

## MTA doktori értekezés bírálata

*Nagy Nikoletta:* „Genotípus-fenotípus összefüggések feltárása, funkcionális vizsgálatok és terápiás fejlesztések monogénes betegségekben”

*Szalai Csaba*

Nagy Nikoletta MTA doktori értekezésében az elmúlt 10 év, főleg bőrbetegségek genetikai hátterét vizsgáló kutatásairól, terápiás fejlesztésekről számol be. A dolgozat az irodalomjegyzékkel és a köszönetnyilvánítással együtt 136 oldal. A dolgozat szövege könnyen érthető, magyaros, van ugyan benne néhány elütés, de ebből a szempontból is megfelelő minőségű.

A dolgozat a tartalomjegyzék után egy nagyon hasznos rövidítések jegyzékével kezdődik, majd utána következik a bevezetés, majd az előzmények, célkitűzések, betegek és módszerek, eredmények, megbeszélés, összefoglalás, eredmények jövőbeni hasznosítása és a végén a különböző irodalmi adatok. Megállapítom, hogy formai, szaknyelvi és érthetőségi szempontokból a disszertáció megfelel az MTA doktori dolgozatokkal szemben támasztott követelményeknek.

Az MTMT alapján (2021.07.21-ei adatok alapján) a PhD fokozat megszerzése óta a jelöltnek 81 publikációja jelent meg, Az összes független idézeteinek száma a vizsgált időpontban 940, 25 első szerzős és 16 utolsó szerzős közleménye van. Ezek alapján megállapítom, hogy szcientometriai szempontból Nagy Nikoletta magasan teljesíti az MTA doktori cím elnyeréséhez szükséges feltételeket.

A dolgozat a „Bevezetés és az előzmények” fejezettel kezdődik, amely a szokásos irodalmi összefoglalót váltja ki. Relatív rövid, és kizárólag a monogénes bőrbetegségek bemutatására szorítkozik. Rögön a harmadik mondatnál beleütköztem egy kisebb furcsaságba. Az itt található gyakorisági adatok kicsit eltértek az általam ismertektől, és utána akartam nézni, hogy milyen forrásból származnak. Sajnos kiderült, hogy a megadott források nem tartalmazzák az idézett adatokat. Egyébként maga a fejezet szakszerű, szabatos leírással szolgál a vizsgált bőrbetegségekről, jelezve, hogy a jelölt valóban kitűnő szakembere ezeknek a betegségeknek.

A „Célkitűzések” részben összesen 15 pontban megismerkedhetünk a dolgozat hátralevő részében leírt kutatások céljaival. Egy kisebb hibát ebben a részben is találtam, ami sajnos azt is mutatja,

hogy a jelölt a régebben lezajlott kutatással kapcsolatos irodalmi adatokat nem mindig aktualizálta. Itt pl. az szerepel, hogy a HAEIII kizárólag nőket érint. Ezt sokáig tényleg így gondolták, azonban később találtak férfi betegeket is, a férfi: nő arány egy 2015-ös publikáció alapján 1:68. Érdekes viszont, hogy a jelölt elsőszerzőségével készült cikkben az „almost exclusively affects females” kifejezés szerepel, ami viszont szintén arra utal, hogy a betegség férfiakban is előfordulhat.

A „Betegek és módszerek” részben ismerkedhetünk meg a vizsgált betegekkel és a vizsgálati módszerekkel. A betegek bemutatásánál szép és informatív családfákat és távolról sem szép (bár értékes) fényképeket láthatunk néhány bőrbeteg betegről. A vizsgálati módszerek leírása elég sajátosan, hibrid-módszerrel készült. Azaz van egy-két rész, ami nagyon részletesen le van írva, pl. hány mikroliter desztillált víz kell a PCR-be, vagy hány mikroliter festék kell az agaróz gélbe, de az agaróz gél (vagy a puffer?) mennyisége (amibe a festék kerül) már nincs megadva. Ezzel szemben vannak olyan módszerek, amiről alig van információ, pl. 30 gén megszekvenálása. Szintén nincs kifejtve, hogy a WES minőségellenőrzésében milyen szerepe van a teljes genom asszociációs vizsgálatnak. Az is furcsa, hogy részletesen le van írva egy PCR program, pontos időkkal, hőmérsékletekkel, azzal a kiegészítéssel, hogy az így történt, majd néhány mondattal később már az szerepel, hogy az annealing hőmérséklete függ az adott primerpártól (azaz reakciónként különbözhet), a szintézis ideje pedig a termék hosszától, azaz az előzőleg megadottól ez is eltérhet. Én úgy gondolom, hogyha a cél a reprodukálhatóság, akkor mindent ennek megfelelően le kell írni. De itt szerintem ez nem lehet cél, így talán elég lett volna a módszerek rövid leírása és a megfelelő irodalmi hivatkozás. Valószínűleg elírás, hogy a génexpressziós vizsgálatokhoz a mintavétel 7,15,90... stb. nappal a kezelés előtt történt. Később az eredményeknél kiderül, hogy a mintavételek a kezelés után történtek.

A dolgozat leghosszabb, leginformatívabb része az eredmények bemutatása. Ez a fejezet, részben nemzetközi együttműködéssel, részben hazai kutatólaboratóriumban végzett kutatások, valóban világszínvonalú eredményeit mutatja be érthetően, szabatosan. A dolgozat fő témája a betegségek háttérében levő genetikai rendellenességek detektálása. Talán a legérdekesebb eredmény egy kiterjedt, 4 generációs, 24 érintett taggal rendelkező család vizsgálata alapján elsőként azonosították TAFOCS szindrómát okozó *ATR* gén mutációját. Érdekesség, hogy a 2010-ben leírt, az OMIM-ban FCTCS-nek rövidített betegséget máig is csak ebben az egyetlen családban detektálták. Nekem, ami ebből a részből kicsit hiányzott az a LOH (loss of heterozygosity)

értelmezése, amit a tumoros szövetben detektáltak. Itt ugyanis a daganatos szövetből izolált DNS-ben az *ATR* gén szekvenálásakor a mutáns lókuszbán homozigótaságot tapasztaltak. Mivel annak a valószínűsége, hogy egy ilyen ritka mutáció pontosan ugyanazon a helyen történik a két homológ génben nagyon kicsi, ez valószínűleg a vad allél (gén) deléciója révén történhetett, azaz itt hemizigótaságot lehetett tapasztalni. Ez az idézett cikkben szerepel is, a dolgozatból azonban kimaradt.

Az előzőhöz hasonlóan a következő eredmény is a londoni St John's Institute of Dermatology kutatóhelyről származik. Itt egy CPN-ben szenvedő marokkói családban azonosították a betegséget okozó mutációt. Sajnos itt is egy példát láthatunk arra, hogy a jelölt a dolgozat írásakor nem mindig nézett utána az újabb eredményeknek, hiszen az itt ismeretlen funkciójú *CI6ORF57*-nek nevezett gént időközben átnevezték *USBI* génre és némi funkciót is kapcsoltak hozzá, igaz, pontos funkciója még mindig bizonytalan. Érdekes, hogy ugyan a családfán látszik, de a szövegben, az eredmények részénél nincs megemlítve, hogy a betegek szülei unokatestvérek voltak, és így lehettek a betegek homozigóták a betegséget okozó delécióra. Igaz, a betegeket leíró részben szerepel a rokonházasság.

Érdekes eredmény az RDEB-ben szenvedő betegben kimutatott mozaikosság leírása és a *COL7A1* génben kimutatott, egyes keratinocitákban megtörtént reverziót és így csökkent tüneteket okozó intragenikus kereszteződés bizonyítása.

A HAEIII-at okozó, *F12* génben azonosított rekurrens mutáció leírásánál, én hiányoltam annak közlését, hogy itt egy funkcionyeréses mutációról van szó (az szerepel, hogy a HAE III-at az *F12* diszfunkció eredményezi). Ez azért is fontos, mert így nyer értelmet az, hogy a nőkben a magas ösztrogénszint (*F12* gén promoter régiója egy ösztrogén érzékeny részt tartalmaz) miatt okoz pont a mutációval rendelkezőkben rohamot. Hozzá kell tenni, hogy a jelölt idézett publikációjában szerepel a „gain-of-function” jelző a mutációval kapcsolatban.

A 29. ábrán látható családfában vannak betegek, amelyek kétféle színnel vannak beszínezve (zöld és kék), amely az értelmezés alapján egyszerre tünetes és tünetmentes egyéneket jelölnek. Melyik az igaz? A IV/2-es beteg a lila jelölés alapján a *WNT10A* génben c.682T>A mutációt, míg a képaláírás alapján c.321C>A mutációt hordoz. Melyik az igaz?

Nagyon érdekesek azok a kutatások is, amelyekben azonos mutációkat hordozó, de különböző országokban, vagy családokban élő betegekben haplotípus vizsgálatokkal nézték, hogy a mutáció egy azon alapítóhatás eredményeként jött-e létre. A *CYLD* génben, magyar BSS (Brooke-Spiegler szindróma) betegekben talált rekurrens mutáció, két angliai betegben is előfordult. A lehetséges alapító hatást három SNP genotipizálásával vizsgálták, és arra a következtetésre jutottak, hogy itt független mutációs események állnak a háttérben. A számomra rendelkezésre álló (lehet, hogy hiányos) adatokból, én erről nem vagyok meggyőződve. Eleve annak a valószínűsége, hogy két családban is egymástól függetlenül ugyanaz a betegséget okozó mutáció következzen be nagyon kicsi, bár valóban nem kizárt. A pontos nagy haplotípusokat, a családvizsgálatok mellett (amiről itt nincs adat), leginkább úgy lehet meghatározni, ha az apai és az anyai kromoszómákat szeparáltan tudjuk megszekvenálni. Itt nem ez történt. Becsült haplotípusokat nagyobb populációk esetén statisztikai módszerekkel lehet még jóslni. Itt erről sincs szó. Az etnikum specifikus haplotípus blokkokat még adatbázisokból is ki lehet nyerni, de erre itt nem történt utalás. Ebből következően én nem látom bizonyítottnak, hogy a III. táblázatban pirossal jelölt allélok egy haplotípuson vannak a mutációval. A rendelkezésre álló adatokból nem dönthető el, hogy mely allélok vannak egy haplotípuson. Ezt figyelembe véve, egyedül a V/6 magyar betegnél látszik egyértelműen, hogy a haplotípus különbözik az angol betegekéétől. Viszont ezt akár a meióziskor bekövetkező crossing overrel is lehet magyarázni, amikor is a törés a két variáció között következik be, így ezek elválnak egymástól, ami tekintve, hogy ennek nagyobb a valószínűsége, mint annak, hogy két betegben egymástól függetlenül ugyanaz a mutáció jöjjön létre, kérdésessé teszi a határozott kijelentést. Persze lehet, hogy számomra rendelkezésre nem álló adatok valóban a független mutációs eseményre utalnak. Egy alternatív magyarázat lehet még, hogy az allélok nem egy haplotípus-blokkba tartoznak. A kérdésem az, hogy vannak-e más bizonyítékok a dolgozatban megfogalmazott állításra? Hasonló a kérdésem a c.2272C>T mutáció esetén is.

A következő kérdésem az OCA betegségekkel kapcsolatos. Az OCA1 az irodalmi adatok alapján, illetve ahogy az enzimgén mutációk általában, egy autoszomális recesszív öröklődésű betegség. Ez nincs megemlítve. Viszont több betegben is csak az egyik *TYR* génben azonosították a mutációt, ami alapján nem kéne, hogy betegek legyenek. Az OCA4 is hasonlóan öröklődik. Az OCA1/OCA4-nek diagnosztizált betegben egy-egy mutációt detektáltak a *TYR* és az *SLC45A2* génben, ami alapján szintén nem kéne a betegségnek kialakulnia. Mi az ellentmondások feloldása?

Tekintve, hogy itt elsősorban genetikai vizsgálatokról van szó, a pityriasis rubra pilaris (PRP) leírásánál azt hiányoltam, hogy nem szerepel, hogy ez egy alapvetően poligénes, multifaktoriális betegség, illetve, hogy a monogénes változtában, amely autoszomális domináns öröklődést mutat a *CARD14* génnek funkciónyeréses mutációja áll a háttérben. Ezek szerintem a disszertációban leírt adatok értelmezése, megértése szempontjából fontos adatok lettek volna.

Tudományos és gyakorlati szempontból is a dolgozat erősségei közé tartoznak a funkcionális vizsgálatok és a terápiás fejlesztések. A funkcionális vizsgálatok közül különösen érdekes a mi-125b szerepének vizsgálata pikkelysömörös betegekben. Szintén kiemelendő, hogy a szabadalmaztatott terápiás fejlesztésről beszámoló publikáció a jelölt első szerzős munkája.

Az eredmények megbeszélése nem tartozik a dolgozat erősségei közé, kissé elnagyolt munka. A korábban említett hiányosságok magyarázata a megbeszélések részéből is hiányoznak, sokszor az eredmények értelmezése hiányos, nagyon sokszor főleg az eredmények megismétlése szerepel, és a magyarázatokból sokszor hiányoznak olyan kulcsszavak, amelyek hozzájárulhatnak az értelmezéshez. Hozzá kell tenni, hogy ezek az eredeti közleményekben általában benne vannak, csak ide nem kerültek át. Erre példa (a korábban említetteken kívül), a 46 és 47. ábra, amelyek a képaláírásukkal ellentétben nem magyarázzák a pathomechanizmust, csak anyagcsere-útvonalakat mutatnak be. A publikációkban viszont, ahonnan ezek az ábrák származnak, részletes, a pathomechanizmust tényleg magyarázó képaláírások szerepelnek.

Az értekezés kapcsán, a korábbiakon kívül megfogalmazódott kérdéseim a jelölthöz:

1. A disszertációban felsorolt eredmények viszonylag nagy része egy londoni kutatólaboratóriumban készült, és az ezekből készült publikációkban a jelölt nem terminális szerző. A kérdésem, hogy ezekben a kutatásokban mi volt a jelölt munkája?
2. A BSS betegségben a *CYLD* génben detektált mutációkon kívül WES-sel azonosítottak 3 SNP-t 3 másik génben, amelyek felelősek lehetnek az angliai és a magyar betegek tüneteinek közötti különbségekért. A dolgozatban jelzett funkcionális vizsgálatoknak, amely magyarázza a különbségeket, van-e már valamilyen eredménye?

3. Kimutatták, hogy az allogén fibroblaszt injekciók hatására a *COL7A1* mRNS termelés 2/3-át a beteg saját kollagéneje adja. Ezt az ilyenkor kívülről bevitt HB-EGF okozza, vagy egy olyan bevitt faktor, ami a saját sejtekben a HB-EGF expressziót fokozza?

4. A szabadalmaztatott HB-EGF kezelésnek van-e már gyakorlati következménye? Klinikai vizsgálat, eredmények stb?

Az értekezés és a megadott publikációk alapján a következőket fogadom el a jelölt saját tudományos eredményeként:

1. A génextpressziós vizsgálatok alapján feltételezik, hogy a recesszív disztrófiás epidermolízis bullozában (RDEB) alkalmazott allogén fibroblaszt injekciók hatékonyságának hátterében a páciens saját *C7* termelődésének fokozódása állhat. Az eredmények egy új terápiás módszert alapozhatnak meg, amelyre egy nemzetközi szabadalmat is benyújtottak, melyre 2011-ben végleges oltalmat is kaptak.

2. Hereditér angioneurotikus ödéma III-as típusában (HAEIII) egy brit családban egy, a betegséget okozó már ismert mutációt azonosítottak az *F12* génben, és haplotípus vizsgálattal bizonyították, hogy más HAEIII-as európai páciensek, akik ugyanezt a mutációt hordozzák, közös őstől származnak.

3. Genetikai vizsgálatokkal kimutatták, hogy a Schöpf-Schulz-Passarge szindróma (SSPS) és az odonto-onycho-dermális diszplázia (OODD) ugyanazon betegség eltérő klinikai variánsai.

4. A *CYLD* génben egy új misszensz mutációt azonosítottak és megállapították, hogy a gén ugyanazon mutációi, részben más módosító genetikai faktorok hatására különböző klinikai variánsokat (Brooke-Spiegler szindróma, familiáris cylindromatózis, 1-es típusú multiplex familiáris trichoepitheliomatózis) eredményezhetnek.

5. Feltételezett módosító genetikai faktorokat azonosítottak Papillon-Lefèvre és Haim-Munk szindrómákban, azaz a *CTSC* génben ugyanaz a mutáció a módosító genetikai faktorok hatására más klinikai képet eredményezhet.

6. Az *SLC45A2* génben két új mutációt azonosítottak, amelyek okulokután albinizmus 4-es típusában játszhatnak szerepet.

Megjegyzem, hogy a jelölt összesen 12 pontban ismerteti a saját megállapításait. Az értekezés és a publikációk alapján én azokat a megállapításokat tudtam sajátként elfogadni, amelyek publikációiban a jelölt első, vagy utolsó szerző. Ettől függetlenül lehetséges, hogy a jelölt más eredményekben is jelentős szerepet játszott, ez a védésen kiderülhet.

Összességében megállapítom, hogy Nagy Nikoletta MTA doktori munkája egy nagy és jelentős kutatási munka összefoglalása. Igazán dicséretre méltó, hogy egy praktizáló orvos, ilyen mélységű genetikai kutatásokkal is foglalkozik. A jelölt által leírt eredmények komolyan járulnak hozzá a bőrbetegségek genetikai hátterének megértéséhez. És bár az eredmények leírásában vannak hiányosságok, és a bírálatomban főleg ezekkel foglalkoztam, összességében a jelölt publikációi alapján megállapítható, hogy Nagy Nikoletta jogosan pályázott az MTA doktora cím elnyerésére, számos eredeti tudományos eredménnyel gyarapította a tudományozakot, ezért a doktori értekezés elfogadását, a nyilvános védés kitűzését és a cím odaítélését javaslom.

Budapest, 2021. 08. 26.



Dr. Szalai Csaba, MTA doktora

Semmelweis Egyetem

Genetikai Sejt és Immunbiológiai Intézet

Heim Pál Kórház