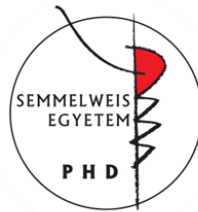


A szteroid-rezisztens nephrosis két új mechanizmusa

A doktori értekezés tézisei

Dr. Balogh Eszter

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Tory Kálmán, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Váradi András, egyetemi tanár
Dr. Ledó Nóra, klinikai orvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Vásárhelyi Barna, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Haltrich Irén, tud. főmunkatárs
Dr. Szabó László, osztályvezető főorvos

Budapest
2020

1. Bevezetés

A szteroid-rezisztens nephrosis a gyermekkori krónikus veseelégtelenség 6-7 %-áért felelős. Ezen belül elkülönítünk genetikai és immunológiai formákat. A genetikai formák háttérében kivétel nélkül a glomeruláris filtrációs barrier fehérjéit kódoló gének (*NPHS2*, *WT1*, *NPHS1*, *MYO1E*, *TRPC6*, *INF2*) mutációi állnak. A glomeruláris filtrációs barrieret fenesztrált endothel, bazális membrán és podocita lábnyúlványok alkotják. Leggyakrabban a podociták fehérjéit kódoló gének érintettek a szteroid-rezisztens nephrosis (SRNS) genetikai formáinak kialakulásában. Genetikai formák esetén az immunszuppresszív kezelés indokolatlan és a betegség a transzplantált vesében nem újul ki, ezért döntő jelentőségű az immunmediált formáktól való elkülönítése.

Kutatásom egyik témája az *NPHS2* gén által kódolt podocin fehérje. Az *NPHS2* biállélikus mutációi 10 éves korra rendszerint végstádiumú veseelégtelenséghez vezetnek, a veleszületett és csecsemőkori szteroid-rezisztens nephrosis 15-39%-áért, a gyermekkori 13-14%-áért felelősek. A podocin fehérje kizárólag podocitákban expresszálódik. Integráns membránfehérje, a stomatin család tagja, ahhoz hasonlóan homooligomereket képez. A nephrinhez kapcsolódik, így a glomeruláris résmembrán alkotóeleme. Emellett intracelluláris jelátvitelt közvetít, mellyel a podociták környezethez való alkalmazkodását segíti elő, de pontos funkciója ezidáig nem ismert.

Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy az *NPHS2* gén gyakori variánsa (R229Q, MAF: 3,6%, rs61747728) csak meghatározott transz-asszociált variánsokkal együtt patogén. Ilyen módon homooligomert képző fehérjék közvetíthetnek interallelikus interakciót: elősegíthetik vagy gátolhatják a másik allél által kódolt fehérje működőképességét. A jelenség a biológiában régről ismert, humán autoszomális recesszív betegségekben azonban ezidáig nem volt az. Az észrevétel azon alapult, hogy az *NPHS2* ezen gyakori, eddig nem pontosan ismert patogenitású allélja, mely genetikai

SRNS miatt gondozott betegekben egyértelmű dúsulást mutatott, homozigóta formában nem, csak bizonyos, a gén két utolsó (7-8.) exonjában lévő mutációkhoz társultan volt patogén. A kódolt fehérje, az R229Q podocin, a vad podocinhoz hasonlóan oligomerekbe rendeződik. Korábbi ismeretek szerint a podocin N- és C-terminális része is részt vesz az oligomerizációban, a különböző domének pontos szerepe ebben nem ismert. A jelenséget *in silico* fehérjeszerkezeti modellek segítségével részben szerkezeti eltérésekkel magyarázták, az R229Q podocin rigidebb szerkezetet mutatott. Sejtkultúrában végzett fehérjelokalizációs kísérletekkel ezen patogén társulások esetén a podocin fehérjék membránba való kihelyeződése gátolt volt. A fenti észrevétel alapvetően meghatározza a diagnosztikát, így a terápiát, és a genetikai tanácsadást is. Ha egy szülőpár egyik tagja az 1-6. exonokban hordoz mutációt, a másik pedig az R229Q podocin variáns kódoló allélt, akkor a gyermekük nem lesz érintett.

A kutatás másik témája egy új *DKC1* mutáció hatásának vizsgálata, mely gén mutációja genetikai SRNS hátterében ezidáig nem volt ismert, csak veleszületett diszkeratózis és Hoyeraal-Hredarsson szindróma hátterében. Utóbbiak a telomeropátiák, a telomer megrövidüléséből fakadó betegségek. A veleszületett diszkeratózis klasszikus tünetei a leukoplákia, körömdisztrófia, csontvelő érintettség, korai öregedés és fokozott tumorkockázat. A Hoyeraal-Hreidarsson szindróma mentális retardációval, epilepsziával, mikrokefáliával, cerebelláris hipopláziával, intrauterin és növekedésbeni elmaradással, progresszív pánцитopéniával járó, csecsemő-és kisgyermekkorban letális kimenetelű kórkép. A *DKC1* gén által kódolt diszkerin fehérje a telomeráz komplex része. A telomeráz reverz transzkriptázzal (TERT), a telomeráz RNS komponenssel (TERC), a NOP10, NHP2 és Gar1 fehérjékkel együtt ribonukleoprotein komplexet alkot. Két fő feladatot lát el: a telomerek meghosszabbítását, mely az osztódó sejteket a korai öregedéstől, apoptózistól védi, valamint a pszeudouridilációt, mely a természetben az egyik leggyakrabban látott poszttranszkripciósi RNS

módosítás, ami az RNS-ek stabilitását és töretlen funkcióját segíti elő. A diszkerin elsősorban a kis nukleoláris és a riboszómális RNS-ek pszeudouridilációját végzi. A telomer-betegségek háttérében valamennyi komplexet alkotó gén és egyéb társuló fehérjét kódoló gének érintettek lehetnek. Amennyiben a *DKCI* mutációi okozzák a betegséget, azok elsősorban a gén 5' és 3' végén helyezkednek el. A pszeudouridilációs domént kódoló régióban eddig összesen csak két mutáció ismert, mindkettő súlyos Hoyeraal-Hredarsson szindrómát okoz.

Az SE I.sz. Gyermekklinikán észlelt, új, nephrosis szindrómával, cataractával, halláscsökkenéssel és enterocolitisszel járó szindróma vizsgálatát kezdte el korábban a kutatócsoportunk. Egy súlyosan érintett roma származású fiúgyermek volt az első index beteg, ezt követően végzett családfaelemzés világított rá, hogy a betegség a családban 3 generáción keresztül fellelhető. A fiúk érintettsége sokkal súlyosabb, az esetek nagy részében 3 éves korra letális, az érintett nők cataractában, olykor retinitis pigmentosában és halláscsökkenésben szenvednek, mely alapján az X-hez kötött öröklésment volt valószínű. A szindróma háttérében a gén azonosítása az SE I. sz. Gyermekklinikán és kollaborációban a Párizsi Necker Kórházban és a Kölni Egyetemen történt. A lókus azonosítása kapcsoltsági analízissel történt, az X kromoszóma hosszú karján sikerült azonosítani egy 5 megabázis méretű régiót (Xq28, logarithm of the odds 3,01), mely feltételezte a kóros mutáció *de novo* megjelenését a nagyszülői generációban. Mivel rendelkezésre álltak haploidentikus, de nem érintett férfiakról is minták a nagyszülői generációból, a régió célzott új generációs szekvenálása történt az index betegben és egy nem érintett haploidentikus felnőttben. Ezen módszer segítségével egy kódoló régióban elhelyezkedő pontmutációt, az említett p.Glu206Lys-t kódoló mutációt sikerült azonosítani a *DKCI* génben. A mutáció 300, köztük 100 roma kontroll egyénben nem volt jelen, a predikciós programok szerint patogén, és egy evolúciósan jelentősen (az archeáig visszamenően) konzervált régiót érint, így ez a p.Glu206Lys-t kódoló mutáció kórokinak tekinthető. Az újonnan

azonosított, Glu206Lys diszkerint kódoló *DKCI* mutáció a pszeudouridilációs domént érinti, és tüneteiben a diszkeratózissal csak néhány ponton fed át (csontvelő érintettség, enyhe diszkeratózis).

Brit kollaboránsaink (UCL Great Ormond Street, London) a *NOP10* génben azonosítottak egy új homozigóta mutációt, mely a Thr16Met aminosavcserét kódolja. A Thr16Met szintén a pszeuouridilációs katalitikus zsebben helyezkedik el, és a két érintett aminosav a komplexben egymással kapcsolatban áll. Sem a *DKCI* Glu206Lys, sem a *NOP10* Thr16Met hatására nem szakad meg a két fehérje kapcsolata. A homozigóta *NOP10* Thr16Met által okozott fenotípus a p.Glu206Lys-t hordozó fiúkéval nagymértékben megegyezik.

2. Célkitűzések

1. A podocin C-terminális dimerizációjának megértése a természetben előforduló csonkoló podocin mutációk heterooligomerizációra gyakorolt hatásának vizsgálata révén.
2. A p.Arg229Gln (R229Q) oligomerizációra gyakorolt hatásának meghatározása *in vitro* expresszált natív podocin fehérjék között mért FRET-hatékonyság révén.
3. Egy új, szteroid-rezisztens nephrosis szindrómával, halláscsökkenéssel, cataractával és enterocolitisszel járó kórkép hátterében azonosított kóroki mutáció fehérje-interakcióra és lokalizációra gyakorolt hatásának vizsgálata.
4. A humán *DKCI* mutációnak megfelelő mutáció létrehozása zebrahalban.
5. A *dkc1* mutáns zebrahal törzsekben a fenotípus és a telomerhossz, illetve a pszeudouridiláció kapcsolatának vizsgálata.

3. Módszerek

A podocin oligomerizáció vizsgálata

A podocin oligomerizáció vizsgálatához a fehérje C-terminális végét (C-terminal tail: CTT) érintő trunkáns mutáns podocin fehérjét használtunk, a vad vagy R229Q podocinnal képződő heterodimerek közötti kötés változásait figyeltük. A három trunkáns mutáns az R286Tfs*17, az A317Lfs*31, az F344Lfs*4 podocin voltak, emellett kiegészítésül egy mesterségesen létrehozott F344* podocint is vizsgáltunk. A CTT régió három helikális elemből (H1,2,3), egy úgynevezett internalizációs (TVV337-339)-motívumból és összekötő szekvenciákból áll. Az R286Tfs*17 podocin nem, az A317Lfs*31 podocin egy (H1), a F344Lfs*4 és a F344* podocinok két intakt helikális elemet (H1, H2) és a TVV-motívumot tartalmazzák. Az F344Lfs*4 és a F344* podocinok csak egy három aminosavból álló (Leu-Thr-Tyr) frameshift szekvenciában különböznek egymástól.

Podocint expresszáló plazmidok felsokszorosítása

A humán podocinvariánsokat kódoló plazmidok kollaborációs partnereinktől származtak. Kompetens baktériumokban, antibiotikum rezisztencia alapján felsokszorosítottuk, plazmid kivonó kittel transzfekciós tisztaságban kinyertük, Sanger szekvenálással ellenőriztük őket. Az expresszált podocinok N-terminális HA (epitóp)-taget hordoztak.

A podocinvariánsok tranziens expressziója, immunprecipitációja és peptidelúciója

A podocinvariánsokat standard módon fenntartott humán embrionális vesesejtekben (HEK298), tranziens módon (kálcium-foszfát alapú módszerrel) expresszáltuk. Az inkubációs időt követően proteáz-inhibitor mellett a HEK298 sejteket lízisnek vetettük alá. A teljes fehérjelizátumot HA-ellenes primer monoklonális antitesttel inkubáltuk. A fehérje-antitest immunkomplexeket az antitestek univerzális Fc-régióján keresztül

mágneses gyöngyökhöz rögzítettük. A gyöngy-antites-fehérje komplexet három alkalommal lízispufferben mostuk. A natív podocin fehérje kinyeréséhez a folyamat utolsó lépéseként a podocinok antitestről való leválasztását kompetitív elúcióval végeztünk el, túlsúlyban szintetikus HA-peptidet adva az oldathoz. A natív podocinok meglétét a kinyert oldatokban Western blottal ellenőriztük.

Natív podocinok jelölése fluorofórokkal, fluoreszcencia-spektroszkópia

Az egyes podocinvariánsokat külön kémcsövekben, tízszeres koncentrációban hozzáadott fluorofór festékmolekulákkal festettük meg. A megfestett podociták oldatát szűrőn engedték át, hogy a szabadon maradt festékmolekulák ne maradjanak az oldatban. Az így létrejött festett podocinokat párosával elegyítettük, az elegyítés következtében heterodimerek (is) tudtak képződni. Az elegyített podocinokon az egyik festékmolekula mindig donor, a másik akceptor molekula kellett legyen. A donor és az akceptor között létrejövő fluoreszcens rezonancia energia transzfert mértük (FRET). A donor által emittált, akceptor által elnyelt energia mértéke utal a két molekula közötti kötés erősségére, ezt nevezzük donor élettartam csökkenésnek, és abból számított FRET-hatékonyságnak. Valamennyi mérést három alkalommal ismételtük, legalább két különböző expresszióból származó fehérjék között. A három mérés átlagát vettük eredményül.

Statisztika

A statisztikai ellenőrzést ANOVA és Tukey HSD post hoc tesztekkel végeztük (Statistica 13.2 szoftverrel).

Az új diszkerin mutáció hatásának vizsgálata

Diszkerin és NOP10-et expresszáló plazmidok létrehozása

Bakteriális expressziós vektorokban megkaptuk kollaboránsainktól a vad, a p.Ala353Val (gyakori DC mutáns) diszkerin és a NOP10 fehérjék cDNS-ét. Polimeráz láncreakció (PCR) segítségével restrikciós helyeket és epitóp taget (Flag, V5) hozzáadva a kódoló szekvenciákhoz humán expressziós vektorokba ültettük át a cDNS-eket. A plazmidokat a podocin kódoló plazmidokhoz hasonlóan sokszorosítottuk fel és készítettük elő a transzfekcióra. Sanger szekvenálással ellenőriztük a létrehozott szekvenciákat.

Mutáns diszkerin és NOP10 plazmidok létrehozása

A p.Glu206Lys diszkerin és a Thr16Met NOP10-et kódoló plazmidokat PCR alapú helyspecifikus mutagenézissel hoztuk létre. Fontos lépései ennek a mutagenézis PCR-t követő ligáció, ugyanis a DNS polimeráz erre nem képes, valamint a templát DNS-ek elemésztése, ezt követően a korábban már említett lépések (transzformáció, plazmidtisztítás, Sanger szekvenálás) következtek.

Nyomásperturbációs fluoreszcens spektroszkópia

A diszkerin és NOP10 fehérjék expressziója, immunprecipitációja, peptidelúciója a podocinokhoz hasonlóan történt. A Glu206Lys diszkerin-vad NOP10 és a vad diszkerin-Thr16Met NOP10 fehérjeparákat vizsgáltuk és hasonlítottuk össze a vad diszkerin-NOP10 kapcsolatával. A két fehérje oldatához egy 8-Anilino-naftalin-1-szulfonsav (ANS) nevű fluorofórt adtunk hozzá, mely apoláris felszínre képes kötődni, kötődésekor pedig fluoreszcens jelintenzitása megnő. A fehérjék oldatban egymással kapcsolatban lépnek. A fehérjeoldatot a tér minden irányából nyomásnak (0-3500 bar) kitéve a dimerek disszociálni kezdenek, a szabaddá váló apoláris felszínre pedig beköt az ANS. Az, hogy mely nyomás mellett nő meg a fluoreszcens jelintenzitás és milyen mértékben megközelítőleg korrelál a két fehérje közötti kötőfelület méretével és a kötés

erősségével. A vizsgálattal leírt paraméter a fluoreszcencia intenzitás a nyomás függvényében, számított paraméterek a disszociációs állandó (10-es alapú logaritmus, a pK_d) és a disszociáció közben bekövetkezett moláris térfogatváltozás. A görbe menetéből a strukturális heterogenitásra is következtetni lehet, összehasonlító jelleggel. A méréseket három alkalommal ismételtük, legalább két különböző expresszióból származó fehérjén. A nyomásperturbációs méréseket az SE Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetével kollaborációban végeztük (Dr. Schay Gusztáv). A módszer kiegészítéseképpen szintén kollaborációban az ELTE Fehérje-modellező Kutatócsoport és Szerkezeti Biokémiai Laboratóriumával (Dr. Karancsiné Dr. Menyhárd Dóra) molekuláris dinamika (MD) módszerével *in silico* fehérjeszerkezeti modellekkel gazdagíthattuk a látott képet.

A humán diszkerin lokalizációjára vonatkozó immuncitológiai vizsgálatok

A humán vad, Glu206Lys és Ala353Val diszkerinek lokalizációját francia kollaborációban (Imagine Institute, Párizs), standard módon tenyésztett humán immortalizált podocita sejtvonalon végeztük. Kollagénnel borított fedőlemezre tettük ki és (non-liposzómális módszerrel) tranziensen transzfektáltuk a sejteket. N-terminális flag-taget viselő diszkerinokkal monoexpressziót végeztünk. Inkubációt követően a sejteket paraformaldehiddel fixáltuk, sóoldattal mostuk, nyúl eredetű primer, monoklonális, flag-ellenes antitesttel inkubáltuk. Ismételt mosások után fluoroför konjugált, nyúl antitest ellenes szekunder ellenanyaggal végeztük a jelerősítést, majd újabb mosások, sejtváz- (phalloidin) és sejtmag (Hoechst)-festés, végül fedés következett. A képeket konfokális mikroszkóppal elemeztük.

Zebrahalak genotipizálása, mutáns zebrahalak azonosítása

Az ELTE Genetikai Tanszékének Zebrahal Kutatócsoportjával (Dr. Varga Máté) szoros együttműködésben CRISP/Cas9 rendszerrel a humán p.Glu206Lys és a p.Ala353Val *DKC1*-et kódoló mutációval ekvivalens mutációkat terveztünk létrehozni zebrahalban. Ennek

megfelelően a zebrahal 7-es és 11-es exonját céloztuk meg a vezető RNS-el. A létrehozott mutációk szűrését zömében a SE I.sz. Gyermekklinikán végeztük allélspecifikus PCR-el és Sanger szekvenálással. Az injektált embriókból a dezoxiribonukleinsavat (DNS) dechorionálás után NaOH oldattal és melegítéssel vontuk ki, a DNS-t további alkoholos kicsapásos módszerekkel tisztítottuk PCR tisztaságúvá. A kiszűrt, további vizsgálatokra szánt embriókat fenntartottuk heterozigóta haltörzsek formájában. Ettől kezdve a szűrés farokúszóból történt, allélspecifikus PCR vagy fragmensanalízis módszerével. Fragmensanalízissel már egy bázisnyi hosszkülönbség is láthatóvá válik, inzerciók és deléciók vizsgálatára alkalmas módszer. Valamennyi PCR-hez a primereket Sequencher (4.9) programmal terveztük meg.

Dkc1^{-/-} és dkc1^{+/?} genotípusú zebrahal lárvákön végzett áramlási citometriás vizsgálatok a telomerhossz meghatározására

Tíz-tíz homozigóta mutáns (*dkc1^{-/-}*) és homozigóta vad vagy heterozigóta (*dkc1^{+/?}*), ötödik fertilizációt követő életnapos lárvából trikain-metán-szulfonátos érzéstelenítést követően nyert izolált sejteken végeztük az áramlási citometriás méréseket. A folyamat lépései dechorionálás, Na-hipokloritos tisztítás, mechanikus roncsolás, kollagenázos emésztés, szűrés, Bürker-kamrában sejt számlálás voltak (hogyan mindig azonos mennyiségű sejtet hasonlítottunk össze). Ezt a DNS-ek telomer régiójának fluoreszcens festékkel történő jelölése követte (erre alkalmas kittel). A teljes kromoszóma is jelölésre került egy másik típusú festékkel, így a G0/G1 állapotú sejtekre tudtuk korlátozni a méréseket. A sejteket BD FACSAria áramlási citométeren (BD Biosciences) analizáltuk Dr. Toldi Gergely és Dr. Florentina Sava segítségével. A mérést három alkalommal ismételtük.

*Dkc1^{-/-} és dkc1^{+/?} genotípusú halakon végzett Western blot vizsgálatok (*dkc1*, p53)*

Hat-hat homozigóta mutáns és homozigóta vad vagy heterozigóta lárvából második, negyedik és ötödik (fertilizációt követő) életnapon

előzetes érzéstelenítést követően erre kifejlesztett protokoll szerint fehérjét vontuk ki. A mintákat Western blottal vizsgáltuk. A primer ellenanyagok nyúlban termelt poliklonális diszkerin ellenes valamint egérben termelt monoklonális p53 ellenes antitestek voltak (külön blottokon). A fehérjemennyiség azonosságát az azonos számú kiindulási lárván túl gamma- vagy alfa-tubulinnal kontrolláltuk. A denzitometriás méréseket ImageJ szoftverrel végeztük.

X-kromoszóma inaktiváció mértékének meghatározása humán sejtekben

Perifériás vérből nyert leukocitákból, bőrből és fibroblasztokból kivont mintákból határoztuk meg a X-kromoszóma inaktiváció mértékét a súlyosan érintett beteg lányban és édesanyjában. A mintákból RNS kivonást majd reverz transzkripciót végeztünk, az így létrejött komplementer DNS-en (cDNS) pedig a Glu206Lys-kódoló mutációra allélspecifikus, Taqman-próbával kiegészített kvantitatív PCR-t. Agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük a termékeket. (Az primerek specificitásáról a vizsgálat előtt, mutáns és vad plazmid hígítási sorok segítségével győződünk meg.) A kvantitatív PCR eredményét LightCycler Analysis Softverrel értékeltük, mely a megadja a kiindulási templát DNS mennyiségével arányos feltörési ciklusszámot (Cp érték). A vad és mutáns allélra specifikus primerrel történt PCR-ek Cp értéke közötti különbség alapján számoltuk ki a vad és mutáns mRNS-ek, így az aktív vad és mutáns X-kromoszómák mintában lévő arányát ($X_{\text{Glu206Lys}}\% = 100 / (2^{(\text{Cp}_{\text{Glu206Lys}} - \text{Cp}_{\text{vad}})} + 1)$). Három mérés átlagát értékeltük.

Vad és mutáns zebrahal törzsekből kivont RNS-en végzett immunonorthern blot technika

12-12 homozigóta mutáns és homozigóta vad vagy heterozigóta, négy és fél-ötödik fertilizációt követő életnapos lárvából végeztünk érzéstelenítést követően, protokollok szerint teljes RNS kivonást. Ezt követően Northern blot technikát alkalmaztunk. Az RNS-t denaturáló agaróz gélben megfuttattuk, a gélekről felvétel

készítettünk. A gélekből az RNS-t nejlon membránra átvittük. Az átvitt RNS-t a membránnal UV-sugár alatt keresztkötöttük. Ettől kezdve egy hagyományos Western blothoz hasonlóan dolgoztunk: blokkolás, primer monoklonális pszeudouridin ellenes antitest, szekunder antitest, (ezek között öblítések), végül kemilumineszcencia alapú előhívás. E kettő technika ötvöztetését nevezzük immuno-northern blotnak. Az agaróz géleken az RNS-ek riboszómális alegységeiről és a membránokon az alegységeknek megfelelően detektált kemilumineszcencia jelekről denzitometriai adatokat vettünk fel (ImageJ szoftverrel): Ezek hányadosát véve (pszeudouridin jelintenzitás/RNS mennyiség) tájékozódunk az egyes RNS alegységek pszeudouridiláltsági állapotáról. Valamennyi kísérletet háromszor végeztük el. A Northern blot technikát Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ (NAIK) Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézetében (MBK) kivitelezte Dr. Silhavy Dániel tudományos tanácsadó és Szádeczky-Kardoss István PhD hallgató segítségével.

A hal és a humán 28S és 18S RNS alegységek érintettségének vizsgálata

Az immuno-northern-blothoz használt teljes RNS mintákkal megegyező mintákkal dolgoztunk. A teljes RNS minőségi elemzését, beleértve a nagy (28S) és kis (18S) riboszómális alegységek arányát ún. RNS Pico chipen gélelektroforézissel határozták meg számunkra egy erre szakosodott laboratóriumban (Chromoscience Kft.). A méréseket három alkalommal ismételtük.

Statisztika

A pszeudouridin denzitometria és a 28/18 S riboszómális alegység arány eredményeit kémmintás t-próbával vetettük össze (Statistica 13.2-es szoftverrel).

4. Eredmények

A podocin oligomerizáció vizsgálatának eredményei

A vad és R229Q podocin homooligomerekben mért FRET-hatékonyság ~20% volt. A vad-R229Q heterooligomerben a FRET-hatékonyság ennél is magasabb volt. Az R286fs*17 podocin, melyből a teljes CTT régió hiányzik, nem adott FRET-jelet sem a vad, sem az R229Q podocinnal. Az R229Q, A317Lfs*31, F344Lfs*4 és F344* variánsok jelentősen befolyásolták a vad és az R229Q podocinnal képzett heterooligomerekben mért FRET-hatékonyságot. A patogén R229Q-F344Lfs*4 társulásban más tendenciájú változás következett be az R229Q-F344* heterooligomerhez képest, mint a vad-344Lfs*4 és vad-F344* heterooligomerekben: vad podocin esetén a három terminális aminosav megléte növelte, R229Q podocin esetén csökkentette a FRET-hatékonyságot.

Az új diszkerin mutáció hatásának vizsgálati eredményei

A Glu206Lys diszkerin-NOP10 valamint a diszkerin-Thr16Met NOP10 kölcsönhatásának változásai a vad variánssal való asszociációhoz képest

Nyomásperturbációs fluoreszcencia spektroszkópiával ábrázoltuk a fluoreszcens jelintenzitás növekedését a növekvő nyomás függvényében a különböző diszkerin és NOP10 társulásokban. Mindkét mutáció (Glu206Lys diszkerin és Thr16Met NOP10) esetében azt tapasztaltuk, hogy a fluoreszcens jelintenzitás magasabb nyomásoknál kezd el meredeken emelkedni, és a jelintenzitások csúcsa mindkét mutáció esetében jelentősen alacsonyabb, mint a vad társulásokban. A számított eredmények közül a pK_d érték, mely arányos a kötéserősséggel, a Glu206Lys diszkerin esetében szignifikánsan magasabb, Thr16Met NOP10 esetén szignifikánsan alacsonyabb volt a vad diszkerin-NOP10 párokéhoz képest. A kötőfelszín mérete tendenciájában változott csak, előbbieknél

megfelelően (mutáns diszkerin esetében nőtt, NOP10 esetében csökkent). A dimerek strukturális heterogenitása és szerkezeti elemeinek száma mindkét mutáció esetében szignifikánsan megnőtt, Thr16Met NOP10 esetében lényegesen nagyobb mértékben. A molekuláris dinamikai vizsgálatok megmutatták, hogy a Glu206 diszkerin a Thr16 és a Lys18 NOP10-hez hidrogénkötéssel kapcsolódik. Mindkét mutáció hatására megszakadnak ezen hidrogénkötések. A pszeudouridilációért felelős, katalitikus diszkerin Asp125 mindkét mutáció hatására eltávolodik a szubsztrát uridintól.

A vad és Glu206Lys diszkerin lokalizációjának vizsgálata

A Glu206Lys lokalizációja a korábban ismert gyakori DC mutáns, az Ala353Val-hoz hasonlóan immuncitológiai vizsgálat alapján nem változott meg (a mutáns diszkerin továbbra is a sejtmagban helyezkedik el).

A CRISPR/Cas9 injektálást követően kiszűrt mutáns zebrahal törzsek

A humán Glu206Lys és Ala353Val diszkerinnel ekvivalens mutációkat nem tudtuk zebrahalban létrehozni, helyette több inzerciót, delécióit és kereteltolódással járó indelt szűrtünk ki mind a 7-es, mind a 11-es exonban. Végül egy 7-es (#17/elu1) és egy 11-es (#7/elu8) exont érintő trunkáns mutáció hatásával foglalkoztunk részletesebben. A homozigóta mutáns lárvák fenotípusa sok tekintetben emlékeztetett a betegek fenotípusára. Makroszkóposan kisebb, görbült testet, kisebb, hiperpigmentált szemet, szikanyag eloszlási zavart és perikardiális ödémát láttunk. Szöveti vizsgálatok során abnormális szem- és tektumszerkezetet, lencsehomályt, emelkedett sejtciklus-marker (ccnD1, PH3) szinteket, éretlen belső fül- és bélszerkezetet, alacsonyabb WT1-pozitív podocita-számot, kóros tobozmirigy szerkezetet, éretlen csontvelőszerveket (gata1, rag1) és hipopláziás állkapcsot láttunk. Legkésőbb az ötödik fertilizációt követő életnapon a nullmutáns zebrahal lárvák elpusztultak. A nullmutánsokban a fertilizációt követő harmadik életnapon a *dkc1* mRNS szintje jelentős mértékben csökkent, negyedik életnapon diszkerin fehérjét sem tudtunk már

kimutatni (a 2. életnapig még kitartott az anyai *dkc1* mRNS-ek hatása).

Az áramlási citometriával meghatározott telomerhossz mérések eredményei

Az ötödik fertilizációt követő életnapon a vad és nullmutáns zebrahalak telomerhossza lényegében nem különbözött egymástól.

*A *dkc1*-/- zebrahalak *p53* szintje*

Az ötödik fertilizációt követő életnapon a nullmutáns zebrahal lárvákban a *p53* szintjének megemelkedését észleltük. Kettős mutáns (*dkc1* -/- és *p53* -/-) zebrahalakban a letális fenotípus nem volt mentesíthető.

Az X-kromoszóma inaktivációs mérések eredményei

A Glu206Lys mutáns allélt expresszáló X-kromoszómák aránya a súlyosan érintett leány perifériás sejtjeiben 7 éves korában 40%, 13 éves korában csupán 26%, a 36 éves édesanyában pedig már gyakorlatilag nem volt kimutatható, az életkor előrehaladtával tehát a mutáns allélt expresszáló X-kromoszómát hordozó sejtek aránya a vérben csökkent. A lassabban osztódó sejteket tartalmazó hasbőrből és a fibroblasztokból kivont RNS mintákban lényegesen nagyobb arányban, 96 és 99 %-ban expresszálódott a mutáns allél, utalva arra, hogy a leány súlyos érintettsége egy egyenlőtlen X-kromoszóma inaktiváció következménye.

*A *dkc1*-/- mutáns zebrahalak riboszómális RNS-pszeudouridilációja*

Az immuno-northern blot technikával a riboszómák kis (18S) alegységét sikerült érdemben megfesteni (a 28S egységek kevésbé festődtek meg). Nullmutáns lárvákban a 18S riboszómális RNS alegység pszeudouridilációja szignifikáns mértékben csökkent.

A $dkc1^{-/-}$ zebrahalakból kivont RNS-en végzett integritási mérések eredményei

A 28S/18S arány a trunkáns mutáns zebrahal lárvákban megemelkedett az egészséges társaikhoz képest. A 28S/18S arány megemelkedésének hátterében a 18S alegység mennyiségének csökkenése állt.

5. Következtetések

1. A podocin kizárólag a C-terminális régióban oligomerizálódik.
2. A podocin C-terminális régiójának mindhárom helikális régiója befolyásolja az oligomerizációt.
3. Az F344Lfs*4 domináns negatív hatását magyarázhatja a frameshift szekvencia által kódolt három aminosav oligomerizációt befolyásoló hatása.
4. A diszkerint kódoló *DKC1* gén Glu206Lys mutációja egy nephrosis szindrómával, halláscsökkenéssel, cataractával és enterocolitisszel járó új szindrómát okoz, mely fiúkban kisgyermekkorban letális, nőkben cataractával, retinitis pigmentosával és halláscsökkenéssel jár.
5. A diszkerin Glu206Lys mutációja a NOP10 fehérjével való kapcsolatot jelentősen torzítja.
6. A diszkerin Glu206Lys mutációja a fehérje lokalizációját nem befolyásolja.
7. Egy fiúkhöz hasonló mértékben érintett lány súlyos fenotípusát egyenlőtlen X-kromoszóma inaktiváció okozta. A fehérvérsejtekben a diszkerin Glu206Lys mutáció jelentős negatív szelekcióhoz vezetett az életkor előrehaladtával.
8. A homozigóta *dkc1* nullmutáns zebrahalban a humán fenotípus fenokópiája akkor alakul ki, amikor a telomerhossza még normális, de a 18S rRNS pszeudouridilációja csökken és a 28S/18S rRNS hányadosa már megnő a 18S alegység mennyiségének csökkenése miatt.
9. Az új szindróma nem a telomerhossz csökkenéséből, hanem legalább részben a riboszómális RNS pszeudouridilációjának csökkenéséből fakad.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények jegyzéke

Stráner P¹, **Balogh E**¹, Schay G, Arrondel C, Mikó Á, L'Auné G, Benmerah A, Perczel A, Menyhárd D K, Antignac C, Mollet G, Tory K

C-terminal oligomerization of podocin mediates interallelic interactions

BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR BASIS OF DISEASE 1864: 7 pp. 2448 2457. , 10 p. (2018)

IF: 4,328

Balogh E¹, Chandler J C¹, Varga M¹, Tahoun M¹, Menyhárd D K, Schay G, Goncalves T, Hamar R, Légrádi R, Szekeres Á, Gribouval O, Kleta R, Stanescu H, Bockenbauer D, Kerti A, Williams H, Kinsler V, Di W-L, Curtis D, Kolatsi-Joannou M, Hammid H, Szöcs A, Perczel K, Maka E, Toldi G, Sava F, Arrondel C, Kardos M, Fintha A, Hossain A, D'Arco F, Kaliakatsos M, Koeglmeier J, Mifsud W, Mooseja M, Faro A, Jávorszky E, Rudas G, Saied M H, Marzouk S, Kelen K, Götze J, Reusz G, Tulassay T, Dragon F, Mollet G, Motameny S, Thiele H, Dorval G, Nürnberg P, Perczel A, Szabó A J, Long D A, Tomita K, Antignac C, Waters A M, Tory K

Pseudouridylation defect due to DKC1 and NOP10 mutations cause nephrotic syndrome with cataracts, hearing impairment and enterocolitis

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA DOI: 10.1073/pnas.2002328117, 11 p. (2020)

IF: 9,580 (Várható IF érték)

A disszertációtól független közlemények jegyzéke

Javorszky E, Moriniere V, Kerti A, **Balogh E**, Piko H, Saunier S, Karcagi V, Antignac C, Tory K

QMPSF is sensitive and specific in the detection of NPHP1 heterozygous deletions

CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE

55: 6 pp. 809 816. (2017)

IF: 3,556

Szabó T, Orosz P, **Balogh E**, Jávorszky E, Mátyus I, Bereczki C, Maróti Z, Kalmár T, Szabó AJ, Reusz G, Várkonyi I, Marián E, Gombos É, Orosz O, Madar L, Balla G, Kappelmayer J, Tory K, Balogh I

Comprehensive genetic testing in children with a clinical diagnosis of ARPKD identifies phenocopies

PEDIATRIC NEPHROLOGY 33: 10 pp. 1713 1721. (2018)

IF: 2,816

Varga M, Ralbovzski D, **Balogh E**, Hamar R, Keszthelyi M T, Tory K

Zebrafish Models of Rare Hereditary Pediatric Diseases

DISEASES 6: 2 Paper: 43, 16 p. (2018)