szenvedő brit páciens

Egy SSPS-ben szenvedő brit páciens került bevonásra, akinek elmondása szerint 74 éves bátyja és már elhunyt édesapja is mutatta a betegség jellegzetes klinikai tüneteit. Más tünetes családtagot a klinikai vizsgálat során nem említett.

3.1.6.2. Az SSPS/OODD fenotípusú brit család bemutatása

Vizsgálatainkba egy 4 generációs brit családot is bevontunk, akiknél 7 érintett családtag genetikai vizsgálata történt meg, akik a 2., 3. és a 4. generációban helyezkednek el a családfán. A vizsgált családban az érintett családtagok diverz ektodermális eltéréseket mutatnak, melyek néhány esetben SSPS-t, míg más családtagoknál OODD fennállását valószínűsítik.

3.1.7. BSS-ben és MFT1-ben érintett családok bemutatása

3.1.7.1. A BSS-ben érintett családok bemutatása

Egy szegedi BSS-ben szenvedő család genetikai vizsgálatát végeztük el. A családnak két tünetes családtagja van (apa és lánya) az 1. és 2. generációkban.

Vizsgálatainkba egy 6 generációs, 19 érintett családtagot tartalmazó Szekszárd környéki BSS-ben érintett család is bevonásra került. A család több mint 50 éve áll bőrgyógyászati gondozás alatt, de a betegség hátterében álló kóroki mutáció azonosítására vizsgálataink révén került sor. A Szekszárd környéki BSS család tünetei súlyosabbak, mint a szegedi BSS család érintett tagjaié. Vizsgálatainkba egy 5 generációs, 8 érintett családtagot tartalmazó BSS-ben szenvedő észak-angliai család is bevonásra került.

3.1.7.2. Az MFT1-ben szenvedő család bemutatása

Vizsgálatainkba egy 3 generációs 2 érintett családtagot tartalmazó MFT1-ben szenvedő spanyol család is bevonásra került.

Haplotípus vizsgálatainkhoz DNS mintákat kaptunk egy FC-ben szenvedő holland család tünetes és tünetmentes tagjaitól, valamint egy BSS-ben érintett osztrák páciens részéről, a kezelőorvosaikkal történt kapcsolatfelvételt követően.

3.1.8. A PLS-ben és HMS-ben érintett páciensek bemutatása

3.1.8.1. A PLS-ben érintett páciensek bemutatása

Egy PLS-ben szenvedő szegedi család vizsgálatát végeztük el, akiknél a szülők klinikailag tünetmentesek, három lánygyermekük közül kettő a betegség tüneteit mutatja.

A PLS-ben érintett szegedi család mellett egy PLS-ben szenvedő kaposvári férfit is bevonásra került vizsgálatainkba. A 25 éves páciensnek a szülei klinikailag tünetmentesek, testvére vagy gyermeke nincs. Más PLS-ben érintett rokonról nincs tudomása.

3.1.8.1. A HMS-ben szenvedő beteg bemutatása

Vizsgálatainkba egy további kaposvári, HMS-sel diagnosztizált 39 éves nőbeteg is bevonásra került, aki szüleit nem ismeri, nevelőotthonban nőtt fel. Gyermeke nincs, a betegségben érintett rokonról nincs tudomása.

3.1.9. Vizsgált OCA páciensek bemutatása

Egy kaposvári leány testvérpár jelentkezett OCA tünetekkel, az idősebb testvér 31, a fiatalabb 28 éves volt a vizsgálatba történt bevonásukkor. Az idősebb testvérnek ismert volt Crohn betegsége és csökkent pajzsmirigyműködése.

A fiatalabb testvér esetében az OCA mellett egyéb belgyógyászati betegség nem volt a vizsgálatkor ismert. A testvérpár klinikai tünetei a hypopigmentált bőr, hófehér haj és kék irisz jellemezte, fotódokumentáció készítésébe nem egyeztek bele. Szülei klinikailag tünetmentesek. További OCA-ban szenvedő rokonról nem volt tudomásuk.

Vizsgálatainkba további 11, szintén közel azonos klinikai tüneteket mutató OCA páciens is bevonásra került. A klinikai tünetek alapján az OCA altípusba történő besorolás nem volt lehetséges, az OCA1, OCA2 és OCA4 variánsok fennállása volt valószínűsíthető.

3.1.10. A vizsgált PRP páciensek bemutatása

Összesen 19 PRP-ben szenvedő magyar páciens esetében elvégeztük a *CARD14* gén mutáció szűrését, a *CARD14* gén mutációs spektrumának bővítése és genotípus-fenotípus összefüggések feltárása céljából.

3.1.11. A vizsgált psoriasisban szenvedő páciensek bemutatása

A vizsgálatba bevont psoriasisban szenvedő páciensektől (n=6) előzetes tájékoztatás és írásbeli beleegyezés után 6 mm-es bőrbíopsziás minta vételezés történt tünetes és tünetmentes bőrterületekről. Minden, a vizsgálatba bevont páciensnek plakk típusú psoriasis van, a tünetes mintavételezés esetében a minta régóta fennálló plakkból, a plakk centrális részéről történt. A mintavétel előtt a páciensek nem kaptak pikkelysömör elleni kezelést. A tünetmentes mintavételezés a gluteális területéről történt. Egészséges kontroll egyének (n=6) plasztikai beavatkozásra érkező páciensek közül kerültek bevonásra, ahol a bőrbíopsziás minta vételezése a plasztikai beavatkozás során eltávolított bőrterületből történt.

3.2. Módszerek

3.2.1. A betegség hátterében álló kóroki gén és kóroki mutáció azonosítása

A TAFOCS, egy a familiáris daganatszindrómák csoportjába tartozó ritka betegség mindaddig nem volt ismert, munkacsoportunk a betegség első leírója. A betegséget egy 5 generációs, 24 érintett családtagot tartalmazó amerikai családban figyeltük meg először. A klinikai tünetek részletes dokumentálása mellett a betegség hátterében álló kóroki gén, valamint a kóroki mutáció azonosítását is munkacsoportunk végezte el először. 26 családtag vizsgálatát végeztük el (13 tünetes és 13 tünetmentes családtag került bevonásra). A vizsgált egyének esetében a teljes genomot lefedően polimorfizmusok kerültek genotipizálásra a Human Mapping 10K 2.0 array (Affymetrix) felhasználásával. A kapott eredményekből az Alohomora szoftverrel generáltunk a kapcsoltsági vizsgálatához alkalmazott Merlin programhoz megfelelő adatokat. Autoszómális domináns öröklődést és teljes penetranciát feltételezve parametrikus kapcsoltsági vizsgálat történt. A vizsgálati eredmények által feltárt régió szűkítésére további mikroszatellita markerek genotipizálását végeztük el. Az így kapott márcsak mintegy 90 különböző gént tartalmazó régió esetében a potenciális kóroki gének körének szűkítése a róluk közölt korábbi tudományos publikációkban leírt genotípus-fenotípus összefüggések alapján történt meg. Így került 30 lehetséges kóroki gén kiválasztásra, melyek esetében direkt szekvenálással történt a betegség hátterében álló kóroki mutáció azonosítása.

Egy CPN-ben szenvedő marokkói család vizsgálata kapcsán - akiknél a klinikai tünetek már korábban publikálásra kerültek, azonban a betegség genetikai háttere mindaddig nem került felderítésre - célul tűztük ki a betegség hátterében álló kóroki gén és kóroki mutáció azonosítását. A CPN klinikai tünetei részletesen dokumentáltak az irodalomban, azonban a betegség hátterében álló kóroki gén és kóroki mutáció azonosítását is munkacsoportunk végezte el először, egy munkacsoportunktól független olasz munkacsoporttal egyidőben (2010). Hat családtag vizsgálatát végeztük el (két tünetmentes szülő, 3 tünetes gyermeke és egy tünetmentes gyermeke került bevonásra). A vizsgált egyének esetében a teljes genomot lefedően polimorfizmusok kerültek genotipizálásra a Human Mapping 10K 2.0 array (Affymetrix) felhasználásával. A kapott eredményekből az Alohomora szoftverrel generáltunk a kapcsoltsági vizsgálatához alkalmazott Merlin programhoz megfelelő adatokat. Autoszómális recesszív öröklődést és teljes penetranciát feltételezve parametrikus kapcsoltsági vizsgálat történt. A vizsgálati eredmények által feltárt hat régió szűkítésére a korábbi irodalmi adatokban szereplő kapcsoltsági vizsgálati eredmények felhasználásával végeztük el. Így került

kiválasztásra a lehetséges kóroki gén, mely esetében direkt szekvenálással történt a betegség háttérében álló kóroki mutáció azonosítása.

3.2.2. Ismert kóroki gén esetén a betegség háttérében álló novum és rekurrens mutációk azonosítása

A BSS-ben, FC-ben és MFT1-ben szenvedő páciensek esetében a háttérben álló *CYLD* gén, a PLS-ben és HMS-ben érintett páciensek esetében a *CTSC* gén, az izolált OCA formákban szenvedők esetében a *TYR*, *OCA2* és *SLC45A2* gének, az SSPS és OODD tüneteit mutató betegek esetében a *WNT10A*, a HAEIII páciensek esetében az *F12* gén, az FPLCA-ban szenvedő családok esetében az *OSMR* és *IL31RA* gének, RDEB-ben szenvedő páciensek esetében a *COL7A1* gén és a PRP-ben szenvedő páciensek esetében a *CARD14* gén mutáció szűrését végeztük el. Az ismertetett esetek egyrésze elsődlegesen diagnosztikus célú megkeresés révén került a látóterünkbe. A kutatási célú vizsgálatokat (funkcionális vizsgálatok és terápiás fejlesztések) etikai engedélyeztetést követően kezdtük meg. A genetikai vizsgálatok elvégzéséhez a vizsgált páciensektől és egészséges egyénektől genetikai tanácsadást követően adott írásbeli beleegyezést követően perifériás vérmintát vettünk. A teljes vérből genomi DNS izolálást végeztünk a QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) segítségével. Az izolálás során proteináz K enzimmal történő emésztést követően alkoholos mosásokat végeztünk a protokollnak megfelelően, majd a gDNS-t 100 µl desztillált vízben vettük fel.

A polimeráz láncreakcióhoz (PCR) templátként a genomi DNS-ből 3 µl használtunk fel reakciókként. Ezen kívül a reakció elegy tartalmazott 7 µl Dream Taq Green PCR Master Mix-et (Fermentas), 3 µl desztillált vizet és 2 µl-t a megfelelő primerpárokból. A primereket az UCSC Genome Browser (www.genome.ucsc.edu) és a Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) interneten elérhető programok segítségével terveztük. A PCR amplifikálásokat MyCycler PCR géppel (BioRad) végeztük a következők szerint. Az 1. lépés: 10 perc 95°C-on, 2. lépés: 30 másodperc 95°C-on (denaturálás), 3. lépés: 30 másodperc 59°C-on (annealing), 4. lépés: 45 másodperc 72°C-on (szintézis), 5. lépés: 10 másodperc 72°C-on és 6. lépés: 4°C fokon tartása a mintáknak. A 2., 3. és 4. lépéseket 40 alkalommal ismételtük meg. Az annealing hőmérséklet és a ciklusok száma az adott primerpár függvénye volt, a szintézis reakció idejét pedig az amplifikált termék várható hossza határozta meg. A PCR reakciók során a kódoló régiók és az azokkal határos intronális régiók felszaporítását végeztük el.

A PCR termékeket 2%-os agaróz gélen (SeaKem LE agaróz, Lonza) 2,5 µl GelRed (Biotium) jelenlétében, TBE puffert (Lonza) használva futtattuk meg. A GelRed-del festett géleket egy BioRad Molecular Imager® GelDoc™ XR gél dokumentációs rendszert használva a QuantiOne szoftver segítségével analizáltuk.

A szekvenálások a PCR reakció termékekből történtek megfelelő tisztítás után, Big Dye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems) felhasználásával ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) szekvenáló platformmal. A szekvenálási eredmények kiértékelése az Ensemble Genome Browser (<https://www.ensembl.org/>), HGMD (<http://hgmd.cf.ac.uk>), ExAC (<http://exac.broadinstitute.org>) és dbSNP (<http://ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) adatbázisok felhasználásával végeztük el. A kapott genetikai variánsok kóroki szerepének vizsgálata *in silico* pathogenitás predikciós szoftverekkel történt, úgy mint SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>), Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) és MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>).

Az *F12*, *CTSC*, *CARD14* és *CYLD* gének esetében az irodalomból már ismert, rekurrens mutációkat is azonosítottunk. Ezekben az esetekben az irodalomban a mutációt publikáló munkacsoporttal felvettük a kapcsolatot, DNS mintákat kértünk és további haplotípus vizsgálatokat végeztük annak vizsgálatára, hogy az adott mutáció a földrajzilag távoli

betegekben egy ugyanazon alapító hatás eredményeként alakult-e ki. A haplotípus analízis elvégzéséhez az azonosított mutációtól 5' és 3' irányban elhelyezkedő polimorfizmusokat vizsgáltuk. Az SNP-k genotipizálását direkt szekvenálással végeztük el. A kapott genotípus eredmények alapján alakítottuk ki a haplotípusokat, melyeket a vizsgált egyének esetében összehasonlítottunk.

3.2.3. Fenotípus-módosító genetikai variánsok azonosítása

Azon pácienseink esetében, akiknél a genetikai vizsgálatok során ugyanazon kóroki mutáció hordozása igazolódott, de a klinikai tünetek jelentős eltéréseket mutattak a tünetek súlyosságát és diverzitását illetően fenotípus-módosító genetikai variánsok azonosítását végeztük el teljes exom szekvenálással (WES). A WES vizsgálatokat az UD-GenoMed Kft. (Debrecen) végezte térítéses szolgáltatás keretében. A vizsgált DNS minták minősége agaróz gélelektroforézissel került értékelésre. A könyvtárszerkesztéshez 4µg 100ng/µl koncentrációjú DNS-minták kerültek felhasználásra. Az összes humán exonikus régió dúsítására az Agilent folyékony chip-rögzítő rendszere került alkalmazásra. Ezután Illumina platformon újgenerációs szekvenálás történt. Az Agilent SureSelect Human All Exon V6 kit alkalmazásával történt a könyvtárkészítés és a "capture" típusú vizsgálatok. Ezt követően az Agilent 2100 rendszert használtuk a könyvtár inzert méreteinek ellenőrzésére. Az Illumina platformon a szekvenálás a gyártó által előírt módon történt. Nagy teljesítményű paired-end szekvenálás végeztünk (paired-end 150 bp, PE150). A WES befejezése után bioinformatikai elemzést végeztünk, amely magában foglalta az adatok minőségének értékelését, az SNP-k detektálását és a teljes genom asszociációs vizsgálatokat. A szekvenálási adatok minőségellenőrzési követelményei a következők voltak: az egyes bázispozíciók szekvenálási hibaaránya kevesebb, mint 1% volt, az átlagos Q20 arány nagyobb, mint 90%, az átlagos Q30 arány nagyobb, mint 80%, a szekvenálás 95% -os vagy annál nagyobb illesztési rátát ért el és a bázis leolvasási mélysége egy pozícióban elérte a 10x vagy annál nagyobb értéket. Az SNP tesztet az alábbiak szerint végeztük: a jó minőségű szekvenciákat a humán referencia genomhoz (GRCh37/hg19) hasonlítottuk, majd az észlelt variációkat elemeztük. A kapott genetikai variánsok kóroki szerepének vizsgálata *in silico* pathogenitás predikciós szoftverekkel történt, amelyek a következők voltak: SIFT, Polyphen2 és MutationTaster.

3.2.4. Bőrbíopsziás minták vétele, keratinociták, fibroblasztok izolálása és tenyésztése

A vizsgált bőrminták vételezése a páciens írásbeli beleegyezését, a terület fertőtlenítését és lidocainnal történő infiltrálását követően 6 mm-es punch bíopsziás korongokkal történt. A bőrmintát 2% antibiotikum/antimikotikum tartalmú 0.9% fiziológiás sóoldatban áztattuk 30 percig szobahőmérsékleten, majd Dispase oldatba helyeztük és egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk. Ezt követően a dermiszt az epidermisztől elválasztottuk. Az epidermiszből hámsejteket izoláltunk, a dermiszből fibroblasztokat. Az epidermiszre 2-3 ml tripszint helyeztünk és 5 percig 37°C-on inkubáltuk. A dermiszre kollagenáz, hialuronidáz és dezoxiribonukleáz tartalmú emésztő enzim mixet helyeztünk és 2 órán át inkubáltuk 37°C-on. Az inkubációs idő letelte után a sejtlizátumokat steril szűrőn átszűrtük. A sejteket megszámloltuk, centrifugáltuk (10 perc, 4°C, 1150 rpm) és a felülúszót leöntve a megfelelő tápoldattal szuszpendáltuk, majd sejtenyészítő flasksba szétosztottuk őket. A sejtenyészítő flasksokat 37°C-os sejtenyészítő termosztátokba helyeztük.

3.2.5. RNS izolálás

Az RNS izoláláshoz a sejteket 500µl Trizolban vettük fel, pár percet szobahőmérsékleten inkubáltuk, ezt követően 100µl kloroformot adtunk a mintákhoz, alaposan összeráztuk, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 13 000 rpm 20 percig, 4°C-on centrifugáltuk. A

felső vizes fázist Eppendorf csőbe mértük. A mintákhoz 250µl izopropanolt adtunk, összeforgattuk, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A mintákat 13 000 rpm 20 percig, 4°C-on centrifugáltuk. A felülúszót leszívtuk, a cső alján lévő pellet-et 750µl 75% etanollal mostuk. Vortexeltük, amíg fel nem vált a pellet, majd maximális fordulaton 6 percig centrifugáltuk 4°C-on. A felülúszót leszívtuk, a cső alján lévő pelletet szobahőmérsékleten szárítottuk kb. 15-20 percig. A pellet méretétől függően 10-20µl nukleáz mentes vízben vortexeltük, míg a pellet feloldódott, majd 10 percig 55°C-on inkubáltuk. Az RNS mintákat felhasználásig -80°C-on tároltuk.

3.2.6. Gén-specifikus csendesítés

A HeLa sejtekben a *PRINS* gén csendesítése vektor-alapú RNS interferencia módszerrel, kiméra konstruktor alkalmazásával történt a pSilencer hygro alkalmazási javaslatai alapján (Ambion).

3.2.7. Génexpressziós vizsgálatok

Az RDEB-ben korábbi klinikai megfigyelések igazolták, hogy az intradermális allogén fibroblaszt injekciók az injektált területen a bőr fragilitását csökkentik, és időszakosan részlegesen helyreállítják a C7 mennyiségét a DEJ-ben. Annak a mechanizmusnak a feltárására, amivel az allogén fibroblasztok hozzájárulnak a C7 mennyiségének növekedéséhez a DEJ-ben, egy RDEB-ben szenvedő páciens esetében bőrbioptiás mintát vettünk a kezelés előtt a 7., 15., 90., 180., 270. és 360. napon. A biopsziás mintákból RNS-t izoláltunk és Sentrix Humán-6 teljes genom expressziós chipet alkalmaztunk (Illumina). Az adatokat a Beadstudio 3.0 verziójának segítségével normalizáltuk (Illumina). A génexpressziós különbségek meghatározása az expressziós különbség értéke (Diff Score) >13 vagy < -13, amely figyelembe veszi a háttérzajt és minták heterogenitását, valamint annak relatív (Diff Fold Change) legalább kétszeres vagy nagyobb változása alapján történt. Emellett az átlagos jelintenzitás mindegyik próba esetében szignifikánsnak volt tekintett <0,05 P érték esetén. Ettől eltérő P érték esetén az adott próba kizárásra került az elemzésből.

A valós idejű, kvantitatív, reverz transkriptáz PCR (Q-RT-PCR) vizsgálatok során az izolált RNS minták koncentrációját megmértük, majd egységes koncentrációra hígítottuk őket (0,2µg/µl). Ezután cDNS-sé írtuk át őket az ABI High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit protokollnak megfelelő alkalmazásával. A cDNS mintákkal Q-RT-PCR vizsgálatokat végeztünk validált ABI Taqman kit-ek alkalmazásával. A vizsgálatokhoz cDNS, Taqman master-mix, specifikus primerek, próba összemérését követően ABI 7500 real-time PCR készüléket alkalmaztunk. A méréseket minden minta esetében elvégeztük egy választott housekeeping génre specifikus primer párral (18S riboszomális RNS) és a vizsgálni kívánt gén(ek) primer párjával. A vizsgálni kívánt minták esetében a relatív expressziót a háztartási 18S és vagy GAPDH gén esetében mért értékekre normalizálva határoztuk meg.

3.2.8. Immunofluoreszcens vizsgálatok

A bőrből 6mm-es punch biopsziával eltávolított, foszfát pufferes sóoldatban (PBS) maximum néhány órán át tárolt, majd lefagyasztott, kriosztátban elhelyezett, mikrotómmal metszett, kb. 4-6 µm vastagságú, natív szövetmintát használunk. A fagyasztott mintát tárgylemezre vettük fel, szárítottuk, PBS-ben mostuk, majd az elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk, ezt követően másodlagos ellenanyaggal blokkoltuk. A metszeteket ezután háromszor váltott PBS-ben mostuk át, majd szárítottuk, végül DAPI-t tartalmazó Vectashield HardSet fedő médiumot helyeztünk rájuk (Vector Laboratories, Peterborough, Anglia) és fluoreszcens mikroszkóppal megvizsgáltuk.

3.2.9. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Lézionális, lézió melletti pikkelysömörös és egészséges bőrbioptiás minták 24 órás 4% formaldehides fixálását követően a mintákat parffinba ágyztuk. 4 µm vastagságú metszeteket

tárgylemezre helyeztünk, 3-szor 5 percig xylene-nel kezeltük, majd visszahidratáltuk csökkenő koncentrációjú ethanol és methanol elegyével 2-szer 3 percig. A szöveti endogén peroxidáz blokkolását 90 ml methanol és 3 ml hidrogén-peroxid elegyével végeztük 5 percig. A nem specifikus antigének blokkolásához 1%-os szarvasmarha szérumból G1P3 umin és 0,1%-os Azidot alkalmaztunk 10 percig. A nem specifikus antigén blokkolást követően a metszeteket G1P3 elleni elsődleges egér monoklonális ellenanyaggal kezeltük (Abnova) egy napig. Az izotípus kontrollok festésekor a G1P3 elleni elsődleges ellenanyagot kihagytuk a festésből. Az érzékenyebb reakció elérése céljából 30 percig tormaperoxidáz polimert alkalmaztunk (Envision System, Dako). A 3,3' diaminobenzidin (DAB) reakció intenzitását fénymikroszkóppal vizsgáltuk meg (RealEnvision system, Dako). A metszeteket egy percig hematoxillin-nel festettük.

3.2.10. Immunprecipitáció és Western blot analízis

A BSS-ben szenvedő szegedi család két tünetes családtagjától, valamint egészséges kontroll egyénektől négy mm-es punch biopszia mintát vettünk. Diszpáz enzimmel (Grade II, Roche Applied Science) történő emésztést követően fibroblaszt sejteket izoláltunk és tenyésztettük standard körülmények között.

A fibroblasztokat PBS-sel történő mosást követően 1 ml lízis pufferben (Sigma) szuszpendáltuk, majd jégen hűtött homogenizátor segítségével homogenizáltuk. Ezt követően az Immunoprecipitation Kit Protein G (Roche Applied Science) megadott instrukcióinak követésével, anti-humán NEMO egér antitest (BD Pharmingen) felhasználásával NEMO fehérjét immunprecipitáltunk mind a kontroll, mind pedig a *CYLD* mutáns fibroblasztokból.

Az immunprecipitáció során kinyert fehérjéket használtuk fel a Western blott analízis során. A fehérjéket 10%-os SDS-poliakrilamid gélen futtattuk meg. A gélről a fehérjéket száraz blott rendszer (iBlot Gel Transfer System, Invitrogen) segítségével nitrocellulóz membránra blottoltuk. A membránokat 3%-os tejport tartalmazó TBS oldatban 2 órán át telítettük. Anti-humán ubiquitin egér (Santa Cruz Biotechnology) elsődleges ellenanyagot használtunk a fehérje kimutatásához. 3% tejport tartalmazó TBS oldatban kihígított ellenanyaggal egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk a nitrocellulóz membránt. Mosásokat követően egér IgG ellen termeltetett alkalikus foszfatáz konjugált másodlagos ellenanyagot (Sigma) és 5-bromo-4-kloro-3-indolil-foszfát/nitroblue-tetrazólium (Sigma) előhívó oldatot használtunk a fehérje sávok megjelenítéséhez.

3.2.11. Statisztika és bioinformatikai elemzések

Az egyes vizsgálatok kapcsán végzett statisztikai analízishez a VassarStats: Statistical Computation Web Site (www.vassarstats.net) oldalon, online, ingyenesen elérhető statisztikai vizsgálómódszereket alkalmaztuk.

A szekvenálási eredmények kiértékelése az Ensemble Genome Browser (<https://www.ensembl.org/>), HGMD (<http://hgmd.cf.ac.uk>), ExAC (<http://exac.broadinstitute.org>) és dbSNP (<http://ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) adatbázisok felhasználásával végeztük el. A kapott genetikai variánsok kóroki szerepének vizsgálata *in silico* pathogenitás predikciós szoftverekkel történt: SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>), Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) és MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org/>).

4. Eredmények

4.1. Genotípus-fenotípus összefüggések feltárása

4.1.1. A kután teleangiectasiával társuló familiáris oropharyngeális daganat szindróma (TAFOCS) hátterében az ataxia teleangiectasia és Rad3-kapcsolt (*ATR*) gén novum mutációját azonosítottuk

A TAFOCS szindrómát egy 5 generációs, 24 érintett családtagot tartalmazó amerikai családban figyeltük meg először. Összesen 26 családtag vizsgálatát végeztük el (13 tünetes és 13 tünetmentes családtag került bevonásra). A vizsgált egyének esetében a teljes genomot lefedően polimorfizmusok kerültek genotipizálásra, kapcsoltsági vizsgálatot végeztünk. A vizsgálati eredmények egy szignifikáns lókuszt azonosítottak a 3q22-24 régióban (az rs722813 SNP-től az rs952032 SNP-ig), a régió szűkítésére további mikroszatellita markerek genotipizálását végeztük el. Az így kapott márcsak mintegy 90 különböző gént tartalmazó régió (az rs712984 SNP-től az rs951465 SNP-ig) esetében a potenciális kóroki gének körének szűkítése a róluk közölt korábbi tudományos publikációkban leírt genotípus-fenotípus összefüggések alapján történt meg. Így került 30 lehetséges kóroki gén kiválasztásra, melyek esetében direkt szekvenálással történt a betegség hátterében álló kóroki mutáció azonosítása. A 30 feltételezett kóroki gén direkt szekvenálása révén a betegség kialakulásáért felelős mutáció, egy heterozigóta misszensz variáns az ataxia teleangiectasia és Rad3-kapcsolt (*ATR*) génen került azonosításra (c.6431A>G, p.Gln2144Arg). Ez a mutáció minden érintett családtag vérből izolált genomi DNS-én jelen volt, míg a vizsgált klinikailag tünetmentes családtagok közül egyik sem hordozta. 220 további egészséges, kontroll egyén vizsgálata során a c.6431A>G, p.Gln2144Arg *ATR* mutáció nem volt jelen egyetlen egyénben sem.

Az érintett családtagok esetében az oropharyngeális daganat szövetből izolált DNS direkt szekvenálása során a mutációt homozigóta formában detektáltuk. A c.6431A>G, p.Gln2144Arg *ATR* mutáció egy újonnan azonosított mutáció, mindeddig nem volt ismert az irodalomból. A mutáció az *ATR* fehérje egy, az evolúció során jelentősen konzervált régióját érinti. Az *ATR* fehérjének a mutáció által érintett területén egy ismert funkcionális domén, a FAT (FRAP, ATM és TRRAP) domén helyezkedik el. Az irodalmi adatokból ismert, hogy az *ATR* fehérje FAT doménje az AARS-interakciós multifunkciós 3 fehérjéhez (*AIMP3*) kapcsolódva a p53 aktiválásában játszik fontos szerepet.

4.1.2. A Clericuzio típusú poikiloderma (CPN) betegség hátterében 16-os kromoszóma nyitott leolvasási keret 57 (*C16orf57*) gén novum mutációját azonosítottuk

Egy CPN-ben szenvedő marokkói család vizsgálata kapcsán - akiknél a klinikai tünetek már korábban publikálásra kerültek, azonban a betegség genetikai háttere mindeddig nem került felderítésre, célul tűztük ki a betegség hátterében álló kóroki gén és kóroki mutáció azonosítását. Hat családtag vizsgálatát végeztük el (két tünetmentes szülő, 3 tünetes gyermeke és egy tünetmentes gyermeke került bevonásra). A vizsgált egyének esetében a teljes genomot lefedően polimorfizmusok kerültek genotipizálásra a Human Mapping 10K 2.0 chip (Affymetrix) felhasználásával.

A vizsgálati eredmények által feltárt hat régió szűkítésében és a lehetséges kóroki gén kiválasztásában nagy jelentősége volt Volpi és munkatársai munkájának (2010, Am J Hum Genet, 86:72-76.), akik munkacsoportunkat pár hónappal megelőzve, ugyanabban az évben írták le a 16-os kromoszóma nyitott leolvasási keret 57 (*C16orf57*) gén kóroki szerepét a betegség kialakulásában. A chip vizsgálati eredmények alapján a *C16orf57* gén közte volt a lehetséges kóroki géneknek. A gén kódoló szakaszainak és azokkal határos intronális régióknak

a direkt szekvenálását elvégezve egy új, az irodalomban korábban nem publikált deléciót azonosítottunk (c.179delC p.Pro60fsX54).

4.1.3. A recesszív disztrófiás epidermolízis bullozában (RDEB) szenvedő páciens szomatikus mozaicizmusáért a keratinocitákban kialakult a 7-as típusú kollagén gént (*COL7A1*) gént érintő egyszeri intragenikus kereszteződés a felelős

A RDEB-ben érintett 41 éves férfibeteg hosszú ideje észlelt két bőrterületet a bal csuklón és a jobb lábszáron, melyek nem vagy csak nagyon ritkán mutattak hólyagképződést vagy kisebenedést. Ezen bőrterületek esetében felmerült a szöveti mozaikosság lehetősége, melyet a C7 immunhisztokémiai vizsgálata valóban igazolt.

A páciens perifériás vérmintájából és a kevésbé fragilis bőrterületekből valamint tünetes környezetükből vett bőrbíopsziás mintákon genetikai vizsgálatokat végeztünk. Mindhárom minta esetében izolált gDNS-en a c.1732C>T p.Arg578X mutációt detektáltuk a *COL7A1* gén 13. exonjában és a c.7786delG p.Gly2593fsX4 mutációt a 104. exonban. Ugyanakkor a perifériás vérmintából és a tünetes bőrből izolált cDNS-en szintén mindkét mutáció, a c.1732C>T p.Arg578X mutáció és a c.7786delG p.Gly2593fsX4 mutáció jelen volt. A tünetmentes bőrből izolált cDNS esetében viszont csak a c.1732C>T p.Arg578X mutáció volt jelen a gén 13. exonjában.

Mivel a C7-et a keratinociták és a fibroblasztok is termelik, a kevésbé fragilis és fragilis teljes bőrmintákból, illetve az abból izolált fibroblasztokból származó mRNS minták esetében is elvégeztük *COL7A1* mRNS expressziójának vizsgálatát. Vizsgálati eredményeink a kevésbé fragilis és fragilis bőrmintákból izolált fibroblasztokból származó mRNS-ek esetében is csökkent *COL7A1* mRNS expressziót mutattak.

Ugyanakkor a kevésbé fragilis és fragilis teljes bőrmintákból izolált mRNS-ek esetében csak a fragilis teljes bőrmintákból izolált mRNS mutatott csökkent *COL7A1* mRNS expressziót. Vizsgálati eredményeink alapján feltételezzük, hogy a reverzió a keratinocitákban jöhetett létre. Feltételezzük továbbá, hogy a páciens esetében tapasztalt szomatikus mozaicizmus hátterében egyszeres intragenikus kereszteződés állhat, melynek következtében a *COL7A1* mRNS átíródásakor az anyai eredetű p.Arg578X mutáció detektálható, azonban az apai eredetű c.7786delG mutáció helyett csak vad típusú szekvencia detektálható a kevésbé fragilis bőrterület cDNS mintájában.

4.1.4. A hereditár angioneurotikus ödéma III-as típusa (HAEIII) hátterében recurrens misszensz mutációt azonosítottunk a koagulációs faktor 12 (*F12*) génen

A HAEIII egy olyan ritka formája a HAE-nek, mely csak nőket érint és a rohamok kialakulása magas ösztrogén szinttel járó állapotokhoz társul. Vizsgálataink során célul tűztük ki egy HAEIII-ban szenvedő család genetikai vizsgálatát, a háttérben álló *F12* gén mutáció szűrését. Az irodalomból már jól ismert rekurrens, misszensz mutációt azonosítottunk (c.983C>A p.Thr328Lys).

Haplotípus vizsgálatot végeztünk, annak igazolására, hogy az európai HAEIII páciensek, akik ugyanezen mutációt hordozzák, egyazon alapító hatás eredményeként vagy pedig egymástól független mutációs események eredményeként hordozzák ugyanazon mutációt. Mivel az európai HAEIII páciensek és az általunk vizsgált brit HAEIII-ban szenvedő család mutációt hordozó tagjai ugyanazon haplotípust hordozzák, feltételezzük, hogy ugyanazon mutáció kialakulásához ezen páciensek esetében egy azon alapító hatás vezetett.

4.1.5. Öt, a familiáris lokálizált kután amyloidosisban (FPLCA) szenvedő család esetében két novum és egy rekurrens misszensz mutációt azonosítottunk az onkostatin M receptor (*OSMR*) génen

Öt, autoszómális domináns öröklődést mutató FPLCA-ban szenvedő család genetikai vizsgálatát végeztük el. Elsődleges célkitűzésünk volt az *OSMR* és az *IL31RA* gének mutáció szűrése, az azonosított mutációk vizsgálata, genotípus-fenotípus összefüggések feltárása. Két család esetében új, az irodalmi adatokból korábban nem ismert misszensz mutációkat azonosítottunk az *OSMR* génen (Család I. c.1939G>T p.Asp647Tyr, Család II. c.1891G>T p.Val631Leu). Három család esetében pedig ugyanazon rekurrens misszensz mutációt azonosítottunk az *OSMR* génen (c.1853G>C p.Gly618Ala). Az újonnan azonosított misszensz mutációk a *OSMR*β fehérje extracelluláris fibronectin III domén (FNIII) területén helyezkednek el. Mivel a Család III., IV. és V. tünetes tagjai valamennyien ugyanazon kóroki misszensz mutációt hordozták, haplotípusvizsgálatot végeztünk annak vizsgálata céljából, hogy ugyanazon mutáció egy azon alapító hatás vagy független mutációs események következtében jött-e létre az érintett családokban. Haplotípus vizsgálati eredményeink alapján a három érintett családban a detektált mutáció ugyanazon alapító hatás eredményeként jöhetett létre, mivel az érintett családtagok ugyanazon haplotípust hordozták. A két új mutáció a Család I. és Család II-ben került detektálásra, a rekurrens mutációt hordozta a Család III, IV és V is.

4.1.6. A WNT család 10A gén (*WNT10A*) homozigóta nonszensz mutációja Schöpf-Schulz-Passarge szindróma (SSPS), míg compound heterozigóta misszensz és nonszensz mutációi és homozigóta misszensz mutációja odonto-onycho-dermális diszplázia (OODD) kialakulását eredményezi

Egy 70 éves, klinikailag SSPS-ben szenvedő brit páciens került bevonásra, akinél az elvégzett genetikai vizsgálatokkal egy, az irodalomból ismert homozigóta nonszensz mutációt, a c.321C>A p.Cys107X-t, azonosítottunk a *WNT10A* génen.

Vizsgálatainkba egy négy generációs brit családot is bevontunk, akiknél 7 érintett családtag genetikai vizsgálata történt meg. A vizsgált családban a klinikai tüneteket mérlegelve diverz klinikai képet mutatnak, melyek néhány esetben SSPS-t, míg más családtagoknál OODD fennállását valószínűsítik.

Az elvégzett genetikai vizsgálatok alapján a családon belül az SSPS klinikai variáns kialakulását a *WNT10A* gén homozigóta nonszensz mutációja eredményezte (c.321C>A p.Cys107X), míg az OODD klinikai variáns kialakulásáért a *WNT10A* gén heterozigóta misszensz (c.682T>A p.Phe228Ile) és heterozigóta nonszensz (c.321C>A p.Cys107X) mutációinak kombinációja vagy a gén homozigóta misszensz mutációja a felelős (c.682T>A p.Phe228Ile).

4.1.7. A *CYLD* génen egy novum misszensz és két rekurrens nonszensz mutációt azonosítottunk, utóbbiak eltérő klinikai variánsok – familiáris cylindromatózis (FC), multiplex familiáris trichoepitheliomatózis (MFT1) és Brooke-Spieger szindróma (BSS) -kialakulását eredményezik

Egy BSS-ben szenvedő szegedi család, egy BBS-ben érintett Szekszárd környéki család és egy MFT1-ben szenvedő spanyol család genetikai vizsgálatát végeztük el. Elsődleges célkitűzésünk volt a *CYLD* gén mutáció szűrése, az azonosított mutációk vizsgálata, genotípus-fenotípus összefüggések feltárása. A BSS-ben szenvedő szegedi család tünetes tagjaiban egy novum, az irodalomból eddig nem ismert heterozigóta, misszensz mutációt azonosítottunk (c.2613C>G p.His87Gln).

A Szekszárd környéki BSS családban egy rekurrens, heterozigóta, nonszensz mutációt azonosítottunk a *CYLD* génen (c.2806C>T, p.Arg936X). A mutáció azonosításának óriási jelentősége van a család számára, mivel esetükben a betegség súlyos, kiterjedt, stigmatizáló

tünetekkel jelentkezik, ami szociális izolációhoz vezetett, illetve ez a család már mintegy 50 éve áll bőrgyógyászati gondozás alatt. A betegség hátterében álló kóroki eltérés azonosítására azonban csak most került sor, ez a későbbiekben a családalapítás kapcsán is nagy jelentőséggel bírhat. Az azonosított rekurrens, nonszensz mutációt egy Észak-angliai, BSS-ben szenvedő család is hordozza, amelyben a tünetes családtagok azonban jóval enyhébb klinikai tüneteket mutatnak. Haplotípus vizsgálatot végeztünk annak igazolására, hogy az angol és magyar BSS páciensek - akik ugyanezen mutációt hordozzák - egy azon alapító hatás eredményeként, vagy pedig egymástól független mutációs események eredményeként hordozzák ugyanazon mutációt.

Haplotípus vizsgálati eredményeink alapján ugyanazon mutációt a földrajzilag távoli két családban egymástól független mutációs események hozták létre, ami felveti a mutációs forrópont lehetőségét a génen.

Vizsgálataink további érdekessége, hogy ugyanazon kóroki mutáció hordozása ellenére az angliai és magyar páciensek klinikai tünetei között jelentős különbségek mutatkoztak a tünetek súlyosságát és diverzitását illetően. További célkitűzésünk volt fenotípus-módosító genetikai variánsok azonosítása teljes exom szekvenálással (WES). Az elvégzett WES vizsgálati eredmények összehasonlítása révén három lehetséges fenotípus módosító markert azonosítottunk: az rs1053023 SNP-t a transzkripció 3 szignál transzducer és aktivátor génen (*STAT3*), az rs1131877 SNP-t a tumor nekrosis faktor receptor assziciált faktor 3 génen (*TRAF3*) és az rs202122812 SNP-t a BRCA génnel határos gén 1-en (*NBR1*) génen.

Egy MFT1-ben szenvedő spanyol család esetében egy heterozigóta nonszensz mutációt azonosítottunk a *CYLD* génen (c.2272C>T p.Arg758X), melyet korábban már egy BBS-ben szenvedő osztrák páciensben, valamint egy FC-vel diagnosztizált holland családban is detektáltak. Haplotípus vizsgálatot végeztünk annak igazolására, hogy a spanyol, a holland és az osztrák páciensek esetében ugyanazon mutáció egy azon alapító hatás eredményeként, vagy pedig egymástól független mutációs események eredményeként jött-e létre.

A vizsgálat alapján az MFT1-ben szenvedő spanyol és az FC-ben érintett holland család tünetes tagjai hordozzák ugyanazon haplotípust, egyazon alapító hatásra utalva. Ugyanakkor az ugyanazon mutációt hordozó BSS-ben szenvedő osztrák páciens eltérő haplotípust hordoz, ami független mutációs eseményre utal. Vizsgálataink további megerősítésül szolgálnak, miszerint az MFT1, FC és BSS nem három különböző betegség, hanem ugyanazon kórkép eltérő klinikai megjelenésű variánsai.

4.1.8. A cathepsin C (*CTSC*) génen egy novum deléciót és egy rekurrens nonszensz mutációt azonosítottunk, amely utóbbi eltérő klinikai variánsok – Papillon-Lefèvre szindróma (PLS) és Haim-Munk szindróma (HMS) - kialakulását eredményezi

Egy PLS-ben szenvedő szegedi család második generációjában két beteg leánytestvér esetében (II:2 és II:3) egy, az irodalomból mindeddig nem ismert 7 bázist érintő homozigóta deléciót azonosítottunk a *CTSC* génen (c.681delCATACAT p.T188fsX199).

Az elvégzett genetikai vizsgálatok igazolták, hogy a klinikailag tünetmentes szülők (I:1 és I:2) a deléciót heterozigóta formában hordozzák és a klinikailag tünetmentes leánytestvér (II:1) szintén heterozigóta hordozója a deléciónak. Mivel a *CTSC* gén mutációi meglehetősen ritkák - mindössze néhány száz PLS-ben érintett beteg ismert világszerte - felmerült annak lehetősége, hogy ugyanazon heterozigóta mutáció hordozása esetleg rokonházasság eredménye-e? A szülőknek azonban nem volt tudomása rokonházasságról a családban.

A PLS-ben és HMS-ben szenvedő kaposvári páciensek esetében az elvégzett genetikai vizsgálatok ugyanazon rekurrens, homozigóta nonszensz mutációt igazolták (c.748C>T p.Arg250X) a *CTSC* génen.

A PLS-ben és a HMS-ben szenvedő páciensek nem ismerik egymást, a PLS-ben szenvedő páciensnek nincs testvére és gyermeke, valamint tudomása szerint az egyedüli PLS-ben szenvedő beteg a családon belül. A HMS-ben szenvedő páciens nem ismeri szüleit, rokonait, nevelőotthonban nevelkedett. Mivel a genetikai vizsgálatok ugyanazon homozigóta mutációt azonosították mind a PLS-ben, mind a HMS-ben szenvedő páciens esetében haplotípus vizsgálatot végeztünk, annak igazolására, hogy a két páciens ugyanazon mutációt egy azon alapító hatás eredményeként, vagy pedig egymástól független mutációs események eredményezték-e.

Vizsgálati eredményeink alapján a PLS-ben és a HMS-ben szenvedő páciensek ugyanazt a haplotípust hordozták, ezért nem kizárt, hogy mégis van közöttük rokoni kapcsolat.

Vizsgálataink további érdekessége, hogy ugyanazon kóroki mutáció hordozása ellenére az egyik páciens PLS-ben, a másik páciens HMS-ben szenved. A PLS-t és HMS-t korábban külön entitásoknak vélték, de az irodalmi adatok és a kapott vizsgálati eredményeink alapján felmerült, hogy a PLS és HMS nem különböző betegségek, hanem ugyanazon kórkép eltérő klinikai variánsai.

További célkitűzésünk volt olyan fenotípus-módosító genetikai variánsok azonosítása, melyek felelősek lehetnek az ugyanazon mutációt hordozó páciensekben az eltérő klinikai variánsok (PLS és HMS) kialakulásáért. Az elvégzett WES vizsgálati eredmények összehasonlítása révén kettő lehetséges fenotípus módosító markert azonosítottunk: az rs34608771 SNP-t az SH2 domént tartalmazó 4A génen (*SH2D4A*) és az rs55695858 SNP-t az illatanyag kötő fehérjét kódoló 2A (*OBP2A*) génen.

4.1.9. Okulokután albinizmusban (OCA) két novum mutációt azonosítottunk a membránhoz kötött transzportfehérje génen (*SLC45A2*) és 11 rekurrens variánst a tirozináz (*TYR*), okulokután albinizmus 2 (*OCA2*) és *SLC45A2* géneken

Az OCA egy klinikailag és genetikailag is heterogén betegségcsoport, mely általános jellegzetessége a haj, a bőr és a szemek hipopigmentációja. Vizsgálatainkba 13 olyan magyar OCA páciens került bevonásra, akik mindegyike hipopigmentált bőrrel, szinte hófehér hipopigmentált hajjal és kék szemmel rendelkeztek.

A kaukázusiak között az OCA1, OCA2 és OCA4 izolált formák fordulnak elő a leggyakrabban, ezért elsődleges célkitűzésünk volt a *TYR*, *OCA2* és *SLC45A2* gének mutáció szűrése, az azonosított mutációk vizsgálata, genotípus-fenotípus összefüggések feltárása.

Egy OCA-ban szenvedő kaposvári leány testvérpár esetében az elvégzett genetikai vizsgálatokkal egy novum heterozigóta misszensz (c.1226G>A p.Gly409Asp) és egy novum heterozigóta nonszensz (c.1459C>T p.Gln437X) mutációt detektáltunk az *SLC45A2* génen. A misszensz mutáció a kódolt fehérje 9. a nonszensz mutáció pedig a 10. transzmembrán domént érinti. A misszensz mutáció erősen konzervált régióban helyezkedik el. Az elvégzett genetikai vizsgálatok alapján a testvérpár klinikai tüneteinek hátterében az OCA4 izolált forma igazolódott.

Vizsgálatainkba további 11, szintén közel azonos klinikai tüneteket mutató OCA páciens is bevonásra került. A klinikai tünetek alapján az OCA altípusba történő besorolás nem volt lehetséges, az OCA1, OCA2 és OCA4 variánsok fennállása volt valószínűsíthető.

Az elvégzett genetikai vizsgálatok során 11 rekurrens variánst azonosítottunk, melyek hozzájárulhatnak az OCA fenotípus kialakulásához. Az azonosított genetikai variánsok a *TYR*, *OCA2* és *SLC45A2* géneken különböző kombinációkban fordultak elő, mely alapján a páciensek különböző izolált klinikai formákba kerültek besorolásra.

A 11-ből 8 páciens esetében az OCA1 izolált forma igazolódott. Vizsgálati eredményeink alapján az OCA1 izolált forma fordult elő a leggyakrabban. Egy páciens - mivel mind *TYR*, mind *SLC45A2*

kóroki mutációt hordozott - az OCA1/OCA4 átmeneti izolált forma került diagnosztizálásra. Két páciens esetében betegséget okozó mutációt nem detektáltunk a *TYR*, *OCA2* és *SLC45A2* géneken, esetükben a diagnosztikai besorolás nem volt lehetséges.

4.1.10. A vizsgált 19 pityriasis rubra pilarisban (PRP) szenvedő páciensből 8 hordozott olyan kaszpáz felvétel domént tartalmazó fehérje 14 (*CARD14*) gén variánst, amelyet korábban pikkelysömörben szenvedő páciensekben is detektáltak

Egy PRP-ben szenvedő magyar nőbeteg esetében végeztük el a *CARD14* gén mutáció szűrését. A vizsgált páciens családjában másik PRP-vel diagnosztizált beteg nincs, de lánya és unokája psoriasis miatt rendszeres bőrgyógyászati kezelés alatt áll. Genetikai vizsgálataink során összesen négy, az irodalomból ismert variánst detektáltunk a *CARD14* génen a páciens perifériás vérmintájából izolált gDNS-en: c.676-6 G/A splice polimorfizmus (ritka allél frekvencia 0,34), p.Arg682Trp misszensz mutációt (ritka allél frekvencia 0,01), a p.Arg547Ser misszensz polimorfizmust (ritka allél frekvencia 0,37) és a p.Arg820Trp misszensz polimorfizmust (ritka allél frekvencia 0,35). A PRP-ben szenvedő páciensnél detektált négy *CARD14* variánsból három variáns korábban psoriasisban szenvedő pácienseknél került kimutatásra (p.Arg682Trp, p.Arg547Ser, p.Arg820Trp), mint hajlamosító genetikai faktor.

A vizsgált nőbeteg mellett további 18 PRP-ben szenvedő magyar páciens esetében is elvégeztük a *CARD14* gén mutáció szűrését. Összesen nyolc, az irodalomból már ismert *CARD14* variánst azonosítottunk a PRP-ben szenvedő páciensekben: 2 mutációt és 6 polimorfizmust. A vizsgált 19 páciensből 10 hordozott *CARD14* variánst. A 10 páciensből 8 hordozott olyan *CARD14* variánst, amelyet korábban psoriasisban szenvedő páciensekben is detektáltak és 10-ből 6 páciens esetében hajlamosító variánsok kombinációját detektáltuk.

Az azonosított variánsok a betegség lefolyásával, súlyosságával vagy a különböző bőrgyógyászati kezelésekre adott terápiás válasszal nem mutattak összefüggést. Vizsgálati eredményeink arra utalnak, hogy a *CARD14* variánsok feltehetőleg nem egyedülállóan a PRP vagy a psoriasis genetikai jellegzetességei, a detektált fokozott NF- κ B aktivitás miatt lehetséges, hogy a krónikus gyulladással hozhatóak összefüggésbe.

4.2. Funkcionális vizsgálatok eredményei

4.2.1. A TAFOCS szindrómában szenvedő páciensek *ATR* mutációt hordozó fibroblasztjaiban a p53 mennyisége csökkent az egészséges egyének fibroblasztjainak p53 szintjéhez képest

A teleangiectasia és oropharyngeális daganat kialakulásával járó TAFOCS szindrómát egy 5 generációs, 24 érintett családtagot tartalmazó amerikai családban írtuk le először. Az elvégzett genetikai vizsgálatok során a betegség hátterében egy hetreozigóta misszensz *ATR* mutációt (c.6431A>G, p.Gln2144Arg) azonosítottunk a vizsgált páciensekben. A genetikai vizsgálatokat követően további célkitűzésünk volt funkcionális vizsgálatok végzése annak felderítésére, hogy az újonnan azonosított hetreozigóta, misszensz *ATR* mutáció hogyan járul hozzá a TAFOCS betegség kialakulásához.

Két érintett családtag és két kontroll egyén esetében bőrbioptizás mintából fibroblasztokat izoláltunk és összehasonlítottuk a mutációt hordozó és nem hordozó fibroblasztokban az *ATR* mRNS és fehérje mennyiségét Q-RT-PCR és Western blot segítségével. A c.6431A>G, p.Gln2144Arg *ATR* mutáció hordozása nem eredményezett jelentős mennyiségi változást az *ATR* mRNS és fehérje termelődésében a mutációt nem hordozókhoz képest.

Habár az *ATR* fehérje mennyiségében nem találtunk eltérést, felmerült annak lehetősége, hogy a mutáció nem az *ATR* fehérje mennyiségi változása révén járul hozzá a betegség kialakulásához, hanem esetleg valamelyik *ATR*-interakciós partner kötőhelyének a defektusa révén. Mivel a FAT doménról ismert, hogy az AIMP3 fehérjén keresztül p53 aktiváló hatása van,

megvizsgáltuk a p53 fehérje mennyiségét hydroxyurea aktiváció előtt és után a mutációt hordozó fibroblasztokban és egészséges egyénekből izolált fibroblasztokban. A mutációt hordozó fibroblasztok p53 szintje alacsonyabb volt az egészséges fibroblasztokban detektált p53-hoz képest.

4.2.2. Az FPLCA-ban kialakuló lichenifikáció és pruritus hátterében álló gén expressziós eltérések azonosítása

Öt autoszómális domináns öröklődést mutató FPLCA-ban szenvedő család genetikai vizsgálatát végeztük el, két család esetében új, az irodalmi adatokból korábban nem ismert misszensz mutációkat azonosítottunk az *OSMR* génen (Család I. c.1939G>T p.Asp647Tyr, Család II. c.1891G>T p.Val631Leu). A genetikai vizsgálatokat követően további célkitűzésünk volt az FPLCA pathomechanizmusának feltárása lézionális és egészséges bőrbíopsziás minták teljes genom gén expressziós mintázatának összehasonlítása révén. Összesen 77 gén expressziójának esetében tapasztaltunk mennyiségi eltérést, ebből 34 fokozott kifejeződést 43 pedig csökkent kifejeződést mutatott. A 77 génből összesen 15 gén expressziójának a validálását végeztük el Q-RT-PCR-rel, ezek a gének az irodalmi adatok alapján kerültek potenciálisan releváns génként kiválasztásra. A 15 kiválasztott gén között voltak keratinocita proliferációs markerek, *KRT6E*, *ARG1*, *SDCBP2* és *KRT16*, amelyek fokozott kifejeződést mutattak, illetve keratinocita differenciációs markerek közül csökkent expressziót mutatott a *CLDN10*, *THH*, *RASD1* and *SFRP1*. Ezen eltérések összefüggésbe hozhatóak az FPLCA egyik jellegzetes klinikai tünetével a lichenifikációval. Vizsgálati eredményeink alapján csökkent expressziót mutattak az epidermális őssejt markerek, úgy mint a *LRIG1*, *KRT15* és *PROM1* és az anti-apoptotikus faktorok, úgy mint az *IGFBP5* és az *MX1*. További vizsgálati eredményeink alapján fokozott kifejeződést mutatott néhány neurális marker, úgy mint a *KIF1A* és a *METRNL*, ami feltehetően a betegséget jellemző pruritussal hozhatóak összefüggésbe.

4.2.3. A *CYLD* gén újonnan azonosított misszensz mutációját (p.His871Gln) hordozó fibroblasztokban a NEMO fehérje fokozott ubikvitináltságot mutatott az egészséges egyének fibroblasztjaiból immunprecipitált NEMO fehérjéhez képest

A BSS-ben szenvedő szegedi család tünetes tagjaiban egy novum, az irodalomból eddig nem ismert heterozigóta misszensz mutációt azonosítottunk (c.2613C>G p.His871Gln) a *CYLD* génen. A genetikai vizsgálatokat követően további célkitűzésünk volt funkcionális vizsgálatok végzése annak felderítésére, hogy az újonnan azonosított *CYLD* mutáció hogyan járul hozzá a BSS betegség kialakulásához.

Az elvégzett funkcionális vizsgálataink során a *CYLD* fehérje interakciós partnerét, a NEMO fehérjét immunprecipitáltuk a mutációt hordozó és nem hordozó fibroblasztokból és összehasonlítottuk a NEMO fehérje ubikvitináltságát a különböző mintákban. A mutációt hordozó fibroblasztokból származó NEMO fehérje esetében jelentősen fokozott ubikvitináltságot detektáltunk, ami arra utal, hogy a c.2613C>G p. His871Gln misszensz *CYLD* mutáció hordozása csökkenti a kódolt *CYLD* enzim deubikvitinációs aktivitását.

4.2.4. A korábban pikkelysömör kialakulására hajlamosító genetikai tényezőként azonosított *CARD14* variánsok fokozott NF- κ B aktivitás révén járulnak hozzá a PRP betegség kialakulásához

Egy PRP-ben szenvedő magyar nőbeteg esetében végeztük el a *CARD14* gén mutáció szűrését. A genetikai vizsgálataink során összesen négy, az irodalomból már ismert variánst detektáltunk a *CARD14* génen a páciens perifériás vérmintájából izolált gDNA-en: c.676-6 G/A splice polimorfizmust, a p.Arg682Trp misszensz mutációt, a p.Arg547Ser misszensz polimorfizmust és a p.Arg820Trp misszensz polimorfizmust. A PRP-ben szenvedő páciensnél detektált négy *CARD14* variánsból három variáns korábban pikkelysömörben szenvedő pácienseknél került

kimutatásra (p.Arg682Trp, p.Arg547Ser, p.Arg820Trp), mint hajlamosító genetikai faktor. A genetikai vizsgálatokat követően további célkitűzésünk volt funkcionális vizsgálatok végzése annak felderítésére, hogy az azonosított *CARD14* variánsok hogyan járulnak hozzá a PRP betegség kialakulásához.

Az elvégzett funkcionális vizsgálatok során a PRP-ben szenvedő páciens lézionális bőrbíopsziás mintájának immunfluoreszcens festése során az NF- κ B p65 alegysége nukleáris festődést mutatott, míg a nem-lézionális PRP-s bőrbíopsziás minta és az egészséges egyének bőrbíopsziás mintájának festődése nem utalt fokozott NF- κ B aktivitásra.

Funkcionális vizsgálataink eredményei alapján a vizsgált nőbetegben a négy detektált *CARD14* variáns fokozott NF- κ B aktivitás révén járul hozzá a PRP kialakulásához.

4.2.5. Az interferon α indukált fehérje 6 (G1P3) és fibroblaszt növekedési faktor receptor 2 (FGFR2) fehérjék szabályozó RNS-molekulák potenciális targetjei a bőrben

A nem transzlálódó RNS-molekulák szerepe a génexpresszió szabályozásában egyre jobban feltérképezett. Vizsgálataink során célul tűztük ki a bőrben azonosított szabályozó RNS-molekulák esetében azok target fehérjéinek azonosítását, lehetséges működési mechanizmusuk tisztázását. Molekuláris biológiai vizsgálataink középpontjában a psoriasisal összefüggésbe hozott stressz indukálta hosszú nem-kódoló RNS gén (*PRINS*) és a mikroRNS-125b állnak.

A *PRINS* nem-kódoló RNS kifejeződését csendesítettük HeLa sejtekben, ami a HeLa sejtek morfológiai változását eredményezte. A morfológiai változások arra utaltak, hogy a *PRINS* csendesítés valóban megváltoztatja fehérje-kódoló gének kifejeződését a HeLa sejtekben, ezért összehasonlítottuk a *PRINS* csendesített és a kontrol siRNS-sel transzfektált HeLa sejtek génexpressziós mintázatát. A mintázatok közötti különbség öt gén jelentős expresszió csökkenését mutatta: interferon α indukált fehérje 6 (*G1P3*) gén, DNS javító fehérje RAD52 homológ (*RAD52*) gén, cink ujj fehérje 207 (*ZNF207*) gén, annexin a7 (*ANXA7*) gén és a B sejtes limfóma 9 (*BCL9*) gén. Eredményeinket Q-RT-PCR-rel validáltuk.

Ezt követően megvizsgáltuk az öt génről átíródó mRNS-eknek és a gének által kódolt fehérjék kifejeződését pikkelysömörös lézionális, a lézió melletti bőr és egészséges bőrmintákban, és azt találtuk, hogy a G1P3 fehérje jelentősen emelkedett kifejeződést mutatott mind a lézionális, mind a lézió melletti mintákban. A másik négy gén által kódolt fehérjék esetében nem találtunk eltérést a pikkelysömörös lézionális, a lézió melletti bőr és egészséges bőrminták festődése között.

A mikroRNS-125b egy multifunkcionális mikroRNS, ami jelentősen csökkent kifejeződést mutat a pikkelysömörös lézionális epidermiszben az egészséges bőr epidermiszéhez viszonyítva. A mikroRNS-125b potenciális target fehérjéje a bőrben a fibroblaszt növekedési faktor receptor 2 (FGFR2). Az FGFR2 csendesített keratinocitákban a proliferáció jelentősen csökken, továbbá a mikroRNS-125b csendesítés is jelentős proliferáció csökkenést eredményez a keratinocitákban. Bioinformatikai analízissel az FGFR2 gén 3' UTR régiójában 4 lehetséges mikroRNS-125b kötőhelyet azonosítottunk. Így felmerült a lehetőség, hogy a mikroRNS-125b-nek a keratinociták proliferációjára gyakorolt szabályozó hatása legalább részlegesen az FGFR2 révén mediált. Ezt követően megvizsgáltuk az FGFR2 kifejeződését pikkelysömörös lézionális bőrben és egészséges bőrmintákban, és a FGFR2 jelentősen emelkedett kifejeződést mutatott a lézionális mintában fehérje szinten.

4.3. Terápiás fejlesztések

4.3.1. Az allogén fibroblaszt injekciók terápiás mechanizmusának hátterében a HB-EGF indukálta COL7A1 expresszió állhat

Az RDEB-ben korábbi klinikai megfigyelések igazolták, hogy az intradermális allogén fibroblaszt injekciók az injektált területen a bőr fragilitását csökkentik és időszakosan részlegesen helyreállítják a C7 mennyiségét a DEJ-ben. Az allogén fibroblaszt terápia a klinikai megfigyelések szerint azoknál az RDEB betegeknél hatásos, akiknél a C7 csökkent termelése áll fenn; azoknál a betegeknél, akiknél teljesen hiányzik, kevésbé hatásos. Mindezen megfigyelések alapján felmerül a kérdés, hogy vajon az allogén fibroblaszt terápia fenotípust javító hatásának hátterében a beinjektózott fibroblasztokból származó C7 vagy a páciens saját keratinocitái és fibroblasztjai által termelt C7 a felelős.

Ennek a vizsgálata céljából egy olyan RDEB pácienszt választottunk, akinél két heterozigóta mutáció felelős a betegség kialakulásáért, az egyik c.2044C>T p.Arg682X nonszensz mutáció, a másik az IVS87+4A>G splice site mutáció, ez utóbbi az átíródó COL7A1 mRNS-en a 87. exon kiesését eredményezi. Így a páciens által termelt C7 jól elkülöníthető az allogén fibroblasztokból származó C7-től. Vizsgálati eredményeink alapján a COL7A1 mRNS kifejeződésének maximuma az injekciót követő 1-3 hónapban következett be. A COL7A1 mRNS termelés 2/3-át a beteg saját kollagénje adta.

Eredményeink alapján felmerült a kérdés, hogy ha az allogén fibroblaszt injekciók hatására a páciens saját C7 termelése ilyen mértékben növekedik, akkor vajon mi lehet a mediátor(ok), amely(ek) ezt a hatást közvetítik? Ennek vizsgálata céljából génexpressziós chip vizsgálatokat végeztünk és a kapott eredményeket Q-RT-PCR-rel validáltuk. Vizsgálati eredményeink alapján azon citokinek szintjében, melyek az irodalmi adatokból ismert módon növelik a COL7A1 mRNS expresszióját és ezáltal a C7 termelést, jelentős mennyiségi változást nem detektáltunk. Vizsgálati eredményeink alapján a heparin kötő epidermális növekedési faktor (HB-EGF) mRNS szintje mutatott leginkább hasonlóságot a COL7A1 mRNS szint változásával (lineáris korreláció, $r=0,978$; $p=0.0001$). Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a HB-EGF-nek jelentős szerepe lehet az allogén fibroblaszt injekciók által kiváltott C7 termelésben.

In vitro keratinocita és fibroblaszt kultúrák 100 ng/ml HB-EGF kezelése jelentősen növelte a COL7A1 mRNS emelkedését a kezelést követően 15 perccel mind a COL7A1 mutációt hordozó, mind nem hordozó sejtekben. Mindezek alapján feltételezzük, hogy az allogén fibroblaszt injekció, az RDEB páciensek saját keratinocitáira és fibroblasztjaira is hatva emeli a páciensek saját C7 termelést a DEJ-ben. Eredményeink jól korrelálnak, illetve magyarázatul szolgálnak azon klinikai megfigyelésre is, miszerint az allogén fibroblaszt injekciók hatékonyabbak azon RDEB pácienseknél, akiknél a C7 termelés csökkenése, nem pedig teljes hiánya van jelen.

Vizsgálati eredményeinkből egy szabadalmi bejelentés született, melyben a HB-EGF kezelés, mint az RDEB egyik lehetséges új kezelési alternatívája került leírásra (Nagy N, McGrath JA: Medical use of heparin-binding egf-like growth factor, Nemzetközi szabadalom, GBGB1014097.8A, közzététel éve: 2010, végleges oltalom: 2011).

5. Megbeszélés

5.1. Genotípus-fenotípus összefüggések feltárása

5.1.1. A TAFOCS betegség - a munkacsoportunk által leírt, új, familiáris daganatszindróma – háttérben az *ATR* gén novum, heterozigóta, misszensz mutációja áll

A TAFOCS szindrómát egy 5 generációs, 24 érintett családtagot tartalmazó amerikai családban figyeltük meg munkacsoportunk először. A betegség autoszómális domináns öröklődésmentet mutat, jellegzetes klinikai tünetei a bőrön kialakuló teleangiectasia, a haj, fog és köröm rendellenességek és a malignus daganat kialakulásának fokozott kockázata, mely leggyakrabban az oropharynx területére lokalizált. Ez a familiáris daganatszindrómák csoportjába tartozó újonnan leírt, ritka betegség mindeddig nem volt ismert. A klinikai tünetek részletes dokumentálása mellett a betegség háttérben álló kóroki gén azonosítása, kóroki mutáció azonosítását is munkacsoportunk végezte el először.

Az elvégzett genetikai vizsgálatok kóroki génként az *ATR* gént azonosították, kóroki mutációként egy heterozigóta misszensz mutációt azonosítottunk (c.6431A>G p.Gln2144Arg), melyet valamennyi vizsgált beteg családtag hordozott. A c.6431A>G, p.Gln2144Arg *ATR* mutáció egy újonnan azonosított mutáció, mindeddig nem volt ismert az irodalomból. Az *ATR* fehérjének a mutáció által érintett területén egy ismert funkcionális domén, a FAT domén helyezkedik el. A páciensekből eltávolított daganat szövetekben a mutáció tekintetében a heterozigótaság elvesztése is megfigyelhető volt.

Az *ATR* gén mutációit korábban Seckel szindrómában (OMIM 210600) írták le, ami egy klinikailag és genetikailag is heterogén betegség. A Seckel szindróma autoszómális recesszív öröklődés mentet mutat és a klinikai tünetek között elsősorban a mikrokefália és a progeroid fenotípus dominálja a klinikai képet, az érintett betegek nem mutatnak fokozott fogékonyságot malignus daganatok kialakulására. A jelentős klinikai különbségek háttérben a TAFOCS és a Seckel szindróma esetében az *ATR* deficiencia mértéke, illetve jellege állhat, melyek miatt feltehetően jelentősen eltérő pathomechanizmussal alakul ki az *ATR* mutációk által okozott két különböző kórkép.

A genetikai faktorok mellett, az oropharyngeális daganatok kialakulásának kockázatát jelentősen emelheti számos életmódbeli tényező is, mint a túlzott alkohol fogyasztás, dohányzás vagy vírus infekciók. Ezek közül az általunk vizsgált családban a vírus infekciók esetleges hajlamosító szerepét nem lehetett kizárni.

5.1.2. A CPN betegség háttérben a *C16orf57* gén egy, az irodalomból eddig nem ismert homozigóta delécióját azonosítottunk

Egy CPN-ben szenvedő marokkói család vizsgálata kapcsán, akiknél a klinikai tünetek már korábban publikálásra kerültek, azonban a betegség genetikai háttere mindeddig nem került felderítésre, célul tűztük ki a betegség háttérben álló kóroki gén és kóroki mutáció azonosítását. A betegség háttérben álló kóroki gén azonosítását és publikálását végül Volpi és munkatársai (2010, Am J Hum Genet, 86:72-76.) végezték el először, akik munkacsoportunkat pár hónappal megelőzve, ugyanabban az évben azonosították a *C16orf57*-t, mint kóroki gént. Az elvégzett genetikai vizsgálataink során, a CPN-ben szenvedő marokkói család esetében egy, az irodalomból még nem ismert homozigóta deléciót azonosítottunk (c.179delC p.Pro60fsX54) a *C16orf57* génen.

A gén által kódolt C16ORF57 fehérje pontos biológiai szerepe ma még kevésbé feltérképezett, az irodalmi adatok alapján ismert interakciós partnere a SMAD4 fehérje, ami a HDAC1, TP53 és/vagy a RAD51-en keresztül a RECQL4-el is kapcsolatban van. A továbbiakban funkcionális vizsgálatok szükségesek magának a fehérjének a megismerésére, illetve annak

feltérképezésére, hogy a *C16orf57* gén mutációi hogyan járulnak hozzá a CPN betegség kialakulásához.

5.1.3. Az RDEB-ben detektált szomatikus mozaicizmusért a páciens keratinocitáiban kialakult egyszeri intragenikus kereszteződés állhat

Egy RDEB-ben érintett férfibeteg bal csuklója és jobb lábszára nem, vagy csak nagyon ritkán mutatott hólyagképződést. A C7 fehérje immunhisztokémiai vizsgálata a kevésbé fragilis bőrterületeken a C7 növekedett mennyiségét mutatta a fragilis bőrterületekhez képest. A páciens perifériás vérmintájából és a kevésbé fragilis bőrterületekből, valamint a tünetes környezetükből vett bőrbopsziás mintákon genetikai vizsgálatokat végeztünk. Mindhárom minta esetében a gDNS-en az anyai eredetű c.1732C>T p.Arg578X heterozigóta, nonszensz mutációt és az apától öröklött c.7786delG p.Gly2593fsX4 heterozigóta deléciót detektáltuk. A perifériás vérmintából és a fragilis bőrből izolált mRNS-en szintén mindkét mutáció jelen volt. Ugyanakkor a kevésbé fragilis bőrből izolált mRNS esetében csak az anyától származó c.1732C>T p.Arg578X heterozigóta nonszensz mutáció volt jelen. A kapott eredmények alapján egyszeri intragenikus kereszteződés állhat a mozaikosság hátterében. Génexpressziós vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a korrekció a páciens keratinocitáiban jött létre. Ennek a „spontán kialakult génterápiának” a hátterében álló mechanizmusának a feltérképezése hozzájárulhat későbbi, új kezelési lehetőségek kidolgozásához ebben az igen súlyos, rossz életminőséggel és csökkent várható élettartammal járó ritka betegségben. Munkacsoportunk közleménye óta (2010) az epidermolízis bulloza valamennyi típusában figyeltek meg szomatikus mozaicizmust, mi több jóval nagyobb előfordulási gyakorisággal, mint ahogy azt az embriogenezis korai időszakában bekövetkező (ezért a bőrben nagyobb méretű egészségesebb bőrterületként megjelenő) reverz mutációk gyakorisága indokolná. A témát vizsgáló kutatók arra következtetésre jutottak, hogy a fejlődés későbbi szakaszában kialakuló fenotípust helyreállító szomatikus mozaicizmus által érintett sejtek növekedési előnyt élveznek és ez magyarázza a szomatikus mozaicizmus megnövekedett gyakoriságát epidermolízis bulllozában szenvedő páciensekben.

5.1.4. Az európai HAEIII páciensek ugyanazon misszensz *F12* mutációt és ugyanazon haplotípust hordozzák, a betegség Európában detektálható eseteiért feltehetően ugyanazon alapító hatás a felelős

A HAEIII egy olyan ritka formája a HAE-nek, mely csak nőket érint és a rohamok kialakulása magas ösztrogén szinttel járó állapotokhoz társul. Egy HAEIII-ban szenvedő brit család esetében genetikai vizsgálataink során egy, az irodalomból már ismert, rekurrens, misszensz mutációt azonosítottunk az *F12* génen. Míg a HAE klasszikus típusai a C1 inhibitor diszfunkciója következtében alakulnak ki, a HAE III-as típusát az *F12* diszfunkció eredményezi. A betegség kialakulásának érdekessége, hogy az angioneurotikus ödémás rohamok általában csak magas ösztrogén szint mellett alakulnak ki, ennek molekuláris hátterében pedig az a magyarázat, hogy az *F12* gén promoter régiója egy ösztrogén érzékeny részt tartalmaz, így a magas ösztrogén szint hatására fokozott *F12* aktiváció jöhet létre.

Haplotípus vizsgálatot végeztünk annak igazolására, hogy az európai HAEIII páciensek - akik ugyanezen mutációt hordozzák - egy azon alapító hatás eredményeként vagy pedig egymástól független mutációs események eredményeként hordozzák ugyanazon mutációt. Mivel az európai HAEIII páciensek és az általunk vizsgált brit HAEIII-ban szenvedő család mutációt hordozó tagjai ugyanazon haplotípust hordozzák, feltételezzük, hogy ugyanazon mutáció kialakulásához ezen páciensek esetében egy azon alapító hatás vezetett. Vizsgálati

eredményeink arra utalnak, hogy a HAEIII betegség európai elterjedéséért feltehetően ugyanazon alapító hatás a felelős.

5.1.5. FPLCA-ban két novum, heterozigóta misszensz mutációt és egy rekurrens misszensz mutációt azonosítottunk az *OSMR* génen

Öt autoszómális domináns öröklődést mutató FPLCA-ban szenvedő család genetikai vizsgálatát végeztük el. Két család esetében új, az irodalmi adatokból korábban nem ismert misszensz mutációt azonosítottunk az *OSMR* génen (c.1939G>T p.Asp647Tyr, c.1891G>T p.Val631Leu). Három FPLCA család esetében pedig ugyanazon rekurrens misszensz mutációt azonosítottunk az *OSMR* génen (c.1853G>C p.Gly618Ala). Az újonnan azonosított misszensz mutációk a *OSMR*β fehérje extracelluláris fibronectin III domén (FNIII) területén helyezkednek el. Az ugyanazon mutációt hordozó családok esetében haplotípus vizsgálatot végeztünk, eredményeink alapján a három érintett családban a detektált mutáció ugyanazon alapító hatás eredményeként jöhetett létre, mivel az érintett családtagok ugyanazon haplotípust hordozták. Az FPLCA lézionális és egészséges bőrbopsziás minták összehasonlítása révén, génexpressziós vizsgálatainkkal a betegségben fokozott kifejeződést mutató keratinocita proliferációs markereket, csökkent expressziót mutató keratinocita differenciációs markereket, csökkent expressziót mutató epidermális őssejt markereket és anti-apoptotikus faktorokat, valamint fokozott kifejeződést mutató neurális markeret azonosítottunk. A keratinocita proliferációs és differenciációs markerek változásai feltehetően az FPLCA-s tünetes bőrben látható lichenifikációval hozható összefüggésbe, míg a neurális faktorok változásai a lézionális bőrben kialakuló pruritussal magyarázhatóak. Vizsgálati eredményeink tovább bővítik az *OSMR* gén mutációs spektrumát, segítik genotípus-fenotípus összefüggések feltárását és hozzájárulnak a betegség pathomechanizmusának jobb megértéséhez.

5.1.6. A *WNT10A* gén homozigóta nonszensz mutációja SSPS, míg compound heterozigóta misszensz és nonszensz mutációi és homozigóta misszensz mutációja OODD klinikai variáns kialakulását eredményezi

SSPS-ben az irodalomból ismert homozigóta nonszensz mutációt, c.321C>A p.Cys107X, azonosítottunk a *WNT10A* génen. Míg az OODD-ben szenvedő pácienseknél a *WNT10A* gén heterozigóta misszensz (c.682T>A p.Phe228Ile) és heterozigóta nonszensz (c.321C>A p.Cys107X) mutációinak kombinációját vagy a gén homozigóta misszensz mutációját (c.682T>A p.Phe228Ile) detektáltunk. Vizsgálati eredményeink hozzájárulnak a genotípus-fenotípus összefüggések feltárásában SSPS-ben és OODD-ben, illetve tovább erősítik azt a felvetést, hogy ezen két ritka betegség nem önálló kórkép, hanem a egy ugyanazon betegség eltérő megjelenésű klinikai variánsai. Munkacsoportunk közleményei óta (2010 és 2011) SSPS-ben nem született új, áttörő eredmény, ugyanakkor OODD-ben szenvedő páciensekben egy újonnan azonosított homozigóta splice site mutációt (2017) és további öt, az irodalomból még nem ismert új mutációt (2019) detektáltak.

5.1.7. A *CYLD* génen egy novum misszensz és két rekurrens nonszensz mutációt azonosítottunk, illetve igazoltuk, hogy ugyanazon mutáció eltérő klinikai variánsok – FC, MFT1 és BSS - kialakulását eredményezhetik, továbbá potenciális fenotípus módosító genetikai faktorokat azonosítottunk, melyek magyarázhatják a fenotípus diverzitást az ugyanazon mutációt hordozó páciensekben

Egy BSS-ben szenvedő szegedi család tünetes tagjaiban egy novum, az irodalomból eddig nem ismert heterozigóta, misszensz mutációt azonosítottunk (c.2613C>G p.His87Gln). Egy Szekszárd környéki BSS családban egy rekurrens, heterozigóta, nonszensz mutációt azonosítottunk a *CYLD* génen (c.2806C>T, p.Arg936X). Az azonosított mutációt egy BSS-ben szenvedő észak-angliai

család is hordozza, amelyben a tünetes családtagok azonban jóval enyhébb klinikai tüneteket mutatnak. Haplotípus vizsgálati eredményeink alapján ugyanazon mutációt a földrajzilag távoli két családban egymástól független mutációs események hozták létre, ami felveti a mutációs forráspont meglétének lehetőségét a génen.

Vizsgálataink további érdekessége, hogy ugyanazon kóroki mutáció hordozása ellenére az angliai és magyar páciensek klinikai tünetei között jelentős különbségek mutatkoztak a tünetek súlyosságát és diverzitását illetően. Az elvégzett WES vizsgálati eredmények összehasonlítása révén három lehetséges fenotípus módosító markert azonosítottunk: az rs1053023 SNP-t a *STAT3* génen, az rs1131877 SNP-t a *TRAF3* génen és az rs202122812 SNP-t a *NBR1* génen. Jelenleg folynak a variánsok kóroki folyamatokat befolyásoló hatásának feltérképezését célzó *in vitro* funkcionális vizsgálatok. Az irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy az azonosított fenotípus módosító faktorok az NF- κ B jelátviteli útvonalon keresztül a gyulladás és a daganat képződés folyamatok keresztül fejtik ki hatásukat.

Egy MFT1-ben szenvedő spanyol család esetében egy heterozigóta nonszensz mutációt azonosítottunk a *CYLD* génen (c.2272C>T p.Arg758X), melyet korábban már BBS-ben szenvedő osztrák páciensben és FC-vel diagnosztizált holland családban is detektáltak.

Vizsgálataink további megerősítésül szolgálnak, arra, hogy az MFT1, FC és BSS nem három különböző betegség, hanem ugyanazon kórkép eltérő klinikai megjelenésű variánsai. Eredményeink szemléltetik, hogy az új technológiák révén tágul a genodermatózisos univerzuma, ugyanakkor az új genotípus-fenotípus összefüggések feltárása révén bizonyos kórképek esetében az univerzum szűkülését is látjuk.

5.1.8. A *CTSC* génen egy novum deléciót és egy rekurrens nonszensz mutációt azonosítottunk, illetve igazoltuk, hogy ugyanazon mutáció eltérő klinikai variánsok – PLS és HMS - kialakulását eredményezhetik, továbbá potenciális fenotípus módosító genetikai faktorokat azonosítottunk, melyek magyarázhatják a fenotípus diverzitást az ugyanazon mutációt hordozó páciensekben

Egy PLS-ben szenvedő szegedi család esetében az irodalomból még nem ismert, 7 bázist érintő, homozigóta deléciót azonosítottunk a *CTSC* génen (c.681delCATACAT p.T188fsX199), - ezzel egy időben, két kaposvári páciensben - egy PLS-ben és egy HMS-ben szenvedő páciensben az elvégzett genetikai vizsgálatok ugyanazon rekurrens, homozigóta, nonszensz mutációt igazolták (c.748C>T p.Arg250X) a *CTSC* génen.

A PLS-t és HMS-t korábban külön entitásoknak vélték, de az irodalmi adatok és a kapott vizsgálati eredményeink alapján felmerült, hogy a PLS és a HMS nem különböző betegségek, hanem ugyanazon kórkép eltérő klinikai variánsai.

További célkitűzésünk volt fenotípus-módosító genetikai variánsok azonosítása, melyek felelősek lehetnek az ugyanazon mutációt hordozó páciensekben az eltérő klinikai variánsok (PLS és HMS) kialakulásáért. Ezekhez a vizsgálatokhoz WES analízist végeztünk. Az elvégzett WES vizsgálati eredmények összehasonlítása révén kettő lehetséges fenotípus módosító genetikai variánst azonosítottunk: az rs34608771 SNP-t a *SH2D4A* génen és az rs55695858 SNP-t az *OBP2A* génen. Az irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy az azonosított fenotípus módosító faktorok az TCR és az ösztrogén receptor jelátviteli útvonalakon keresztül a gyulladás és a sejtproliferáció fokozásán keresztül fejtik ki hatásukat.

5.1.9. OCA-ban két novum mutációt azonosítottunk az *SLC45A2* génen és 11 rekurrens variánst a *TYR*, *OCA2* és *SLC45A2* géneken

Egy OCA-ban szenvedő kaposvári leány testvérpár esetében az elvégzett genetikai vizsgálatokkal egy novum, heterozigóta misszensz (c.1226G>A p.Gly409Asp) és egy novum, heterozigóta nonszensz (c.1459C>T p.Gln437X) mutációt detektáltunk az *SLC45A2* génen. Az

elvégzett genetikai vizsgálatok alapján a testvérpár klinikai tüneteinek háttérében az OCA4 izolált forma igazolódott.

Vizsgálatainkba további 11 OCA páciens is bevonásra került. A klinikai tünetek alapján az OCA altípusba történő besorolás nem volt lehetséges, az OCA1, OCA2 és OCA4 variánsok fennállása volt valószínűsíthető. Ezen leggyakoribb klinikai variánsok a melanin szintézis folyamatának különböző pontokon létrejövő defektusai következtében alakulnak ki.

Az elvégzett genetikai vizsgálatok során 11 rekurrens variánst azonosítottunk, melyek hozzájárulhatnak az OCA fenotípus kialakulásához.

Az azonosított genetikai variánsok alapján a pácienseket a következő izolált klinikai formákba kerültek besorolásra: A 11-ből 8 páciens esetében az OCA1 izolált forma igazolódott. Egy páciens esetében OCA1/OCA4 átmeneti izolált forma került diagnosztizálásra. Két páciens esetében betegséget okozó mutációt nem detektáltunk a *TYR*, *OCA2* és *SLC45A2* géneken, esetükben a diagnosztikai besorolás nem volt lehetséges.

Az irodalmi adatokkal korrelál, hogy az izolált OCA esetek 10-25%-ának genetikai háttere felderítetlen marad a leggyakoribb OCA formák kóroki génjeinek mutáció szűrésével. Ezekben az esetekben a háttérben feltehetően további ritka OCA variánsok kóroki génjeinek kóroki mutációi állhatnak.

5.1.10. CARD14-asszociált papuloszkvamózus eruptióval járó betegségspektrum magába foglalja mind a PRP-t, mind a psoriasist

Egy PRP-ben szenvedő magyar nőbeteg esetében összesen négy, az irodalomból ismert variánst detektáltunk a *CARD14* génen: egy misszensz mutációt, egy splice site és két misszensz polimorfizmust. A detektált variánsok közül a két misszensz polimorfizmus korábban már pikkelysömörös betegekben is kimutatásra került több egymástól független vizsgálatban.

PRP-ben szenvedő további páciensek (n=18) esetében is elvégeztük a *CARD14* gén mutáció szűrését. Összesen nyolc, az irodalomból már ismert *CARD14* variánst azonosítottunk: 2 mutációt és 6 polimorfizmust. A vizsgált 19 páciensből 10 hordozott *CARD14* variánst. A 10 páciensből 8 hordozott olyan *CARD14* variánst, amelyet korábban psoriasisban szenvedő páciensekben is detektáltak és 10-ből 6 páciens esetében hajlamosító variánsok kombinációját is detektáltuk. Az azonosított variánsok a betegség lefolyásával, súlyosságával vagy a különböző bőrgyógyászati kezelésekre adott terápiás válasszal nem mutattak összefüggést.

Vizsgálati eredményeink arra utalnak, hogy a *CARD14* variánsok feltehetőleg nem egyedülállóan a PRP vagy a psoriasis genetikai jellegzetességei. Craiglow és munkatársai (2018) a *CARD14*-nek a PRP-ben és a psoriasisban betöltött szerepének vizsgálata kapcsán javasolta a nevezéktan módosítását *CARD14*-asszociált papuloszkvamózus eruptióra, ami jól mutatja, hogy a PRP-t és a pikkelysömört ugyanazon betegség-spektrum különböző részeként kapcsolná össze.

5.1.11. A genotípus-fenotípus összefüggések megismerésének jelentősége

A ritka monogénis bőrbetegségek közül számos kórkép igen súlyos, akár az érintett páciensek várható élettartamát is csökkentheti (az általam vizsgálatok közül például a TAFOCS betegség vagy az epidermolízis bulloza), illetve vannak további kórképek, amelyek az élettartamot nem csökkentik, de igen stigmatizáló tünetekkel járnak az érintettek számára, úgy mint a Brooke-Spiegler szindróma, okulokután albinizmus vagy a *CARD14*-asszociált papuloszkvamózus eruptióval járó betegségspektrum. Mindezek fényében a genotípus-fenotípus összefüggések feltárásának óriási jelentősége van, mivel a páciensek számára arról adhat felvilágosítást, hogy az adott mutáció hordozása milyen súlyos klinikai tünetekkel járhat, mi lesz a betegség várható prognózisa. A genotípus-fenotípus összefüggések feltárása a páciensek kezelőorvosait is nagymértékben segítheti, a páciensek alcsoportokba történő besorolásában például a

különböző kezelések várható terápiás hatékonyságának szempontjából. A genotípus-fenotípus korrelációkon túl a fenotípus módosító faktorok azonosítása új potenciális terápiás célpontokat tárna fel és hozzájárulnak a betegség pathomechanizmusának jobb megértéséhez, mint például a *CYLD* gén vagy a *CTSC* gén mutációihoz kapcsolt fenotípus spektrumok esetében.

5.2. Funkcionális vizsgálatok

5.2.1. A TAFOCS betegség pathomechanizmusa p53 mediált

A TAFOCS szindrómát munkacsoportunk írta le először. A betegség autoszómális domináns öröklődésmentet mutat, jellegzetes főbb klinikai tünetei a bőrön kialakuló teleangiectasia és a malignus daganat kialakulásának fokozott kockázata, mely leggyakrabban az oropharynx területére lokalizált. Az elvégzett genetikai vizsgálatok kóroki génként az *ATR* gént azonosították, kóroki mutációként egy heterozigóta, misszensz mutációt azonosítottunk (c.6431A>G p.Gln2144Arg), melyet valamennyi vizsgált beteg családtag hordozott. A c.6431A>G, p.Gln2144Arg *ATR* mutáció egy újonnan azonosított mutáció, mindeddig nem volt ismert az irodalomból. Az *ATR* fehérjének a mutáció által érintett területén egy ismert funkcionális domén, a FAT domén helyezkedik el. Az irodalmi adatokból ismert, hogy az *ATR* fehérje FAT doménje az AIMP3 fehérjéhez kapcsolódva a p53 aktiválásában játszik fontos szerepet.

Megvizsgáltuk a p53 fehérje mennyiségét hydroxyurea aktiváció előtt és után a mutációt hordozó fibroblasztokban és egészséges egyénekből izolált fibroblasztokban. A mutációt hordozó fibroblasztokban csökkent p53 mennyiséget detektáltunk. Funkcionális vizsgálataink alapján feltételezzük, hogy az azonosított novum misszensz mutáció az *ATR* génen a p53 szint csökkenése révén járulhat hozzá a betegség tüneteinek kialakulásához.

5.2.2. FPLCA-ban azonosítottuk a főbb tünetek, mint a pruritus és a lichenifikáció kialakulásának hátterében álló génexpressziós eltéréseket

Két FPLCA-ban szenvedő család esetében két új, az irodalmi adatokból korábban nem ismert misszensz mutációk (c.1939G>T p.Asp647Tyr, c.1891G>T p.Val631Leu), három FPLCA család esetében pedig ugyanazon rekurrens misszensz mutációt azonosítottunk az *OSMR* génen (c.1853G>C p.Gly618Ala). FPLCA lézionális és egészséges bőrbiopsziás minták összehasonlítása révén, génexpressziós vizsgálatainkkal FPLCA-ban fokozott kifejeződést mutató keratinocita proliferációs markereket, csökkent expressziót mutató keratinocita differenciációs markereket, csökkent expressziót mutató epidermális őssejt markereket és anti-apoptotikus faktorokat, valamint fokozott kifejeződést mutató neurális markeret azonosítottunk. A keratinocita proliferációs és differenciációs markerek változásai feltehetően az FPLCA-s tünetes bőrben látható lichenifikációval hozhatók összefüggésbe, míg a neurális faktorok változásai a lézionális bőrben kialakuló pruritussal magyarázhatóak. Vizsgálati eredményeink hozzájárulnak a betegség pathomechanizmusának jobb megértéséhez.

5.2.3. A *CYLD* gén novum misszensz mutációja feltehetően a deubikvitációs aktivitás csökkenése révén eredményezi a BSS betegség kialakulását

Egy BSS-ben szenvedő szegedi család tünetes tagjaiban egy novum, az irodalomból eddig nem ismert heterozigóta misszensz mutációt azonosítottunk (c.2613C>G p.His871Gln). Az elvégzett funkcionális vizsgálataink során a mutációt hordozó fibroblasztokból származó NEMO fehérje esetében jelentősen fokozott ubikvitináltságot detektáltunk, ami arra utalt, hogy az azonosított *CYLD* mutáció hordozása csökkenti az enzim deubikvitinációs aktivitását. Vizsgálati eredményeink hozzájárulnak a betegség pathomechanizmusának jobb megértéséhez.

5.2.4. CARD14-asszociált papuloszkvamózus eruptióval járó betegségspektrum magába foglalja mind a PRP-t, mind a psoriasist

Egy PRP-ben szenvedő magyar nőbeteg esetében összesen négy, az irodalomból már ismert variánst detektáltunk a *CARD14* génen: egy misszensz mutációt, egy splice site és két misszensz polimorfizmust detektáltunk. A detektált variánsok közül a két misszensz polimorfizmus korábban már pikkelysömörös betegekben is kimutatásra került több egymástól független vizsgálatban. Az elvégzett funkcionális vizsgálatok eredményei alapján a vizsgált nőbetegben a detektált *CARD14* variánsok fokozott NF- κ B aktivitás révén járul hozzá a PRP kialakulásához.

Vizsgálati eredményeink arra utalnak, hogy a *CARD14* variánsok, feltehetőleg nem egyedülállóan a PRP vagy a psoriasis genetikai jellegzetességei. A detektált fokozott NF- κ B aktivitás miatt lehetséges, hogy inkább a mind a PRP-ben, mind a psoriasisban kialakuló krónikus gyulladással hozhatóak összefüggésbe.

5.2.5. A szabályozó RNS-molekulák target fehérjéinek meghatározása bőrben

A génexpresszió szabályozásában a nem transzlálódó RNS-molekulák szerepe egyre jobban feltérképezett. Azonban a téma komplexitását jól mutatja, hogy egy-egy ilyen szabályozó molekula több száz különböző fehérje kifejeződését befolyásolhatja, illetve egy-egy fehérje kifejeződése is számos RNS-molekula szabályozó hatása alatt állhat. A szabályozó RNS-molekulák kapcsán végzett molekuláris biológiai vizsgálataink középpontjában a *PRINS* hosszú nem kódoló RNS és a mikroRNS-125b állnak.

A *PRINS* csendesítése HeLa sejtekben a *G1P3*, *RAD52*, *ZNF207*, *ANXA7* és a *BCL9* gének expresszió csökkenését eredményezte. Ezen gének közül a *G1P3* fehérje szinten jelentős emelkedést mutat a lézió melletti és a lézionális psoriasisos epidermiszben az egészséges epidermiszhez képest. Vizsgálati eredményeink alapján feltételezzük, hogy a *G1P3* a *PRINS* szabályozása alatt áll, tisztázva ezzel egy új, eddig az irodalomból nem ismert, pathomechanizmust, amely révén a *PRINS* hozzájárul a psoriasis kialakulásához.

Bioinformatikai analízissel az *FGFR2* gén 3' UTR régiójában 4 lehetséges mikroRNS-125b kötőhelyet azonosítottunk. Így felmerült a lehetőség, hogy a mikroRNS-125b-nek a keratinociták proliferációjára gyakorolt szabályozó hatása legalább részlegesen az *FGFR2* révén mediált. Vizsgálati eredményeink alapján mind az *FGFR2* csendesítés, mind a mikroRNS-125b csendesítés a proliferáció jelentősen csökkenését eredményezi a keratinocitákban. Vizsgálati eredményeink alapján feltételezzük, hogy az *FGFR2* a mikroRNS-125b szabályozása alatt áll, tisztázva ezzel egy új, eddig az irodalomból nem ismert mechanizmust, amely révén a mikroRNS-125b hozzájárulhat a proliferációs rendellenességek kialakulásához a bőrben.

Munkacsoportunk közleményei óta (2010 és 2011) a bőrgyógyászati vonatkozások tekintetében a *PRINS* további funkciója került tisztázásra, mivel fokozott kifejeződése csökkenti a keratinocitákban a gyulladáshoz mediátorok termelődését, a mikroRNS-125b esetében pedig újabb target (*Akt3*) került azonosításra, melyen keresztül a keratinociták proliferációjának szabályozása megvalósul.

5.2.6. A funkcionális vizsgálatok jelentősége

A ritka monogénis bőrbetegségek esetében a funkcionális vizsgálatok jelentősége abban rejlik, hogy segítenek feltérképezni a vizsgált betegség pathomechanizmusát. A TAFOCS betegségben - melynek első leírója munkacsoportunk - nem volt ismert a genetikai háttér és a betegség kialakulási mechanizmusa, így a kóroki *ATR* gén és mutációjának azonosítása valamint a funkcionális vizsgálatok révén feltárt mechanizmus, mely szerint p53 mediált betegségről van szó igen nagy tudományos jelentőséggel bír. Más vizsgált genodermatózis esetében, a funkcionális vizsgálatok egy-egy újonnan azonosított mutáció jellemzése kapcsán kerültek

elvégzésre annak vizsgálata céljából, hogy a mutáció hordozása hogyan járulhat hozzá az adott betegség kialakulásához, erre példa az FPLCA-ban és BSS-ben végzett vizsgálatok. A funkcionális vizsgálatoknak ugyanakkor már az irodalomból ismert genetikai variánsok kapcsán is óriási jelentősége lehet, mint például a *CARD14* szerepének feltárása esetében. Vizsgálati eredményeink arra utalnak, hogy a *CARD14* variánsok feltehetőleg nem egyedülállóan a PRP vagy a psoriasis genetikai jellegzetességei. A detektált fokozott NF- κ B aktivitás miatt lehetséges, hogy inkább a mind a PRP-ben, mind a psoriasisban a kialakuló krónikus gyulladásal hozhatóak összefüggésbe.

Mindezek alapján az értekezésben bemutatott a funkcionális vizsgálatok - melyek kapcsán a molekuláris biológiai vizsgálatok széles skáláját végeztük el - nagymértékben hozzájárultak a vizsgált betegségek kialakulási mechanizmusának feltérképezéséhez, illetve jobb megismeréséhez.

5.3. Terápiás fejlesztések

5.3.1. Az RDEB-ben alkalmazott allogén fibroblaszt injekciók hatékonyságának mechanizmusának hátterében a páciens saját C7 termelésének fokozódása állhat, melyet feltehetően az injekciók által kiváltott HB-EGF emelkedés indukál

Az RDEB-ben korábbi klinikai megfigyelések igazolták, hogy az intradermális allogén fibroblaszt injekciók az injektált területen a bőr fragilitását csökkentik és részlegesen helyreállítják a C7 fehérje mennyiségét a DEJ-ben. Felmerült a kérdés, hogy vajon az allogén fibroblaszt terápia fenotípust javító hatásának hátterében a beinjekciózott fibroblasztokból származó C7, vagy a páciens saját keratinocitái és fibroblasztjai által termelt C7 fehérje a felelős. Ennek a vizsgálata céljából egy olyan RDEB pácienszt választottunk, akinél két heterozigóta mutáció felelős a betegség kialakulásáért, az egyik c.2044C>T p.Arg682X nonszensz mutáció, a másik az IVS87+4A>G splice site mutáció, ez utóbbi az átíródó COL7A1 mRNS-en a 87. exonjának a kiesését eredményezi. Vizsgálati eredményeink alapján a COL7A1 mRNS kifejeződésének maximuma az allogén fibroblaszt injekciót követő 1-3 hónapban következett be. A COL7A1 mRNS termelés 2/3-át a beteg saját kollagénje adta. Génexpressziós vizsgálati eredményeink alapján az allogén fibroblaszt injekciók C7 termelődést fokozó hatását feltehetően a HB-EGF mediálja.

Eredményeink jól korrelálnak, illetve magyarázatul szolgálnak azon klinikai megfigyelésre is, miszerint az allogén fibroblaszt injekciók hatékonyabbak azon RDEB pácienseknél, akiknél a C7 termelés csökkenése, nem pedig teljes hiánya van jelen. Vizsgálati eredményeink hozzájárulnak ahhoz, hogy az allogén fibroblaszt injekciós kezeléstől (sejtterápia) eljuthassunk a gyógyszeres kezelés kidolgozásáig, illetve potenciálisan hozzájárulhat későbbi, új kezelési lehetőségek kidolgozásához ebben az igen súlyos, rossz életminőséggel és csökkent várható élettartammal járó ritka betegségben. Vizsgálati eredményeinkből egy szabadalmi bejelentés is született (Nagy N, McGrath JA: Medical use of heparin-binding egf-like growth factor, GBGB1014097.8A, nemzetközi szabadalom, közzététel: 2010, végleges oltalom: 2011).

Munkacsoportunk közleménye óta (2011) számos új áttörés született ebben a témában, jól mutatva, hogy a genodermatózisos esetekben az oki terápiás alternatívák fejlesztése az elmúlt évek orvos biológiai kutatásainak fókuszában vannak világszerte. Az áttöréseket tekintve három fő csoportba sorolhatjuk őket: új sejtterápiás, új gyógyszeres kezelési alternatívák és új génterápiás eljárások. Csontvelői őssejt illetve genetikailag korrigált indukált pluripotens őssejt kezeléssel javították az RDEB-ben szenvedő páciensek klinikai tüneteit. A gyógyszeres kezelések közül az amlexanox, a gentamicin és a losartan jelentősen javítják az epidermolízis bullozában szenvedő páciensek klinikai tüneteit. Az új génterápiás eljárásokat tekintve sikerrel jutatták be

in vivo kezelés során a *COL7A1* gént lentivirális vektorral RDEB páciensek fibroblasztokjaiba, a kezelés hatékonynak és biztonságosnak bizonyult. *In vivo* génterápia során retrovirális vektorral is sikeresen korrigálták a *COL7A1*-et RDEB páciensek fibroblasztjaiban, valamint a CRISPR/Cas9 rendszer segítségével sikerrel korrigálták RDEB páciensekben a *COL7A1* gént.

5.3.2. A terápiás fejlesztések jelentősége

Eredményeink közül az allogén fibroblaszt injekciók C7 termelődést fokozó hatásának vizsgálata RDEB-ben jól szemlélteti, hogy ezekben a ritka mongénes betegségekben jelenleg is számos új terápiás modalitás klinikai vizsgálata folyik és a betegség genetikai hátterének felderítése, a háttérben álló ok felderítése nagymértékben hozzájárul ezen új terápiás lehetőségek fejlesztéséhez. A fibroblaszt injekciók kapcsán megállapítottuk, hogy a sejttterápiával az RDEB kialakulását eredményező C7 hiány csökkenthető, a fenotípus javul az alkalmazás területén. További vizsgálatunk célja az volt, hogy kiderítsük felváltható-e a sejttterápia gyógyszeres kezeléssel. Eredményeink alapján a HB-EGF alkalmazása hatékony alternatívája lehet a sejttterápiának (Szabadalom: Nagy N, McGrath JA: Medical use of heparin-binding egf-like growth factor. Nemzetközi szabadalom: GBGB1014097.8A). A jövőben eredményeink remélhetőleg egy új, hatékony, gyógyszeres kezelés kidolgozásának alapjául szolgálnak RDEB-ben.

A *CYLD* gén mutációhoz kapcsolt fenotípus spektrum különböző variánsaiban – FC, MFT1 és BSS – szenvedő páciensek, a betegségben érintett családok regisztrációja megtörtént külföldi kollaboráció keretében egy jelenleg Nagy-Britanniában már engedélyezett és folyamatban lévő klinikai vizsgálatban. A klinikai vizsgálat célkitűzése egy már más betegség gyógyításában, leukémia és mieloproliferatív betegségek kezelésében, indikációban lévő tirozin kináz inhibitor hatóanyagoknak, a lestaurtinibnak, új indikációban, a Brooke-Spiegler szindrómában, történő alkalmazása („repurposing”). A klinikai vizsgálat során A klinikai vizsgálat egyik vezetője, Dr. Neil Rajan (Newcastle, Anglia) együttműködő partnerünk.

Az bemutatott példák jól mutatják, hogy a genetikai és funkcionális vizsgálatoknak egyre nagyobb jelentősége van a genodermatózisok esetében, mivel hozzájárul új terápiás modalitások fejlesztéséhez, valamint a „repurposing” megközelítés alkalmazása révén már más betegségekben indikációban lévő terápiás alternatívák új indikációban történő alkalmazására.

6. Összefoglalás és saját megállapítások

1. A TAFOCS betegséget - egy új familiáris daganatszindrómát - munkacsoportunk írt le elsőként. A klinikai tünetek részletes dokumentálása mellett a TAFOCS háttérében álló kóroki génként az *ATR* gént azonosítottuk. A család esetében a betegség kialakulását az *ATR* gén újonnan azonosított, heterozigóta, misszensz mutációja eredményezte. Az elvégzett funkcionális vizsgálatok arra utalnak, hogy a mutáció a p53 szintjének csökkentése révén járul hozzá a betegség kialakulásához. Vizsgálati eredményeink új klinikai kórképpel és háttérbe álló kóroki mutációval kapcsolták össze az *ATR* gént, hozzájárulva ezzel a familiáris daganatszindrómák csoportjának jobb megismeréséhez.

A fentiek alapjául szolgáló közlemény:

Tanaka A, Weinel S, **Nagy N**, O'Driscoll M, Lai-Cheong JE, Kulp-Shorten CL, Knable A, Carpenter G, Fisher SA, Hiragun M, Yanase Y, Hide M, Callen J, McGrath JA. Germline mutation in *ATR* in autosomal- dominant oropharyngeal cancer syndrome. *Am J Hum Genet.* 2012;90:511-7.

2. A CPN betegség háttérében a *C16orf57* génen egy, az irodalomból eddig nem ismert homozigóta deléciót azonosítottunk egy CPN-ben szenvedő marokkói család vizsgálata kapcsán. Vizsgálati eredményeink hozzájárulnak a CPN-ben szenvedő páciensek esetében a genotípus-fenotípus összefüggések feltáráshoz és tovább bővítik a *C16orf57* gén ismert mutációinak spektrumát.

A fentiek alapjául szolgáló közlemény:

Tanaka A, Morice-Picard F, Lacombe D, **Nagy N**, Hide M, Taïeb A, McGrath J. Identification of a homozygous deletion mutation in *C16orf57* in a family with Clericuzio-type poikiloderma with neutropenia. *Am J Med Genet A.* 2010;152A:1347-8.

3. Az RDEB-ben detektált szomatikus mozaicizmusért a páciens keratinocitáiban kialakult egyszeri intragenikus kereszteződés állhat. Génexpressziós vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a korrekció a páciens keratinocitáiban jöhetett létre. Ennek a „spontán kialakult génterápiának” a háttérében álló mechanizmusnak a feltérképezése hozzájárulhat későbbi, új kezelési lehetőségek kidolgozásához ebben az igen súlyos, rossz életminőséggel és csökkent várható élettartammal járó ritka betegségben.

A fentiek alapjául szolgáló közlemény:

Almaani N, **Nagy N**, Liu L, Dopping-Hepenstal PJ, Lai-Cheong JE, Clements SE, Techanukul T, Tanaka A, Mellerio JE, McGrath JA. Revertant mosaicism in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 2010;130:1937-40.

4. Az RDEB-ben alkalmazott allogén fibroblaszt injekciók hatékonyságának háttérében a páciens saját C7 termelésének fokozódása állhat, melynek maximuma az allogén fibroblaszt injekciót követő 1-3 hónappal következik be. Génexpressziós vizsgálati eredményeink alapján az allogén fibroblaszt injekciók C7 termelődést fokozó hatását feltehetően a HB-EGF mediálja. Eredményeink magyarázatul szolgálnak azon klinikai megfigyelésre is, miszerint az allogén fibroblaszt injekciók hatékonyabbak azon RDEB pácienseknél, akiknél a C7 termelés csökkenése, nem pedig teljes hiánya van jelen. Vizsgálati eredményeink hozzájárulnak ahhoz, hogy az allogén fibroblaszt injekciós kezeléstől, mint sejttérápiától eljuthassunk a gyógyszeres kezelés kidolgozásáig, illetve hozzájárulhatnak későbbi, új kezelési lehetőségek kidolgozásához RDEB-ben. Vizsgálati eredményeinkből egy nemzetközi szabadalmi bejelentés is született.

A fentiek alapjául szolgáló közlemény:

Nagy N, Almaani N, Tanaka A, Lai-Cheong JE, Techanukul T, Mellerio JE, McGrath JA. HB-EGF induces COL7A1 expression in keratinocytes and fibroblasts: possible mechanism underlying allogeneic fibroblast therapy in recessive dystrophic epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol.* 2011;131:1771-4.

5. Egy HAEIII-ban szenvedő brit család esetében genetikai vizsgálataink során egy, az irodalomból már ismert, rekurrens, misszensz mutációt azonosítottunk az *F12* génen. Haplotípus vizsgálatot végeztünk, annak igazolására, hogy az európai HAEIII páciensek, akik ugyanezen mutációt hordozzák, egy azon alapító hatás eredményeként vagy pedig egymástól független mutációs események eredményeként hordozzák ugyanazon mutációt. Mivel az európai HAEIII páciensek és az általunk vizsgált brit HAEIII-ban szenvedő család mutációt hordozó tagjai ugyanazon haplotípust hordozzák, feltételezzük, hogy ugyanazon mutáció kialakulásához ezen páciensek esetében egy azon alapító hatás vezetett. Vizsgálati eredményeink arra utalnak, hogy a HAEIII betegség európai elterjedéséért feltehetően ugyanazon alapító hatás a felelős.

A fentiek alapján szolgáló közlemények:

Nagy N, Greaves MW, Tanaka A, McGrath JA, Grattan CE. Recurrent European missense mutation in the F12 gene in a British family with type III hereditary angioedema. *J Dermatol Sci.* 2009;56:62-4.

Nagy N, Greaves MW, Tanaka A, McGrath JA, Grattan CE. Recurrent European missense mutation in the F12 gene in a British family with type III hereditary angioedema. *J Dermatol Sci.* 2009;56:62-4.

6. FPLCA-ban két novum, heterozigóta misszensz mutációt és egy rekurrens, misszensz mutációt azonosítottunk az *OSMR* génen. Az újonnan azonosított misszensz mutációk a *OSMR*β fehérje extracelluláris FNIII doménjében helyezkednek el. Az ugyanazon mutációt hordozó családok esetében haplotípus vizsgálatot végeztünk, eredményeink alapján a három érintett családban a detektált mutáció ugyanazon alapító hatás eredményeként jöhetett létre. Génexpressziós vizsgálatainkkal FPLCA-ban keratinocita proliferációs és differenciás markerek változásai detektáltak, ami feltehetően a lichenifikációval hozható összefüggésbe, illetve neurális faktorok változásait detektáltuk, ami a pruritus kialakulásához kapcsolható. Vizsgálati eredményeink tovább bővíti az *OSMR* gén mutációs spektrumát, segítik a genotípus-fenotípus összefüggések feltárását és hozzájárulnak a betegség pathomechanizmusának jobb megértéséhez.

A fentiek alapján szolgáló közlemény:

Tanaka A, Lai-Cheong JE, van den Akker PC, **Nagy N**, Millington G, Diercks GF, van Voorst Vader PC, Clements SE, Almaani N, Techanukul T, Hide M, South AP, McGrath JA. The molecular skin pathology of familial primary localized cutaneous amyloidosis. *Exp Dermatol.* 2010;19:416-23.

7. SSPS-ben az irodalomból ismert, homozigóta, nonszensz mutációt azonosítottunk a *WNT10A* génen. Míg az ODD-ben a *WNT10A* gén heterozigóta misszensz és heterozigóta nonszensz mutációinak kombinációját vagy a gén homozigóta misszensz mutációját detektáltunk. Vizsgálati eredményeink hozzájárulnak a genotípus-fenotípus összefüggések feltárásához SSPS-ben és ODD-ben, illetve tovább erősítik azt a felvetést, hogy ez a két ritka betegség nem önálló kórkép, hanem ugyanazon betegség eltérő megjelenésű klinikai variánsai.

A fentiek alapján szolgáló közlemények:

Wedgeworth EK, **Nagy N**, White JM, Pembroke AC, McGrath JA. Intra-familial variability of ectodermal defects associated with WNT10A mutations. *Acta Derm Venereol.* 2011;91:346-7.

Nagy N, Wedgeworth E, Hamada T, White JM, Hashimoto T, McGrath JA. Schöpf-Schulz-Passarge syndrome resulting from a homozygous nonsense mutation in WNT10A. *J Dermatol Sci.* 2010;58:220-2.

8. A *CYLD* génen egy novum misszensz és két rekurrenz nonszensz mutációt azonosítottunk. Igazoltuk, hogy ugyanazon *CYLD* mutáció eltérő klinikai variánsok – FC, MFT1 és BSS - kialakulását eredményezhetik. Továbbá potenciális fenotípus módosító genetikai faktorokat azonosítottunk, melyek magyarázhatják a fenotípus diverzitást az ugyanazon mutációt hordozó páciensekben. Vizsgálati eredményeink hozzájárulnak a *CYLD* gén mutációs spektrumának bővítéséhez, genotípus-fenotípus összefüggések feltárásához, illetve tovább erősítik azt a felvetést, hogy a BSS, FC és MFT1 nem önálló kórképek, hanem ugyanazon betegség eltérő megjelenésű klinikai variánsai.

A fentiek alapján szolgáló közlemények:

Pap ÉM, Farkas K, Széll M, Németh G, Rajan N, **Nagy N.** Identification of putative genetic modifying factors associated with phenotypic diversity in Brooke-Spiegler syndrome. *Exp Dermatol.* 2020 Aug 3. doi: 10.1111/exd.14161. Online ahead of print.

Farkas K, Deák BK, Sánchez LC, Martínez AM, Corell JJ, Botella AM, Benito GM, López RR, Vanecek T, Kazakov DV, Kromosoeto JN, van den Ouweland AM, Varga J, Széll M, **Nagy N.** 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;17:36.

Nagy N, Farkas K, Kemény L, Széll M. Phenotype-genotype correlations for clinical variants caused by *CYLD* mutations. *Eur J Med Genet.* 2015;58:271-8.

Nagy N, Rajan N, Farkas K, Kinyó A, Kemény L, Széll M. A mutational hotspot in *CYLD* causing cylindromas: a comparison of phenotypes arising in different genetic backgrounds. *Acta Derm Venereol.* 2013;93:743-5.

Nagy N, Farkas K, Kinyó A, Nemeth IB, Kis E, Varga J, Bata-Csorgo Z, Kemeny L, Szell M. A novel missense mutation of the *CYLD* gene identified in a Hungarian family with Brooke-Spiegler syndrome. *Exp Dermatol.* 2012;21:967-9.

9. A *CTSC* génen egy novum deléciót és egy rekurrenz nonszensz mutációt azonosítottunk, illetve igazoltuk, hogy ugyanazon mutáció eltérő klinikai variánsok – PLS és HMS - kialakulását eredményezheti, továbbá potenciális fenotípus módosító genetikai faktorokat azonosítottunk, melyek magyarázhatják a fenotípus diverzitást az ugyanazon mutációt hordozó páciensekben. Vizsgálati eredményeink hozzájárulnak a *CTSC* gén mutációs spektrumának bővítéséhez, genotípus-fenotípus összefüggések feltárásához, illetve tovább erősítik azt a felvetést, hogy a PLS és HMS nem önálló kórképek, hanem ugyanazon betegség eltérő megjelenésű klinikai variánsai.

A fentiek alapján szolgáló közlemények:

Pap ÉM, Farkas K, Tóth L, Fábos B, Széll M, Németh G, **Nagy N.** Identification of putative genetic modifying factors that influence the development of Papillon-Lefèvre or Haim-Munk syndrome phenotypes. *Clin Exp Dermatol.* 2020;45:555-9.

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;41:190-5.

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 Gen & Genom Med.* 2014;2:217-28.

Farkas K, Paschali E, Papp F, Vályi P, Széll M, Kemény L, **Nagy N**, Csoma Z. A novel seven-base deletion of the CTSC gene identified in a Hungarian family with Papillon-Lefèvre syndrome. Arch Dermatol Res. 2013;305:453-5.

10. OCA-ban két novum mutációt azonosítottunk az *SLC45A2* génen és 11 rekurrens variánst a *TYR*, *OCA2* és *SLC45A2* géneken. A genetikai vizsgálatok alapján a 13 vizsgált páciensből nyolc OCA1 izolált formában, kettő OCA4 izolált formában, egy OCA1/OCA4 átmeneti formában szenved és két páciens nem lehetett besorolni, mivel a *TYR*, *OCA2* és *SLC45A2* gének mutáció szűrésével a háttérben álló kóroki variánsok nem kerültek azonosításra. Vizsgálati eredményeink hangsúlyozzák az OCA betegségcsoport meglehetősen heterogén genetikai hátterét, ezért a genetikai vizsgálatok kapcsán a komplex megközelítés, a több lehetséges kóroki gén együttes szűrése javasolt a genetikai háttér feltérképezéséhez a páciensek pontos diagnosztikai besorolása céljából.

A fentiek alapjául szolgáló közlemények:

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;22:20.

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;18:27.

11. A 19 PRP-ben szenvedő betegből 10 hordozott a betegség kialakulására hajlamosító *CARD14* variánst. A 10-ből 8 hordozott olyan *CARD14* variánst, amelyet korábban psoriasisban szenvedő páciensekben is detektáltak. Vizsgálati eredményeink arra utalnak, hogy a *CARD14* variánsok, feltehetőleg nem egyedülállóan a PRP vagy a psoriasis genetikai jellegzetességei. A detektált fokozott NF-κB aktivitás miatt lehetséges, hogy inkább a mind a PRP-ben, mind a psoriasisban kialakuló krónikus gyulladásal hozhatóak összefüggésbe.

A fentiek alapjául szolgáló közlemények:

Gál B, Göblös A, Danis J, Farkas K, Sulák A, Varga E, **Nagy N**, Széll M, Kemény L, Bata-Csörgő Z. The management and genetic background of pityriasis rubra pilaris: a single-centre experience. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2019;33:944-9.

Danis J, Göblös A, Gál B, Sulák A, Farkas K, Török D, Varga E, Korom I, Kemény L, Széll M, Bata-Csörgő Z, **Nagy N**. Nuclear Factor κB Activation in a Type V Pityriasis Rubra Pilaris Patient Harboring Multiple CARD14 Variants. Front Immunol. 2018;9:1564.

12. A génexpresszió szabályozásában a nem transzlálódó RNS-molekulák szerepe egyre jobban feltérképezett, vizsgálati eredményeink két potenciális target fehérjét azonosítottak, melyek révén ezen RNS-molekulák kifejtik hatásukat a bőrben: A G1P3 kifejeződésének regulátora a *PRINS* lncRNA, az FGFR2 mRNS a mikroRNS-125b targetje.

A fentiek alapjául szolgáló közlemény:

Szegedi K, Sonkoly E, **Nagy N**, Németh IB, Bata-Csörgő Z, Kemény L, Dobozy A, Széll M. The anti-apoptotic protein G1P3 is overexpressed in psoriasis and regulated by the non-coding RNA, PRINS. Exp Dermatol. 2010;19:269-78.

Xu N, Brodin P, Wei T, Meisgen F, Eidsmo L, **Nagy N**, Kemény L, Stähle M, Sonkoly E, Pivarcsi A. MiR-125b, a microRNA downregulated in psoriasis, modulates keratinocyte proliferation by targeting FGFR2. J Invest Dermatol. 2011;131:1521-9.

7. Eredmények jövőbeni hasznosíthatósága

7.1. A genotípus-fenotípus összefüggések jövőbeni hasznosíthatósága

A genotípus-fenotípus összefüggések feltárásának jövőbeni hasznosíthatósága óriási, mivel a páciensek számára arról adhat felvilágosítást, hogy az adott mutáció hordozása milyen súlyos klinikai tünetekkel járhat, mi lesz a betegség várható prognózisa. A genotípus-fenotípus összefüggések feltárása a páciensek kezelőorvosait is nagymértékben segítheti, a páciensek alcsoportokba történő besorolásában például a különböző kezelések várható terápiás hatékonyságának szempontjából. A genotípus-fenotípus korrelációkon túl a potenciális fenotípus módosító faktorok azonosítása új potenciális terápiás célpontokat tár fel és hozzájárulnak a betegség pathomechanizmusának jobb megértéséhez.

Munkacsoportunk által azonosított eredmények közül a legjelentősebbek:

Új familiáris daganatszindróma, a TAFOCS leírása, háttérben álló kóroki *ATR* gén és kóroki mutáció azonosítása. Eredményeink tovább bővítik az ismert ritka monogénis bőrbetegségek univerzumát. A háttérben álló kóroki gén azonosítása pedig a jövőben hozzájárulhat ahhoz, hogy új, oki terápiás eljárásokat fejlesszenek ki a betegség kezelésére.

A CPN háttérben novum delécio azonosítása a *C16orf57* génen. A CPN-ben szenvedő páciensek esetében hozzájárultunk a genotípus-fenotípus összefüggések feltáráshoz és tovább bővítik a *C16orf57* gén ismert mutációinak spektrumát, valamint a betegség pathomechanizmusának jobb megismeréséhez. Eredményeink új terápiás modalitások kidolgozásához hozzájárulhatnak a jövőben.

FPLCA-ban azonosított novum mutációk esetében funkcionális vizsgálatok és recurrens mutációk esetében haplotípus vizsgálatok révén bővült az *OSMR* gén mutációs spektruma, új genotípus-fenotípus összefüggések tárultak fel. Vizsgálataim során azonosított mutációs forráspontoknak, mutációs szűrőpanelek kidolgozásában lehet nagy jelentősége, ami szintén jelentős gazdasági haszonnal járhat a jövőben.

HAELI-as típusában végzett genetikai vizsgálati eredményeink arra utalnak, hogy a betegség európai elterjedéséért feltehetően ugyanazon alapító hatás a felelős. Vizsgálataim során azonosított mutációs forráspontnak jelentős gazdasági haszna lehet a jövőben, mivel az *F12* gén egyetlen genetikai variánsának szűrésével az európai esetek olcsón, megbízhatóan azonosíthatóak.

Genetikai vizsgálatok révén bővült a *WNT10A* gén mutációihoz társuló betegség spektrum: homozigóta, nonszensz mutáció SSPS-t, homozigóta, misszensz mutáció illetve heterozigóta misszensz és heterozigóta nonszensz mutációinak kombinációja OODD kialakulását eredményezi. Az általam elsőként feltárt genotípus-fenotípus összefüggéseknek a betegség várható prognózisa szempontjából van jelentősége és a betegek terápiás alcsoportba történő besorolása szempontjából lehet jelentősége a jövőben új, oki terápiás eljárások fejlesztése során.

A *CYLD* gén novum és rekurrens mutációinak azonosítása FC-ben, MFT1-ben és BSS-ben, genotípus-fenotípus összefüggések feltárása. Igazolásra került, hogy az FC, MFT1, BSS nem önálló kórképek, hanem ugyanazon betegség eltérő megjelenésű klinikai variánsai.

A *CTSC* gén novum és rekurrens mutációinak azonosítása PLS és HMS szindrómákban. Genotípus-fenotípus összefüggések feltárása. Igazolásra került, hogy a PLS és HMS nem önálló kórképek, hanem ugyanazon betegség eltérő megjelenésű klinikai variánsai. A feltárt genotípus fenotípus összefüggéseknek a betegek terápiás alcsoportba történő besorolása szempontjából lehet jelentősége a jövőben új, oki terápiás eljárások fejlesztése során.

A *CTSC* és a *CYLD*-gén mutációi okozta betegség spektrumokban elvégeztük potenciális fenotípus módosító genetikai variánsok azonosítása, melyek magyarázhatják a fenotípus diverzitást az ugyanazon mutációt hordozó páciensekben. A betegségek prognóza szempontjából lehet jelentősége a jövőben.

OCA-ban a *TYR*, *OCA2* és *SCL45A2* gének együttes szűrése hatékony stratégiának igazolódott a páciensek pontos diagnosztikai besorolása céljából. A vizsgálataim során azonosított mutációs forrópontoknak mutációs szűrőpanelek kidolgozásában lehet nagy jelentősége, ami szintén jelentős gazdasági haszonnal járhat a későbbiekben.

7.2. A funkcionális vizsgálatok jövőbeni hasznosíthatósága

A ritka monogénes bőrbetegségek esetében a funkcionális vizsgálatok jövőbeni hasznosíthatósága abban rejlik, hogy segítenek feltérképezni a vizsgált betegség pathomechanizmusát hozzájárulva ezzel jövőbeni, új terápiás modalitások kidolgozásához.

A TAFOCS betegségben nem volt ismert a betegség kialakulási mechanizmusa, így a funkcionális vizsgálatok révén feltárt mechanizmus nagy tudományos jelentőséggel bír és a későbbiekben oki kezelési modalitások kidolgozásának alapjául szolgálhat.

Az FPLCA és BSS esetében a funkcionális vizsgálatok egy-egy újonnan azonosított mutáció jellemzése kapcsán kerültek elvégzésre annak vizsgálata céljából, hogy a mutáció hordozása hogyan járulhat hozzá az adott betegség kialakulásához. Az elvégzett vizsgálataink a jövőbeni páciensek számára igen hasznosok lehetnek, mivel olyan kérdésekre is választ adnak, miszerint egy-egy klinikai tünet hátterében milyen molekuláris biológiai eltérések vannak, ami az adott tünet célzott kezeléséhez is hozzájárulhat a jövőben.

A funkcionális vizsgálatoknak ugyanakkor már az irodalomból ismert genetikai variánsok kapcsán is óriási jelentősége lehet, mint például a *CARD14* variánsok vizsgálatának. Vizsgálati eredményeink arra utalnak, hogy a *CARD14* variánsok feltehetőleg nem egyedülállóan a PRP vagy a psoriasis genetikai jellegzetességei. A detektált fokozott NF- κ B aktivitás miatt lehetséges, hogy inkább a mind a PRP-ben, mind a psoriasisban kialakuló krónikus gyulladással hozhatóak összefüggésbe. Eredményeink a jövőben hozzájárulnak ahhoz, hogy a monogénes bőrbetegségeket klinikai tüneteinek túl oki hátterük, pathomechanizmusuk alapján csoportosítsák és oki terápiás modalitások kerüljenek kidolgozásra.

7.3. A terápiás fejlesztések jövőbeni hasznosíthatósága

A terápiás fejlesztéseknek kiemelkedően nagy jövőbeni hasznosíthatósága van, mivel új kezelési alternatívákat tesznek elérhetővé a jövőbeni páciensek számára, illetve a „Repurposing” megközelítés alkalmazásával egy már más betegség gyógyításában indikációban lévő hatóanyagoknak új indikációban történő alkalmazását teszi lehetővé.

Eredményeink közül az allogén fibroblaszt injekciók C7 termelődést fokozó hatásának vizsgálata RDEB-ben jól szemlélteti, hogy ezekben a ritka monogénes betegségekben jelenleg is számos új terápiás modalitás klinikai vizsgálata folyik és a betegség genetikai hátterének megismerése, a háttérben álló ok felderítése nagymértékben hozzájárul ezen új terápiás lehetőségek fejlesztéséhez. A fibroblaszt injekciók kapcsán megállapítottuk, hogy a sejttérápiával az RDEB kialakulását eredményező C7 hiány csökkenthető, a fenotípus javul az alkalmazás területén. További vizsgálatunk célja az volt, hogy kiderítsük felváltható-e a sejttérápia gyógyszeres kezeléssel. Eredményeink alapján a HB-EGF alkalmazása hatékony alternatívája lehet a sejttérápiának (Szabadalom: Nagy N, McGrath JA: Medical use of heparin-binding egf-like growth factor. Nemzetközi szabadalom: GBGB1014097.8A). A jövőben eredményeink remélhetőleg egy új, hatékony gyógyszeres kezelés kidolgozásának alapjául szolgálnak RDEB-ben.

A vizsgálataimban szereplő, a BSS betegségben érintett családok regisztrációja megtörtént külföldi kollaboráció keretében egy jelenleg Nagy-Britanniában már engedélyezett és folyamatban lévő klinikai vizsgálatban. A klinikai vizsgálat célkitűzése a „Repurposing” megközelítés alkalmazása a Brooke-Spiegler szindrómában szenvedő betegek esetében. A klinikai vizsgálat során egy már más betegség gyógyításában, leukémia és mieloproliferatív betegségek kezelésében, indikációban lévő tirozin kináz inhibitor hatóanyagnak, a lestaurtinibnak, új indikációban, a Brooke-Spiegler szindrómában, történő alkalmazása. A klinikai vizsgálat egyik vezetője, Dr. Neil Rajan (Newcastle, Anglia).

8. Publikációs lista

8.1. A doktori értekezés alapját képező 'in extenso' saját közlemények

1. Pap ÉM, Farkas K, Széll M, Németh G, Rajan N, **Nagy N**. Identification of putative genetic modifying factors associated with phenotypic diversity in Brooke-Spiegler syndrome. *Exp Dermatol*. 2020 Aug 3. doi: 10.1111/exd.14161. Online ahead of print.
2. Pap ÉM, Farkas K, Tóth L, Fábos B, Széll M, Németh G, **Nagy N**. Identification of putative genetic modifying factors that influence the development of Papillon-Lefèvre or Haim-Munk syndrome phenotypes. *Clin Exp Dermatol*. 2020;45:555-9.
3. Gál B, Göblös A, Danis J, Farkas K, Sulák A, Varga E, **Nagy N**, Széll M, Kemény L, Bata-Csörgő Z. The management and genetic background of pityriasis rubra pilaris: a single-centre experience. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019;33:944-9.
4. Danis J, Göblös A, Gál B, Sulák A, Farkas K, Török D, Varga E, Korom I, Kemény L, Széll M, Bata-Csörgő Z, **Nagy N**. Nuclear Factor κB Activation in a Type V Pityriasis Rubra Pilaris Patient Harboring Multiple CARD14 Variants. *Front Immunol*. 2018;9:1564.
5. 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;22:20.
6. 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;18:27.
7. 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;41:190-5.
8. Farkas K, Deák BK, Sánchez LC, Martínez AM, Corell JJ, Botella AM, Benito GM, López RR, Vanecek T, Kazakov DV, Kromosoeto JN, van den Ouweland AM, Varga J, Széll M, **Nagy N**. 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;17:36.
9. **Nagy N**, Farkas K, Kemény L, Széll M. Phenotype-genotype correlations for clinical variants caused by CYLD mutations. *Eur J Med Genet*. 2015;58:271-8.
10. **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 Gen & Genom Med*. 2014;2:217-28.
11. Farkas K, Paschali E, Papp F, Vályi P, Széll M, Kemény L, **Nagy N**, Csoma Z. A novel seven-base deletion of the CTSC gene identified in a Hungarian family with Papillon-Lefèvre syndrome. *Arch Dermatol Res*. 2013;305:453-5.
12. **Nagy N**, Rajan N, Farkas K, Kinyó A, Kemény L, Széll M. A mutational hotspot in CYLD causing cylindromas: a comparison of phenotypes arising in different genetic backgrounds. *Acta Derm Venereol*. 2013;93:743-5.
13. **Nagy N**, Farkas K, Kinyó A, Nemeth IB, Kis E, Varga J, Bata-Csörgő Z, Kemény L, Széll M. A novel missense mutation of the CYLD gene identified in a Hungarian family with Brooke-Spiegler syndrome. *Exp Dermatol*. 2012;21:967-9.
14. Tanaka A, Weinell S, **Nagy N**, O'Driscoll M, Lai-Cheong JE, Kulp-Shorten CL, Knable A, Carpenter G, Fisher SA, Hiragun M, Yanase Y, Hide M, Callen J, McGrath JA. Germline mutation in ATR in autosomal-dominant oropharyngeal cancer syndrome. *Am J Hum Genet*. 2012;90:511-7.
15. **Nagy N**, Almaani N, Tanaka A, Lai-Cheong JE, Techanukul T, Mellerio JE, McGrath JA. HB-EGF induces COL7A1 expression in keratinocytes and fibroblasts: possible mechanism underlying allogeneic fibroblast therapy in recessive dystrophic epidermolysis Bullosa. *J Invest Dermatol*. 2011;131:1771-4.
16. Wedgeworth EK, **Nagy N**, White JM, Pembroke AC, McGrath JA. Intra-familial variability of ectodermal defects associated with WNT10A mutations. *Acta Derm Venereol*. 2011;91:346-7.
17. Xu N, Brodin P, Wei T, Meisgen F, Eidsmo L, **Nagy N**, Kemény L, Stähle M, Sonkoly E, Pivarcsi A. MiR-125b, a microRNA downregulated in psoriasis, modulates keratinocyte proliferation by targeting FGFR2. *J Invest Dermatol*. 2011;131:1521-9.
18. Szegedi K, Sonkoly E, **Nagy N**, Németh IB, Bata-Csörgő Z, Kemény L, Dobozy A, Széll M. The anti-apoptotic protein G1P3 is overexpressed in psoriasis and regulated by the non-coding RNA, PRINS. *Exp Dermatol*. 2010;19:269-78.

19. Tanaka A, Lai-Cheong JE, van den Akker PC, **Nagy N**, Millington G, Diercks GF, van Voorst Vader PC, Clements SE, Almaani N, Techanukul T, Hide M, South AP, McGrath JA. The molecular skin pathology of familial primary localized cutaneous amyloidosis. *Exp Dermatol*. 2010;19:416-23.
20. **Nagy N**, Wedgeworth E, Hamada T, White JM, Hashimoto T, McGrath JA. Schöpf-Schulz-Passarge syndrome resulting from a homozygous nonsense mutation in WNT10A. *J Dermatol Sci*. 2010;58:220-2.
21. Almaani N*, **Nagy N***, Liu L, Dopping-Hepenstal PJ, Lai-Cheong JE, Clements SE, Techanukul T, Tanaka A, Mellerio JE, McGrath JA. Revertant mosaicism in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*. 2010;130:1937-40. *Osztott első szerzők
22. **Nagy N**, Grattan CE, McGrath JA. New insights into hereditary angio-oedema: Molecular diagnosis and therapy. *Australas J Dermatol*. 2010;51:157-62.
23. Tanaka A, Morice-Picard F, Lacombe D, **Nagy N**, Hide M, Taïeb A, McGrath J. Identification of a homozygous deletion mutation in C16orf57 in a family with Clericuzio-type poikiloderma with neutropenia. *Am J Med Genet A*. 2010;152A:1347-8.
24. **Nagy N**, McGrath JA. Blistering skin diseases: a bridge between dermatopathology and molecular biology. *Histopathology*. 2010;56:91-9.
25. **Nagy N**, Greaves MW, Tanaka A, McGrath JA, Grattan CE. Recurrent European missense mutation in the F12 gene in a British family with type III hereditary angioedema. *J Dermatol Sci*. 2009;56:62-4.

8.2. A doktori értekezés témakörében megjelent 'in extenso' saját közlemények

1. Cakmak Genc G, Dursun A, **Nagy N**, Celikmakas A, Acuner B. Brooke-Spiegler Syndrome: Two Patients From a Turkish Family With Multiple Familial Trichoepithelioma. *Am J Dermatopathol*. 2019;41:778-80.
2. Seren S, Rashed Abouzaid M, Eulenberg-Gustavus C, Hirschfeld J, Nasr Soliman H, Jerke U, N'Guessan K, Dallet-Choisy S, Lesner A, Lauritzen C, Schacher B, Eickholz P, **Nagy N**, Szell M, Croix C, Viaud-Massuard MC, Al Farraj Aldosari A, Ragunatha S, Ibrahim Mostafa M, Giampieri F, Battino M, Cornillier H, Lorette G, Stephan JL, Goizet C, Pedersen J, Gauthier F, Jenne DE, Marchand-Adam S, Chapple IL, Kettritz R, Korkmaz B. Consequences of cathepsin C inactivation for membrane exposure of proteinase 3, the target antigen in autoimmune vasculitis. *J Biol Chem*. 2018;293:12415-28.
3. Veres K, **Nagy N**, Háromszéki B, Solymosi Á, Vass V, Széll M, Szalai ZZ. The First Reported Case of Trichothiodystrophy in Hungary: A Young Male Patient with Mutations in the ERCC2 Gene. *Acta Dermatovenerol Croat*. 2018;26:169-72.
4. **Nagy N**, Medvecz M, Széll M. Genodermatosisek korszerű diagnosztikája. *BŐR VENER SZEMLE*. 2018;94:45-9.
5. Sulák A, Tripolszki K, Farkas K, Széll M, **Nagy N**. Phenotypic diversity of the recurrent p.Val379Leu missense mutation of the TGM1 gene. *Dermatol Sinica*. 2018;36:89-92.
6. Baltás E, Kis E, **Nagy N**, Sohár N, Varga E, Széll M, Kemény L, Oláh J. Electrochemotherapy for Non-melanoma Skin Cancer in a Child with Xeroderma Pigmentosum. *Acta Derm Venereol*. 2017;97:962-4.
7. 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;42:763-6.
8. 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;59:223-6.
9. Hamon Y, Legowska M, Fergelot P, Dallet-Choisy S, Newell L, Vanderlynden L, Kord Valeshabad A, Acrich K, Kord H, Charalampos T, Morice-Picard F, Surplice I, Zoidakis J, David K, Vlahou A, Ragunatha S, **Nagy N**, Farkas K, Széll M, Goizet C, Schacher B, Battino M, Al Farraj Aldosari A, Wang X, Liu Y, Marchand-Adam S, Lesner A, Kara E, Korkmaz-Icöz S, Moss C, Eickholz P, Taieb A, Kavukcu S, Jenne DE, Gauthier F, Korkmaz B. Analysis of urinary cathepsin C for diagnosing Papillon-Lefèvre syndrome. *FEBS J*. 2016;283:498-509.
10. Kemény L, **Nagy N**, Csoma Z, Szabó K, Eros G. Pharmacological Targeting of the Epidermal Barrier. *Curr Pharm Des*. 2016;22:5373-81.
11. Csoma Z, Mari J, Franczia P, Varga E, Kemény L, **Nagy N**. Epidermolytic ichthyosis. *Bőr Vener Szemle*. 2016;92-.288-91.
12. 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;307:891-5.
13. **Nagy N**, Farkas K, Kemény L, Széll M. Knowledge explosion for monogenic skin diseases. *W J Dermatol*. 2015;4:44-9.

14. Csoma Z, Tóth-Molnár E, Doró P, Szabó É, Tálosi G, Szabó H, Kemény L, Széll M, **Nagy N**. Magától gyógyuló kollodium bébi. *Bőr Vener Szemle*. 2015;91:113-6.
15. Rebane A, Runnel T, Aab A, Maslovskaja J, Rückert B, Zimmermann M, Plaas M, Kärner J, Treis A, Pihlap M, Haljasorg U, Hermann H, **Nagy N**, Kemény L, Erm T, Kingo K, Li M, Boldin MP, Akdis CA. MicroRNA-146a alleviates chronic skin inflammation in atopic dermatitis through suppression of innate immune responses in keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134:836-47.
16. Vályi P, Farkas K, Tripolszki K, Sulák A, Széll M, **Nagy N**, Nagy K. Recurrent European missense mutation in a Hungarian pedigree with Papillon-Lefèvre syndrome. *Fogorv Sz*. 2014;107:87-92.
17. Kinyó A, Vályi P, Farkas K, **Nagy N**, Gergely B, Tripolszki K, Török D, Bata-Csörgő Z, Kemény L, Széll M. A newly identified missense mutation of the EDA1 gene in a Hungarian patient with Christ-Siemens-Touraine syndrome. *Arch Dermatol Res*. 2014;306:97-100.
18. Csoma Z, Meszes A, Kemény L, **Nagy N**, Széll M, Gyurkovits Z, Bakki J, Orvos H. Epidermolysis bullosa simplex diagnosztizálása és kezelése újszülött osztályon. *Gyermekebőrgyógyászat*. 2014;65:46-8.
19. **Nagy N**, Farkas K, Kinyó Á, Fazekas B, Szabó K, Kollár E, Sztano B, Meszes A, Beke D, Kemény L, Rovó L, Széll M. A Synonymous Polymorphism of APCDD1 Affects Translation Efficacy and is Associated with Androgenic Alopecia. *J Life Sci (Libertyville)*. 2014;8:106-14.
20. **Nagy N**, Farkas K, Tripolszki K, Sulák A, Kemény L, Széll M. A cylindromatosis gén mutációi által okozott genodermatosisok. *Bőr Vener Szemle*. 2014;90:185-93.
21. **Nagy N**, Szabad G, Szolnoky G, Kiss-László Z, Dósa-Rácz É, Bata-Csörgő Z, Kemény L, Széll M. Chronic nonhealing wounds: could leg ulcer be hereditary. *Ulcers*. 2013;2013:1-4.
22. Kis E, Baltás E, Kinyó A, Varga E, **Nagy N**, Gyulai R, Kemény L, Oláh J. Successful treatment of multiple basalomas with bleomycin-based electrochemotherapy: a case series of three patients with Gorlin-Goltz syndrome. *Acta Derm Venereol*. 2012;92:648-51.
23. Meisgen F, Xu N, Wei T, Janson PC, Obad S, Broom O, **Nagy N**, Kauppinen S, Kemény L, Stähle M, Pivarcsi A, Sonkoly E. MiR-21 is up-regulated in psoriasis and suppresses T cell apoptosis. *Exp Dermatol*. 2012;21:312-4.
24. Farkas K, **Nagy N**, Kinyó A, Kemény L, Széll M. 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 Dermatol Res*. 2012;304:679-81.
25. **Nagy N**, Tanaka A, Techanukul T, McGrath JA. Common IL-31 gene haplotype associated with non-atopic eczema is not implicated in epidermolysis bullosa pruriginosa. *Acta Derm Venereol*. 2010;90:631-2.
26. Széll M, Baltás E, Bodai L, Bata-Csörgő Z, **Nagy N**, Dallos A, Pourfarzi R, Simics E, Kondorosi I, Szalai Z, Tóth GK, Hunyadi J, Dobozy A, Kemény L. The Arg160Trp allele of melanocortin-1 receptor gene might protect against vitiligo. *Photochem Photobiol*. 2008;84:565-71.

8.3. A doktori értekezés témaköréhez nem kapcsolódó 'in extenso' saját közlemények

1. Zombor M, Kalmár T, **Nagy N**, Berényi M, Telcs B, Maróti Z, Brandau O, Sztrihai L. A novel WDR62 missense mutation in microcephaly with abnormal cortical architecture and review of the literature. *J Appl Genet*. 2019;60:151-62.
2. Dávid É, Török D, Farkas K, **Nagy N**, Horváth E, Kiss Z, Oroszlán G, Balogh M, Széll M. Genetic investigation confirmed the clinical phenotype of congenital chloride diarrhea in a Hungarian patient: a case report. *BMC Pediatr*. 2019;19:16.
3. Márki S, Göblös A, Szlávics E, Török N, Balicza P, Bereznai B, Takáts A, Engelhardt J, Klivényi P, Vécsei L, Molnár MJ, **Nagy N**, Széll M. The rs13388259 Intergenic Polymorphism in the Genomic Context of the BCYRN1 Gene Is Associated with Parkinson's Disease in the Hungarian Population. *Parkinsons Dis*. 2018;2018:9351598.
4. Csoma Z, Franczia P, Kemény L, **Nagy N**. Szerzett cink-hiány esete koraszülöttnél. *Bőr Vener Szemle*. 2018;94:49-53.
5. **Nagy N**, Farkas K, Bata-Csörgő Z, Széll M, Kemény L. A hajhullás leggyakoribb formáinak patomechanizmusa és kezelése. *Orvostovábbk Szemle*. 2017;24:21-5.
6. Kövesdi E, Bene J, **Nagy N**, Horváth Á, Melegh B, Hadzsiev K. Importance of gross deletions in the diagnosis of tuberous sclerosis complex: the first Hungarian cases. *Orv Hetil*. 2017;158:1188-94.
7. Tripolszki K, Csányi B, Nagy D, Ratti A, Tiloca C, Silani V, Kereszty É, Török N, Vécsei L, Engelhardt JI, Klivényi P, **Nagy N**, Széll M. Genetic analysis of the SOD1 and C9ORF72 genes in Hungarian patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*. 2017;53:1-5.
8. 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:e00669.

9. Koumbaris G, Kypri E, Tsangaras K, Achilleos A, Mina P, Neofytou M, Velissariou V, Christopoulou G, Kallikas I, González-Liñán A, Benusiene E, Latos-Bielenska A, Marek P, Santana A, **Nagy N**, Széll M, Laudanski P, Papageorgiou EA, Ioannides M, Patsalis PC. Cell-Free DNA Analysis of Targeted Genomic Regions in Maternal Plasma for Non-Invasive Prenatal Testing of Trisomy 21, Trisomy 18, Trisomy 13, and Fetal Sex. *Clin Chem*. 2016;62:848-55.
10. Gajda A, Horváth E, Hortobágyi T, Gergev G, Szabó H, Farkas K, **Nagy N**, Széll M, Sztriha L. Nemaline myopathy type 2 (NEM2): two novel mutations in the nebulin (NEB) gene. *J Child Neurol*. 2015;30:627-30.
11. Herr G, Szenes M, Hohl G, Vinkler ME, Tüske G, Horváth J, Nagy G, Tihanyi M, Széll M, **Nagy N**, Gasztanyi B. The tip of the iceberg: multiple cutaneous sebaceous tumor in colon cancer. Muir-Torre syndrome--case report. *Orv Hetil*. 2015;156:979-84.
12. Zádori D, Máté A, Róna-Vörös K, Gergev G, Zimmermann A, **Nagy N**, Széll M, Vécsei L, Sztriha L, Klivényi P. The clinical manifestations of two novel SPAST mutations. *Clin Neurol Neurosurg*. 2015;136:82-5.
13. Vanya M, Jakó M, Szabó K, **Nagy N**, Farkas K, Janovák L, Bitó T, Bártfai G, Kemény L, Dékány I, Pjevac G, Grbović R, Krickovic PK, Kljajić D, Vejnović T, Novakov MA, Brkić S, Bogavac M, Kulauzov M. Új nanotechnológiai terápiás lehetőségek és genetikai predispozíció vizsgálata recurrens vulvovaginális candidiasisban és bakteriális vaginózisban szenvedő reprodukív korú nők körében. *Magyar Nőorv L*. 2014;77:20-5.
14. Kinyó Á, **Nagy N**, Oláh J, Kemény L, Bata-Csörgő Z. Ulcus vulvae acutum Lipschütz in two young female patients. *Eur J Dermatol*. 2014;24:361-4.
15. Horváth E, Farkas K, Herczegfalvi A, **Nagy N**, Széll M. Identification of a novel missense GLRA1 gene mutation in hyperekplexia: a case report. *J Med Case Rep*. 2014;8:233.
16. Horváth E, **Nagy N**, Széll M. Difficulties of genetic counselling in rare, mainly neurogenetic disorders. *Orv Hetil*. 2014;155:1221-7.
17. Horváth E, Horváth Z, Isaszegi D, Gergev G, **Nagy N**, Szabó J, Sztriha L, Széll M, Endreffy E. Early detection of Angelman syndrome resulting from de novo paternal isodisomic 15q UPD and review of comparable cases. *Mol Cytogenet*. 2013;6:35.
18. Kinyó Á, Belso N, **Nagy N**, Pálvölgyi A, Nagy I, Korom I, Varga E, Kemény L, Bata-Csörgő Z. Strontium ranelate-induced DRESS syndrome with persistent autoimmune hepatitis. *Acta Derm Venereol*. 2011;91:205-6.
19. Kemény L, **Nagy N**. Új lehetőségek a gyulladáságtól kezelések terén. *Bőr Vener Szemle*. 2011;87:98-101.
20. **Nagy N**, Kemény L. A halogénizáció és a szteroidhatás. *Lege Art Med*. 2011;21:271-9.
21. Kemény L, **Nagy N**. Hámsejtek szerepe a női nemi szervek veleszületett immunitásában. *Nőgyógy Onkol*. 2010;15:56-63.
22. Kemény L, **Nagy N**. New perspective in immunotherapy: local imiquimod treatment. *Orv Hetil*. 2010;151:774-83.
23. **Nagy N**, Bata-Csörgő Z, Varga E, Korom I, Kemény L. Eczema herpeticum. *Bőr Vener Sz*. 2009;85:11-3.
24. Szolnoky G, **Nagy N**, Kovács RK, Dósa-Rácz E, Szabó A, Bársony K, Balogh M, Kemény L. Complex decongestive physiotherapy decreases capillary fragility in lipedema. *Lymphology*. 2008;41:161-6.
25. **Nagy N**, Németh IB, Szabad G, Szolnoky G, Belső N, Bata-Csörgő Z, Dobozy A, Kemény L, Széll M. The altered expression of syndecan 4 in the uninvolved skin of venous leg ulcer patients may predispose to venous leg ulcer. *Wound Repair Regen*. 2008;16:495-502.
26. **Nagy N**, Szolnoky G, Szabad G, Bata-Csörgő Z, Balogh A, Klausz G, Györgyei J, Mándi Y, Dobozy A, Kemény L, Széll M. Genetic background of venous leg ulcer development. *Hun Med J*. 2008;2:391-405.
27. **Nagy N**, Szolnoky G, Szabad G, Bata-Csörgő Z, Balogh A, Klausz G, Mándi Y, Dobozy A, Kemény L, Széll M. Tumor necrosis factor-alpha -308 polymorphism and leg ulceration--possible association with obesity. *J Invest Dermatol*. 2007;127:1768-9.
28. **Nagy N**, Bata-Csörgő Z, Kopasz N, Szeg C, Pivarcsi A, Koreck A, Dobozy A, Kemény L, Széll M. The expression of keratinocyte growth factor receptor (FGFR2-IIIb) correlates with the high proliferative rate of HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol*. 2006;15:596-605.
29. **Nagy N**, Szolnoky G, Szabad G, Bata-Csörgő Z, Dobozy A, Kemény L, Széll M. Single nucleotide polymorphisms of the fibroblast growth factor receptor 2 gene in patients with chronic venous insufficiency with leg ulcer. *J Invest Dermatol*. 2005;124:1085-8.
30. **Nagy N**, Janáky M. Negatív típusú elektroretinogrammal járó kórképek. *Szemészet*. 2005;142:167-70.

9. Szabadalom

Szabadalom címe: **Medical use of heparin-binding egf-like growth factor (hb-egf)**

Szabadalom tulajdonosai: **Nagy Nikoletta**, John A. McGrath

Szabadalom azonosító száma: GBGB1014097.8A

Szabadalom típusa: Nemzetközi szabadalom

Közzététel éve: 2010

Végleges oltalom: 2011

10. Köszönetnyilvánítás

„Mindannyian csomópontok vagyunk egy olyan hálózatban, amely több milliárd más csomóponttal kapcsol össze minket...” Barabási Albert-László

Egy MTA Doktori Értekezésben összefoglalt kutatómunka minden esetben számos közreműködő közös eredménye. Jómagam is számtalan embernek tartozom köszönettel, mind szakmai, mind magánéleti területeken nyújtott támogatásukért. Nekik köszönhető, hogy ez az Értekezés megszületett.

Szeretnék köszönetet mondani **Prof. Dr. Széll Márta** odaadó szakmai és emberi támogatásáért, akinek a védőszárnyai alatt immár 2003 óta dolgozok. Kezdetben az SZTE ÁOK Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikán, mint tudományos diákköri munkát végző hallgató kapcsolódtam be a tudományos munkába. Professzor Asszony irányítása mellett, majd pedig 2012-től, mint az általa vezetett intézet, az ÁOK Orvosi Genetikai Intézet, adjunktusaként folytattuk a közös munkát. Továbbá köszönettel tartozom **Dr. Farkas Katalin** precíz szakmai munkájáért és barát támogatásáért, **Dr. Horváth Emese**, **Dr. Sulák Adrienn**, **Dr. Tripolszki Kornélia**, **Dr. Tóth Lola**, **Gárgyán Zsuzsanna** és az ÁOK Orvosi Genetikai Intézet valamennyi munkatársának szíves támogatásáért.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Kemény Lajos** és **Prof. Dr. Dobozy Attila** támogatásáért és, hogy lehetővé tette, hogy az SZTE ÁOK Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinikán folyó tudományos és betegellátó munkához csatlakozhattam. **Prof. Dr. Bata-Csörgő Zsuzsanna** mellett tanulhattam bele a bőrgyógyászati fekvőbeteg ellátásba. **Dr. Kinyó Ágnes** barátként és kollégaként is odaadóan támogatott és motivált a fejlődésben. **Dr. Csoma Zsanett**, **Dr. Szolnoky Győző**, **Dr. Németh István**, **Dr. Varga Erika**, **Dr. Korom Irma**, **Dr. Baltás Eszter**, **Dr. Kis Erika** és **Dr. Varga János** részt vettek közös tudományos munkáink során a betegek bevonásában, a mintavételezésben és a szövettani vizsgálatokban. **Dr. Göblös Anikó** és **Dr. Danis Judit** a laboratóriumi munkákban közreműködtek, valamint köszönettel tartozom az SZTE ÁOK Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika valamennyi munkatársának.

A szegedi klinikai központ további tanszékein dolgozó kollégáknak közreműködésükért, mint **Dr. Vályi Péter**, **Prof. Dr. Nagy Katalin**, **Dr. Papp Ferenc**, **Prof. Dr. Sztriha László**.

A páciensek országos szintű bevonásáért és szakmai együttműködésükért **Dr. Fábos Beáta**, **Dr. Tihanyi Mariann** kollégáknak.

Köszönettel tartozom a számos külföldi partnernek, akik nélkül a vizsgálatokat nem tudtuk volna elvégezni, **Dr. Neil Rajan**, **Prof. Dr. John McGrath**, **Dr. Akio Tanaka**, **Dr. Clive Grattan**, **Dr. Sonkoly Enikő** és **Dr. Pivarcsi Andor** nevét emelném ki elsősorban.

Köszönöm a pácienseknek a vizsgálatokban történt részvételüket.

Végül, legnagyobb hálával családomnak tartozom. Szeretném megköszönni **szüleimnek** és **testvéremnek** támogatásukat. A páromnak, **Veszelovszki Baláznak** és gyermekeinknek, **Fruzsínának** és **Vincének**, hogy szerető támogatásukra, motivációjukra minden körülmények között támaszkodhattam.