



UNIVERSITAS
BUDAPESTINENSIS
DE SEMMELWEIS
NOMINATA

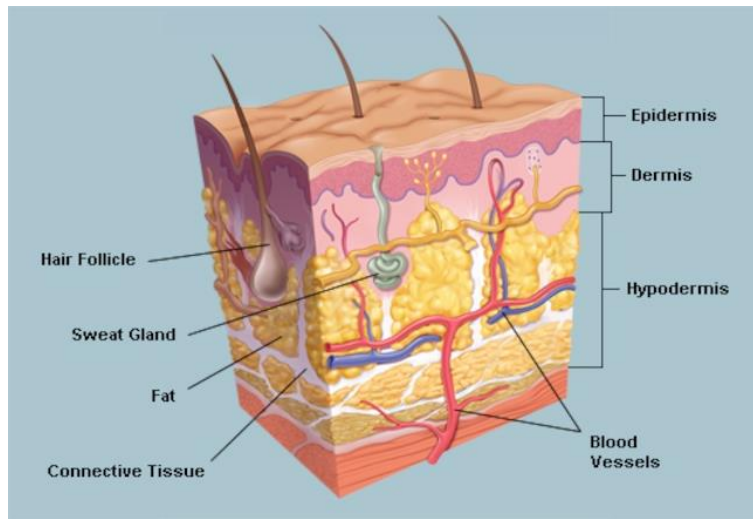


Nanomechanikai tesztek a genodermatosisok diagnosztikájában

Mayer Balázs, PhD

Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika,
Általános Orvostudományi Kar, Semmelweis Egyetem, Budapest

MedInProt Konferencia, ELTE TTK, Budapest, 2018. április 21.

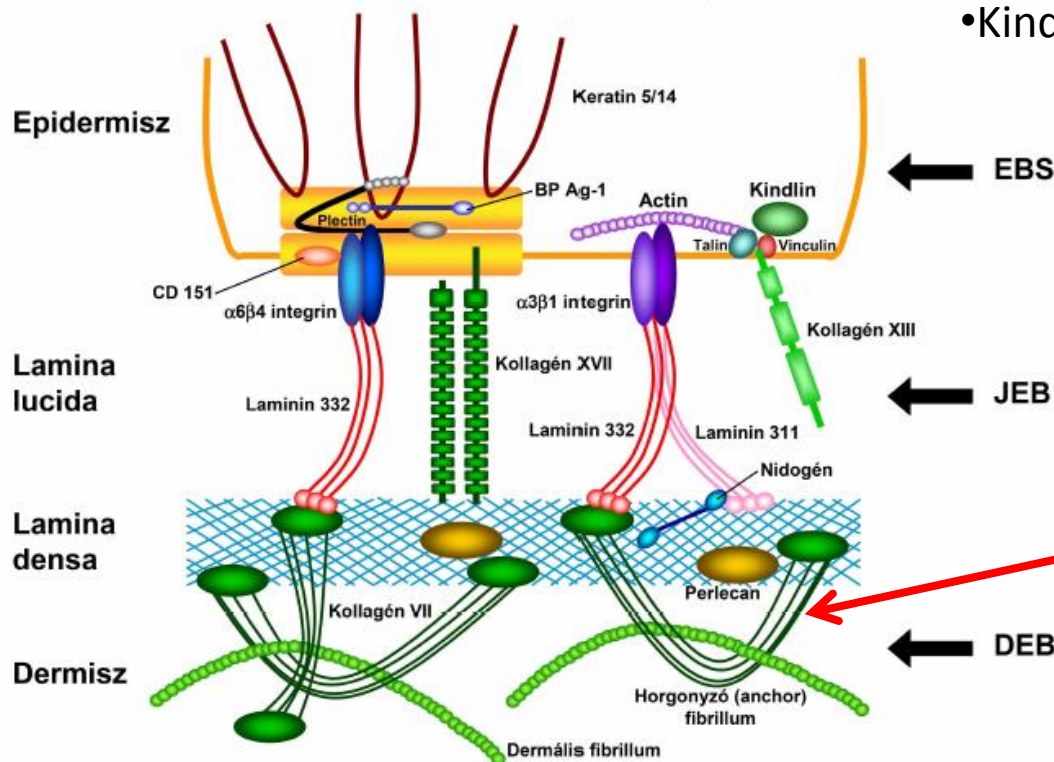


Örökletes genetikai bőrbetegségek

Örökletes Epidermolysis bullosa
betegségcsoport

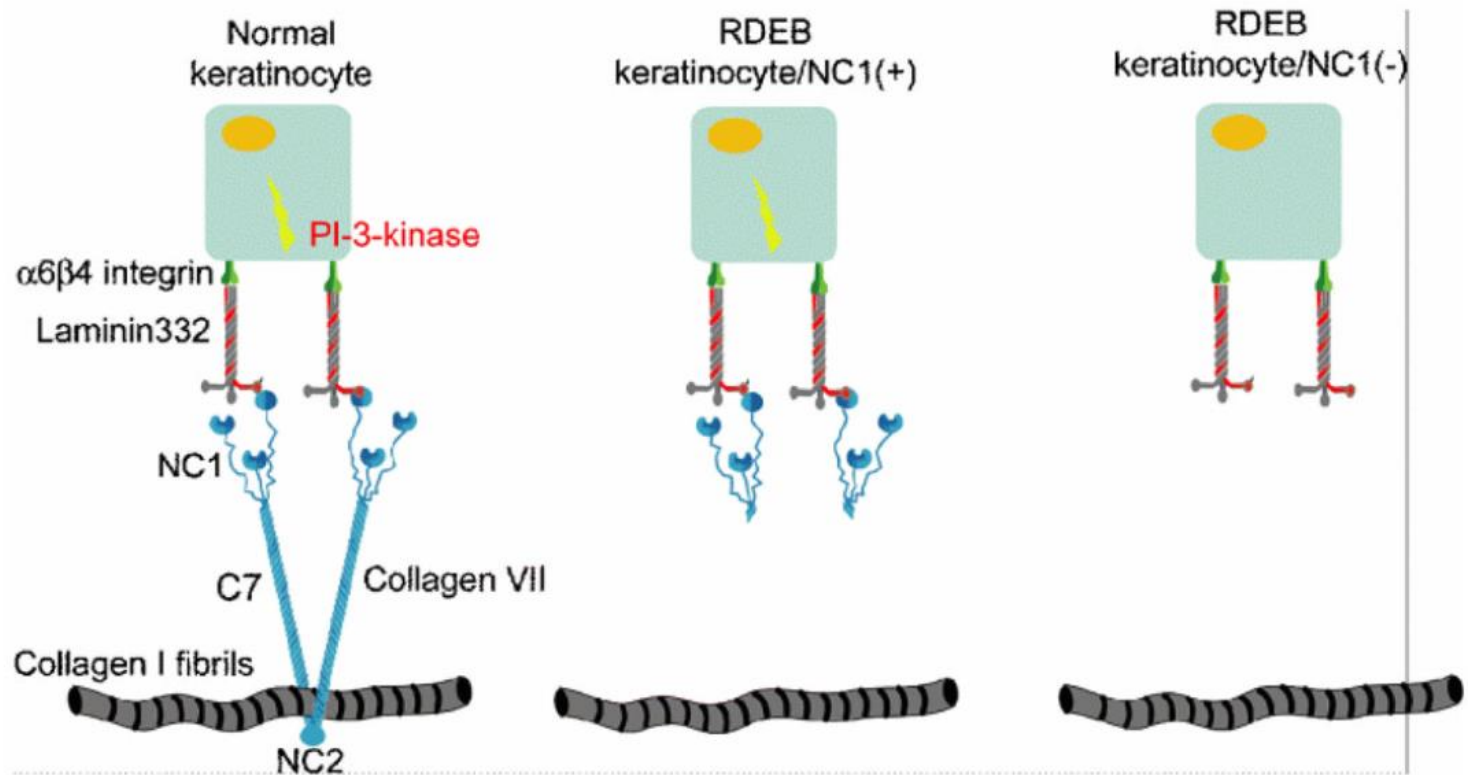
4 fő típus:

- Epidermolysis bullosa simplex EBS
- **Epidermolysis bullosa dystrophica DEB**
- Epidermolysis bullosa junctionalis JEB
- Kindler szindróma

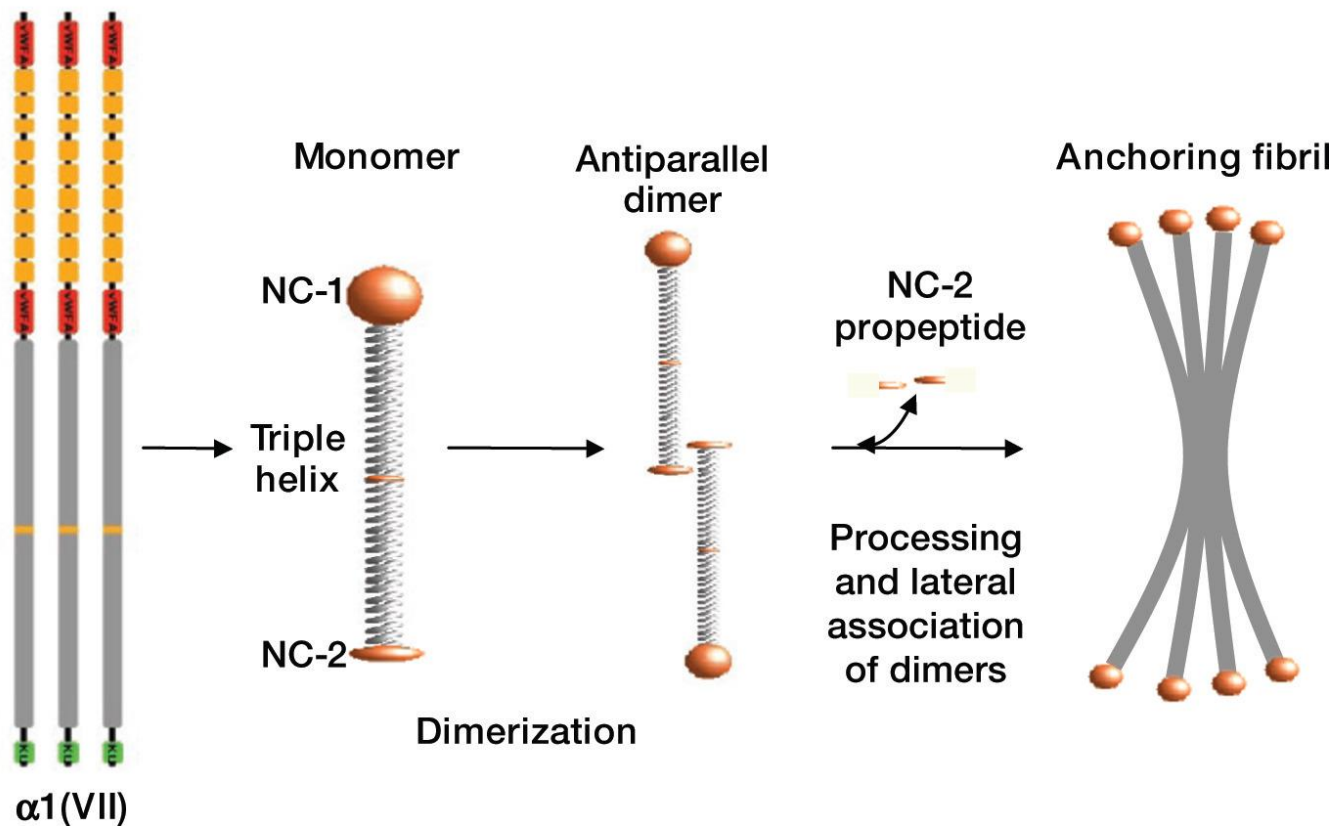


Kollagén VII fibrillumok

Mutációk a COL7A1 génben



Chung és Uitto 2010

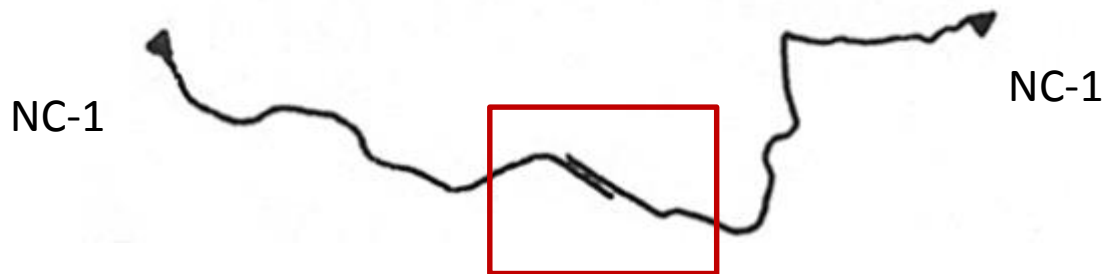
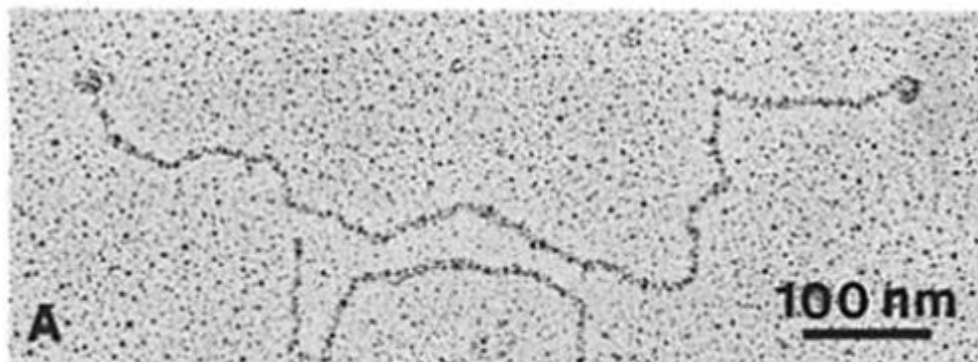


Leena Bruckner-Tuderman 2009

A két kollagén VII homotrimer antiparallel elrendeződésű dimereket alkot úgy, hogy a karboxi terminálisuk középen átfed és az amino terminális részük kifelé fordul

Transzmissziós elektronmikroszkópia

Sakai és mtsai 1986



Átfedő NC-2 régiók



785 nm

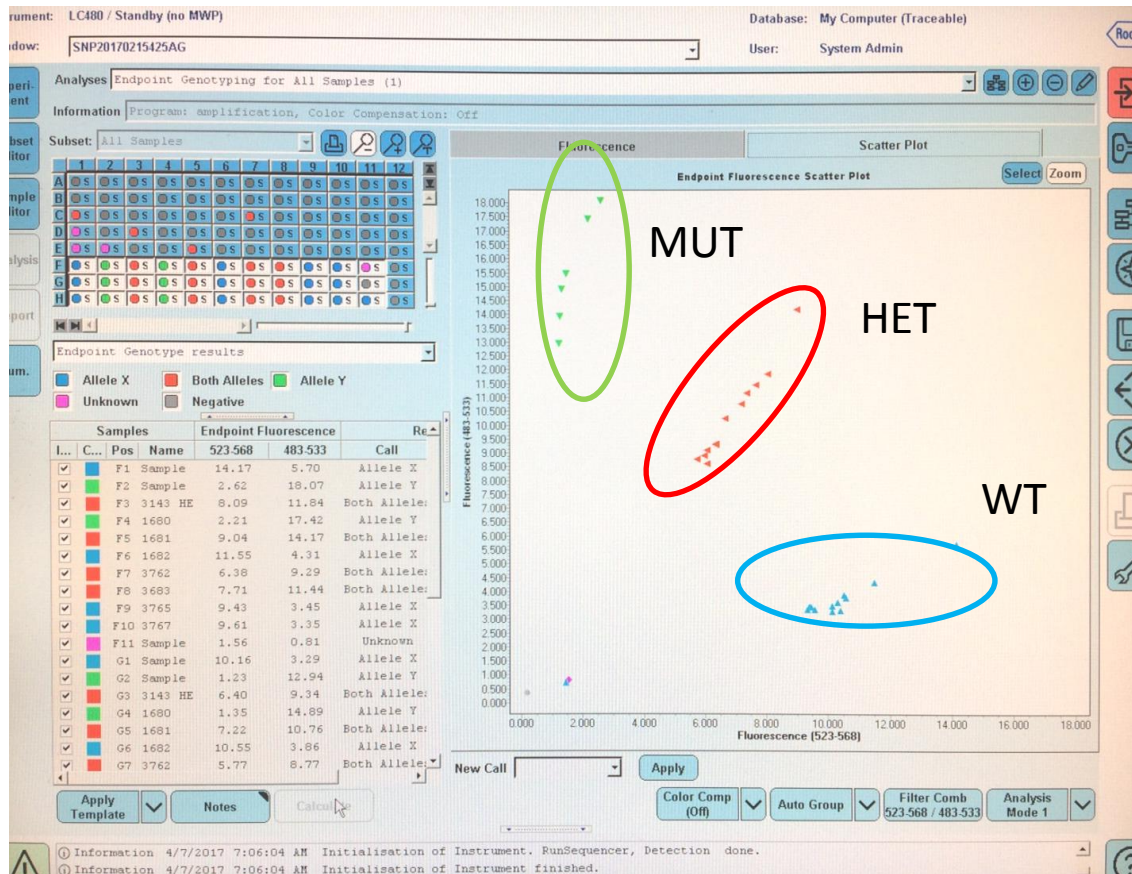
Célkitűzések

- RDEB beteg és kontroll bőrminták elemzésére alkalmas nanomechanikai teszt kifejlesztése
- Kollagén VII molekulák izolálása, triplahélix elemzése

Betegek

Beteg kora/neme	Családi anamnesis	IF Ag mapping LH7.2 festés minta/kontroll	Diagnózis	Pathogén mutáció a COL7A1 génben
1 éves/N	Negatív	-/+++	Generalizált súlyos RDEB	Homoz. c.425A>G, p.K142R
54 éves/F	Negatív	+++/>++++	Lokalizált RDEB	Het. c.5869C>T, p.R1957W, Arg>Trp Het. c.8457T>G, p.Tyr2819*

Genetikai vizsgálatok



NGS új generációs szekvenálás

Sanger szekvenálás

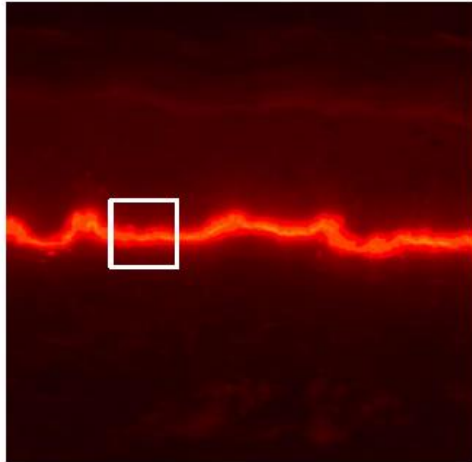
Taqman SNP esszé

COL7A1 c.425A>G mutációra specifikus
Taqman SNP genotipizáló esszé

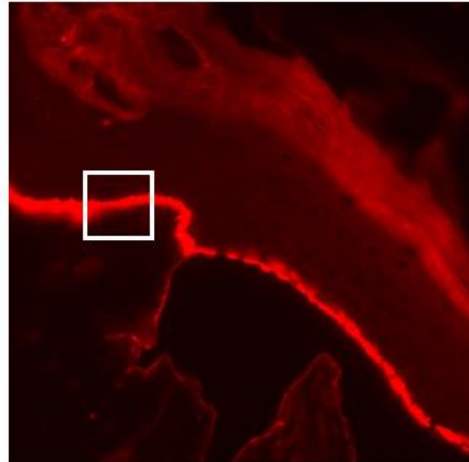
G – zöld
G/A - piros
A - kék

Kollagén VII immunfestés

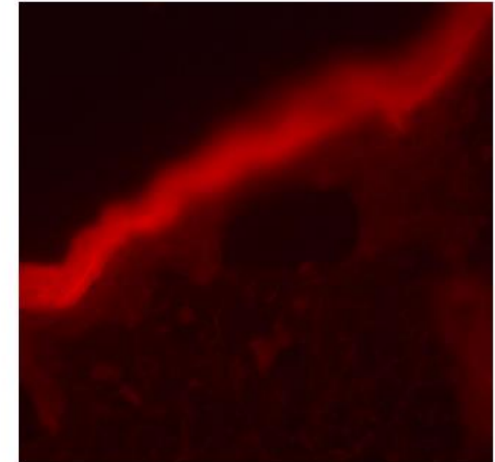
Egészséges kontroll



Lokalizált RDEB



Súlyos RDEB



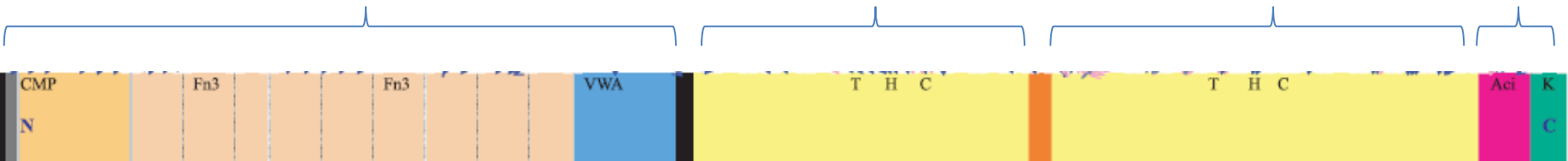
NC-1

THC

H

THC

NC-2



*LH 7.2 epitóp

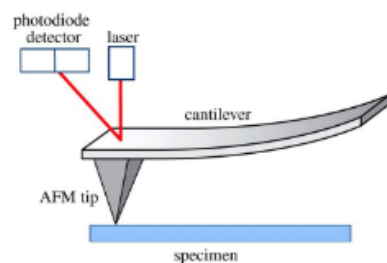
Súlyos RDEB beteg

3. Exon

Dang és mtsai 2008

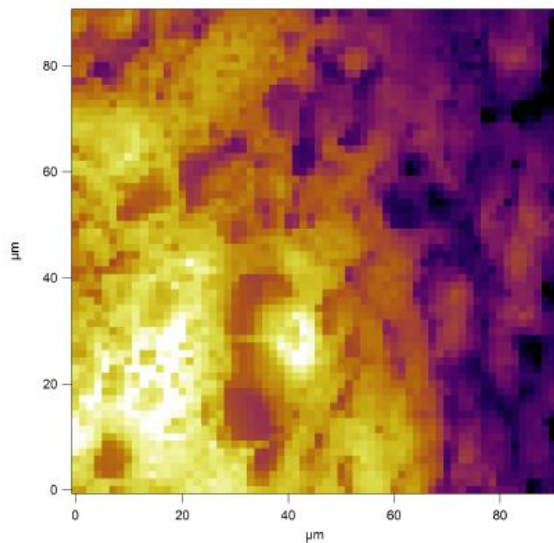
- Signal Peptide
- Cartilage matrix protein (CMP)
- Fibronectin III-like domains (Fn3)
- Von Willebrand factor A domain (VWA)
- Cysteine & protein rich domain (C/P)
- Triple helical collagenous domains (THC)
- 39 amino acid "hinge" region
- Acidic
- Kunitz module (KM)

RDEB loc beteg
72. Exon hinge
115. Exon Aci

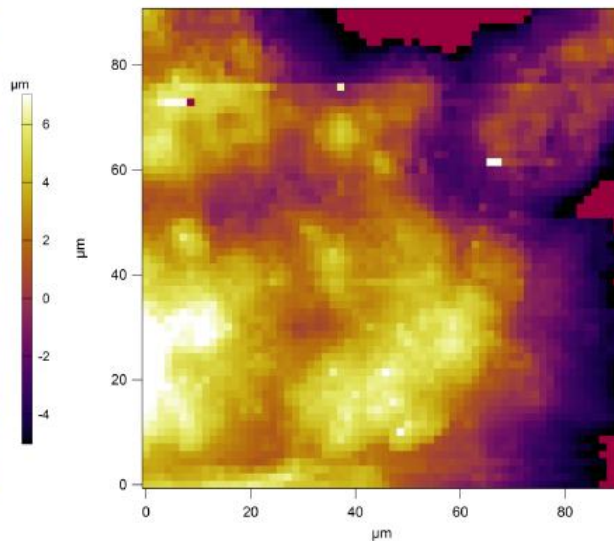


Az atomerő mikroszkóp (AFM)
mérési elve

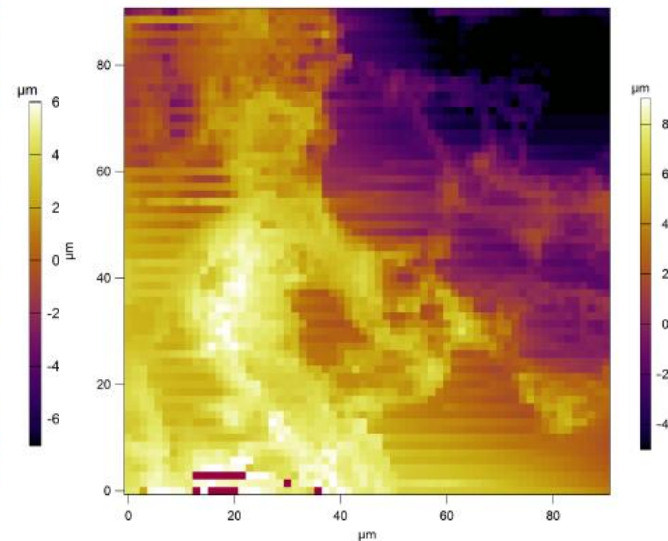
Egészséges kontroll



Lokalizált RDEB

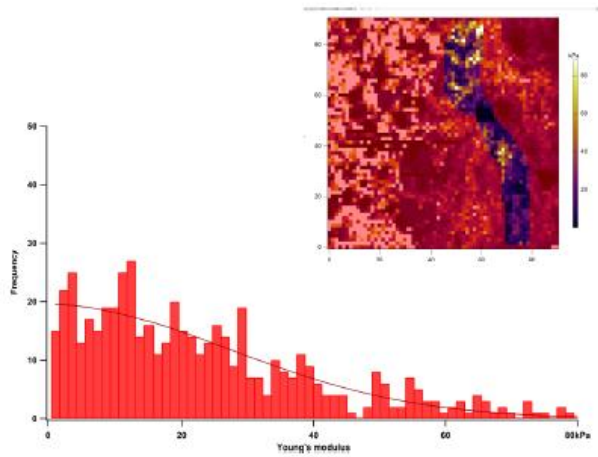


Súlyos RDEB

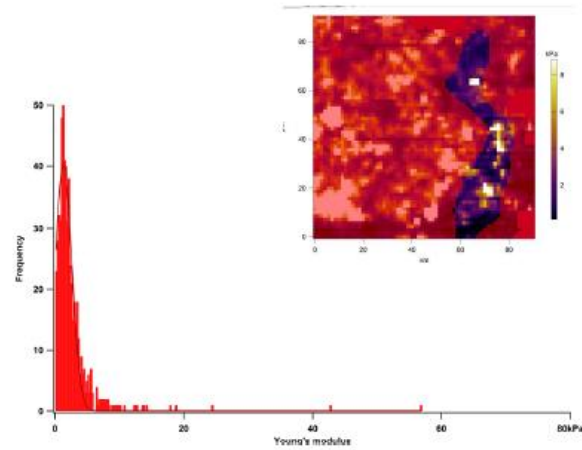


AFM erőterképek
90 μm x 90 μm

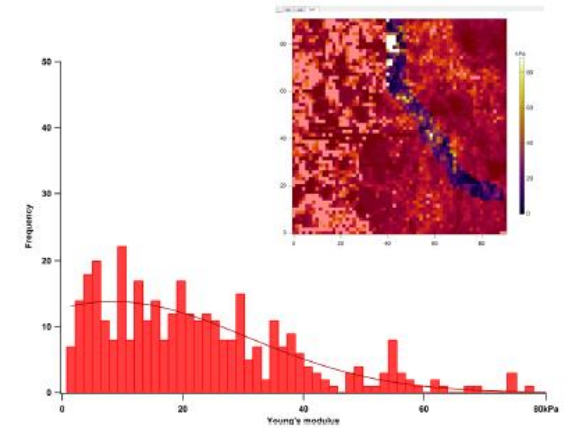
Egészséges kontroll



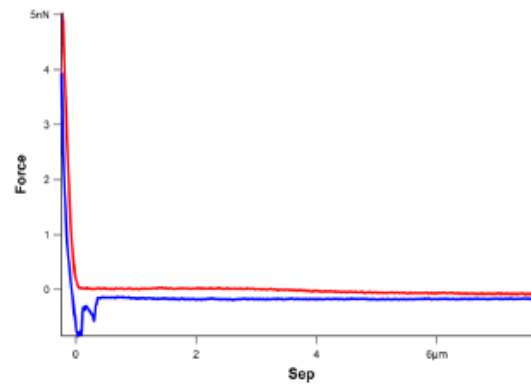
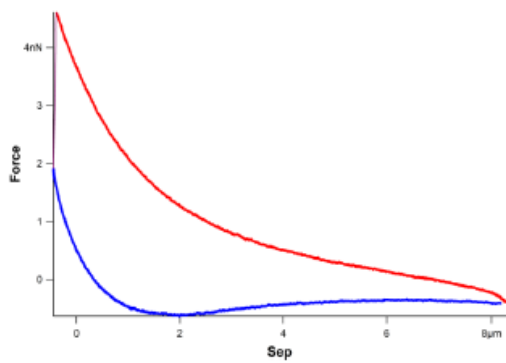
Lokalizált RDEB



Súlyos RDEB



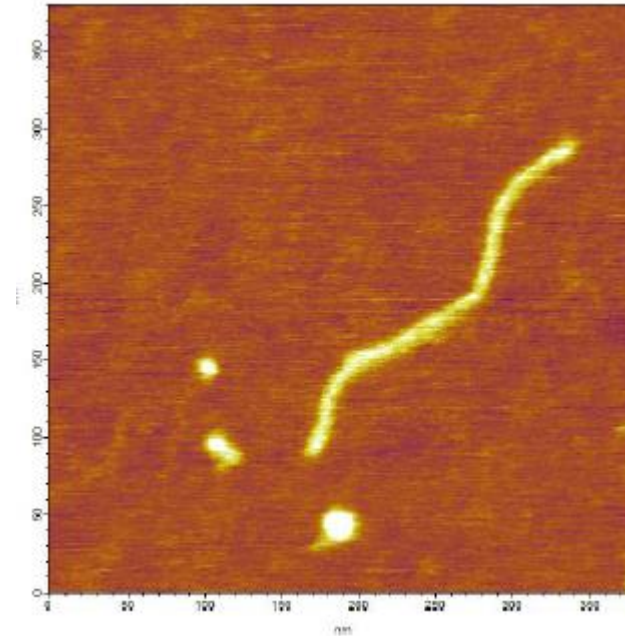
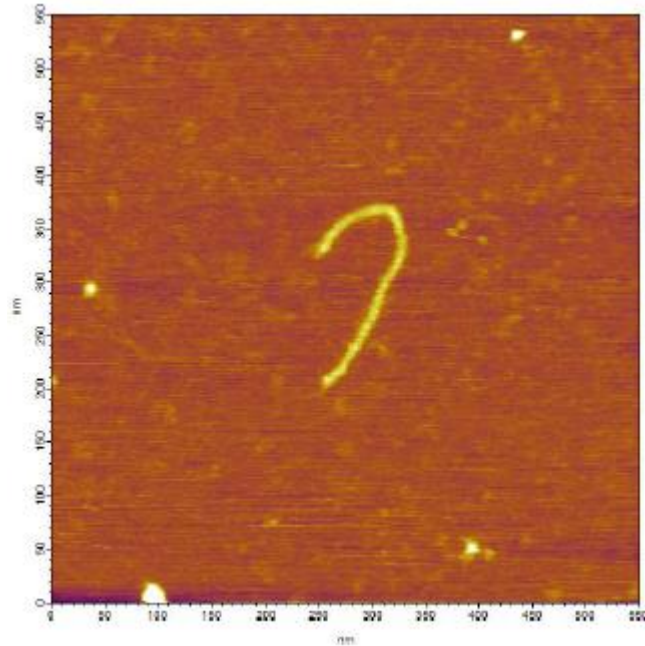
Young modulus eloszlás



Erő-távolság görbék

AFM mérések kollagén VII triplahélixen

Vad típusú kollagén VII egészséges kontrollból



1
Add SureBeads
Protein A or G
Magnetic Beads.

2
Add capture antibody,
incubate, and magnetize
beads to remove
unbound antibody.

3
Add sample containing
target protein and incubate.

4
Magnetize beads,
remove supernatant,
and wash unbound
protein fractions.

5
Add elution buffer, magnetize
beads, and collect purified
target protein.

Összefoglalás

- A kontroll bőrbíopszia metszeteken magas, közepes és alacsony Young modulussal rendelkező területeket azonosítottunk, amelyek sorrendben a dermisnek, a basalis membrán zónának és az epidermisnek feleltek meg.
- A dermisnek egy nagyságrenddel nagyobb a Young modulusa mint az epidermisnek.
- A Young modulus eloszlásában egyértelmű különbséget láttunk az lokalizált RDEB és egészséges kontroll minták között az alaphártya régióban.
- A közepes Young modulussal jellemezhető régiót nem tudtuk egyértelműen azonosítani a súlyos RDEB betegben.
- A kollagén VII molekuláknak fontos szerepe van mechanikailag eltérő epidermis és dermis összekapcsolásában.
- Jövőben tervezzük a kollagén VII triplahélix izolálását-elemzését a lokalizált RDEB betegből.

Köszönetnyilvánítás

Dr. Silló Pálma
Mazán Mercédesz
Suba Flóriánné Adrien
Göbölös-Pintér Dóra
Szigetvári Csilla
Prof. Dr. Kárpáti Sarolta

Semmelweis Egyetem, ÁOK,
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet
Haluszka Dóra
Prof. Dr. Kellermayer Miklós

NGS adatok:
Comenius Egyetem,
Természettudományi Kar,
Pozsony, Szlovákia
Dr. Tomas Szemes
Michaela Hýblova



MedinProt 2017
Megvalósíthatósági Program

Semmelweis Egyetem,
Dékáni Pályázat



OTKA NN 114460



DEBRA Hungary