

Semmelweis Egyetem ÁOK Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika, Budapest (igazgató: Horváth Attila dr. egyetemi tanár), Freiburgi Egyetem Bőrgyógyászati Klinika (igazgató: Leena Bruckner-Tuderman dr. egyetemi tanár), MTA-SE Bőrgyógyászati Genetikai és Immunológiai Kutatócsoport (vezető: Kárpáti Sarolta dr. egyetemi tanár), Országos Epidermolysis Bullosa Centrum (DEBRA Hungary) (vezető: Kárpáti Sarolta dr. egyetemi tanár)*

Herediter epidermolysis bullosa molekuláris genetikai vizsgálata Molecular genetic analysis of hereditary epidermolysis bullosa

CSIKÓS MÁRTA DR., BECKER KRISZTINA DR., RÁCZ EMŐKE DR.,
BÓNA ANNAMÁRIA, BENKŐ RÉKA, CZIPPÁN ÁGNES, KATONA MÁRIA DR.,
LEENA BRUCKNER-TUDERMAN DR.*, KÁRPÁTI SAROLTA DR., HORVÁTH ATTILA DR.

ÖSSZEFOGLALÁS

A közlemény témája a hereditár epidermolysis bullosa csoport klinikai és molekuláris genetikai vizsgálata. Ezekben az örökletes bőrgyógyászati kórképekben a bőrön és a nyálkahártyákon mechanikai stresszt követően vagy látványosan spontán hólyagok képződnek. Egyes formáihoz elszarusodási zavar társul.

Jelen közleményben a cytokeratin 5 és 14 (KRT5/14), laminin 5 béta lánc (LAMB3), valamint a VII. típusú kollagén (COL7A1) gének mutációinak heteroduplex analízisen alapuló vizsgálatát foglaljuk össze. Fenotípusukat tekintve az epidermolysis bullosa simplex (EBS), epidermolysis bullosa junctionalis (EBJ) és epidermolysis bullosa dystrophica (EBD) domináns és recesszív kórfarmáival foglalkoztunk.

Jelentős és a mutáció detekciós stratégiát befolyásoló megfigyelés a közép-európai EBD beteg populációban mintegy 12,8%-os gyakorisággal előforduló rekurál 425A→G, K142R COL7A1 splice site mutáció.

Kulcsszavak:
**epidermolysis bullosa - mutáció analízis -
cytokeratin 5/14 - laminin 5 -
VII. típusú kollagén**

SUMMARY

Clinical and molecular genetic studies in different forms of epidermolysis bullosa are presented. These inheritable skin diseases are characterized by blister formation of the skin and mucous membranes induced by mechanical stress. In some cases abnormal keratinisation is also present.

This paper presents several novel mutations in the KRT5/14, LAMB3 and COL7A1 genes based on the strategy of heteroduplex analysis introduced as a novel method in our laboratory. In terms of phenotypes, clinical and ultrastructural features of epidermolysis bullosa simplex (EBS), junctional epidermolysis bullosa (JEB) as well as dominant and recessive forms of dystrophic epidermolysis bullosa (EBD) are discussed.

The 425A→G, K142R splice site mutation in the COL7A1 gene was present in 12,8% of the Central European EBD population. This observation may change the COL7A1 mutation strategy screening in this geographical area.

Key words:
**epidermolysis bullosa - mutation analysis -
cytokeratin 5/14 - laminin 5 - type
VII. collagen**

A dermo-epidermális jukció feladatai és szerkezete

Az epidermális bazálmembránzóna feladata a bazális hámsejteken keresztül az epidermisnek a dermis extracelluláris mátrixához való rögzítése, lehorgonyozása, ezáltal a bőr integritásának, mechanikai ellenállóképességének biztosítása.

A dermo-epidermális jukciós zóna (DEJZ) szupramolekuláris komplexumában számos multiquiter bazálmembrán molekula mellett, sajátosan, csak a humán bőrre jellemző komponens is megtalálható. A bőr DEJZ-ját a bazális hámsejtek dermális oldalán lévő hemidesmosómák és a

bennük rögzülő cytoskeletális intermediér keratin filamentumok, a bazálmembrán lamina lucidáját átívelő anchor filamentumok, a lamina lucida és densa összetevői, valamint a bazálmembrán alatti anchor fibrillumok együttese alkotja (1). Hasonló struktúra építi fel a szájnyalkahártya, a szem, a gasztrointesztinális és a respiratórikus traktus, valamint a placenta bazálmembránjait (2, 3).

A bazálmembránban ultrastrukturálisan elektronáteresztő lamina lucida (komponens: laminin 2, 5, 6, 10) és elektrondenz lamina densa (komponens: IV. típusú kollagén, nidogén, BM-40/SPARC, perlecan) különül el. A hemidesmosómák (komponensei pl. BP230 antigén, plecti-

nek) a bazális keratinocyták dermális plazmamembránján mint kis méretű elektronenz képletek tűnnek fel, és befogadják a bazális keratin filamentumokat (keratin 5 és keratin 14). A hemidesmosómák bazális felszínéről induló fonalszerű anchoring filamentumok ($\alpha 6\beta 4$ integrin, XVII. típusú kollagén (BP180 antigén), $\alpha 3\beta 1$ integrin, XIII. típusú kollagén, syndecan 1, 4) szelik át a lamina lucidát, kapcsolatot teremtve a hemidesmosómák és a lamina densa között. A bazálmembrán dermális felszínén egymással kereszt-kötésben lévő, a lamina densából kiinduló anchor fibrillumok (VII. típusú kollagén, GDA-J/F3 antigén) töltik ki a lamina densa és a papilláris kötőszövet közötti teret. Az anchor komplexum a hemidesmosómákat, anchor filamentumokat és az anchor fibrillumokat foglalja magába. Az anchor komplexum ultrastrukturális egysége a humán bőrre egyedülálló módon specifikus aggregátum. A különálló molekulák termelését, majd makromolekulákká történő hierarchikus összeépülését az epitheliális és mesenchimális sejtek ill. a szintézist reguláló egyéb sejtekből és az extracelluláris matrixból származó paracrin szignálok irányítják (1-3).

Számos genetikai és szerzett, autoimmun bőrbetegség célpontjai a dermo-epidermális adhéziós molekulák. Ilyen a hereditér epidermolysis bullosa csoport és a különféle a DEJZ komponensei ellen irányuló autoantitestekkel jellemezhető akvirált hólyagos bőrbetegségek (pl. epidermolysis bullosa acquisita, bullosus pemphigoid).

Epidermolysis bullosa csoport

A hereditér epidermolysis bullosa (EB) betegségcsoportra a hám fokozott sérülékenysége jellemző: a bőrön és a nyálkahártyákon traumára vagy látszólag spontán fellépő hólyagképződés zajlik, mely a dermo-epidermális határzónában történik.

Klasszikus klinikai felosztása a hólyagképződés szintjét is figyelembevevő módon történt: epidermolysis bullosa simplex (bazális keratinocyták), epidermolysis bullosa junctionalis (lamina lucida), epidermolysis bullosa dystrophica (sublamina densa, anchor-rostok).

Az elmúlt évtizedben a genodermatosisok kutatása világszerte felgyorsult. A bevezetett új technikák segítségével a klinikailag, hisztológiailag és prognosztikailag is jelentősen különböző epidermolysis bullosa alcsoportok háttérben sikerült az érintett molekulák és betegség gének azonosítása (1. táblázat). A génmutációk kimutatása és az etiológia pontosabb ismerete a korábbi klasszikus klinikai felosztás mellett újabb alcsoportok létrejöttét eredményezte (pl. hemidesmosomalis variánsok). Emellett nemzetközi konszenzus konferenciák nem tartották indokoltnak a következő klinikai kategóriák további haszná-

EB típus	EB altípus	Érintett protein/gén rendszer
EBS („epidermolyticus”)	EBS-WC	Keratin5/14 (<i>KRT5/14</i>)
	EBS-K	Keratin5/14 (<i>KRT5/14</i>)
	EBS-DM	Keratin5/14 <i>KRT5/14</i>)
	EBS-MD	Plectin 1 (<i>PLEC1</i>)
EBJ („junctionalis”)	EBJ-H	Laminin5 (<i>LAMA3, LAMB3, LAMC2</i>)
	EBJ-nH	Laminin5 (<i>LAMA3, LAMB3, LAMC2</i>) XVII. típusú kollagén (<i>COL17A1</i>)
	EBJ-PA	$\alpha 6\beta 4$ integrin (<i>ITGA6, ITGB4</i>)
EBD („dermolyticus”)	EBDD	VII. típusú kollagén (<i>COL7A1</i>)
	RDEB-HS	VII. típusú kollagén (<i>COL7A1</i>)
	RDEB-nHs	VII. típusú kollagén (<i>COL7A1</i>)

1. táblázat

A hereditér EB revideált, a klinikai fenotípuson és a genotípuson alapuló klasszifikációja (gyakori variánsok)

EBS epidermolysis bullosa simplex, WC Weber-Cockayne, K Köbner, DM Dowling-Meara, MD musculáris dystrophia, EBJ epidermolysis bullosa junctionalis, H Herlitz, nH nem Herlitz, PA pylorus atresia, EBDD domináns epidermolysis bullosa dystrophica, RDEB recesszív epidermolysis bullosa dystrophica, HS Hallopeau-Siemens, nHs nem Hallopeau Siemens

latát (4): EB lethalis, EB atrophicans, GABEB (generalizált atrophias benignus epidermolysis bullosa), cicatrizáló JEB, DDEB albopapuloidea (Pasini variáns), DDEB hyperplasticus (Cockayne-Touraine variáns), Bart szindróma, EBS Ogná variáns, EBS Kallin szindróma, EBS Mendes da Costa variáns, valamint a gravis, mitis, progressziva jelzőket.

Epidermolysis bullosa simplex

Az EB csoport leggyakoribb és egyben klinikailag legenyhébb formája az epidermolysis bullosa simplex (EBS). Döntő többségében autoszomális domináns, igen ritkán autoszomális recesszív öröklődésmenetű betegség. EBS esetén a dermo-epidermális szeparáció a bazálmembrán felett, a bazális sejtrétegben van. Esetenként a keratinocytákban degeneratív elváltozások, összecsapódott keratin rögök, ún. keratin clumps jelenség figyelhető meg. Rövid idővel a születés után, a mechanikai traumának kitett területeken többnyire serosus hólyagok keletkeznek, melyek hamar megnyílnak, gyorsan hámosodó erosiókat hagyva maguk után. Hegképződés nincs, de miliumképződés előfordulhat. A szájnálkahártya, a haj, a körmök és a fogazat érintettsége – alcsoporttól függően – ritkább. A meleg évszakokban, a hyperhidrosis miatt gyakran romlik a betegek állapota („nyári hólyagosodás”), de az élet előrehaladtával a hólyagképződés aktivitása általában csökken (5, 6).

Az EBS egyik speciális formája, az EB herpetiformis (Dowlin-Meara) (OMIM 131760) esetében hólyagok a születés után képződnek a törzsön, tenyéren, talpon. A törzs gruppirozott, herpetiform hólyagjai pigmentációt hátrahagyva gyógyulnak. A hólyagképződés a korrallal mérséklődik, azonban tenyéri és talpi hyperkeratosis alakulhat ki (5).

Ultrastrukturálisan a bazális hámsejtekben durva keratin-tonofilamentum aggregáció, clumps-képződés detektálható. A keratin 5 és keratin 14 molekulák mutációi a nagyfokú evolúciós állandóságot mutató szekvenciákat érintik (pl. helix iniciációs motívum) (8). Ezen szakaszok



1. ábra

Epidermolysis bullosa simplex



2. ábra

Epidermolysis bullosa dystrophica domináns forma

kóros eltérései akadályozzák a keratin fehérjék magasabbrendű, filamentáris struktúrába történő szerveződését és a keratin filamentumok összecsapódásához vezetnek.

Az enyhébb fenotípusú lokalizált, döntően tenyéri-talpi tünetekkel jellemezhető (Weber-Cockayne) (OMIM 131800) (1. ábra) és generalizált (Köbner) EBS (OMIM 131900) formákban hólyagok általában a mechanikai traumának leginkább kitett helyeken keletkeznek (láb, kéz, sarok, térd, könyök) és súlyosabb következmény nélkül gyógyulnak. Mutációkat ugyancsak a KRT5/14 génekben, enyhébb fenotípusban a tonofilamentum aggregációt okozó kritikus régiókn kívül találtak (9, 10). A keratin-clumping nem jellemzője az ultrastrukturális képnek. Az irodalom említ néhány az EBS fenotípusba illeszhető és hisztológiailag bazális epidermolysist mutató, lethális kimenetelű esetet is.

Hemidesmosomális (pseudojunkcionális) variánsok

A bazális keratinocyták hemidesmosomáiban elhelyezkedő kohéziós fehérjék (plectin 1, XVII. kollagén intracelluláris része, BP230 antigén) betegségei didaktikailag hemidesmosomális variánsok néven korábban külön alcsoportban voltak összefoglalhatóak. Ultrastrukturálisan a diagnózis EBS, mivel a hemidesmosomák dezorganizációja és következményes bazális epidermolysis figyelhető meg.

A plectin 1 (*PLEC1*) gén mutációi állnak az epidermolysis bullosa simplex muscularis dystrophiával (EBS-MD) társult fenotípusának háttérében. Korábban a gén lokuszát az epidermolysis bullosa simplex az ujjbegy suffúzióival és körömdystrophiával jellemzett ún. Ogná variánsával is összefüggésbe hozták. Bár a betegek klinikai fenotípusa leginkább az epidermolysis bullosa junctionalis nem Herlitz (EBJ-nH) altípusának megfelelő, az ultrastrukturális diagnózist követő klinikai besorolás az EBS egy ritka altípusaként tartja számon (11).

Az anchor filamentumok közé tartozó XVII. kollagén fehérjét intracelluláris, transzmembrán és egy extracelluláris kollagénszerű részleteket tartalmazó domének hármasa építi fel. Az intracelluláris részlet missense mutációi EBS közeli fenotípust okozhatnak, ezzel szemben a lamina lucidát átfvelő extracelluláris rész mutációi az EBJ-nH, lokalizált tünetekkel járó egyes formáikért felelősek (12-14).

A BP230 antigén génjének knock out állatmodelljei EBS fenotípust mutattak, ám a humán gén mutációit még nem azonosították EBS betegekben.

Epidermolysis bullosa junctionalis

Gyakorta a születéskor is észlelhető, autoszomális recesszív öröklődésű, ritka betegségek (OMIM 226700). A hólyagképződés során a bazálmembrán rétegei távolodnak el egymástól. A generalizált tünetekkel jellemezhető fatális kimenetelű, a laminin 5 molekula defektusára, ill. hiányára visszavezethető epidermolysis bullosa junctionalis Herlitz variáns (EBJ-H) esetén a fej, az arc, a száj körül, valamint a nyomásnak kitett területeken nagy, haemorrhagiás bennékű bullák, vérző, pörkkel fedett erosiók jelentkeznek. Akarális sok hólyag keletkezik, és a felső gasztrointesztinális és genitourinális traktus is érintett lehet.

A lokalizált tünetekkel, lassú sebgyógyulással, heges alopeciával társult non-Herlitz (EBJ-H) kórformái esetén (korábbi GABEB) többnyire a XVII. kollagén génjének (*COL17A1* gén) és ritkábban a laminin 5 heterotrimer valamelyik láncát kódoló gén mutációit találjuk (*LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2* gén) (15, 17).

Pylorus atresiával társult (EBJ-Pa) formák háttérében az $\alpha 6\beta 4$ integrin mutációi állnak (*ITGA6/ITGB4* gének) (16).

Epidermolysis bullosa dystrophica

Az epidermolysis bullosa dystrophica (EBD) a mechano-bullosus genodermatosisok gyakori előfordulású csoportja, mely enyhe fenotípussal járó autoszomális domináns (EBDD) és súlyosabb tünetekkel jellemezhető autoszomális recesszív módon (RDEB) egyaránt öröklődik. A hólyagképződés dermolyticus, ezért a bőrtünetek hegeképződéssel gyógyulnak. Valamennyi kórforma háttérében az anchor fibrillumok legfontosabb építőkövének a VII. típusú kollagén génjének (*COL7A1* gén) mutációi állnak (18).

Domináns formáiban (OMIM 131750) a trauma hatására keletkező hólyagok a predilekciós területeken, a mechanikai sérülésnek leginkább kitett régiókban, a könyök, kézfej, térd, lábfej területén keletkeznek (2. ábra). A heggekben nagy számú milium található. Az általános állapotot nem befolyásolja, és a gyermekkori aktív hólyagoso-



3. ábra

Epidermolysis bullosa dystrophica recessív
Haloiseau-Siemens forma

dás az életkor előrehaladtával mérséklődik. A betegek genotípusában gyakran glicin szubsztitúciós mutációkat találunk (19).

Ritkábban találkozunk a recessív formájával, a drámai fenotípusú Haloiseau-Siemens variánssal (RDEB-HS) (OMIM 226600), melyet pseudosyndactylia és mutiláció jellemez (3. ábra). Az anchorrostok mennyisége erősen redukált vagy teljesen hiányzik a bőrből. A bőrtüneteket számos cutan és extracutan komplikáció kísérheti: spinocelluláris carcinoma, secunder reaktív amyloidosis (nephrosis syndroma), oesophagus strictura. Egyéb recessív, nem-Haloiseau-Siemens (RDEB-nHS) formáiban az ujjak csonkolódása és összenövése nem jön létre, és egyéb szövődmények is ritkábban fordulnak elő, ám a betegek életminőségét ez a variáns is nagymértékben rontja. A betegek enyhébb tüneteit az anchorrostok mérsékelt redukciója magyarázza (20-25).

Molekuláris genetikai vizsgálatok jelentősége

A hazai csecsemő- és gyermekbőrgyógyászati epidemiológiai adatokat figyelembe véve, közel százra tehető Magyarországon azon családok száma, melynek tagjai valamely örökletes epidermolysis bullosa variánsban szenvednek. Joggal merült fel az igény az utóbbi években ezen mendeli módon öröklődő monogénes betegségek háttérben azonosított betegség gének hazai molekuláris vizsgálatára. Az eredmények bizonyos esetekben a klinikailag sejtethető diagnózis egzakt felállításához is hozzásegítenek, ezért a prognózis megítélésében a klinikus segítségére lehetnek, módot adhatnak a DNS alapú prenatális diagnózis révén a prevencióra, és alapul szolgálhatnak a napjainkban egyre elérhetőbb közelségbe jutó szomatikus génterápiához is.

A genodermatosisok által érintett családok, ill. betegek DNS és szövetmintáinak, vizsgálati eredményeinek összegyűjtése, regiszterbe rendezése a részletes genetikai vizsgálatok alapfeltétele. A rendelkezésre álló nagy számú adat epidemiológiai következtetések levonására alkalmas, és a világ más régióinak eredményeivel való összehason-

lításra ad lehetőséget. A genodermatosisokban szenvedő betegek klasszifikációjához a részletes klinikai vizsgálaton és a fenotípus pontos rögzítésén kívül a pedigre analízise, részletes családi anamnézis, valamint bőrbioptizás mintavétel a fénymikroszkópos hisztológiai, az immunfluoreszcens antigén mapping és az elektronmikroszkópos elemzések céljából szükséges. A vizsgálatok együttes értékelése teszi lehetővé a pontos klinikai besorolást. Az öröklődésmenet és a bőrpatólogiai elemzések jelzik, hogy melyik fehérje hiányzik vagy károsodott. Mindezen eredmények együttes értékelése alapján kerülhet sor csupán a károsodott molekula génjének részletes vizsgálatára.

Anyag és módszer

Klinikai adatok, a kutatás etikai vonatkozásai

A közleményben szereplő betegek elsősorban a Semmelweis Egyetem Bőr- és Nemikórtani Klinikájának, a Heim Pál Gyermekkorház Bőrgyógyászati osztályának, valamint az intézetünkben működő Epidermolysis Bullosa Centrumnak a gondozása alatt állnak. Munkacsoportunk rendelkezik a Tudományos Kutatás-Értékelési Bizottság engedélyeivel, melyek mintavételekhez, ezek feldolgozásához, az eredmények közzétételéhez, genetikai tanácsadáshoz és prenatális diagnózis felállításához szükségesek.

Kontrollok

Munkánk során minden ismétlődő és új mutáció esetében 50 egészséges, bőrtünetekkel nem rendelkező, negatív családi anamnézistű személytől származó 100 normál allélt vizsgáltunk, mint kontrollt. Kizártuk annak lehetőségét, hogy az általunk talált genetikai defektus az adott gén fenotípusbeli változást nem okozó neutrális polimorfizmusa lenne. Ismétlődő mutáció esetén meghatároztunk annak a normál populációban kimutatható előfordulási gyakoriságát.

Családfa és öröklődésmenet vizsgálat

A genodermatosisok vizsgálatának első lépése a részletes családi anamnézisen alapuló pedigre analízis. Az általunk vizsgált betegség gén csoport az autoszómákon öröklődik. Autoszómális domináns öröklődésmentű formák esetében az érintett családtagokat reprezentáló családfán a betegség szegregációja vertikális. Recessív kórfarmákban az indexszemély szülei klinikailag egészségesek, és a családfán az esetek halmozódása horizontális elrendezésű.

A pedigre analízise önmagában nem elegendő az öröklődésment tisztázásához (a mutációgenesis de novo, ill. az átörökítésnek a szülők gonadális mozaicizmusán alapuló formái).

Klasszifikáció

Az EB betegek klinikai klasszifikálása az alábbi ajánlás figyelembevételével történt: Fine J. D., Eady R. A. J., Bauer E. A. et al. Revised classification system for inherited epidermolysis bullosa: Report of the Second International Consensus Meeting on diagnosis and classification of epidermolysis bullosa. *J. Am. Acad. Dermatol.* (2000) 42, 1051-1066.

Hisztopatológia és immunfluoreszcens antigén mapping

Szöveti mintavétel lokális anaestéziát követő atraumatikus, az ép-kóros részlet határáról történő sebészi kimetszéssel, ritkábban punch-bioptizás mintavételi eszközzel történt.

Az antigén mapping, a bazálmembrán proteinek expressziójának immunhisztokémiai módszerekkel történő meghatározása és a hólygalaphoz, ill. hólygfedélhez viszonyított festődésük vizsgálatára szolgáló módszer. Egyszerű, gyors vizsgálat a hólyagképződés szintjének megállapítására. Friss hólyag esetében, az ép és kóros bőrtünet határáról vett bőrbioptizás mintát számos bazálmembrán komponens ellen irányuló antitesttel egyesével, kontroll bőrminta jelenlétében festjük, és a hólyagfedélhez vagy a hólygalaphoz való viszonyuk, mintázatuk alapján következtetünk a lysis szintjére.

A 6 µm vastagságú cryostattal metszett bőrbioptizás mintákat indirekt immunfluoreszcens vizsgálatnak vetjük alá. A következő mo-

noklonális antitesteket használtuk: 161-6 és fúziós protein NC2-7 (anti-kollagén VII), mAb-1D1 (anti-BPAG2), BM-2 (anti-laminin 5 α 3), 6F12 (anti-laminin 5 β 3), GB3 (anti-laminin 5 β 3 és γ 2) és GoH3 (anti-integrin α 6), anti-cytokeratin 14. Továbbá egyéb autoimmun betegségben szenvedő betegek poliklonális IgG frakcióba tartozó antitesteket tartalmazó savókat (epidermolysis bullosa acquisita – anti VII. típusú kollagén, Good-Pasture szindróma – anti IV. típusú kollagén, bullosus pemphigoid – anti BP180). Második antitestként FITC-el konjugált kecske anti-egér (Jackson, USA) és nyúl anti-humán (DAKO, Danemark) IgG-t használtunk.

Ultrastrukturális elemzés

A bőrbioptizás minták elektronmikroszkópos vizsgálatához 4% paraformaldehid és 1% glutáraldehid tartalmú fixálást alkalmaztunk, majd Poly/Bed 812 Embedding Media (Polysciences, Inc.) – gyantába ágyztuk. A minták analízise Philips CT 10 mikroszkóppal történt.

DNS-izolálás

Genomiális DNS szeparálása EDTA-val alvadást gátló perifériás vérből történt. A perifériás vér lymphocytáiból részben módosított Miller módszere szerint „salting out” technikával (26), részben standard kit technológiával (SIGMA Gen™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit) nyertünk DNS-t, melyet génbankunkban –80 °C-on tárolunk.

PCR amplifikáció

Az adott gének DNS-szekvenciájának és exon-intron szerkezetének ismeretében a PCR amplifikációhoz olyan oligonukleotid primereket használtunk, amelyek az exonokat övező intronikus szekvenciákkal komplementerek voltak. Így a PCR reakciók termékei mind az egyes exonokat, mind az mRNS érése során az exonok helyes kivágódását biztosító junkció (donor és acceptor splice site) szekvenciákat tartalmazták. PCR termékeink nagysága általában 190-600 bp közé esett. Az általunk használt primerek nagyjából az irodalomból ismertté vált ún. konszenzus primerek voltak, kisebb részt saját tervezésű oligonukleotidok. A standard amplifikációs feltételek mellett az 54-64 °C annelációs hőmérsékletet alkalmaztunk a Perkin-Elmer 9600, valamint TouchGene (Techne Cambridge Ltd. UK) thermo cyclerekkel. A standard amplifikációs reakció össztérfogata 50 μ l volt. Az 5 μ l térfogatú aliquotokat 2% agaróz gél-elektroforézis során ethidium bromide-dal tettük láthatóvá.

Heteroduplex analízis, konformációszenzitív gél-elektroforézis

A vad típusú szekvenciától eltérő exonok kimutatására és kiválogatására szűrő módszerként a mismatch hibridizáció elvén alapuló heteroduplex analízist végeztünk (27). Ha a vizsgálandó, mutációt hordozó PCR terméket egy vad típusú standard amplifikátummal keverjük össze, majd az elegyüket denaturáljuk, egyszálú DNS láncok halmazát kapjuk. Ha a következő lépésben a mintákat lehűtjük, az egyszálú DNS láncok ismét összekapcsolódnak, renaturálódnak. Ez után azonban már nem csak a kiinduláskor jelenlévő mutáns és vad típusú exon amplifikátumok homoduplexei vannak jelen, hanem kétféle, egymásnak komplementer vad és mutáns szekvencia összekapcsolódásából létrejött heteroduplexe is. A heteroduplexe megjelenése utal a vad típusú szekvenciától eltérő nukleotid sorrendre vagy számra. A heteroduplexe kimutatása (shift) nagy felbontású, denaturálószerrel tartalmazó 8%-os polyacrilamid gélen történő elválasztáson alapul.

Automata szekvencia analízis

A heteroduplex analízis során shift pozitívnak bizonyult PCR mintákat direkt automata szekvencia-analízisnek vetettük alá (ABI Prism 310 automated sequencing system – Applied Biosystem). Eredményeink értékelése során a nukleotidok és codonok számozását minden esetben az adott gén kódoló szekvenciájának kezdetétől indítottuk (1. metionin

aminosav, ill. A az ATG=1), a GenBank adott Homo sapiens mRNA szekvenciaadatainak megfelelően (keratin 14 – hivatkozási szám: NM 000526; laminin 5 beta lánc – hivatkozási szám: L25541; kollagén VII. – hivatkozási szám: L02870.)

Mutációverifikálás restrikciós endonukleázok segítségével

A vizsgált betegek családtagjainak szűrővizsgálatára, a mutáns allélek szegregációjának nyomonkövetésére 5-17 μ l PCR terméket emésztettünk restrikciós endonukleázok segítségével. Az emésztés termékeit 2-4% agaróz gél-elektroforézissel vagy 6-12%-os polyacrylamid gél-elektroforézissel, ethidium bromide vagy SYBR Green I festéssel tettük láthatóvá.

Eredmények

Epidemiológiai megfigyelések

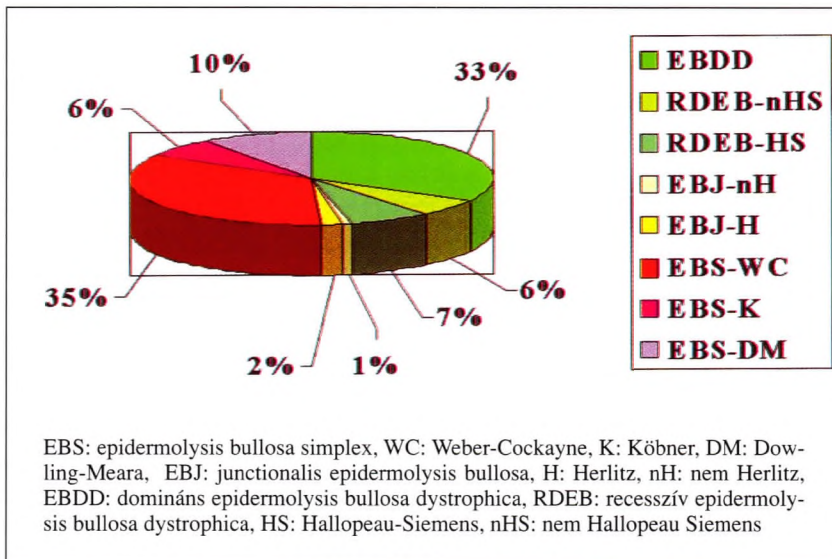
A herediter epidermolysis bullosa valamennyi kontinensben és rasszban előfordul. Incidenciája Európában és Észak-Amerikában 1:50 000–100 000 körüli, mely az EB összgyakoriságát tükrözi, természetesen altípusonként és egyes populációként ettől eltérés észlelhető (2).

Az 1995-ben alapított Országos Epidermolysis Bullosa Centrum, mely DEBRA (Dystrophic Epidermolysis Bullosa Research Association) Hungary néven a DEBRA Europe-ba integrálódott, 59 epidermolysis bullosa betegség által érintett családot és 112 beteget gondoz, így megállapítható, hogy hazánkban a nemzetközi tapasztalatokkal közel azonos arányban fordul elő e ritka bőrbetegség (28).

A betegek közel 51% simplex típusú eltéréssel rendelkezik, junctionalis EB által érintett beteget ritkán diagnosztizálunk (3%). A domináns EBD gyakorisága 33%, recesszív, nem-Hallopeau-Siemens típusú EBD betegek 6%-os, valamint a súlyos, mutilációval járó Hallopeau-Siemens szindrómás betegek 7%-os arányban fordulnak elő az EB altípusai között (4. ábra).

Epidermolysis bullosa simplex

Három, az EBS klinikai és ultrastrukturális kritériumait teljesítő beteg esetében, új, domináns öröklődésmentű missense mutációt azonosítottunk a keratin 14 gén



4. ábra

Az epidermolysis bullosa altípusainak megoszlása hazánkban

(*KRT14*) 1. exonában (N123K, R125G és V133L). Az általunk elsőként feltárt új pont mutációk közül kettő, melyek DM-EBS fenotípust eredményeznek, az N123K és R125G a helix iniciációs motívumban található, míg a V133L WC-EBS fenotípust okozva ezen kritikus régió kívül detektáltunk (28).

A *KRT14* 125. codona hordozza a DM-EBS fenotípussal járó mutációk több mint 50%-át (30-31). Többségük arginin→cystein cserét eredményező hotspot, de két egyéb rekurráló mutáció is ismert ebben a pozícióban: arginin→histidin és arginin→serin szubsztitúció. Egy EBS-DM diagnózisú betegünk esetében a 125. codonban azonosított új arginin→glicin szubsztitúciót elsőként ismertettük.

Az EBS családfák genetikai analízise azt mutatja, hogy gyakran állnak de novo mutációk e bőrbetegség hátterében. Vizsgálataink során több alkalommal észleltük a klasszikus autoszomális domináns öröklődésment mellett egyes esetekben azt, hogy csupán az index személy érintett az adott családban, ami de novo mutációra, ill. a szülők gonadális mozaicizmusára is utalhat.

Elsőként vizsgáltuk és közöltünk adatokat közép-kelet-európai EBS betegek *KRT14* mutációiról. Eredményeink újabb információul szolgálnak az EBS genotípus-fenotípus korrelációjának megértéséhez.

Epidermolysis bullosa junctionalis

Sikeres DNS-alapú prenatális diagnózist végeztünk EBJ-Herlitz lethalis variánsban. A mater első terhességéből született fiúgyermek EBJ-Herlitz lethalis genodermatosis következtében újszülöttkorában hunyt el. A gyermek nem vérrokon, klinikailag tünetmentes szülőktől származó, a család egyedüli érintett tagja volt. A családban egyéb bőrbetegség nem fordult elő.

Az immunfluoreszcens antigén mapping vizsgálat a hólyagképződés junctionális jellegére utalt: a hólyagalapon intenzív VII. típusú kollagén festődés mellett a hólyagalapról és a hólyagfedélről teljességben eltűnt a laminin 5 láncaira a festődés, és a hólyagfedélen igen gyengén jelzett BPAG180 és $\alpha\beta 4$ integrin festődést találtunk.

Vérvétel DNS-vizsgálat céljából a probandustól és a klinikailag tünetmentes szülőktől történt. A beteg gyermeknél még életében kimutatott mutáció a heterotrimer kohéziós molekula a laminin 5 béta láncának a *LAMB3* génnek (GenBank No. L25541) recesszív módon megnyilvánuló R635X, hot spot mutációja volt. Az R635X mutációt a probandus és a tünetmentes mater heterozigóta módon hordozta. A pater az adott mutációra nézve negatív volt. Az elhalálozott gyermek az adott kórképre jellemző recesszív öröklődésmentet figyelembevéve, kevert, ún. compound heterozigóta módon két, egymástól eltérő mutáció hordozója lehetett, melyek közül az anyai allél mutációja vált ismertté, az apai allél eltérése a gén teljes terjedelmének szisztematikus vizsgálata során (PCR amplifikáció, heteroduplex analízis, szekvenálás, RFLP) nem volt azonosítható.

A szülők kérésére a következő tervezett terhességben a

DNS alapú prenatális diagnosztika alapja az R635X mutáció kimutatása mellett nagyszámú intragenikus polimorfizmus és extragenikus microsatellita markerek szegregációjának vizsgálata volt. A mater második terhességéből származó chorionboholyok a magzattal identikus DNS-ének vizsgálata során a *LAMB3* gén R635X mutációja nem volt kimutatható. Az átörökítés mechanizmusában ritka, maternalis germline mozaicizmus volt megfigyelhető. Az egészséges fiúgyermek a zavartalan terhességből szabályos terminusra jött világra.

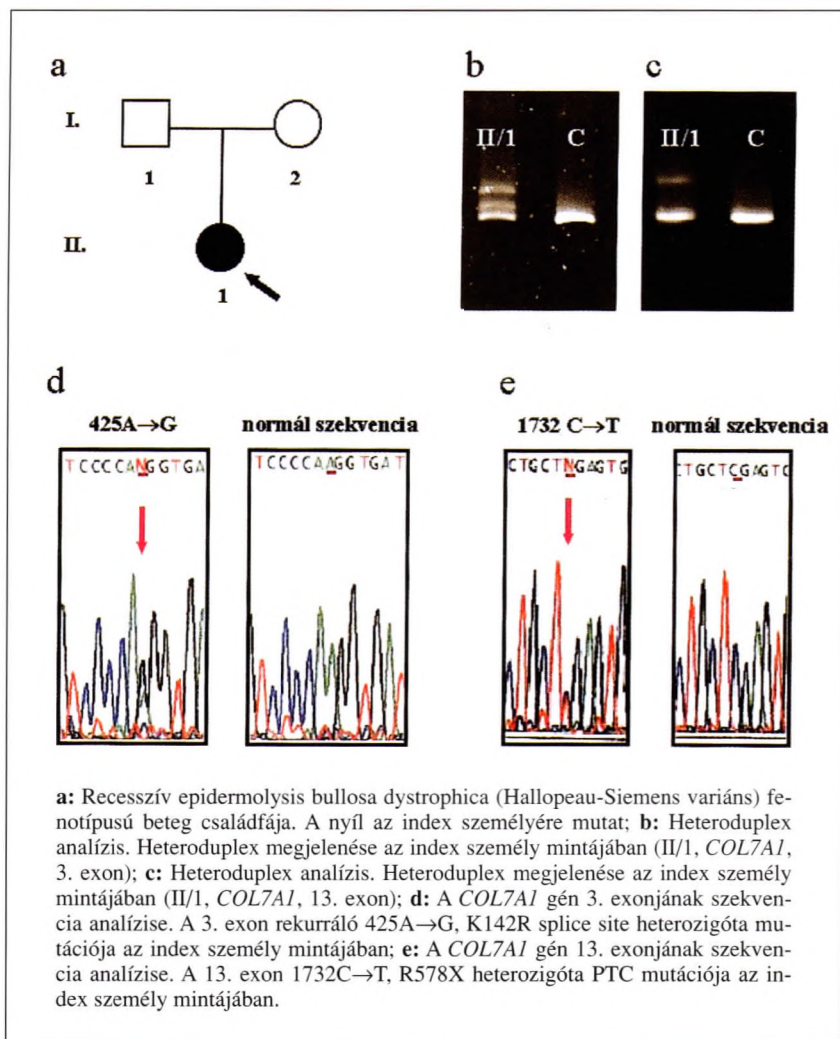
Epidermolysis bullosa dystrophica

A *COL7A1* gén mutációi az EBD altípusban mutathatók ki. Enyhe fenotípussal járó domináns öröklődésmentű formákat általában glicin szubsztitúciós mutációk okoznak. A hibás allél termékei domináns negatív effektus révén megzavarják az ép allél termékének funkcióját is. A kollagén VII. molekulák, bár kóros morfológiával, de kifejeződnek a keratinocytákban. Ezzel összhangban, az EBD domináns betegek bőrének immunfluoreszcens antigén mapping vizsgálata során a protein lineáris megoszlásban detektálható, a bazálmembrán alatt. Súlyos fenotípussal járnak a recesszív öröklődésmentű formák, kiemelten a synechyát és mutilációt okozó Hallopeau-Siemens szindróma. Az antigén mapping vizsgálattal általában nem találunk VII. kollagént a felső dermisben. A protein hiányát a betegek genotípusában a mindkét szülői allélen elhelyezkedő, korai terminációt eredményező PTC mutációk, vagy frame shift révén PTC-t generáló egyéb splice-site mutációk magyarázzák (18).

A *COL7A1* gén mutációi halmozottan észlelhetők a 73. exonban. E kitüntetett régiót néhány rekurráló glicin szubsztitúciós mutáció érinti, melyek elsősorban a 2008., 2034., és 2043. aminosavat érintik. Ezen dominánsan öröklődő glicin szubsztitúciós mutációk azonosíthatók a leggyakrabban a domináns EBD hátterében (19).

A recesszív DEB betegek genotípusában csupán kis számú rekurráló mutáció vált ismertté napjainkig, melyek bizonyos földrajzi megoszlást mutatnak: Olaszországban (497insA, 8441-14de121), Nagy-Britanniában (R2814X, R578X, 7786de1G), Mexikóban (2470insG) és Japánban (5818de1C, E2857X, 6573+1G→C) (20-25).

Tanulmányunkban 43, különféle EBD fenotípusú, a DEBRA Hungary és DEBRA Germany által gondozott és nyilvántartott beteget vizsgáltunk új vagy rekurráló mutációk igazolása céljából (32-33). A közép-európai régióban az érintett allélon PTC-t generáló 425A→G, K142R splice site mutáció előfordulását kiemelkedően magas gyakoriságúnak találtuk (33). A korábban már ismert 425A→G tanziót a *COL7A1* gén 3. exonának -2 donor splice site-ján 10 EBD által érintett családban (23%), összességében 11 allélon azonosítottuk (kilenc proband heterozigóta és egy homozigóta módon hordozta a mutációt) (5. ábra). A 425A→G mutáció allél előfordulási gyakorisága 12,8% volt az általunk vizsgált betegcsoportban, és ez azt sugallta, hogy a közép-európai EBD betegek csoportjának domináló gyakoriságú mutációját



5. ábra

A *COL7A1* gén mutációanalízisének eredményei

gálatokat a hereditár epidermolysis bullosa csoport két altípusában: az epidermolysis bullosa simplex legsúlyosabb formájában, a Dowling-Meara variánsban és a lokalizált tünetekkel rendelkező Weber-Cockayne variánsban a keratin 5 és 14 génjeinek, a *KRT5*, és *KRT14*-nek a korábbiakban nem publikált genetikai eltéréseit azonosítottuk.

Megvalósítottuk az első Magyarországon kivitelezett, sikeres, DNS-alapú prenatális genetikai vizsgálatot egy az EBJ lethalis (Herlitz) variáns következtében első gyermekét elveszített család esetében.

Tanulmányunk új génanalitikai adatokat közölt a közép-európai EBD betegekről. Az epidermolysis bullosa dystrophica betegség génje, a VII. kollagén gén (*COL7A1*), egyike a leghosszabb humán géneknek. Napjainkig több mint 200 mutációja vált ismertté, melyek legtöbbje individuális, család-specifikus. Rekurráló mutációira kevés adat van. Munkánk során sikerült egy a közép-európai régióban nagy gyakorisággal előforduló mutációt azonosítanunk. A 425A→G, K142R mutáció kiemelkedően magas előfordulási gyakoriságával ezen etnikai populáció jellegzetes, rekurráló mutációját képviseli. Tekintettel a vizsgált gén nagyságára, megfigyelésünk Közép-Európában a későbbiekben a *COL7A1* gén mutáció szűrésének stratégiai változáshoz

vezethet. azonosítottuk. A 425A→G, K142R mutációnak 50 egészséges kontroll személy 100 allélének vizsgálata során az 1%-os gyakoriságának találtuk, mivel egy egészséges kontroll személy tünetmentes heterozigóta carriernek bizonyult.

Megbeszélés

Hazánkban egyedülálló és egyben hiánypótló módon egy centrumban elérhetővé vált számos genodermatózis molekuláris genetikai vizsgálata. Mindez a betegek bizalmának növekedéséhez, a klinikai vizsgálatok pontosabbá válásához, új diagnosztikai lehetőségek eléréséhez (genotípus-fenotípus korreláció ismeretében pontosabb prognózis adható), új prevencióeszközökhöz (DNS alapú prenatális vagy preimplantációs diagnosztika), és a későbbiekben új szomatikus génterápiás beavatkozások megteremtéséhez vezethet.

Munkánk célja az epidermolysis bullosa csoport klinikai és genetikai hátterének vizsgálata, mutációanalízis, DNS alapú prenatális diagnosztika bevezetése volt. Hazánkban elsőként végeztünk molekuláris genetikai vizs-

vezethet.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondunk a Heim Pál Gyermekkorház Bőrgyógyászati Osztályának a betegek szakszerű gondozásáért, Menyhárt Ferencnének az immunfluoreszcens és DNS szeparáláshoz nyújtott asszisztenciájáért, Tamási Annának az immunhisztokémiai vizsgálatok magas színvonalú elvégzéséért, Dián Klárának a rutin hisztológiai minták feldolgozásáért és dr. Plavec Tibornének a bőrminták elektronmikroszkópos feldolgozásához nyújtott technikai segítségéért.

A munka az Epidermolysis Bullosa Alapítvány, a T-05-391/03 ETT, a 1/044/2001 NKFP Széchenyi Terv Pályázat, a T043004 OTKA és 19799/99 OMF pályázatok támogatásával valósult meg.

IRODALOM

1. Bruckner-Tuderman L.: Blistering skin diseases: models for studies on epidermal-dermal adhesion. *Biochem. Cell. Biol.* (1996) 74, 729-736.
2. Bruckner-Tuderman L.: Hereditary skin diseases of anchoring fibrils. *J. Dermatol. Science.* (199) 20, 122-133.
3. Bruckner-Tuderman L., Höpfner B., Hammami-Hausli N.: Biology of anchoring fibrils: lessons from dystrophic epidermolysis bullosa. *Matrix Biol.* (1999) 18, 43-54.
4. Fine J. D. és mtsai: Revised classification system for inherited epidermolysis bullosa: Report of the Second International Con-

- sensus Meeting on diagnosis and classification of epidermolysis bullosa. *J. Am. Acad. Dermatol.* (2000) *42*, 1051-1066.
5. *Csikós M. és mtsai*: A keratinok szekezete és funkciói (Structure and function of keratins.) *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle* (1999) *75*, 53-57.
 6. *Csikós és mtsai*: Keratin mutációk okozta örökletes bőrbetegségek. (Keratin mutations associated genodermatoses.) *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle* (2001) *77*, 149-155.
 7. *Szalai Zs., Csikós M., Kárpáti S.*: Epidermolysis Bullosa Herpetiformis Dowling-Meara típusa – két eset ismertetése és az irodalom áttekintése. (Epidermolysis Bullosa Herpetiformis Dowling-Meara type- two cases and review of literature.) *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle* (2000) *76*, 247-250.
 8. *Chen H. és mtsai*: Keratin 14 gene mutations in patients with epidermolysis bullosa simplex. *J. Invest. Dermatol.* (1995) *105*, 629-632.
 9. *Bonifas J. M., Rothman A. K., Epstein E. H.*: Epidermolysis bullosa simplex: evidence in two families for keratin gene abnormalities. *Science*. (1991) *254*, 1202-1204.
 10. *Coulombe P. A. és mtsai*: Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses. *Cell*. (1991) *66*, 1301-1311.
 11. *Smith F. J. D. és mtsai*: Plectin deficiency results in muscular dystrophy with epidermolysis bullosa. *Nature Genet.* (1996) *13*, 450-457.
 12. *Schumann H. és mtsai*: Three novel homozygous point mutations and a new polymorphism in the COL17A1 gene: relation to biological and clinical phenotypes of junctional epidermolysis bullosa. *Am. J. Hum. Genet.* (1997) *60*, 1344-1353.
 13. *Schacke H. és mtsai*: Two forms of collagen XVII in keratinocytes. A full-length transmembrane protein and a soluble ectodomain. *J. Biol. Chem.* (1998) *273*, 25937-25943.
 14. *Franzke C. W. és mtsai*: Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs. *EMBO J.* (2002) *21*, 5026-5035.
 15. *Nakano A. és mtsai*: Herlitz junctional epidermolysis bullosa: novel and recurrent mutations in the LAMB3 gene and the population carrier frequency. *J. Invest. Dermatol.* (2000) *115*, 493-498.
 16. *Ruzzi L. és mtsai*: A homozygous mutation in the integrin alpha-6 gene in junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia. *J. Clin. Invest.* (1997) *99*, 2826-2831.
 17. *McGrath J. A. és mtsai*: Mutations in the 180-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG2) a hemidesmosomal transmembrane collagen (COL17A1) in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Nature Genet.* (1995) *11*, 83-86.
 18. *Christiano A. M. és mtsai*: A strategy for identification of sequence variants in COL7A1, and a novel 6 bp deletion mutation in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Hum. Mutat.* (1997) *10*, 408-414.
 19. *Mecklenbeck S. és mtsai*: Clustering of COL7A1 Mutations in Exon 73: Implications for Mutations Analysis in Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *J. Invest. Dermatol.* (1999) *112*, 398-400.
 20. *Christiano A. M. és mtsai*: A common insertion mutation in COL7A1 in two Italian families with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol.* (1996) *106*, 679-684.
 21. *Ashton G. H. S. és mtsai*: Recurrent molecular abnormalities in type VII collagen in southern Italian patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Clin. Exp. Dermatol.* (1999) *24*, 232-235.
 22. *Gardella R. és mtsai*: Three homozygous PTC mutations in the collagen VII gene of patients affected by recessive dystrophic epidermolysis bullosa: analysis of transcript levels in dermal fibroblast. *Human Mutation.* (1999) *13*, 439-452.
 23. *Mellerio J. E. és mtsai*: Recurrent mutations in the type VII collagen gene (COL7A1) in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol.* (1997) *109*, 246-249.
 24. *Salas-Alains J. C., Amaya-Guerra M., McGrath J.*: The molecular basis of dystrophic epidermolysis bullosa in Mexico. *International Journal of Dermatology.* (2000) *39*, 439-442.
 25. *Tamai K., Murai T., Mayama M. és mtsai*: Recurrent COL7A1 mutations in Japanese patients with dystrophic epidermolysis bullosa: positional effects of premature termination codon mutations on clinical severity. *J. Invest. Dermatol.* (1999) *112*, 991-993.
 26. *Miller S. A., Dykes D. D., Polesky H. F.*: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acid. Res.* (1988) *16*, 1215.
 27. *Ganguly A., Rock J. M., Prockopp D. J.*: Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent induced bands in DNA heteroduplexes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* (1993) *90*, 10325-10329.
 28. *Kárpáti S. és mtsai*: Az Országos Epidermolysis Bullosa Centrum megalakulása és öt éves működése. *Bőrgyógyászati és Venerológiai Szemle* (2000) *76*, 283-285.
 29. *Csikós M. és mtsai*: Novel Keratin 14 Gene Mutations in Hungarian Patients with Epidermolysis Bullosa Simplex. *Exp. Dermatol.* (2004) *13*, 185-191.
 30. *Coulombe P. A. és mtsai*: A function for keratins and a common thread among different types of epidermolysis bullosa simplex diseases. *J. Cell. Biol.* (1991) *115*, 1661-1674.
 31. *Sasaki Y. és mtsai*: A recurrent keratin 14 mutation in Dowling-Meara epidermolysis bullosa simplex. *Br. J. Dermatol.* (1999) *14*, 747-748.
 32. *Csikós M. és mtsai*: Dystrophic epidermolysis bullosa complicated by cutaneous squamous cell carcinoma and pulmonary and renal amyloidosis. *Clin. Exp. Dermatol.* (2003) *28*, 163-166.
 33. *Csikós M. és mtsai*: High Frequency of the 425A→G Splice Site Mutation and Novel Mutations of COL7A1 Gene in Central-Europe: Significance for Future Mutation-Detection Strategies in Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Br. J. Dermatol.* (2004) (közlés alatt).