

PhD Dolgozat:

**A familiáris krónikus benignus pemphigus (Hailey-Hailey
betegség) molekuláris patológiája**

Dr. Szigeti Réka

Témavezető:

Dr. Miseta Attila

2005.

Tartalomjegyzék

Összefoglalás.....	3
Bevezető.....	4
Célkitűzések.....	9
Felhasznált anyagok és metodikák.....	9
Eredmények.....	11
Megbeszélés.....	27
Felhasznált saját irodalom.....	29
További saját irodalom.....	29
Irodalomjegyzék.....	31
Köszönetnyilvánítás.....	35

Összefoglalás

A Hailey-Hailey betegség, más néven familiáris krónikus benignus pemphigus (MIM# 169600), egy olyan genodermatózis, melyet felnőtt korban jelentkező, elsősorban a hajlatokat érintő bőr vezikulumok és eróziók jellemeznek. Autoszómális dominánsan öröklődő bőrelváltozás, ahol a keratinocita adhézió zavara figyelhető meg az epidermisz szuprabazális rétegében. Nemrégiben, a humán szekretoros útvonal Ca^{2+} -ATPázát (hSPCA1) kódoló gén, az *ATP2C1* bizonyult sérültnek Hailey-Hailey betegségben. Azóta több mint 80 különböző mutációját írták le az *ATP2C1* génnek.

A szekretoros útvonal Ca^{2+} -ATPázairól (SPCA), mint amilyen az *ATP2C1* által kódolt hSPCA1 is, legtöbbet a sütőélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) PMR1 fehérjéjének vizsgálatai alapján tudunk. E fehérje a mediális Golgi apparátusba lokalizálódik és a Ca^{2+} és Mn^{2+} kompartmentalizációját segíti az organelumba. PMR1 hiányában sérül a Golgi apparátusban a fehérjék lebontása, glikolizációja és továbbítása. A PMR1 hiányos sejtek mangánra, alacsony és magas Ca^{2+} tartalmú környezetre érzékenyek. Bár a hSPCA1 csak 49%-ban homológ az élesztő PMR1-gyel, a fehérje expressziója élesztőben teljesen komplementálja a PMR1 hiányát. Így a PMR1 hiányos élesztő törzsek hasznos modellként szolgálnak a betegség alapjainak feltárásában és a lehetséges kezelési eljárások továbbfejlesztésében.

Munkámban a PMR1 hiányos élesztők olyan jellemzőit igyekszem feltárni, melyek a Hailey-Hailey betegség molekuláris patogenezisének és az egyes farmakoterápiás mechanizmusok megértésében hasznosak lehetnek. Ezen túlmenően, vizsgálataink direkt hasznosságát klinikai szinten is szeretném bemutatni, egy Magyarországon általunk elsőként genetikailag is alátámasztott Hailey-Hailey beteg esetének ismertetése során.

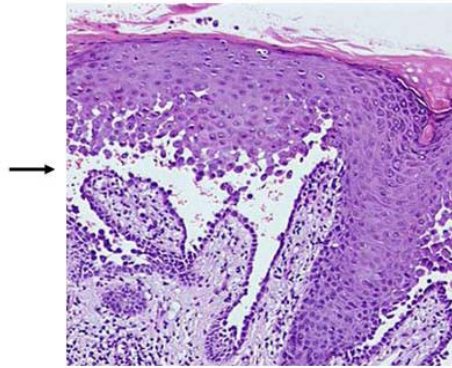
Bevezető

A Hailey-Hailey betegséget (MIM#169600), avagy familiáris krónikus benignus pemphigust, elsőként a Hailey fivérek írták le 1939-ben [1]. A betegség ritka, incidenciája 1/50 000-re tehető. A bőrelváltozásra jellemző, hogy pubertást követően jelentkeznek a tünetek, elsősorban a dörzsölésnek kitett hajlati területeken (mint a nyak, hónalj és ágyékhajlat). Fizikai stressz, hő, izzadás, infekció, UV sugárzás szerepel provokáló tényezőként. Az érintett területeken vezikulák, ritkábban bullák, fájdalmas eróziók és eritémás plakkok alakulnak ki (1-es ábra). A kórkép váltakozó menetű, visszatérő exacerbációk és remissziók jellemzik. A bőrön kívül más szerv nem érintett [2]. A betegség kezelésében a provokáló tényezők elkerülésén túl hagyományosan szteroid és antibiotikum tartalmú kenőcsök, fertőtlenítők használatosak, de újabban FK506 és D3 vitamin analóg tartalmú készítményeket, valamint lézer terápiát is alkalmaznak [3-6].



1-es ábra. A Hailey-Hailey betegségre jellemző vezikuláris, pörkös bőrelváltozás hiperémiás alapon.

Szövettanilag a bőrelváltozást a szuprabazális réteg sejtjeinek adhézions defektusa jellemzi, mely intercelluláris szétválást (akantolízis) eredményez (2-es ábra). A sejtekben az intermedier keratin filamentumok perinukleáris aggregációja és a filamentumok eltávolodása a dezmoszómális plakkoktól figyelhető meg [7;8].



2-es ábra. Szuprabazális akantolízis. A Hailey-Hailey betegség biopsziás, fénymikroszkópos képére jellemző szuprabazális akantolízis látható (fekete nyíl).

A Hailey-Hailey betegség autoszómális dominánsan öröklődik. Teljes penetrancia jellemzi felnőtt korban, változó expresszivitással [2]. Ez annyit jelent, hogy a hordozó betegek mindenképpen érintettek lesznek, de tüneteik súlyossága előre nem megjósolható, egyénre jellemző lesz.

A betegségért felelős génmutációk feltárásában fontos szerepe volt a kórképpel kapcsolatos génlókus (*3q21-q24*) meghatározásának [9-11]. Ezt követően két munkacsoport egymástól függetlenül igazolta a humán szekretoros útvonal Ca^{2+} -ATPázát (hSPCA1) kódoló gén, az *ATP2C1* kóroki szerepét a bőrelváltozásban [12;13]. Maga az *ATP2C1* gén 28 exonból áll egy körülbelül 30 kb-nyi szakaszán a *3q21-q24* régiónak. Egy 4.5kb hosszúságú elsődleges mRNS-t kódol, mely alternatív splicing folyamatokon keresztül 4 variánssá, *ATP2C1a,b,c,d*-vé alakul [13-17]. Ezek közül az *ATP2C1d* a legnagyobb, mely tartalmazza mind a 27-es és 28-as exont is [18]. Egyelőre nem ismert, hogy vannak-e funkcionális különbségek az egyes mRNS variánsok által kódolt fehérjék között.

Az *ATP2C1* által kódolt hSPCA1 a P-típusú ion ATPázok SPCA alcsaládjába sorolható. Az SPCA transzporterek a SERCA (sarco/endoplasmic-reticulum Ca^{2+} -transport

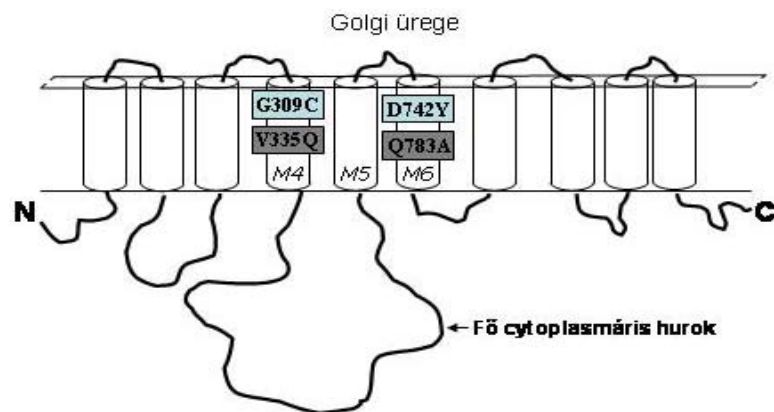
ATPase-ok) típusú ATPázokra jellemző két nagy-affinitású Ca^{2+} kötőhely közül csak egyet tartalmaznak. Mégis, ezek nagy hatékonysággal képesek egy Ca^{2+} , vagy Mn^{2+} ion mozgatására. E tulajdonságaik különítik el az SPCA transzportereket a szintén P-típusú SERCA és PMCA (plasma-membrane Ca^{2+} -ATPase) pumpáktól [19;20].

A hSPCA1 közel ubiquiter módon kifejeződik különböző szövetekben, de eltérő mértékben. A bőrben mutatható ki relatíve legnagyobb mennyiségben [14]. A hSPCA1 a Golgi-apparátusban található és a SERCA típusú transzporterekkel együtt segíti a Ca^{2+} kompartmentalizációját ebbe az organelumba. A hSPCA1 hozzájárulása a Golgi Ca^{2+} felvételéhez eltérő mértékű, különböző sejttípusokban 15-50%, de a keratinocitákban a legjelentősebb [21-23]. Ez részben magyarázhatja azt, hogy miért kizárólag a bőr érintett HHD-ben. Azonban, ennek pontos oka jelenleg nem ismert [4;24].

Míg a hSPCA1 jobbra a Golgiban helyezkedik el, addig mérhető módon hozzájárul az endoplazmatikus retikulum (ER) Ca^{2+} anyagcseréjéhez is. Így befolyásolja mind a Golgi, mind az ER Ca^{2+} függő folyamatait, úgymint például a poszt-transzlációs glikán feldolgozást, az ER-hoz kapcsolódó fehérje lebontást (ER associated protein degradation /ERAD/) és az ER stresszre adott választ [25;26]. Úgy tűnik, hogy a hSPCA1 a citoszólikus Ca^{2+} oszcillációk finom-szabályozásában is szerepet játszik [19;22;25]. A HHD keratinocitáknak magasabb a citoszólikus Ca^{2+} szintje, mint a normálisaknak, de azoknál összegésében kevesebb Ca^{2+} -ot akkumulálnak. Ezen túlmenően, a HHD keratinociták kevésbé reagálnak a környezeti kalcium szint növekedésére, mint az egészséges sejtek. Így össz-kalcium tartalmuk egyre kevesebb a normál sejtekhez képest, amikor a környezeti kalcium emelkedik [14].

Máig több mint 80 különböző *ATP2C1* génmutációt írtak le HHD-ben. Ezek közül 20% nonsense mutáció, 19% splice site mutáció, 30% frameshift mutáció, mely korai terminációs kodonhoz vezet (premature termination codon /PTC/), 28% missense mutáció, és

~3% in-frame deléció vagy inzerció [4;24]. A korai terminációs kodonhoz vezető mutációk (frameshift és nonsense) nagy száma ahhoz a következtetéshez vezetett, hogy valószínűleg haploinsufficiencia a domináns öröklődésment módja HHD-ben. A fehérje stabilitását és funkcióját befolyásoló missense mutációk vizsgálata során kiderült, hogy míg a mutáns *ATP2C1* mRNS szintje normális, addig a mutáns fehérje mennyisége kisebb a Golgi-ban, annak ellenére, hogy lokalizációja megfelelő. Ezek a vizsgálatok megerősítették, hogy a haploinsufficiencia lehet a domináns öröklődési mechanizmus HHD-ben, és rávilágítottak az Asp₇₄₂ és Gly₃₀₉ aminosavak fontos szerepére a hSPCA1 Ca²⁺ és/vagy Mn²⁺ kötésében (3-as ábra) [18;27]. Mindezek ellenére, érdekes módon az egyes mutációk nincsenek összefüggésben a kórkép súlyosságával [28]. E megfigyelések azt jelzik, hogy nincs genetikai „forró pont” a génben.



3-as ábra. Az SPCA transzporterek fő alegységei. Az M4, M5 and M6 transzmembrán hélixek kritikus szereppel bírnak az ion szelektivitásban és transzportban. A V335Q és Q783A mutációk a hélix konformáció kialakulását és az ion szelektivitást befolyásolják [29;30]. A G309C és D742Y mutációk szintén a hSPCA1 Ca²⁺ és Mn²⁺ kötését befolyásolják [18;27]. A fő cytoplasmáris hurok tartalmazza a foszforilációs, és a nukleotid kötő helyeket. Kék háttérrel a hSPCA1-gyel, szürke háttérrel pedig a PMR1-gyel végzett mutációs eredményeket jelöltük.

A hSPCA1-gyel kapcsolatos egyre bővülő ismereteink ellenére az SPCA transzporterekről szerzett legtöbb információnk a *Saccharomyces cerevisiae* homológ, PMR1-től ered.

A SPCA pumpák közül elsőként a PMR1 került leírásra [31;32]. A mediális Golgi apparátusban helyezkedik el, de hozzájárul az ER $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ homeosztázisához is egy másik P-típusú ATPázal, a COD1-gyel együtt *S. cerevisiae*-ben [33;34]. A PMR1 hiányos élesztők érzékenyek alacsony divalens kation tartalmú környezetre (EGTA, BAPTA) és magas kalcium tartalmú környezetre is [35-37]. Mind a citoszólikus, mind a sejt össz-kalcium szintjük emelkedett [37]. A *pmr1Δ* törzsek mangánra és oxidatív stresszre is érzékenyek, de toleránsabbak Na^+ -ra, mint a vad típusú sejtek [38-40]. Sérült ER és Golgi $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ homeosztázisuknak köszönhetően a *pmr1Δ S. cerevisiae*-ben zavart a fehérjék továbbítása a szekretoros útvonalon, és érzékenyek ER stresszre [33;34;41]. A *PMR1* mutációs vizsgálata során a Gln₇₈₃-as aminosav bizonyult kritikusnak a Mn^{2+} szelektivitásban és a transzmembrán hélixek közötti másodlagos kapcsolatok fontosságára is fény derült (3-as ábra) [29;30].

A PMR1 fehérjén kívül kiemelkedő fontosságú a *S. cerevisiae* intracelluláris Ca^{2+} anyagcseréjében a PMC1 elnevezésű vakuoláris Ca^{2+} -ATPáz [42] és a VCX1 elnevezésű vakuoláris $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ „kicszerelő” (exchanger) is. E fehérjék segítségével az élesztők a sejten belüli Ca^{2+} mennyiségének mintegy 80-90%-át a vakuolumon belül tárolják [43;44]. Amint munkánkból kitűnik majd, a PMC1- és VCX1 működésének kiesése befolyásolja a *pmr1Δ* sejtek Ca^{2+} - és Mg^{2+} fenotípusát, mely eredményeink is hasznos következtetések alapjául szolgálhatnak a Hailey-Hailey betegség patomechanizmusát illetően.

Az a felismerés, hogy a PMR1 humán homológja érintett HHD-ben, lehetővé tette, hogy hasznosítsuk ezt a modellt ezen genodermatózis patofiziológiájának és esetleges terápiás lehetőségeinek megértésében [45;46]. Valóban, terjedőben van az „orthobetegség” fogalma. Ez alatt olyan humán betegségeket értünk, melyeknél alacsonyabb rendű

élőlényekben is fellelhető homológok bírnak patogenetikai szereppel. Így, ezen alacsonyabb rendű élőlények hasznos modell organizmusok lehetnek a humán betegség megismerésében [47]. Ezáltal még az egyelőre igen alapkutatásnak tűnő, extrém organizmusokban végzett megfigyelések is [48] közelebb kerülhetnek majd a klinikumhoz.

Célkitűzések

Munkámban elsősorban a PMR1 hiányos élesztőkkel nyert eredményeinket szeretném összefoglalni a Hailey-Hailey betegség tükrében. Vizsgálni fogjuk a PMR1 hiányos *S. cerevisiae* növekedését és sejt össz-ion tartalmát fokozódó környezeti Ca^{2+} - és Mg^{2+} -szint mellett. Továbbá azt is tanulmányozni fogjuk, hogy a calcineurin gátlása hogyan befolyásolja a PMR1 hiányos sejtek különböző fenotípusait. Bemutatjuk egy HHD beteg hSPCA1 génjét, és különböző terápiákra adott válaszát.

Felhasznált anyagok és metodikák

Táptalajok, élesztő törzsek

Az élesztő törzseket (lsd. I. Táblázat) gazdag YPD (2% glükóz) táptalajban, vagy szintetikus, minimál mediumban - kiegészítve a szükséges adalékokkal - tenyésztettük [49]. A mediumokat rutinszerűen 40mM Mes-Tris-sel puffereltük pH 5.5-re. A vad típusú (VT) *ATP2C1*-et és a missense T570I mutációt tartalmazó *ATP2C1*-et hordozó élesztő expressziós plazmidokat Dr. Rajini Rao-tól kaptuk [50;51]. A T570I mutációt véletlenszerűen választottuk a különböző patogén konstrukciók közül. Korábbi élesztőbeli expressziós vizsgálatok azt mutatták, hogy a különböző kóroki mutációk hasonló fenotípust hoznak létre *pmr1Δ S. cerevisiae*-ben [51]. Így jelenlegi tudásunk szerint minden patogén allél hasonlóan viselkedik.

Törzs	Genotípus	Referencia
SEY6210	<i>MAT α, ura3-52, leu2-3,112, his3- Δ200, trp1- Δ901, lys2-801, suc2- Δ9 S.</i>	Emr, UCSD, San Diego, CA
YDB224	<i>MAT α, ura3-52, leu2-3,112, his3- Δ200, trp1- Δ901, lys2-801, suc2- Δ9, pmc1 Δ::TRP1</i>	Miseta et al., 1999a
YDB225	<i>MAT α, ura3-52, leu2-3,112, his3- Δ200, trp1- Δ901, lys2-801, suc2- Δ9, vcx1 Δ::URA3</i>	Miseta et al., 1999a
YDB279	<i>MATα, ura3-52, leu2-3,112, his3- Δ200, trp1- Δ901, lys2-801, suc2- Δ9, pmr1 Δ::LEU2</i>	Miseta et al., 1999a
YDB254	<i>MAT α, ura3-52, leu2-3,112, his3- Δ200, trp1- Δ901, lys2-801, suc2- Δ9, pmc1 Δ::TRP1, vcx1 Δ::URA3</i>	Miseta et al., 1999a
YDB276	<i>MATα, trp1- Δ901, ura3-52, his3- Δ200, leu2-3,112, pmc1 Δ::TRP1, pmr1 Δ::LEU2</i>	Kellermayer et al. 2003
YDB289	<i>MATα, trp1- Δ901, ura3-52, his3- Δ200, leu2-3,112, lys2-80, vcx1 Δ::URA3, pmr1 Δ::LEU2</i>	Kellermayer et al. 2003

I. Táblázat. Felhasznált törzsek.

Sejt össz-Ca²⁺, össz-Mg²⁺ mérés

A sejt össz-Ca²⁺ mérés lángfotometriával, az össz-Mg²⁺ mérés atomabszorpcióval történt [35]. Az élesztőket 30-40 ml YPD-ben, vagy ugyanezen táptalajban - kiegészítve különböző koncentrációjú kalciummal vagy magnéziummal - tenyésztettük logaritmikus fázisig, amíg a tenyészet kb. 1 OD (600nM-en mért optikai denzitás) sűrűséget ért el. Ekkor a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük és 20ml puffertelt YPD-vel mostuk kétszer, majd előre lemért tömegű Eppendorf csövekbe továbbítottuk. 2x3 perces centrifugálást (16,000 rpm) követően a felülúszókat eltávolítottuk. Ezt követően a minták tömegét meghatároztuk, majd Speedvac-ben teljes száradásig szárítottuk a sejteket. Ismételt tömegmérést követően HCl-ban feloldottuk (minimum 24 órán keresztül) a mintákat a mérésekhez. A Ca²⁺ mérések Eppendorf EFOX-5070 lángfotométerrel, a Mg²⁺ mérések Varian AA-20 atomabszorpciós spektrofotométerrel történtek, melyet követően a sejtek Ca²⁺ és Mg²⁺ tartalmát szárazanyag tömegre vonatkoztatva adtuk meg

„Hely-irányított” (site directed) mutagenézis

A 1402C>T mutációt „QuickChange site-directed mutagenesis kit” (Stratagene) segítségével - a DB2561 (5'-GCT GTT AAG TGT GTA CAC TGA ACA CAG CAG GAC-3') és DB2562 (5'-GTC CTG CTG TGT TCA GTG TAC ACA CTT AAC AGC-3') primerek felhasználásával - hoztuk létre a vad típusú *ATP2C1*-et hordozó élesztő expressziós plazmidban. A YDB0279 *pmr1 Δ* élesztő törzset transzformáltuk a VT hSPCA1-et, hSPCA1-R468X-et, vagy hSPCA1-T570I –et hordozó élesztő expressziós plazmidokkal.

Immunprecipitáció

A hSPCA1-R468X-et expresszáló *pmr1*Δ mutánst 100μg/ml paromomicin jelenlétében és a nélkül növesztettük 18 órán keresztül. Ezt követően a kultúrákat metabolikusan jelöltük Tran³⁵S-Label-lel (ICN Pharmaceuticals) 40 percig, majd a sejt extraktumokat immunoprecipitáltuk hSPCA1 elleni nyúl poliklonális antitesttel (aa 720-919) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) és SDS-PAGE-t végeztünk. Az immunoprecipitált fehérjéket PhosphorImager analízisnek vetettük alá (GE Healthcare). Kontrollként a mitochondrialis F1-ATPáz béta alegységet (subunit) (F1β) használtuk.

Betegvizsgálat

Az ismertett beteg beleegyezését adta a vizsgálatokba, amelyek a Helsink Deklarátumban foglaltakkal nem ütköztek. Az egyetem (PTE) etikai bizottsága jóváhagyta az ismertett kísérleti terápia alkalmazását.

DNS izolálás, ATP2C1 szekvenálás

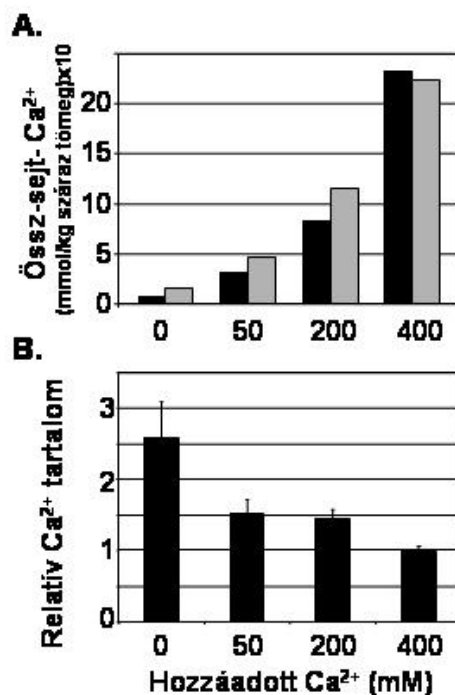
A DNS izolálás perifériás vérből, standard módszerekkel történt [52]. Az *ATP2C1* gén 27 exonjának szekvencia meghatározása Chao és mtsai módszere szerint történt Dr. Chao intézetében [53].

Eredmények

1. A PMR1 hiányos élesztők relatív sejt össz-Ca²⁺ tartalma csökken magas Ca²⁺ koncentrációjú környezetben

Mint azt a bevezetőben említettük, a HHD keratinociták kevésbé reagálnak a környezeti kalcium szint növekedésére, mint az egészséges sejtek. Tehát össz-kalcium

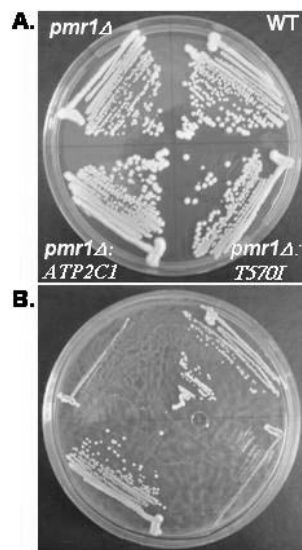
tartalmuk egyre kevesebb a normál sejtekhez képest, amikor a környezeti kalcium emelkedik. Felmerült a kérdés, hogy hasonló jelenség megfigyelhető-e *pmr1Δ S. cerevisiae*-ben. Vad és *pmr1Δ* sejteket emelkedő Ca^{2+} tartalmú tápoldatban tenyésztettünk, majd sejt össz- Ca^{2+} mennyiségüket meghatároztuk. Azt tapasztaltuk, hogy a HHD keratinocytákhoz hasonlóan, a PMR1 hiányos élesztők egyre kisebb mennyiségű Ca^{2+} -ot tartalmaznak a vad típusú sejtekhez képest, növekvő környezeti Ca^{2+} koncentrációk mellett.



4-es ábra. Csökkenő sejt össz- Ca^{2+} tartalom a *pmr1Δ S. cerevisiae*-ben VT-hoz képest. Míg növekvő médium Ca^{2+} koncentráció mellett mind a VT (fekete hasáb), mind a *pmr1Δ S. cerevisiae*-ben (szürke hasáb) nő az sejt össz- Ca^{2+} tartalom, addig az utóbbi törzsben kevésbé (A.), ami csökkenő relatív sejt össz- Ca^{2+} tartalomhoz vezet a PMR1 hiányos sejtekben VT-hoz képest (B.). Az ábrákon egy reprezentatív mérés eredményeit (A.) vagy három külön kísérleti eredmény átlagait (B.) ábrázoltuk. A hibahatárok a standard deviációt mutatják.

2. A hSPCA1 visszafordítja a PMR1 hiányos törzs magas környezeti Ca²⁺ érzékenységét

Előző vizsgálatunk azt jelezte, hogy a PMR1 hiányos élesztők magas környezeti Ca²⁺ fenotípusa fontos lehet a HHD patogenezisének megértésében, hiszen a sejtek hasonlóan viselkednek ilyenkor a beteg keratinocitákhoz. Korábbi kísérletek alapján tudtuk, hogy a *pmr1Δ S. cerevisiae* érzékeny magas környezeti Ca²⁺-ra [34;35]. E mellett megfigyelték, hogy az EGTA és mangán érzékeny *pmr1Δ* fenotípusokat visszafordítja a hSPCA1 (a PMR1 humán homológja) expressziója élesztőben, de a magas környezeti Ca²⁺ érzékeny fenotípust nem vizsgálták e tekintetben [50]. Ezért mi is expresszáltuk a hSPCA1-et *pmr1Δ S. cerevisiae* törzsünkben és megvizsgáltuk hatását magas környezeti Ca²⁺ mellett. Azt tapasztaltuk, hogy a hSPCA1 visszafordítja a PMR1 hiányos sejtek magas környezeti Ca²⁺ érzékenységét.



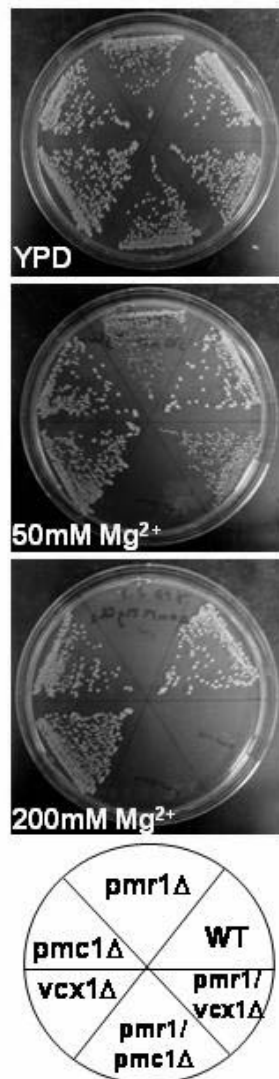
5-ös ábra. A hSPCA1 visszafordítja a PMR1 hiányos törzs magas környezeti Ca²⁺ érzékenységét. A törzseket YPD agaróz (A.) plusz 500mM CaCl₂ (B.) táptalajokon tenyésztettük. Amíg a *pmr1Δ* mutáns nem nőtt 500mM Ca²⁺-on (B.), addig az *ATP2C1* expressziója (amely hSPCA1-é transzlálódik) visszafordította ezt a fenotípust (B.). Ez a hatás *ATP2C1*-re specifikus volt, hiszen a patogén mutációt (T570I) hordozó *ATP2C1* expressziós plazmidnak nem volt hatása a fenotípusra (B.).

Tehát a hSPCA1 még 4-500mM extracelluláris Ca^{2+} koncentráció mellett is képes ellátni a PMR1 szerepét, mely igen meglepő, hiszen a két fehérje csak 49%-ban szekvencia azonos (homológ) [50].

3. A PMR1 hiányos törzs érzékeny környezeti magnéziumra

Ahogy azt korábban már hangsúlyoztuk, a HHD keratinociták nem képesek fokozódó környezeti Ca^{2+} szint mellett Ca^{2+} -ot akkumulálni a normál sejtekhez képest. Valószínűleg ez a hiányosság vezet ahhoz, hogy az egészséges bőrre jellemző epidermális Ca^{2+} grádiens (a bazális rétegtől kiindulva fokozódik mind az intra-, mind az extracelluláris Ca^{2+} tartalom a granuláris rétegegig) hiányzik a HHD betegek epidermiszéből [14]. A normál Ca^{2+} grádiens fontos szerepet játszik az epidermális inzultusokra adott bőrválaszokban, melynek során gyors grádiens lebomlás, majd lassú (6-24 órán belüli) újjáépülés figyelhető meg [54]. Ezen túlmenően, nemcsak Ca^{2+} , de Mg^{2+} szint változások is jellemzik a bőr fizikai stresszre adott választ [55]. Ilyenkor a Mg^{2+} és a Ca^{2+} kompetitív módon befolyásolja az E-cadherin- és alpha-2-beta-1 integrin által elősegített keratinocita adhéziót és aktivációt [56]. Ezért megvizsgáltuk, hogy a *pmr1*Δ élesztők érzékenyek-e Mg^{2+} -ra.

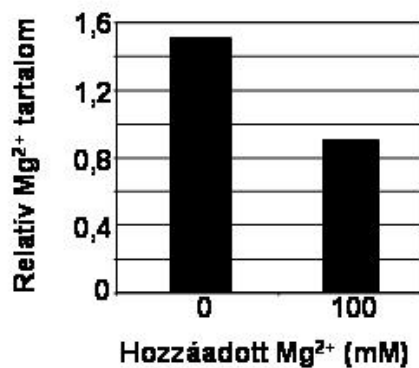
Azt tapasztaltuk, hogy a *pmr1*Δ törzs érzékeny környezeti Mg^{2+} -szint emelkedésre (6-os ábra). Ezt az érzékenységet fokozta a PMC1 elnevezésű vakuoláris Ca^{2+} -ATPáz hiánya. A *pmr1/pmcl*Δ kettős mutánsról ismert, hogy Golgi/ER Ca^{2+} tartalma kisebb, mint a *pmr1*Δ törzsé. Így a kettős mutáns érzékenyebb környezeti Ca^{2+} szint csökkenésre, mint a *pmr1*Δ törzs, mivel kevésbé tudja fenntartani a Golgi/ER rendszer működéséhez szükséges megfelelő szintű Ca^{2+} tartalmat [36]. Mindezek alapján arra következtettünk, hogy a Mg^{2+} gátolja a sejt és/vagy Golgi Ca^{2+} akkumulációját, tovább csökkentve azon törzsek Golgi/ER Ca^{2+} kompartmentalizációs képességét, amelyek már eleve kevésbé tudják a Ca^{2+} -ot bejuttatni a Golgi/ER rendszerbe.



6-os ábra. A PMR1 hiány Mg²⁺ érzékenységet okoz *Saccharomyces cerevisiae*-ben. A törzseket 40mM Mes-Tris, pH 5.5-öt (A.), valamint 50mM- (B.), és 200mM (C.) MgCl₂-ot tartalmazó agaróz táptalajokon tenyésztettük. A *pmr1/pmc1Δ* mutáns (amelyik több Ca²⁺-ot akkumulál és érzékenyebb alacsony környezeti Ca²⁺-ra, mint a *pmr1Δ* törzs [36]) már 50mM Mg²⁺-on, míg a *pmr1Δ* törzs 200mM Mg²⁺-on nem nőtt. A *VCX1* (a vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchanger [57]) deléciójának nem volt hatása e fenotípusra.

4. A PMR1 hiányos élesztő össz-Mg²⁺ tartalma hasonlóan alakul, mint össz-Ca²⁺ tartalma

Megvizsgáltuk a PMR1 hiányos törzs össz-Mg²⁺ tartalmát növekvő környezeti Mg²⁺ koncentráció mellett és azt tapasztaltuk, hogy hasonlóan a Ca²⁺ esetén megfigyeltékhez, a *pmr1Δ* mutáns, csökkenő mértékben képes Mg²⁺-ot akkumulálni magas Mg²⁺ tartalmú környezetben (7-es ábra). E tekintetben tehát a sejtek magnézium homeosztázisa hasonlít a kalciuméra.

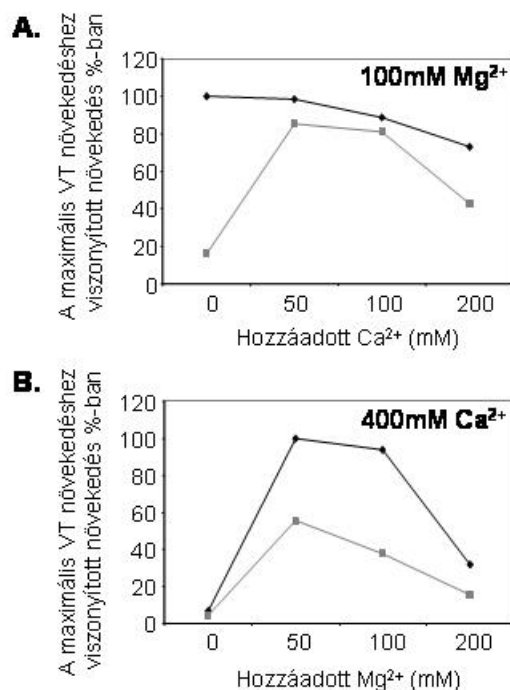


7-es ábra. A *pmr1Δ* mutánsban csökken a Mg²⁺ akkumulációs képesség növekvő környezeti Mg²⁺ koncentráció mellett. A VT és a *pmr1Δ* törzset YPD 40mM Mes-Tris, pH 5.5-ben és plusz 100mM Mg²⁺-ban tenyésztettük. Amíg normal médiumban a *pmr1Δ* törzs körülbelül 1.5-szer több sejt össz-Mg²⁺-mal bír mint a VT, addig a relatív Mg²⁺ tartalma a VT-hoz képest körülbelül 90%-ra csökkent 100mM Mg²⁺-ban. Az eredmények két külön mérés átlagát mutatják (kisebb, mint 10% különbség volt a két mérés között).

5. A Ca²⁺ és a Mg²⁺ egymással szemben befolyásolja a PMR1 hiányos törzs növekedését

Ahogy azt a 3. fejezetben ismertettük, a Mg²⁺ és a Ca²⁺ kompetitív módon befolyásolja az E-cadherin- és alpha-2-beta-1 integrin által elősegített keratinocita adhéziót és aktivációt. Ezen túlmenően, megfigyeléseink azt sugallták, hogy a Mg²⁺ a Ca²⁺ felvétel (vagy

sejt, vagy Golgi/ER szintű) gátlásán keresztül fejti ki hatását a *pmr1Δ* törzsre. Így megvizsgáltuk, hogy vajon a Ca^{2+} befolyásolja-e a *pmr1Δ S. cerevisiae* Mg^{2+} fenotípusát, és fordítva. Azt találtuk, hogy Ca^{2+} hozzáadása segíti a *pmr1Δ* mutáns növekedését magas Mg^{2+} tartalmú tápoldatban. Fordítva, Mg^{2+} hozzáadása is segíti a *pmr1Δ* mutáns növekedését magas Ca^{2+} tartalmú tápoldatban, de ez a hatás kevésbé szelektív a PMR1 hiányos törzsre, mivel a vad típusú (VT) törzs növekedését is hasonlóan támogatta a Mg^{2+} ilyen körülmények között (8-as ábra).



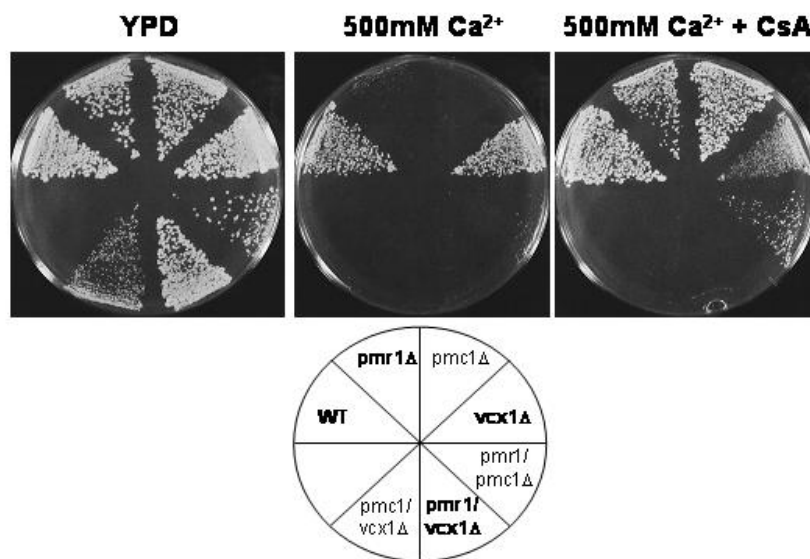
8-as ábra. A Ca^{2+} és a Mg^{2+} kompetitíve befolyásolja a *pmr1Δ* törzs növekedését. A VT (fekete vonal) és *pmr1Δ* (szürke vonal) törzseket YPD, 40mM Mes-Tris, pH 5.5-öt tartalmazó táptalajban tenyésztettük, kiegészítve 100mM Mg^{2+} -mal (A.) vagy 400mM Ca^{2+} -mal (B.). Mind a két médium gátló hatású a *pmr1Δ* mutáns növekedésére. A táptalajokat ezután növekvő mennyiségű Ca^{2+} -mal (A.) vagy Mg^{2+} -mal (B.) egészítettük ki, majd az $A_{600}=0,01$ -re hígított sejt-kultúrákat egy éjszakán keresztül tenyésztettük és A_{600}

(OD) értékeket meghatároztuk. Az OD értékeket az adott körülmények között (100mM Mg²⁺ (A.) vagy 400mM Ca²⁺(B.)) maximálisan növekvő VT tenyészet értékeihez viszonyítottuk. 50 és 100mM Ca²⁺ hozzáadása a 100mM Mg²⁺-ot tartalmazó táptalajhoz specifikusan segítette a *pmr1Δ* törzs növekedését (A.). Ezzel szemben Mg²⁺ hozzáadása a 400mM Ca²⁺-ot tartalmazó táptalajhoz mind a VT, mind a *pmr1Δ* növekedését fokozta, de a *pmr1Δ* mutáns mindig 50-60%-al lassabban nőtt, mint a VT. Így a Mg²⁺ hatása ilyen körülmények között kevésbé volt specifikus (B.). Az ábra két különböző vizsgálat reprezentatív értékeit mutatja, ahol a két kísérlet eredménye közötti különbség kisebb volt, mint 10%.

Megfigyeléseink igazolták, hogy a Mg²⁺ Ca²⁺-tól függően fejti ki hatását a PMR1 hiányos törzsre. Ezen túlmenően, tenyésztési vizsgálataink szerint a Mg²⁺ a Ca²⁺ egész-sejt szintű felvételét gátolja, hiszen magas Ca²⁺ tartalmú környezetben fokozza a PMR1 hiányos (és a VT) élesztő törzs növekedését. Ilyen körülmények között a PMR1 hiányos élesztők valószínűleg azért érzékenyebbek Ca²⁺-ra, mint a vad típus mert a vakuoláris Ca²⁺ kompartmentalizációs készségük telítődése után nem képesek a Golgi/ER rendszer Ca²⁺ felvételét maximalizálni [35]. Így ha a Mg²⁺ a sejten belüli (pl. Golgi/ER) Ca²⁺ kompartmentalizációt gátolná, akkor magas környezeti Ca²⁺-ban inkább gátló hatású lenne, mert tovább csökkentené a már amúgy is beszűkült intracelluláris Ca²⁺ raktározási lehetőséget. Ezzel szemben, a sejtek direkt Ca²⁺ felvételét gátolva jótékony hatású lehet magas Ca²⁺ koncentrációjú környezetben. Valóban, korábbi megfigyelések szerint a Ca²⁺ és a Mg²⁺ hasonló mechanizmussal, egymással kompetícióban jut be az élesztő sejtekbe [58;59]. Ezen túlmenően, a Mg²⁺ hatására bekövetkező Ca²⁺ akkumuláció csökkenést már megfigyelték *pmr1Δ S. cerevisiae*-ben [37], de a törzs Mg²⁺ fenotípusát nem vizsgálták.

6. A calcineurin gátlás segíti a PMR1 hiányos törzs növekedését magas Ca^{2+} tartalmú környezetben

A fenti kísérleteinkből azt a következtetést vontuk le, hogy a PMR1 hiányos élesztők magas környezeti Ca^{2+} érzékeny fenotípusa jó modellként szolgálhat a HHD betegség molekuláris patológiájának megértésében. A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy a HHD farmakoterápiájában kaphatunk-e információt modell sejtünkötől. Az irodalomból ismert volt, hogy a HHD terápiájában hasznos lehet a calcineurin gátló szerek (mint az FK506 és a cyclosporin) alkalmazása. A fő hatásmechanizmusa e szereknek nagy valószínűséggel a limfocita aktiváció gátlásában nyilvánul meg. Azonban direkt, nem immunológiai jellegű, sejtszintű hatások lehetőségét is felvetették a calcineurin gátlók alkalmazásakor [60;61]. Ezért megvizsgáltuk, vajon a PMR1 hiányos élesztők valamelyik fenotípusára van-e jótékony („visszafordító”) hatása a calcineurin gátlásának. Azt tapasztaltuk, hogy magas Ca^{2+} tartalmú táptalajon a calcineurin gátlás segíti a *pmr1* Δ mutáns növekedését, még hozzá a VCX1 elnevezésű vacuoláris $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ exchanger-től függő módon (9-es ábra). Ezzel szemben a PMR1 hiányos élesztők más fenotípusaira nem-, vagy éppenséggel hátrányosan hat a calcineurin gátlása, fokozva az érzékenységüket [62].



9-es ábra. A calcineurin gátlás VCX1-en keresztül segíti a PMR1 hiányos törzs növekedését magas Ca²⁺ tartalmú környezetben. A törzseket 40mM Mes-Tris, pH 5.5-öt-(A.), valamint 500mM Ca²⁺-ot-(B.), és 500mM Ca²⁺-ot plusz 20 µg/ml cyclosporint (C.) tartalmazó agaróz táptalajokon növesztettük. Míg a PMR1 hiányos törzs nem nő magas környezeti Ca²⁺-ban, addig cyclosporin kezelés hatására eltűnik ez a fenotípus. A cyclosporin hatása a VCX1-en keresztül érvényesül, mivel a *pmr1/vcx1Δ* mutánsra nem hat a cyclosporin kezelés. Az ábra azt is mutatja, hogy a PMC1 fehérje nem játszik szerepet ebben a folyamatban, mert a *pmr1/pmc1Δ* törzset is hasonlóan segíti a cyclosporin kezelés, mint a *pmr1Δ* mutánst.

Magas Ca²⁺ tartalmú környezetben tehát a cyclosporin segíti a vakuoláris Ca²⁺ kompartmentalizációt a VCX1 fehérje aktiválásán keresztül. Keratinocitákban nincs vakuolum, azonban a calcineurin funkcionálisan aktív [63], és az emlős sejtek lizoszómáiban létezik a VCX1 működéséhez nagyon hasonló Ca²⁺ kompartmentalizációs mechanizmus [64].

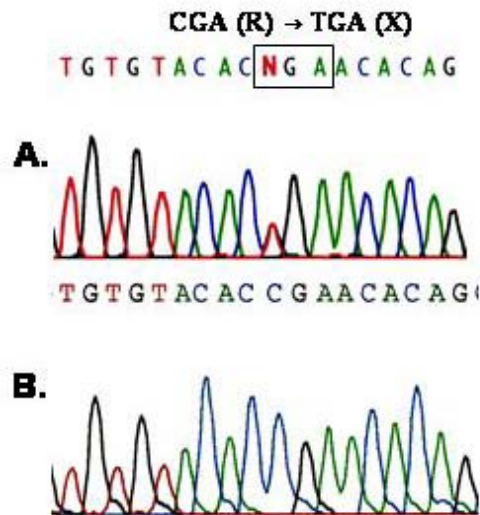
Ezek alapján felvetettük, hogy esetleges hasonló folyamatok játszódhatnak le a calcineurin gátlók alkalmazásakor HHD keratinocytákban, mint *pmr1* Δ *S. cerevisiae*-ben [62].

7. Az első genetikailag is igazolt HHD beteg Magyarországon

73 éves nőbeteg. Anamnézisében bőrbetegségén kívül csak alsó végtag varikozitások és epekő műtét szerepelt. Első bőrtünetei 21 éves korában jelentkeztek masztitist követően, a kötés alatti területen. Azóta, leginkább hőre, izzadásra 2-3 hétig tartó bőrkiütései jelennek meg főleg a nyaki-, hónalji-, emlő alatti és inguinális régiókban. Kezdetben viszkető, égő érzés, hyperemiás alapon megjelenő vezikulák, majd kifakadás, pörkösödés és gyógyulás jellemezte az exacerbációkat. A betegségre jellemző hosszanti, fehéres körömcsíkozottság nem volt megfigyelhető betegünkön. Tünetei korábban gyorsabban visszafejlődtek különböző bőrgyógyászati, lokális fertőtlenítő, hámosító kezelésekre, úgymint bórax pasztára, merkurochrom ecsetelésre, szalicil-bőr kenőcsre. A korábban elvégzett bőrbioopszia Hailey-Hailey betegséget igazolt. Az érintett területből kimetszett szövetben intraepidermális hólyagképződést, szuprabazális akantolízist és granulocitákat, limfocitákat tartalmazó papilláris lobosodást figyeltek meg. A definitív diagnózis felállítása és a kezdeti tünetek megjelenése között azonban mintegy 45 év telt el a beteg esetében.

Édesanyja hasonló, de súlyosabb és gyakoribb bőrelváltozásban szenvedett. Első terhességéből született fiánál (51é) is Hailey-Hailey betegség igazolódott. Az ő tüneteinek csak kifejezett fizikai bőr-stressz után jelentkeznek és enyhébb lefolyásúak, mint betegünké.

A beteg *ATP2C1* gén exonjainak szekvencia vizsgálata egy nukleotid cserét igazolt az 1402-es pozícióban (1402C>T) mely elváltozás nonsense mutáció (R468X) kialakulásához vezet (10-es ábra). A beteg édesanyja elhalálozott, fia és fiának tünetmentes fia (19é), valamint lánya (14é) egyelőre nem vetették alá magukat a genetikai vizsgálatnak.



10-es ábra. A direkt szekvencia meghatározás mutációt igazolt az *ATP2C1* génben **A.** A beteg génjében egy C>T csere figyelhető meg heterozigóta formában az 1402-es bázisnál (piros N). Ez egy nonsense (korai stop) mutációhoz vezet (R468X). **B.** Normál kontrol.

8. Gentamicin indukálta remisszió nonsense *ATP2C1* mutációt hordozó betegben.

Vizsgált betegünk tehát egy nonsense mutációt hordozott *ATP2C1* génjében, mely a hSPCA1 fehérje szintézisének korai stopjához vezetett. Ezek alapján felmerült bennünk, hogy esetlegesen elősegíthetnénk-e génszintű farmakoterápiás úton a nonsense mutáció átírását terápiás cézzattal. Korábbi tanulmányokból tudtuk, hogy különböző genetikai kórképekben az aminoglikozid antibiotikum csoportot már kísérletesen alkalmazták, mint esetleges farmakogenetikus szereket. E kísérletekben az aminoglikozidok missense translációt okozó hatását használták ki (ha nonsense mutációt hibásan olvasnak le a riboszómák aminoglikozid hatására, akkor azt - ha kis százalékban is - de átírhatják, indukálva a teljes fehérje szintézist). Számos *in vitro* és klinikai tanulmány hozott biztató eredményt [65-71]. Azonban ezt a farmakogenetikai megközelítést bőrbetegségben még nem alkalmazták. Annak ellenére nem, hogy például a gentamicint 100-szoros koncentrációban

alkalmazza az orvostudomány felületi kezelés során, mint parenterálisan. Ezen túlmenően, a hagyományos aggodalom az aminoglikozidok mellékhatásait (hallás csökkenés, vesekárosodás) illetően általában elhanyagolható felületi kezelés esetén.

Amikor betegünk kiütésekkel jelentkezett, akkor beleegyezésével összevetettük a felületi gentamicin kezelés hatékonyságát egy 5% bórsavat és 2% szalicil savat (szalbőr kenőcs) tartalmazó készítménnyel (11-es ábra). Ezt a készítményt korábban sikerrel alkalmazták a betegnél. A szalbőr kenőcs antimikrobiális hatása összevethető a gentamicinével [72-74] míg tudunkkal nem hat a transzlációra.

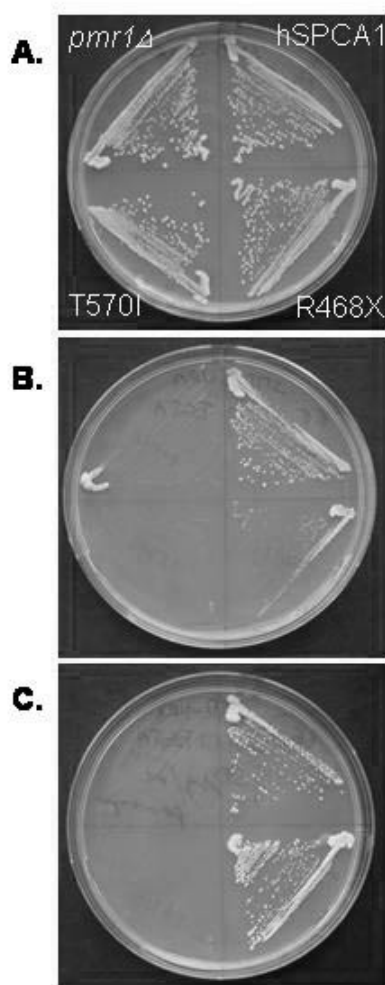


11-es ábra. A gentamicin elősegíti a remissziót nonsense *ATP2C1* mutációt hordozó HHD betegben. 0.1% gentamicin-t (1 mg/ml) /Gent./ alkalmaztunk naponta kétszer egy emlő alatti elváltozásra (bal oszlop). A kezelés hatásosságát összehasonlítottuk egy tüneteket mutató hónalji területtel, melyet egy 5% bórsavat és 2% szalicil savat (szalbőr kenőcs) /Boric acid/ tartalmazó készítménnyel kezeltünk (jobb oszlop).

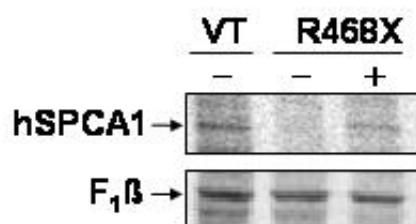
Azt tapasztaltuk, hogy betegünk szubjektív panaszai már a kezelés 2. napján megszűntek és kiütése a 7-10. napon teljesen visszafejlődött a gentamicinnel kezelt területen. Ezzel szemben a szalbór kenőccsel kezelt kiütés esetén 10-12 napig tartott a viszkető-, égető érzés és még a kezelés 18. napján is apró eritemás foltok voltak megfigyelhetők (10-es ábra).

9. Az aminoglikozidok mint potenciális farmakogenetikai szerek HHD-ben.

Betegünket megkímélendő egy, vagy két invazív bőrbioopsziától, ismételten élesztő modellünk segítségét vettük igénybe annak érdekében, hogy új farmakogenetikus megközelítésünket molekuláris szinten is alátámasszuk. Létrehoztuk a betegben talált R468X mutációt az *ATP2C1*-et hordozó élesztő expressziós vektorunkban és ezt transzformáltuk PMR1 hiányos törzsünkbe. Az aminoglikozidok közül az élesztők nonsense mutációs átírását jobban stimuláló paromomycint választottuk kísérleteinkhez. Azt tapasztaltuk, hogy a paromomycin mind funkcionálisan (12-es ábra), mind fehérje szinten (13-as ábra) fokozta az R468X mutáció átírását a transláció során. Vizsgálatainkból arra következtettünk, hogy az aminoglikozidok, vagy általában a patogén nonsense mutáció átíródását elősegítő ágensek, hasznos gyógyszerek lehetnek a genodermatózisos kezelésben.



12-es ábra. A paromomycin elősegíti a hSPCA1-R468X-et expresszáló PMR1 hiányos élesztő törzs növekedését. A VT hSPCA1-et, a hSPCA1-R468X, és a hSPCA1-T570I-et expresszáló *pmr1*Δ, valamint a *pmr1*Δ törzset minimál médiumon (SM –URA, 2% dextróz, 40mM Mes-Tris, pH 6.5) (A) és ugyanezen médium plusz 2mM EGTA (B) vagy 2mM EGTA + 50µg/ml paromomycin (C) növesztettük. Míg csak a VT hSPCA1-et expresszáló törzs nőtt jól 2mM EGTA-n, addig a paromomycin fokozta a hSPCA1-R468X-et expresszáló *pmr1*Δ mutáns növekedését, de nem befolyásolta a hSPCA1-T570I-et expresszáló *pmr1*Δ mutánst. Ez azt mutatja, hogy a paromomycin funkcionálisan vissza tudja fordítani az R468X mutáció hatását az UGA stop kodon transzlációját indukálva.



13-as ábra. A paromomycin elősegíti a teljes hosszúságú hSPCA1 fehérje képződést. A hSPCA1-R468X-et expresszáló *pmr1Δ* mutánst 100μg/ml paromomycin jelenlétében (+) és a nélkül (-) növesztettük 18 órán keresztül, majd immunprecipitációt végeztünk. Míg az R468X mutáció következtében megrövidült fehérje nem detektálható a felhasznált antitesttel, addig a teljes hosszúságú hSPCA1 fehérje (115 kDa) megjelenését/mennyiségének fokozódását észleltük a hSPCA1-R468X plazmidot hordozó *pmr1Δ* mutánsban, melyet 100μg/ml paromomycinnel kezeltünk (+), szemben a kezeletlen törzssel (-). Kontrollként a mitochondrialis F1-ATPáz béta alegységet (subunit) (F1β) is immunoprecipitáltuk, mutatva, hogy a paromomycin lényegileg nem befolyásolja a fehérje szintézis egészét.

Megbeszélés

Munkámban a PMR1 hiányos *S. cerevisiae* segítségével tanulmányoztuk a familiáris krónikus benignus pemphigus (avagy Hailey-Hailey betegség /HHD/) molekuláris patogenezisét. Bár a kórkép nevében szerepel a benignus kifejezés, tanulmányok igazolják, hogy igen komoly morbiditással társul a legtöbb esetben [75].

A HHD keratinociták eddig leginkább megfigyelt fenotípusa az intracelluláris Ca^{2+} homeosztázis megváltozása, melynek következtében nem képesek a sejtek megfelelő mennyiségű Ca^{2+} -ot akkumulálni és a normál bőrre jellemző epidermális Ca^{2+} -grádiens kialakítani [14;23;76]. Vizsgálataink igazolták, hogy e tekintetben a PMR1 hiányos élesztők magas környezeti Ca^{2+} érzékeny fenotípusa hasznos modell rendszer lehet a molekuláris patológia vizsgálatok számára. Ilyen körülmények között hasonlóan viselkednek az élesztő sejtek, mint a keratinociták Ca^{2+} akkumuláció tekintetében [77], továbbá a HHD betegség kezelésében hasznos calcineurin gátlás is csak a magas környezeti Ca^{2+} érzékeny *pmr1 Δ* fenotípust enyhíti [62].

A Ca^{2+} grádiens jelenléte fontos a fizikai stresszre adott bőrválasz során, amikor extracelluláris Ca^{2+} - és Mg^{2+} szintváltozások egymást befolyásolva alakítják a keratinocita aktivációt. A HHD betegek (akik epidermiszéből hiányzik a normál Ca^{2+} grádiens) pedig pont fizikai stresszre érzékenyek, aminek következtében jelentkeznek akut exacerbációik. Vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a PMR1 hiányos élesztők nemcsak az extracelluláris Ca^{2+} , de Mg^{2+} szint változásokra is érzékenyek, és a két ion egymással együttműködve alakítja a *pmr1 Δ* *S. cerevisiae* Ca^{2+} homeosztázisát [77]. Ezek alapján feltételezhető, hogy a HHD keratinociták Mg^{2+} háztartása is módosult az intracelluláris Ca^{2+} homeosztázis zavar mellett, amely nagy valószínűséggel szövetszintű ionális zavarhoz is vezet. Érdekes módon a szövetszintű zavarok lehetnek a legfontosabbak a HHD patogenezisében, mert sejtszinten a HHD keratinocyták nem mutatnak eltérést dezmoszómák kialakulásában, illetve az UVB

sugárzásra adott válaszban, normál sejtekhez képest [78]. Szövetszinten vizsgálva azonban akantolízis (melynek alapja a dezmoszómák felbomlása) jellemzi az elváltozást.

Elsőként írtuk le Magyarországon egy Hailey-Hailey beteg *ATP2C1* mutációját [79]. Dolgozatunk megjelenését megelőzően azonban hasonló tanulmány jelent meg hazánkból is [80]. Betegünkönél sikeresen alkalmaztunk egy új farmakogenetikai megközelítést, mely nonsense mutációk átírásának elősegítését célozza. Gentamicin segítségével korábbi remissziót értünk el, mint egy bevált felületi antiszeptikus kezeléssel [81]. Munkánk az első ilyen jellegű vizsgálat volt a bőrgyógyászatban. Ahogy azt bemutattuk, megfigyeléseink molekuláris szintű alátámasztásában segítségünkre volt a PMR1 hiányos élesztő-modell.

Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy humán betegségek (mint például a Hailey-Hailey betegség) vizsgálatakor a *S. cerevisiae* hasznos mikroorganizmus lehet, mind a molekuláris patogenezis megértésben, mind farmakoterápiás megközelítések kidolgozásában.

Felhasznált saját irodalom

Kellermayer R, **Szigeti R**, Keeling K, Bedekovics T, and Bedwell DM
Aminoglycosides as potential pharmacogenetic agents in the treatment of Hailey-Hailey disease
J Invest Dermatol Elfogadva
IF: 4.2

Szigeti R, Miseta A. and Kellermayer R.
Calcium and magnesium competitively influence the growth of a PMR1 deficient *Saccharomyces cerevisiae* strain.
FEMS Microbiol Lett. 2005 Oct 15;251(2):333-9.
IF: 1.9

Szigeti R., Chao SC., Várszegi D., Czakó M., Kosztolányi G., Kellermayer R.
Az első genetikailag is alátámasztott chronicus benignus pemhigus (Hailey-Hailey betegség) esete Magyarországon
Orv. Hetil. 2005. szeptember 11. - 146. évfolyam 37. szám

Szigeti R, Kellermayer R.
Hailey-Hailey disease and calcium: lessons from yeast.
J Invest Dermatol 2004 Dec;123(6):1195-6.
IF: 4.2

Szigeti R, Milesco M, Gollnick P.
Regulation of the tryptophan biosynthetic genes in *Bacillus halodurans*: common elements but different strategies than those used by *Bacillus subtilis*.
J Bacteriol. 2004 Feb;186(3):818-28
IF: 4.2

További saját irodalom

Kellermayer R, **Szigeti R**, Kellermayer M, Miseta A.
The intracellular dissipation of cytosolic calcium following glucose re-addition to carbohydrate depleted *Saccharomyces cerevisiae*.
FEBS Lett. 2004 Jul 30;571(1-3):55-60.
IF: 3.6

L. Lenard, Jr., Zs. Lazar, R. Benko, **R. Szigeti**, Zs. Bathori, G.K. Toth, B. Penke, L. Bartho
Inhibitory Effect of PACAP(6-38) on Relaxations Induced by PACAP, VIP and Non-adrenergic, Non-cholinergic Nerve Stimulation in the Guinea-pig Taenia Caeci
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 2000, 361: 492-497
IF: 3

L. Bartho, L. Lenard, Jr., **R. Szigeti**

Nitric Oxide and ATP Co-mediate the NANC Relaxant Response in the Guinea-pig
Taenia Caeci

Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1998, 358: 496-499

IF: 2.2

Irodalomjegyzék

- [1] Hailey,H. & Hailey,H. (1939) Familial benign chronic pemphigus. Report of 13 cases in 4 generations of a family and report of 9 additional cases in 4 generations of a family. *Arch. Dermatol. Syphilol.*, 39, 679-685.
- [2] Burge,S.M. (1992) Hailey-Hailey disease: the clinical features, response to treatment and prognosis. *Br. J. Dermatol.*, 126, 275-282.
- [3] Kruppa,A., Korge,B., Lasch,J., Scharffetter-Kochanek,K., & Hunzelmann,N. (2000) Successful treatment of Hailey-Hailey disease with a scanned carbon dioxide laser. *Acta Derm. Venereol.*, 80, 53-54.
- [4] Foggia,L. & Hovnanian,A. (2004) Calcium pump disorders of the skin. *Am. J. Med. Genet.*, 131C, 20-31.
- [5] Bianchi,L., Chimenti,M.S., & Giunta,A. (2004) Treatment of Hailey-Hailey disease with topical calcitriol. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 51, 475-476.
- [6] Sand,C. & Thomsen,H.K. (2003) Topical tacrolimus ointment is an effective therapy for Hailey-Hailey disease. *Arch. Dermatol.*, 139, 1401-1402.
- [7] Metze,D., Hamm,H., Schorat,A., & Luger,T. (1996) Involvement of the adherens junction-actin filament system in acantholytic dyskeratosis of Hailey-Hailey disease. A histological, ultrastructural, and histochemical study of lesional and non-lesional skin. *J. Cutan. Pathol.*, 23, 211-222.
- [8] Hashimoto,K., Fujiwara,K., Harada,M., Setoyama,M., & Eto,H. (1995) Junctional proteins of keratinocytes in Grover's disease, Hailey-Hailey's disease and Darier's disease. *J. Dermatol.*, 22, 159-170.
- [9] Ikeda,S., Welsh,E.A., Peluso,A.M., Leyden,W., Duvic,M., Woodley,D.T., & Epstein,E.H., Jr. (1994) Localization of the gene whose mutations underlie Hailey-Hailey disease to chromosome 3q. *Hum. Mol. Genet.*, 3, 1147-1150.
- [10] Peluso,A.M., Bonifas,J.M., Ikeda,S., Hu,Z., Devries,S., Waldman,F., Badura,M., O'Connell,P., Damen,L., Epstein,E., & . (1995) Narrowing of the Hailey-Hailey disease gene region on chromosome 3q and identification of one kindred with a deletion in this region. *Genomics*, 30, 77-80.
- [11] Richard,G., Korge,B.P., Wright,A.R., Mazzanti,C., Harth,W., Annicchiarico-Petruzzelli,M., Compton,J.G., & Bale,S.J. (1995) Hailey-Hailey disease maps to a 5 cM interval on chromosome 3q21-q24. *J. Invest Dermatol.*, 105, 357-360.
- [12] Hu,Z., Bonifas,J.M., Beech,J., Bench,G., Shigihara,T., Ogawa,H., Ikeda,S., Mauro,T., & Epstein,E.H., Jr. (2000) Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nat. Genet.*, 24, 61-65.
- [13] Sudbrak,R., Brown,J., Dobson-Stone,C., Carter,S., Ramser,J., White,J., Healy,E., Dissanayake,M., Larregue,M., Perrussel,M., Lehrach,H., Munro,C.S., Strachan,T., Burge,S., Hovnanian,A., & Monaco,A.P. (2000) Hailey-Hailey disease is caused by mutations in ATP2C1 encoding a novel Ca(2+) pump. *Hum. Mol. Genet.*, 9, 1131-1140.
- [14] Hu,Z., Bonifas,J.M., Beech,J., Bench,G., Shigihara,T., Ogawa,H., Ikeda,S., Mauro,T., & Epstein,E.H., Jr. (2000) Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nat. Genet.*, 24, 61-65.
- [15] Dobson-Stone,C., Fairclough,R., Dunne,E., Brown,J., Dissanayake,M., Munro,C.S., Strachan,T., Burge,S., Sudbrak,R., Monaco,A.P., & Hovnanian,A. (2002) Hailey-Hailey disease: molecular and clinical characterization of novel mutations in the ATP2C1 gene. *J. Invest Dermatol.*, 118, 338-343.
- [16] Yokota,K., Yasukawa,K., & Shimizu,H. (2002) Analysis of ATP2C1 gene mutation in 10 unrelated Japanese families with Hailey-Hailey disease. *J. Invest Dermatol.*, 118, 550-551.
- [17] Ikeda,S., Shigihara,T., Mayuzumi,N., Yu,X., & Ogawa,H. (2001) Mutations of ATP2C1 in Japanese patients with Hailey-Hailey disease: intrafamilial and interfamilial phenotype variations and lack of correlation with mutation patterns. *J. Invest Dermatol.*, 117, 1654-1656.
- [18] Fairclough,R.J., Dode,L., Vanoevelen,J., Andersen,J.P., Missiaen,L., Raeymaekers,L., Wuytack,F., & Hovnanian,A. (2003) Effect of Hailey-Hailey Disease mutations on the function of a new variant of human secretory pathway Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase (hSPCA1). *J. Biol. Chem.*, 278, 24721-24730.

- [19] Wuytack,F., Raeymaekers,L., & Missiaen,L. (2003) PMR1/SPCA Ca²⁺ pumps and the role of the Golgi apparatus as a Ca²⁺ store. *Pflugers Arch.*, 446, 148-153.
- [20] Wuytack,F., Raeymaekers,L., & Missiaen,L. (2002) Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium*, 32, 279-305.
- [21] Callewaert,G., Parys,J.B., De Smedt,H., Raeymaekers,L., Wuytack,F., Vanoevelen,J., Van Baelen,K., Simoni,A., Rizzuto,R., & Missiaen,L. (2003) Similar Ca(2+)-signaling properties in keratinocytes and in COS-1 cells overexpressing the secretory-pathway Ca(2+)-ATPase SPCA1. *Cell Calcium*, 34, 157-162.
- [22] Van Baelen,K., Vanoevelen,J., Callewaert,G., Parys,J.B., De Smedt,H., Raeymaekers,L., Rizzuto,R., Missiaen,L., & Wuytack,F. (2003) The contribution of the SPCA1 Ca²⁺ pump to the Ca²⁺ accumulation in the Golgi apparatus of HeLa cells assessed via RNA-mediated interference. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 306, 430-436.
- [23] Behne,M.J., Tu,C.L., Aronchik,I., Epstein,E., Bench,G., Bikle,D.D., Pozzan,T., & Mauro,T.M. (2003) Human keratinocyte ATP2C1 localizes to the Golgi and controls Golgi Ca²⁺ stores. *J. Invest Dermatol.*, 121, 688-694.
- [24] Missiaen,L., Raeymaekers,L., Dode,L., Vanoevelen,J., Van Baelen,K., Parys,J.B., Callewaert,G., De Smedt,H., Segaert,S., & Wuytack,F. (2004) SPCA1 pumps and Hailey-Hailey disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 322, 1204-1213.
- [25] Mitchell,K.J., Tsuboi,T., & Rutter,G.A. (2004) Role for plasma membrane-related Ca²⁺-ATPase-1 (ATP2C1) in pancreatic beta-cell Ca²⁺ homeostasis revealed by RNA silencing. *Diabetes*, 53, 393-400.
- [26] Ramos-Castaneda,J., Park,Y.N., Liu,M., Hauser,K., Rudolph,H., Shull,G.E., Jonkman,M.F., Mori,K., Ikeda,S., Ogawa,H., & Arvan,P. (2004) Deficiency of ATP2C1, a golgi ion pump, induces secretory pathway defects in ER-associated degradation and sensitivity to ER-stress. *J. Biol. Chem.*
- [27] Fairclough,R.J., Lonie,L., Van Baelen,K., Haftek,M., Munro,C.S., Burge,S.M., & Hovnanian,A. (2004) Hailey-Hailey disease: identification of novel mutations in ATP2C1 and effect of missense mutation A528P on protein expression levels. *J. Invest Dermatol.*, 123, 67-71.
- [28] Ikeda,S., Shigihara,T., Mayuzumi,N., Yu,X., & Ogawa,H. (2001) Mutations of ATP2C1 in Japanese patients with Hailey-Hailey disease: intrafamilial and interfamilial phenotype variations and lack of correlation with mutation patterns. *J. Invest Dermatol.*, 117, 1654-1656.
- [29] Mandal,D., Rulli,S.J., & Rao,R. (2003) Packing interactions between transmembrane helices alter ion selectivity of the yeast Golgi Ca²⁺/Mn²⁺-ATPase PMR1. *J. Biol. Chem.*, 278, 35292-35298.
- [30] Mandal,D., Woolf,T.B., & Rao,R. (2000) Manganese selectivity of pmr1, the yeast secretory pathway ion pump, is defined by residue gln783 in transmembrane segment 6. Residue Asp778 is essential for cation transport. *J. Biol. Chem.*, 275, 23933-23938.
- [31] Rudolph,H.K., Antebi,A., Fink,G.R., Buckley,C.M., Dorman,T.E., LeVitre,J., Davidow,L.S., Mao,J.I., & Moir,D.T. (1989) The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca²⁺ ATPase family. *Cell*, 58, 133-145.
- [32] Sorin,A., Rosas,G., & Rao,R. (1997) PMR1, a Ca²⁺-ATPase in yeast Golgi, has properties distinct from sarco/endoplasmic reticulum and plasma membrane calcium pumps. *J. Biol. Chem.*, 272, 9895-9901.
- [33] Durr,G., Strayle,J., Plemper,R., Elbs,S., Klee,S.K., Catty,P., Wolf,D.H., & Rudolph,H.K. (1998) The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca²⁺ and Mn²⁺ required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol. Biol. Cell*, 9, 1149-1162.
- [34] Cronin,S.R., Rao,R., & Hampton,R.Y. (2002) Cod1p/Spf1p is a P-type ATPase involved in ER function and Ca²⁺ homeostasis. *J. Cell Biol.*, 157, 1017-1028.
- [35] Miseta,A., Fu,L., Kellermayer,R., Buckley,J., & Bedwell,D.M. (1999) The Golgi apparatus plays a significant role in the maintenance of Ca²⁺ homeostasis in the vps33Delta vacuolar biogenesis mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 274, 5939-5947.

- [36] Keller Mayer, R., Aiello, D.P., Miseta, A., & Bedwell, D.M. (2003) Extracellular Ca²⁺ sensing contributes to excess Ca²⁺ accumulation and vacuolar fragmentation in a pmr1Δ mutant of *S. cerevisiae*. *J. Cell Sci.*, 116, 1637-1646.
- [37] Halachmi, D. & Eilam, Y. (1996) Elevated cytosolic free Ca²⁺ concentrations and massive Ca²⁺ accumulation within vacuoles, in yeast mutant lacking PMR1, a homolog of Ca²⁺-ATPase. *FEBS Lett.*, 392, 194-200.
- [38] Ryu, J.H., Lee, Y., Han, S.K., & Kim, H.Y. (2003) The role of hydrogen peroxide produced by polychlorinated biphenyls in PMR1-deficient yeast cells. *J. Biochem. (Tokyo)*, 134, 137-142.
- [39] Park, S.Y., Seo, S.B., Lee, S.J., Na, J.G., & Kim, Y.J. (2001) Mutation in PMR1, a Ca²⁺-ATPase in Golgi, confers salt tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by inducing expression of PMR2, an Na⁺-ATPase in plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 276, 28694-28699.
- [40] Lapinskas, P.J., Cunningham, K.W., Liu, X.F., Fink, G.R., & Culotta, V.C. (1995) Mutations in PMR1 suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase. *Mol. Cell Biol.*, 15, 1382-1388.
- [41] Knop, M., Finger, A., Braun, T., Hellmuth, K., & Wolf, D.H. (1996) Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast. *EMBO J.*, 15, 753-763.
- [42] Cunningham, K.W. & Fink, G.R. (1994) Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking PMC1, a homolog of plasma membrane Ca²⁺ ATPases. *J. Cell Biol.*, 124, 351-363.
- [43] Ohsumi, Y., Kitamoto, K., & Anraku, Y. (1988) Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. *J. Bacteriol.*, 170, 2676-2682.
- [44] Eilam, Y., Lavi, H., & Grossowicz, N. (1985) Mechanism of stimulation of Ca²⁺ uptake by miconazole and ethidium bromide in yeasts: role of vacuoles in Ca²⁺ detoxification. *Microbios*, 44, 51-66.
- [45] Ton, V.K. & Rao, R. (2004) Functional expression of heterologous proteins in yeast: insights into Ca²⁺ signaling and Ca²⁺-transporting ATPases. *Am. J. Physiol Cell Physiol*, 287, C580-C589.
- [46] Marie, M.T. (2004) Yeast researchers consider Hailey-Hailey disease. *J. Invest Dermatol.*, 123, xxii-xxiii.
- [47] O'Brien, K.P., Westerlund, I., & Sonnhammer, E.L. (2004) OrthoDisease: a database of human disease orthologs. *Hum. Mutat.*, 24, 112-119.
- [48] Szigeti, R., Milescu, M., & Gollnick, P. (2004) Regulation of the tryptophan biosynthetic genes in *Bacillus halodurans*: common elements but different strategies than those used by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 186, 818-828.
- [49] Burke, D., Dawson, D.C., & Stearns, T. *Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. 2000. Cold Spring Harbor, NY.
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- [50] Ton, V.K., Mandal, D., Vahadji, C., & Rao, R. (2002) Functional expression in yeast of the human secretory pathway Ca²⁺, Mn²⁺-ATPase defective in Hailey-Hailey disease. *J. Biol. Chem.*, 277, 6422-6427.
- [51] Ton, V.K. & Rao, R. (2004) Expression of Hailey-Hailey disease mutations in yeast. *J. Invest Dermatol.*, 123, 1192-1194.
- [52] Miller, S.A., Dykes, D.D., & Polesky, H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 16, 1215.
- [53] Chao, S.C., Tsai, Y.M., & Yang, M.H. (2002) Mutation analysis of ATP2C1 gene in Taiwanese patients with Hailey-Hailey disease. *Br. J. Dermatol.*, 146, 595-600.
- [54] Mao-Qiang, M., Mauro, T., Bench, G., Warren, R., Elias, P.M., & Feingold, K.R. (1997) Calcium and potassium inhibit barrier recovery after disruption, independent of the type of insult in hairless mice. *Exp. Dermatol.*, 6, 36-40.
- [55] Grzesiak, J.J. & Pierschbacher, M.D. (1995) Shifts in the concentrations of magnesium and calcium in early porcine and rat wound fluids activate the cell migratory response. *J. Clin. Invest.*, 95, 227-233.

- [56] Grzesiak,J.J. & Pierschbacher,M.D. (1995) Changes in the concentrations of extracellular Mg⁺⁺ and Ca⁺⁺ down-regulate E-cadherin and up-regulate alpha 2 beta 1 integrin function, activating keratinocyte migration on type I collagen. *J. Invest Dermatol.*, 104, 768-774.
- [57] Pozos,T.C., Sekler,I., & Cyert,M.S. (1996) The product of HUM1, a novel yeast gene, is required for vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchange and is related to mammalian Na⁺/Ca²⁺ exchangers. *Mol. Cell Biol.*, 16, 3730-3741.
- [58] Holmes,A.R., Cannon,R.D., & Shepherd,M.G. (1991) Effect of calcium ion uptake on *Candida albicans* morphology. *FEMS Microbiol. Lett.*, 61, 187-193.
- [59] Borbolla,M. & Pena,A. (1980) Some characteristics of Ca²⁺ uptake by yeast cells. *J. Membr. Biol.*, 54, 149-156.
- [60] Ormerod,A.D., Duncan,J., & Stankler,L. (1991) Benign familial pemphigus responsive to cyclosporin, a possible role for cellular immunity in pathogenesis. *Br. J. Dermatol.*, 124, 299-300.
- [61] Rabeni,E.J. & Cunningham,N.M. (2002) Effective treatment of Hailey-Hailey disease with topical tacrolimus. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 47, 797-798.
- [62] Szigeti,R. & Kellermayer,R. (2004) Hailey-Hailey disease and calcium: lessons from yeast. *J. Invest Dermatol.*, 123, 1195-1196.
- [63] Al Daraji,W.I., Grant,K.R., Ryan,K., Saxton,A., & Reynolds,N.J. (2002) Localization of calcineurin/NFAT in human skin and psoriasis and inhibition of calcineurin/NFAT activation in human keratinocytes by cyclosporin A. *J. Invest Dermatol.*, 118, 779-788.
- [64] Christensen,K.A., Myers,J.T., & Swanson,J.A. (2002) pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *J. Cell Sci.*, 115, 599-607.
- [65] Helip-Wooley,A., Park,M.A., Lemons,R.M., & Thoene,J.G. (2002) Expression of CTNS alleles: subcellular localization and aminoglycoside correction in vitro. *Mol. Genet. Metab*, 75, 128-133.
- [66] Sleat,D.E., Sohar,I., Gin,R.M., & Lobel,P. (2001) Aminoglycoside-mediated suppression of nonsense mutations in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Eur. J. Paediatr. Neurol.*, 5 Suppl A, 57-62.
- [67] Aguiari,G., Banzi,M., Gessi,S., Cai,Y., Zeggio,E., Manzati,E., Piva,R., Lambertini,E., Ferrari,L., Peters,D.J., Lanza,F., Harris,P.C., Borea,P.A., Somlo,S., & Del Senno,L. (2004) Deficiency of polycystin-2 reduces Ca²⁺ channel activity and cell proliferation in ADPKD lymphoblastoid cells. *FASEB J.*, 18, 884-886.
- [68] Howard,M.T., Anderson,C.B., Fass,U., Khatri,S., Gesteland,R.F., Atkins,J.F., & Flanigan,K.M. (2004) Readthrough of dystrophin stop codon mutations induced by aminoglycosides. *Ann. Neurol.*, 55, 422-426.
- [69] Keeling,K.M. & Bedwell,D.M. (2002) Clinically relevant aminoglycosides can suppress disease-associated premature stop mutations in the IDUA and P53 cDNAs in a mammalian translation system. *J. Mol. Med.*, 80, 367-376.
- [70] Clancy,J.P., Bebok,Z., Ruiz,F., King,C., Jones,J., Walker,L., Greer,H., Hong,J., Wing,L., Macaluso,M., Lyrene,R., Sorscher,E.J., & Bedwell,D.M. (2001) Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit Care Med.*, 163, 1683-1692.
- [71] Wilschanski,M., Yahav,Y., Yaacov,Y., Blau,H., Bentur,L., Rivlin,J., Aviram,M., Bdolah-Abram,T., Bebok,Z., Shushi,L., Kerem,B., & Kerem,E. (2003) Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N. Engl. J. Med.*, 349, 1433-1441.
- [72] Benson,C. Susceptibility of Selected Otitis Externa Pathogens to Individual and Mixtures of Acetic and Boric Acids. 1998.
Ref Type: Conference Proceeding
- [73] Moshi,N.H., Minja,B.M., Ole-Lengine,L., & Mwakagile,D.S. (2000) Bacteriology of chronic otitis media in Dar es Salaam, Tanzania. *East Afr. Med. J.*, 77, 20-22.
- [74] Herrmann,M. (2003) Salicylic acid: an old dog, new tricks, and staphylococcal disease. *J. Clin. Invest*, 112, 149-151.

- [75] Gisondi,P., Sampogna,F., Annessi,G., Girolomoni,G., & Abeni,D. (2005) Severe impairment of quality of life in Hailey-Hailey disease. *Acta Derm. Venereol.*, 85, 132-135.
- [76] Leinonen,P.T., Myllyla,R.M., Hagg,P.M., Tuukkanen,J., Koivunen,J., Peltonen,S., Oikarinen,A., Korkiamaki,T., & Peltonen,J. (2005) Keratinocytes cultured from patients with Hailey-Hailey disease and Darier disease display distinct patterns of calcium regulation. *Br. J. Dermatol.*, 153, 113-117.
- [77] Szigeti,R., Miseta,A., & Kellermayer,R. (2005) Calcium and magnesium competitively influence the growth of a PMR1 deficient *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Microbiol. Lett.*
- [78] Bernards,M. & Korge,B.P. (2000) Desmosome assembly and keratin network formation after Ca²⁺/serum induction and UVB radiation in Hailey-Hailey keratinocytes. *J. Invest Dermatol.*, 114, 1058-1061.
- [79] Szigeti,R., Chao,S.C., Varszegi,D., Czako,M., Kosztolanyi,G., & Kellermayer,R. (2005) Az első genetikai vizsgálattal is alátámasztott chronicus benignus pemphigus (Hailey-Hailey-betegség) esete Magyarországon. *Orv. Hetil.*, 146.
- [80] Racz,E., Csikos,M., & Karpati,S. (2005) Novel mutations in the ATP2C1 gene in two patients with Hailey-Hailey disease. *Clin. Exp. Dermatol.*, 30, 575-577.
- [81] Kellermayer,R., Szigeti,R., Keeling,K.M., Bedkovics,T., & Bedwell,D.M. (2005) Aminoglycosides as potential pharmacogenetic agents in the treatment of Hailey-Hailey disease. *J. Invest Dermatol.*

Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik munkám folyamán segítségemre voltak. Dr. Kellermayer Miklós programvezetőmnek, és Dr. Miseta Attila témavezetőmnek nagylelkű támogatásukért. Dr. Barthó Lorándnak a kutatás megszerettetéséért. Dr. Charles L. Turnbough Jr.-nak és Dr. Paul Gollnicknak, önzetlen tanításukért, illetve a molekuláris biológia és genetika területén végzett munkámhoz nyújtott segítségükért. Továbbá mindazon munkatársamnak és segítőmnek, akiknek név szerinti felsorolására meghaladná e munka kereteit.