

ZÁRÓBESZÁMOLÓ

A Brooke-Spiegler szindróma (BSS; OMIM 605041) egy ritka, monogénes betegség, melynek jellegzetessége a bőrfüggelékeinek tumoros elfajulása, cilindromák, spiradenomák és trichoepitheliomák kialakulása. A betegség autoszómális domináns öröklődés menetet mutat és háttérben ismertek a cylindromatózis gén (*CYLD*) mutációi. A betegség kialakulásért felelős gén 2000-ben került azonosításra és, az azóta eltelt 15 évben ugyan számos mutáció került leírásra ezen a génen, genotípus-fenotípus összefüggések azonban mindeddig nem voltak ismertek. A betegség pathogenezisének megismerése szempontjából a mutációk azonosításán túl azok funkcióinak vizsgálata is nagy jelentőséggel bír és hozzájárulhat a tünetek kialakulásának mechanizmusának megismeréséhez és a későbbiekben akár új terápiás eljárások fejlesztéséhez is.

Az OTKA támogatás segítségével ebben a ritka betegségben szenvedő betegek vizsgálata révén kerestem a válaszokat az előbbieken megjelölt kérdésekre. Az OTKA támogatás révén a következő BSS-ben szenvedő betegek vizsgálatát végeztem el:

- szegedi BSS család, 3 generáció vizsgálata, 2 érintett családtag
- Szekszárd környéki BSS család, 7 generáció vizsgálata, 21 érintett családtag
- szegedi BSS beteg (érintett családtagról nincs tudomása)
- spanyol BSS család, 2 generáció vizsgálata, 3 érintett családtag

Genetikai vizsgálataim eredményei:

A *CYLD* gén direkt szekvenálása a betegek perifériás vérmintáiból nyert genomi DNS-en: A szegedi BSS család esetében a *CYLD* génen egy új misszensz mutációt azonosítottam (c.2613C/G p.His871Gln; Nagy *et al.*, 2012). További célom volt a Szekszárd környéki család mutáció elemzése is, mely esetében egy az irodalomban már ismert nonsense mutációt (c.2806C/T p.Arg936X) azonosítottam. Ez a mutáció szintén jelen van egy észak-angliai BSS családban is. Az észak-angliai BSS család kezelőorvosával Dr. Neil Rajannal (Newcastle, UK) felvettem a kapcsolatot, és a magyar ill. az észak-angliai család DNS mintáin haplotípus vizsgálatot végeztem a mutáció környéki polimorfizmusok genotípezálásával. Haplotípus vizsgálati eredményeim arra utalnak, hogy a két földrajzilag is távoli családban azonosított ugyanazon mutáció két egymástól független mutációs esemény eredményeként alakult ki (Nagy *et al.*, 2013). A *CYLD* gén direkt szekvenálása a betegek paraffinba ágyazott daganatos szövetszövetmintáin is megtörtént, de további mutáció azonosítására sem a szegedi, sem a Szekszárd környéki család esetében nem került sor.

Vizsgálataimba egy további magyar BSS beteg (J.V.) is bevonásra került, akinek a családjában nem volt tudomása szerint más BSS-ben szenvedő beteg. Az 59 éves férfibeteg esetében a klinikai kép és a szövettani vizsgálati eredmény alapján merült fel a Brooke-Spiegler szindróma lehetősége. A vizsgált beteg esetében a korábban a Szekszárd környéki családban azonosított nonszensz mutációt azonosítottam heterozigóta formában. A vizsgált

beteg részletes kikérdezése és családfájának felrajzolása alapján eddig nem volt ismert esetleges rokonsága az általam vizsgált Szekszárd környéki családdal. Tekintettel arra, hogy egy ritka betegségről van szó, és a vizsgált beteg ugyanazon mutációt hordozza, mint a Szekszárd környéki család tünetes tagjai, a rokonsági kapcsolat és az azonos alapító hatás lehetősége felmerül. Ennek a kérdésnek a további vizsgálatára a haplotípus vizsgálatot végeztem, melynek eredménye alapján feltételezhetem, hogy J.V. szegedi BSS beteg és a Szekszárd környéki BSS család közeli rokonok lehetnek.

Vizsgálataimba egy további spanyol BSS család is bevonásra került. A spanyol Brooke-Spiegler szindrómában szenvedő család genetikai vizsgálatát spanyol-magyar együttműködés keretében kezdtem meg. Dr. Alfredo Montoro és Dr. Raquel Rodriguez (Valencia, Spanyolország) spanyol bőrgyógyász kollégákkal együttműködésben elvégeztem a spanyol BSS család genetikai vizsgálatát és azonosítottam a c.2272C/T p.R758X nonszensz mutációt. A detektált mutáció az irodalmi adatok alapján az egyik leggyakoribb *CYLD* gén mutáció világszerte. Azon kutatókkal, akik a világirodalomban már a c.2272C/T p.R758X mutációt közölték Brooke-Spiegler szindrómában szenvedő betegekben felvettem a kapcsolatot és spanyol-magyar-holland-cseh együttműködés keretében, amelyben a cseh BSS beteg mintákat Prof. Dr. Dmitry V. Kazakov-tól (Pilsen, Csehország), a holland beteg mintákat Dr. Ans M.W. van den Ouweland-tól (Rotterdam, Hollandia) kaptam, haplotípus vizsgálatot végeztem, mely egy újabb mutációs forrópontot igazolt a génen (Nagy *et al.*, BCM Genetics, under review).

A vizsgálataim során megállapított új genotípus fenotípus összefüggések:

A genotípus fenotípus összefüggések vizsgálatához összegyűjtöttem az irodalomban eddig közölt *CYLD* gén mutációkat (n=95), a leggyakoribb mutáció típusokat (nonszensz, frameshift és misszensz mutációk), megvizsgáltam a mutációk elhelyezkedését és a betegek klinikai tüneteit és a következő új genotípus-fenotípus összefüggéseket állítottam fel (Nagy *et al.*, 2014, 2015a és 2015b): A *CYLD* gén nonszensz mutációi a misszensz mutációkhoz képest súlyosabb klinikai tüneteket eredményeznek. A *CYLD* gén nonszensz mutációi nemcsak a deubiquitináz aktivitásért felelős domén kódolásáért felelős szakaszon helyezkednek el, mint a misszensz mutációk, hanem a citoszkeleton asszociált glicin gazdag domén kódolásáért felelős területeken is, esetükben nemcsak a deubiquitinációs aktivitás csökken, hanem a *CYLD* fehérje mikrotubulusokhoz való kapcsolódása is sérül. A nonszensz mutációk esetében a bőrfüggelék tumorok változatos formái (cylindromák, spiradenomák és trichoepitheliomák) dominálják a klinikai tüneteket, míg a misszensz mutációk esetében trichoepitheliomák alakulnak főként ki.

Funkcionális vizsgálataim eredményei:

A szegedi család esetében a betegek fibroblasztokjaiból immunprecipitált NEMO fehérje ubiquitináltságának vizsgálatával igazoltam, hogy a mutáció csökkent deubiquitinációs aktivitást eredményez és a mutáció hordozása fokozott NF- κ B aktivitást eredményez (Nagy *et al.*, 2012). További funkcionális vizsgálataim során a *CYLD* fehérje által mediált további jelátviteli útvonal, a WNT/ β -catenin útvonal vizsgálatát, melyről ismert, hogy fontos szerepet játszik a bőrfüggelékek kialakulásában. A WNT/ β -catenin útvonal vizsgálatához

immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztem a BSS betegek paraffinba ágyazott bőrfüggeléktumor mintáin, azonban nem detektáltam a WNT/ β -catenin útvonal fokozott aktiválódására utaló jelet. A szegedi család esetében megtörtént friss perifériás vérmintából a különböző limfocita altípusok arányának a meghatározása flow citometriával, azonban a nem és kor azonos egészséges kontrollokhöz képest nem detektáltunk eltérést egyik limfocita altípusok arányában sem.

Génkorrekciós vizsgálataim eredményei:

A génkorrekciós SMART módszer alkalmazásához, *CYLD* mutációt hordozó sejtvonalak indítását és a sejtek immortalizálását terveztem elvégezni. A szegedi család tünetes tagjaitól bőrbioptás mintákat vettem, melyekből keratinocita és fibroblaszt sejtek izoláltam és tenyésztettem. A *CYLD* mutációt hordozó sejtek immortalizálását a következők szerint végeztem: Hatodik passzázsban lévő, *CYLD* mutációt hordozó sejtekbe HPV16-E6 pCMV plazmidot juttattam Roche X-treme Gene 9 transzfektáló reagenssel. A transzfekciót követően a sejteket G418 antibiotikum tartalmú tápoldattal szelektáltam. A keratinociták immortalizálása számos kísérlet után sem sikerült. A fibroblasztok esetében a nukleofektált kultúrában az életben maradt sejtek a 3. héten osztódni kezdtek. A megfelelő sejtszám elérése után a sejteket passzáltam és folyamatos fenntartó G418 koncentráció mellett felszaporítottam őket. Ezután a sejtek egy részét ritkára passzáltam, és hónapokig tenyésztettem monoklonális kultúra létrehozása céljából. A fibroblaszt sejt kultúrákban azonban a növekedési ütem lelassult, és az immortalizálás ezekben a sejtekben sem volt sikeres. A génkorrekciós vizsgálatok tekintetében a munkatervben vállaltakhoz képest lemaradás történt, nem sikerült a munkatervben vállaltakat teljes mértékben megvalósítani, mivel a génkorrekciós vizsgálathoz szükséges *CYLD* mutációt hordozó keratinocita és fibroblaszt sejtvonalak immortalizálása mindeddig nem volt sikeres. Az immortalizálásra irányuló sikertelen kísérleteink oka lehetett a donorok viszonylag magas életkora, a sejtek mutáns volta, illetve viszonylag magas passzázs száma.

Vizsgálataim jelentősége, hasznosíthatósága:

1. Az általam újonnan azonosított mutáció esetében elvégzett funkcionális vizsgálataim igazolták, hogy a mutáció csökkenti a *CYLD* fehérje deubiquitinációs aktivitását (Nagy *et al.*, 2012). Ennek a megállapításnak nemcsak a betegség kialakulásának mechanizmusának feltérképezése, hanem későbbi új, oki terápiai eljárások fejlesztése szempontjából is lehet jelentősége.
2. Az általam azonosított, de az irodalomból ismert mutációk esetében nemzetközi együttműködés keretében haplotípus vizsgálatokat végeztem, melyek mutációs forrópontokat igazoltak a *CYLD* génen. Vizsgálataim során azonosított mutációs forrópontoknak, mutációs szűrőpanelek kidolgozásában lehet nagy jelentősége, ami szintén jelentős gazdasági haszonnal járhat a későbbiekben (Nagy *et al.*, 2013; Nagy *et al.*, BCM Genetics, under review).

3. 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 későbbiekben új, oki terápiás eljárások fejlesztése során (Nagy *et al.*, 2014, 2015a és 2015b).
4. Vizsgálataim során azonosított kóroki mutációk jelentős diagnosztikai értékkel bírnak, mivel a ritka betegségek gyógyításában jelentkező, új kutatási irány, a „repurposing” kapcsán a gazdasági haszon abban jelentkezik, hogy már meglévő gyógyszereket, vagy gyógyszer hatóanyagokat új indikációban hasznosítanak. Ennek a vonatkozásnak, új terápiás modalitásként a betegek számára is és ugyanakkor gazdaságilag is nagy a haszna.
5. A vizsgált BSS családok és izolált BSS beteg esetében azonosítottam a betegség kialakulásáért felelős kóroki mutációt, melynek jelentősége, hogy ezáltal a prenatális diagnosztika elérhető a család számára és ez nagy jelentőséggel bír a családtervezésben (Nagy *et al.*, 2012 és 2013; Nagy *et al.*, BCM Genetics, under review).

A pályázat végrehajtása során született közlemények:

1. **Nagy N**, Farkas K, Kocsis-Deák B, Sánchez CL, Martínez AMV, Corell JJV, Montoro Botella A, Benito GM, López RR, Vanecek T, Kazakov DV, Kromosoeto JNR, van den Ouweland AMW, Varga J, Széll M.: 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 Genetics, **under review IF: 2,400**
2. **Nagy N**, Farkas K, Kemény L, Széll M.: Phenotype-genotype correlations for clinical variants caused by CYLD mutations. Eur J Med Genet. **2015 (b)** May;58(5):271-8. doi: 10.1016/j.ejmg.2015.02.010. **IF: 1,486**
3. **Nagy N**, Farkas K, Kemény L, Széll M.: Knowledge explosion for monogenic skin diseases. World J Dermatol. **2015 (a)** February 2; 4(1): 44-49. doi: 10.5314/wjd.v4.i1.44.
4. **Nagy N**, Farkas K, Tripolszki K, Sulák A, Kemény L, Széll M.: A cylindromatosis gén mutációi által okozott genodermatosisok. Bőrgyógyászati és Venereológiai Szemle. **2014** 90 (5). pp. 185-193. doi: 10.7188/bvsz.2014.90.5.1
5. **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** Nov;93(6):743-5. doi: 10.2340/00015555-1590. **IF: 3,487**

6. **Nagy N**, Farkas K, Kinyo 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** Dec;21(12):967-9. doi: 10.1111/exd.12040. **IF: 3,762**