

A szaruhártya disztrófiákat két nagy csoportra oszthatjuk. A mendeli öröklődésű, monogénes disztrófiákra, és a nem típusos mendeli öröklésmentet mutató, feltehetően poligénes öröklésű disztrófiákra. A genomikai vizsgálatok mindkét típusú betegségek patogenezisének megértéséhez hozzájárulhatnak.

A genomikai vizsgálatok eredményeit a monogénesen öröklődő disztrófiák esetében a betegséget okozó mutációk ismerete nélkül nem lehet interpretálni. Az utóbbi évek kutatási eredményei alapján ezen elváltozások többsége az 5q31 régióban található TGFBI génhez kötött. A mutációk hatására kórosan processzálódnó BIGH3 fehérje lerekódásait már korábbi munkánk során kimutattuk (Takács et al., REF), Jelen pályázatban az 5q31-hez kötött disztrófiák genetikai hátterét vizsgáltuk a magyar betegekben. Tizenöt család 38 tagjánál végeztük el a TGFBI gén szekvenálását. 18 Haab-Dimmer disztrófiás betegnél heterozygóta R124C mutációt, 5 Groenouw I disztrófiás betegnél R555W heterozygóta mutációt, 4 Reis-Bücklers disztrófiás beteg esetében pedig R555Q heterozygóta mutációt mutattunk ki. Három betegnél Avellino disztrófiát állapítottunk meg a heterozygóta R124H mutáció előfordulása alapján. Magyarországon, illetve Közép-Európában korábban Avellino disztrófia előfordulásáról még nem számoltak be. Egy klinikailag polymorph corneális amyloidosisos betegnél új, heterozygóta mutációt (T1640C) mutattunk ki, amely az F547S aminosavcserét okozza a BIGH3 fehérjében. A beteg corneájában immunhisztokémiai vizsgálat a BIGH3 fehérje jelenlétét mutatta a kóros fehérjelerakódásokban. Összességében megerősítettük a TGFBI génben eddig ismert forró pontokat és egy új mutáció patogenetikai szerepére hívtuk fel a figyelmet. Mivel a mutációk analízisével már egész fiatal korban prognózis adható, RFLP módszert is optimalizáltunk a leggyakoribb mutációkra. (Takács et al., REF)

A multigénes öröklődésű disztrófiák közül a viszonylag gyakori keratoconust vizsgáltuk részletesen. Keratoplastica során eltávolított keratoconusos szaruhártyák mindhárom rétegéből (epithelium, endothelium ill. stroma) izoláltunk mRNS-t. Megfelelő mennyiségű és minőségű mRNS előállítására csak az epitheliumból sikerült. Kontrollként photorefractív keratectomián átesett betegek műtét közben eltávolított centrális epitheliumát használtuk. Hat keratoconusos és hat egészséges epitheliumot vizsgáltunk teljes genom GE CodeLink mRNS microarray segítségével. A három legjobb minőségű mRNS mintát a beteg és egészséges corneák közül egyaránt megvizsgáltuk Affymetrix teljes humán genom microarray segítségével is. Mindkét microarray esetében kiválasztottuk azokat a géneket, amelyek $p < 0.01$ szignifikancia szinten legalább 2-szeres eltérést mutattak a beteg és egészséges corneák között. A két különböző microarray eredményeit ezután összehasonlítottuk. Mivel a két rendszer által használt oligonukleotid szekvenciák azonos gének esetében sem azonosak, illetve gyakran ugyanazon gén más-más elnevezéseit adják meg a gyártók, a kapott génlistákat génenként, több publikusan hozzáférhető adatbázis adatait összevetve, egy külön erre a célra írt keresőprogram segítségével egyeztetettük. Nyolc olyan gént sikerült azonosítani, amely mindkét microarray-n ugyanolyan mértékű és irányú változást mutatott. Felvetődik a kérdés, hogy a teljes genomról miért csak ilyen kevés gén változását sikerült mindkét módszerrel igazolni. Ezt részben magyarázza az, hogy a keratoconusos minták génexpressziója igen nagy heterogenitást mutatott. Ha az egészséges és keratoconusos minták közötti eltérés összehasonlításánál a p szignifikanciaszintet 0.05-re emeltük, vagy a változás kritikus

mértékét csökkentettük, lényegesen több, akár 2500 gén került a potenciális kóroki vagy indikátor szereppel bírók közé, azonban ezek szerepének általánosíthatósága megkérdőjelezhető lenne. A nyolc kiemelt gén közül 6 ismert fehérjé kódol (FMO1, FAM110B, GATA3, HS3ST1, KRT19, RASGRP1). Ezen gének expresszója közötti eltéréseket qRT-PCR segítségével is megvizsgáltuk 20 normál kontroll és 9 keratoconusos minta esetében, és a microarray-vel kapottal azonos eredményeket mértünk. Négy géntermék (FAM110B, HS3ST1, GATA3, RASGRP1) kifejeződését fehérjeszinten is megvizsgáltuk 6db keratoconusos és 3 normál corneában immunfluoreszcenciás módszerrel. A HS3ST1 és GATA3 esetében az mRNS szintű változásokat fehérjeszinten is ki tudtuk mutatni, míg a FAM110B és RASGRP1 esetében a fehérjeexpresszió mennyiségében nem mutatkozott különbség. A HS3ST1 egy Golgiban elhelyezkedő szulfotranszferáz, amely a heparán szulfát szintézisében játszik szerepet. Közvetve a metallopeptidáz enzimek aktiválásában van szerepe, utóbbiak igazoltan hozzájárulnak a keratoconus kialakulásához. A HS3ST1 hiánya knockout egértörzsekben a szem morfogenezisének zavarát idézi elő. A GATA3 transzkripciós faktor többek között az epidermális sejtek differenciálódásának meghatározásában játszik szerepet.

Az elkészült mRNS izolátumok maximális kihasználására microarray technika segítségével a centrális és limbális cornea epithelium génexpressziós különbségeit is megvizsgáltuk. A limbális régióban található a cornea epitheliális őssejtjei, így a differenciáltan expresszált gének között őssejt specifikus fehérjék kimutatására van esély. A microarray vizsgálatokat és analízisüket a keratoconusos mintákhoz hasonlóan végeztük. 148 olyan gént találtunk, amely a két microarray-n hasonló különbségeket mutatott. Ezek közül irodalomból ismert differenciálódási, ill. jelátviteli szerepük alapján kiválasztottunk hetet (SPON1, PHLDA1, IFITM1, ITM2A, DKK4, FZD7, CXCR4), amelyek potenciálisan fontos markerek lehetnek a corneális epithelium fejlődésében és regenerációjában (Takács et al, Cytometry,, REF). Ezen gének mRNS szintű expressziós eltéréseit a centrum és a limbus között qRT-PCR-rel is igazoltuk 20 centrum és 9 limbus minta alapján. Szövetteni metszeteken a SPON1, a PHLDA1, és az ITM2A elleni antitestek a limbális epithelialis sejtek basalis rétegében jelölnek kisebb sejtcsoportokat, amelyek egy részében megtalálható a Bmi-1 illetve CEBP-delta elleni jelölés is, (utóbbi két fehérjét a nyugvó limbális epithelialis őssejtjelekben mutatták ki). A vizsgálataink kapcsán előtérbe került fehérjék potenciális őssejt markerek lehetnek, melyek többek között a sérült vagy kórosan elváltozott corneák autotransplantációs regenerálásában klinikai felhasználásra is kerülhetnek.

A centralis corneában fokozottan expresszáldó thrombospondint ismert corneális angiogenezis gátló szerepe miatt vizsgáltuk tovább. Ereződött humán corneákban csökkent thrombospondin szintet találtunk az ereződött szakaszokon, valamint ugyanezekben a helyeken FXIIIa jelenlétét tudtuk kimutatni. Immortalizált humán corneális epithelialis sejtvonalon (HCET), valamint cornea stromális primer fibroblastokon vizsgáltuk a felülúszóhoz adott FXIIIa hatását a thrombospondin termelésre, immunoblot és ELISA segítségével. HCET sejtekben és corneális fibroblast tenyészetben FXIIIa hatására a thrombospondin termelés csökkent. qRT-PCR segítségével kimutattuk, hogy a fehérje expresszióval együtt a thrombospondin mRNS-

ének a mennyisége is csökken ezekben a sejtekben. Szöveti mintáinkon igazoltuk, hogy az újonképződött corneális erek körüli FXIIIa főleg az erek körül elhelyezkedő CD11b pozitív sejtekben található meg. Az újonképződő cornealis lymphaticus erek keletkezésében korábban már kimutatták a CD11b pozitív sejtek szerepét, illetve a bőr CD11b pozitív sejtjeinek többsége FXIIIa pozitív is egyben, a cornea vonatkozásában azonban a CD11b pozitív sejtek FXIIIa tartalma eddig nem volt ismert.

A már elfogadott közleményeken kívül jelenleg három kéziratot készítünk elő közlésre, a keratoconus genomikai vizsgálatáról, a limbális őssejtek markereiről, és az FXIIIa angiogenetikus hatásáról. Kérem, hogy a jelentésben foglaltakon túl az OTKA kiegészítő eljárásban a később elfogadandó közleményeket is vegye figyelembe.