

# Epigenetikai vizsgálatok jelentősége elhízott gyermekekben

Doktori tézisek

**Dr. Ács Orsolya Dóra**

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szabó András, D.Sc, egyetemi tanár  
Dr. Török Dóra, Ph.D, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Papp Gergő, Ph.D, tudományos főmunkatárs  
Dr. Kovács Gábor László, Ph.D, főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Reusz György, D.Sc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szamosi Tamás, Ph.D, egyetemi docens  
Dr. Kiss Zoltán, Ph.D, főorvos

Budapest  
2018

## I. Bevezetés

Az elmúlt években a gyermekkori elhízás előfordulása és annak mértéke drasztikusan növekedik világszerte. Ez az állapot egyre korábbi életkorban jelentkezik, amelynek következtében a rizikótenyezők, elhízással járó szövődményeik és azok következményei egyre korábban kezdik kifejteni hatásukat. A legfrissebb kutatások alapján az elhízás környezeti és genetikai hatások együttes eredménye, amelyeket epigenetikai mechanizmusok (pl.: DNS metiláció, hiszton modifikáció, mikro RNS útvonalak) kapcsolnak össze. A kandidáns génvizsgálatok (CGA) alapján az insulin-like growth factor 2 (*IGF2*) és proopiomelanokortin (*POMC*) gének expressziója közvetlen összefüggést mutatott a növekedéssel, az elhízással és a testösszetétellel. AZ *IGF2* és a *H19* imprintált gének, amelyek a növekedést és a testösszetételt szabályozzák.

A D-vitamin-hiány és a gyermekkori elhízás előfordulása együttesen és külön-külön is nagymértékben megnövekedett világszerte. A 25OHD3 vitamin aktivációja és metabolizmusa egy összetett folyamat, amely a májban és a vesékben található citokróm P450 enzimek által történik (pl.: a vesében található 1-alfa-hidroxiáz (*CYP27B1*) aktiváló enzim részvételével). Ezen enzimeket kódoló gének aktivitását és expresszióját olyan epigenetikai útvonalak is szabályozzák, mint a DNS metiláció. A D-vitamin nukleáris receptorán (*VDR*) keresztül epigenetikai útvonalakat szabályoz és számos gén transzkripciójára van hatással, amelyek a metabolizmusban vagy éppen a sejtproliferációban vesznek részt. Egyes tanulmányok alapján az alacsony szérum 25OHD3 vitamin szint összefüggésben áll a megnövekedett zsírtömeeggel, BMI-vel, mortalitással, a kardiavaszkuláris betegségekkel és a diszlipidémiával. Vizsgálatunk során elhízott gyermekekben összefüggést kerestünk az elhízás mértéke (BMI SDS) és a D-vitamin metabolizmusában részt vevő

(*CYP27B1* és *VDR*), valamint a metabolikus státuszt befolyásoló (*IGF2*, *POMC*) gének DNS metiláltsági szintje között. Továbbá az elhízással kapcsolatos leggyakoribb szövődmények gyakoriságát vizsgáltuk elhízott, de egyebekben egészségesnek gondolt gyermekekben.

A Prader-Willi szindróma (PWS) egy ritka, komplex genetikai betegség, amelynek klinikai tünetei az életkorral változnak. A klinikai diagnózis felállításához Holm és munkatársai kritériumrendszert dolgoztak ki, amely életkor specifikusan segíti a PWS felismerését. A betegség hátterében a 15. kromoszóma hosszú karján található apai eredetű 15q11q13 régióban fellelhető gének expressziójának hiánya áll, amely az esetek 70%-ában a legsúlyosabb formát okozó paternális deléció, 20-30%-ában anyai uniparentális diszómia, 4-5%-ában imprinting defektus, 1-2%-ában pedig kiegyensúlyozott, ill. kiegyensúlyozatlan transzlokáció eredménye. A diagnózis lehetősége a klinikai tünetek alapján merül fel, amelynek igazolásához elengedhetetlen a genetikai vizsgálat, aminek jelenleg a legérzékenyebb és leghatékonyabb formája az Small Nuclear Ribonucleoprotein- Associated Protein N (SNRPN) génlókuszt promóter régiójának DNS metilációs vizsgálata. Ezen módszerek szenzitivitása 99%-os. Mind a nyugat-európai országokban, mind pedig az Amerikai Egyesült Államokban a legerjedtebb DNS metilációs vizsgálat a metilációs-specifikus multiplex ligáció függő próbaamplifikációs (MS-MLPA) módszer. Az MS-MLPA módszer nemcsak a PWS igazolására ill. kizárására alkalmas, hanem egyben további információval szolgál a betegség molekuláris genetikai hátterét illetően. A nagy felbontású olvadáspont-elemzéses (HRM) technika szintén nemzetközileg elismert és támogatott. Vizsgálatunk során az általunk módosított, költséghatékony, könnyen hozzáférhető, metilációs-szenzitív HRM technikát hasonlítottuk össze a leginkább elterjedt, költséges MS-MLPA technikával.

## II. Célkitűzések

### Célkitűzésünk volt az alábbi hipotézisek bizonyítása:

**II.1.** Mire az elhízott gyermekek kórházi kivizsgálásra és ellátásra kerülnek, jelentős részükben már kialakultak az elhízással összefüggő kóros laboreltérések és szövődmények.

**II.2.** Betegeinkben a vérből meghatározható 25OHD3 vitamint-szint és az elhízás mértéke között kapcsolat áll fenn.

Mivel a D-vitamin anyagcsere jellegzetesen megváltozik az elhízásban és az alacsony D-vitamin-szint és inzulinrezisztencia gyakran fordul elő az elhízással együtt.

**II.3.** A D-vitamin aktivációjában és D-vitamin receptor mediált hatásában is szerepet játszó, *CYP27B1* és *VDR* gének DNS metiláltsági szintje és a gyermekkori elhízás mértéke összefügg.

Mivel az aktív D-vitamin-szint kialakításában fontos 1-alfa-hidroxiláz génje, számos más génnel együtt része az „obez epigenetikus mintának”, a D-vitamin az epigenetikus szabályozáson keresztül kapcsolódik be az obezitásban és metabolikus szindrómában jellemző mintázatba.

**II.4.** A metabolizmust közvetlenül befolyásoló *IGF2* illetve *POMC* gének metiláltsági szintje, egyben ennek gyermekkori elhízás mértékére gyakorolt hatása jelentős szereppel bír a gyermekkori elhízásban.

Mivel az „elhízásra hajlamos alkat” több komponensből tevődik össze, átörökítésében epigenetikai mechanizmusok fontos szerepet játszanak.

**II.5.** A Prader-Willi-szindrómás és a Prader-Willi like fenotípusú gyermekek esetében a Holm kritériumrendszer szerinti besorolás klinikailag hasznos.

**II.6.** Az SNRPN génlókuszt promoter régiójának DNS metilációs mintázata eltér a szindrómás és a nem szindrómás esetekben, ezért az általunk kidolgozott, a Prader-Willi-szindróma első vonalbeli szűrésére alkalmas.

Ez a DNS metiláción alapuló vizsgálati metodika validálható saját Prader-Willi-szindrómás betegek bevonásával.

### **III. Módszerek**

#### **III.1. A vizsgált betegek**

Összesen 82 (40 fiút és 42 lányt), 95. percentil feletti kor- és nem specifikus BMI-vel rendelkező, egyebekben egészséges, 3 és 18 év közötti gyermeket vontunk be vizsgálatunkba. Rögzítettük az antropometriai (magasság, testsúly, derékkörfogat, születési súly és - hossz) és a metabolikus paramétereiket (lipid profil, éhomi vércukor – és inzulin szint, orális glükóz tolerancia teszt eredményei), a D-vitamin (25OHD3 vitamin), a parathormon és a TSH szintjüket, a pubertárs státuszukat és 24 órás vérnyomásmérést is végeztünk. Minden egyes esetben BMI SDS-t számoltunk annak érdekében, hogy az elhízás mértékét relativizálni tudjuk. Meghatároztuk a kóros metabolikus eltéréseket, az elhízással kapcsolatban álló szövödmények jelenlétét. Egy általunk összeállított kérdőív segítségével az anamnesztikus adatok felvételekor kitértünk a terhesség során felmerülő komplikációkra, anyai súlynövekedés mértékére, perinatális eseményekre, fejlődés menetére, a jelenlegi étkezési szokásokra és életmódra.

A Prader-Willi szindróma genetikai vizsgálatához kapcsolódó munkánk során a markáns klinikai tünetek alapján (pl.: hipotonia, csecsemőkori táplálási nehézségek, hipogonadizmus, enyhe - ill. közepes fokú mentális retardáció, viselkedés zavarok, gyermekkori elhízás és hiperfágia) 17, Klinikánkon való megjelenéskor 18 év alatti, PWS gyanús gyermeket vizsgáltunk retrospektíven. Az anamnesztikus adatgyűjtés kiterjedt a perinatális anamnézisére, fejlődési adatokra, antropometriai paraméterekre, illetve a Holm szerinti major és minor kritériumok regisztrálására.

## III.2. Genetikai módszerek

### III.2.1 Elhízott és Prader - Willi szindróma gyanús betegek mintáin elvégzett vizsgálatok

#### III.2.1.1 DNS izolálás és biszulfít kezelés

Minden esetben a perifériás teljes vérmintából történő genomiális DNS izolálás High Pure PCR Template Preparation Kit-tel, az ezt követő biszulfít konverzió EZ DNA Methylation™ Kit-tel történt. A biszulfít konvertált minták koncentrációját NanoDrop spektrofotométerrel határoztuk meg, 'ssDNA' beállítást használva.

#### III.2.1.2 Biszulfít szekvenáló polimeráz láncreakció (BS-PCR)

Mind az elhízott gyermekekben vizsgált gének (*POMC*, *IGF2*, *CYP27B1*, *VDR*), mind pedig a Prader - Willi szindróma kialakulásáért felelős *SNRPN* (Small Nuclear Ribonucleoprotein-Associated Protein N) génlókus promoter régiójának metiláltságának becslésére alkalmaztuk a BS-PCR technikát.

*In silico* CpG sziget azonosításhoz CpG Plot EMBOSS Application programot használtuk. Biszulfít-szekvenáló PCR reakciók a PyroMark Assay Design software (SW 2.0, Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) segítségével tervezett, a metilációs mintázatot leginkább mutató CpG régiókra fókuszáló primerekkel zajlottak (forward primer és biotinnal jelöl reverz primer). A primerek specificitását *in silico* BiSearch software-rel (<http://bisearch.enzim.hu>) teszteltük (1.táblázat).

A BS-PCR reakciókhoz AmpliTaq Gold 360 Master Mix-et (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), LightCycler® 480 ResoLight Dye (Roche, Bázél, Svájc) festéket használtunk, a primerek végkoncentrációja 0,2 µM volt. 20–40 ng biszulfít konvertált DNS került reakciónként a 15 µl-es végtérfogatba. Az MgCl<sub>2</sub> végkoncentrációja *SNRPN* gén esetében 3,5

mM, *CYP27B1* és az *IGF2* gén esetében 2,5 mM, a *VDR* és *POMC* gének esetében 1,5 mM volt. A valós idejű PCR során a következő LightCycler® 480 System beállításokat alkalmaztuk: 95°C 10 percig, utána 95°C 30 másodpercig, 60°C 0,4°C-os ciklusonkénti csökkenéssel 30 másodpercig, 72°C 30 másodpercig 10 touchdown ciklus alatt, ezt követően amplifikáció: 95°C 30 másodpercig, 56°C 30 másodpercig, és 72°C 30 másodpercig 50 cikluson keresztül. A PCR ciklusok befejeztével, a nagyfelbontású olvadáspont elemzés (HRM) a következőképpen zajlott: denaturáció 95°C-on 1 percig, 40°C-ra hűtés után a hőmérsékletet tartva 1 percig, utána folyamatos melegítés 95°C-ra. Olvadáspont mérés során folyamatos melegítés közben fokenként 20 alkalommal detektáltuk a fluoreszcens jeleket.

A metiláltsági értékek becsléséhez a normalizált MS-HRM görbék negatív deriváltját vettük alapul, ezekhez a LightCycler® 480 Software 1.5.0 és a LightCycler® Gene Scanning software segítségével jutottunk hozzá.

Az MS-HRM assay-k kalibrálása *in vitro* biszulfid konverzióan átesett teljesen metilált (100%) és metilálatlan (0%) standard DNS-ek keverékéből származó, különböző metiláltságú (0%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%) mintákkal történt, amelyek a MS-HRM vizsgálat során jelentették a viszonyítási pontokat. A metiláltsági szint megállapítása minden vérminta esetében, a beteg és a standard minták vizuális összehasonlításával történt, két különböző szakértő bevonásával.

## **III.2.2. Elhízott gyermekek mintáján elvégzett vizsgálatok**

### **III.2.2.1. Piroszekvenálás**

A metabolizmussal kapcsolatos *POMC* és *IGF2*, valamint a D-vitamin anyagcserében és jelátvitelben jelentős szerepet játszó *CYP27B1* és *VDR*

gének egzakt CpG metiláltsági mértékét határoztuk meg piroszekvenálással.

A heterogén BS-PCR termékek bázisösszetételét direkt szekvenálással határoztuk meg. Az eredetileg metilálatlan citozinok helyén timin, míg a metiláltak helyén citozin detektálható. Mivel csak a CpG citozinok metilálódhatnak, ezért ezek helyén a BS-PCR termékben citozin és timin is előfordulhat, DNS-en található összes többi citozin helyén timin marad. A Qiagen PyroMark System (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) általi piroszekvenálással megállapítottuk, hogy a vizsgált génszakaszokról amplifikált BS-PCR ampliconokban a CpG citozinok helyén milyen aránya a citozinoknak és a timineknek, ebből számítottuk ki az adott CpG metiláltságát. A maximum 100 bázispár hosszúságú szakaszok elemzése a PyroMark Q24 (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) szekvenáló géppel, PyroMark Gold Q24 Reagens-t (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) alkalmazva, a gyártó utasításainak megfelelően történt. A DNS tisztítás, valamint a biotinizált egyszálú DNS további vizsgálata a PyroMark Assay Design software, SW 2.0 (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) segítségével tervezett, speciális, CpG szigeteket lefedő szekvenáló primereket felhasználó reakciók során történt (1. táblázat). A szekvenálás során kapott eredményeket a PyroMark Q24 software v2.0.6 (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) segítségével értékeltük ki. A vizsgált DNS szakasz átlagolt százalékos metilációját határoztuk meg piroszekvenálás során.



Target gén és assay	Forward primer	Reverse primer (biotinnal jelölt)	Szekvenáló primer
<i>CYP27B1</i> Assay1	GGTTTTTGGGGG TAGAGAAGAT	CTCCCTATTCCCA AACCCAATCAA	GGGGGTAGAGAAG ATTTA
<i>CYP27B1</i> Assay2	AGAGGGGTTTGG GATGTT	AACCCTCAAATA CCCCTCCAAAAT ATTCCAT	GGGATGTTTGTTAA GTT
<i>VDR</i> Assay2	GGATTAGGGATT AGGGAAGTTGAG ATTTA	TACTACTACAAA ACCCCAAAAAAC TCAACCTAA	AGATTTAGTTTTTT TGGGTGA
<i>VDR</i> Assay3	ATTTTAATTTGTG GGATTAGGTTGA GT	TAATCCAAAATA CAACCCCCCACC CTTCCTAC	TGGAGTTTTGTAGT AGTAATAGG
<i>IGF2</i> Assay1	GGGATTGGGTTA GGAGAAGT	CCCCCCCCAAAA TAACCAACAAT	GGGTTAGGAGAAG TTTTA
<i>POMC</i> Assay7	GTTGGAAAGGGG TTGGAATTAGTA	ACACCCACAAAA CCACTCCTAACTT CTAC	TTTAGGAAGAATTT AATTATGGAT
<i>SNRPN</i> Assay1	GAGGGAGTTGGG ATTTTTGT	AATAACCCCTCC CCAAACTATCTCT T	

***1.táblázat: A biszulfid szekvenáló PCR reakció és a piroszekvenálás során vizsgált target gének, azokhoz tartozó assay-k és primerek***

*A BS-PCR során saját tervezésű, forward – és biotinnal jelölt reverz primereket, míg a piroszekvenálás kivitelezésekor szekvenáló primereket alkalmaztunk. Mind a VDR, mind pedig a CYP27 génekhez több Assayt terveztünk a promóter régió teljes lefedése érdekében. CYP27B1: 1-alfa-hidroxiláz gén, VDR: D-vitamin receptor gén, IGF2: insulin-like growth factor gén, POMC: proopiomelanokortin gén, SNRPN: Small Nuclear Ribonucleoprotein-Associated Protein N gén*

### **III.2.3. Prader - Willi szindróma gyanús betegek mintáin elvégzett vizsgálatok**

A PWS klinikai diagnózisát mutató betegeken végzett metiláció specifikus multiplex ligáció függő próba amplifikáció (MS-MLPA) segítségével mind a target 15q11q13 régió kópia száma, mind pedig a metilációs státusz megállapítható, tehát a betegség fennállása igazolható vagy elvethető volt. Az uniparentalis diszómia illetve az imprinting defektus további elkülönítésére, tehát a diagnózis genetikai hátterének pontosítására mikroszatellita analízist (MSA) alkalmaztunk.

#### **III.2.3.1 Multiplex ligáció függő próba amplifikáció (MS-MLPA)**

A SALSA ME028 (lot B2-0413 és B2-0811) MS-MLPA mixet az MRC-Holland-tól (Amszterdam, Hollandia) rendeltük. A próba mix 32 specifikusan a Prader-Willi-/Angelman- szindrómában érintett 15q11q13 régiót lefedő próbát tartalmazott. Ezek közül 5 MS-MLPA próba egy imprintált szekvenciára és egyben a metiláció érzékeny *HhaI* enzim felismerő helyére volt specifikus. 14 MLPA próba a PWS/Angelman régión kívül helyezkedett el és kontrollként funkcionált mind kópia szám kvantifikáció, mind pedig az MS-MLPA során történő *HhaI* enzim általi emésztés teljességének ellenőrzésére. Minden minta esetében 100ng genomális DNS került reakciónként felhasználásra. A mintákat 60°C-on történő 16 órás hibridizáció után két aliquot részre osztottuk. Az elsőt ligációnak, míg a másodikat ligációnak és enzimátikus emésztésnek vetettük alá. Ezek után PCR amplifikációt hajtottunk végre a mintákon. Minden PCR termékhez (1 µl) belső standardot (1 µl) és deionizált formamidot (20 µl) adtunk, majd ABI-3100 Genetic Analyzer DNS szekvenáló (Applied Biosystems, Life Technologies, Waltham, MA, USA) segítségével analizáltuk a kapott eredményeket.

### **III.2.3.2. Mikroszatellita analízis (MSA)**

MSA során mind a gyermekek, mind pedig a szülők DNS mintáit megvizsgáltuk. A 15q11q13 régióra specifikus 5 markert használtunk (*D15S541*, *D15S817*, *D15S128*, *D15S1234* és *D15S822*) a multiplex PCR után, amelyet a Qiagen Multiplex PCR Kit-tel (Qiagen, Valencia, CA, USA) végeztünk. A PCR reakció 25  $\mu$ L végvolumene 100 ng DNS-t és minden primerből 2  $\mu$ M-t tartalmazott. Az amplifikáció első lépése denaturáció volt, 95°C-on 15 percig, amelyet 35 ciklus követett (30 másodperc 94°C-on, 90 másodperc 58°C-on, 90 másodperc 72°C-on), végül 10 percig 72°C-on, majd 4°C-on hűtés). Három, PWS/Angelman régión kívül eső lókuszt (*D15S144*, *D15S1007* és *D15S642*) genotipizálása segített különbséget tenni a deléció és az uniparentális diszómia között: az apai kritikus régió hiánya és biparentális megjelenés a régió kívül együttesen deléciót jelentett, míg az uniparentális öröklődés mind a kritikus régióban, mind pedig azon kívül, uniparentális diszómiára utalt. A MSA során a fluoreszcensen jelölt PCR termékeket ABI 3100 Automatic Capillary Genetic Analyzer, GeneScan és Genotyper software (Applied Biosystems, Life Technologies, Waltham, MA, USA) segítségével detektáltuk.

### **III.3. Statisztikai módszerek**

Az elhízott gyermekek esetében a vizsgált paraméterek jellemzésére leíró statisztikai módszert (átlag  $\pm$  SD) használtunk. Az elhízás mértékének, valamint a D-vitamin szintnek és a gyermekek antropometriai, valamint metabolikus paramétereinek összefüggéseit páros Student *t*-teszttel és Pearson korrelációs analízissel vizsgáltuk. Az egyes gének DNS metilációjának az elhízással és a D-vitamin státusszal való kapcsolatát lineáris regressziós modellekkel írtuk le.

## IV. Eredmények

### IV.1. Az elhízott gyermekek metabolikus státuszának felmérése, illetve az esetükben előforduló, a metabolikus státusszal szorosan összefüggő szövödmények gyakorisága leírása

A vizsgálatba történő beválasztásnál 42 lányból 33, 41 fiú közül pedig 27 volt a pubertás valamely stádiumában, a két nem átlag életkora közel állt egymáshoz (lányok:  $12,5 \pm 3,1$ , fiúk:  $12,9 \pm 2,6$ ). Az antropometriai és metabolikus adatok nemek szerinti összehasonlításakor a lányok a fiúkhoz képest nagyobb BMI SDS-sel bírtak ( $4,5 \pm 0,3$  vs.  $3,9 \pm 0,2$ ,  $p = 0,1571$ ), a fiúk esetében a várandósság alatti anyai súlynövekedés nagyobbban bizonyult, mint a lányok esetében ( $13,7 \pm 2,5$  vs  $11,9 \pm 1,5$ ,  $p = 0,5488$ ), illetve a lányok glutamát-piruvát tanszamináz (GPT), valamint alkalikus foszfatáz (ALP) szérum szintjei szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak a fiúkénál ( $28,1 \pm 3,8$  vs.  $18,23 \pm 1,3$ ,  $p=0,0228$  ;  $230,3 \pm 16,4$  vs.  $184,2 \pm 15,6$ ,  $p = 0,0452$ ).

A 82 elhízott, de egyebekben látszólag egészséges gyermek közül 27-nél találtunk legalább egyet az alábbi három, elhízáshoz kapcsolható szövödmény közül: 24 órás vérnyomásmérés (ABPM) során megállapított hipertónia, szénhidrát anyagcserezavar (orális glükóz tolerancia teszt alapján – csökkent glükóz tolerancia), diszlipidémia (emelkedett összkoleszterin érték). Egy gyermeknél a megemelkedett húgysavszint mellett mind a három, már említett szövödmény egyszerre volt jelen. Eredményeink alapján a hipertónia és a diszlipidémia önállóan 18,29 -18,29 % -ban, míg a szénhidrát anyagcsere zavar 13,41% -ban fordult elő. Az 55 vizsgált gyermek közül, akinél e három szövödmény nem volt kimutatható, 9 esetben igazoltunk izolált hiperurikémiát. Összesen 36 esetben volt jelen legalább egy, elhízáshoz kapcsolható szövödmény (ez a vizsgált gyermekek 43,9 %-a), 46 gyermeknél pedig szövödmény nem volt kimutatható.

#### **IV.2. A 25OHD3 vitamin szint és az elhízás mértékének kapcsolata**

Nem találtunk szignifikáns összefüggést sem a metabolizmust befolyásoló gének (*POMC*, *IGF2*), sem pedig a *CYP27B1* gén metiláltságának mértéke és a 25OHD3 vitamin szint között sem, azonban a *VDR* gén metiláltsági foka tendenciózus pozitív összefüggést mutatott a szérum 25OHD3 vitamin szintjével ( $r=0,2053$ ,  $p=0,066$ ).

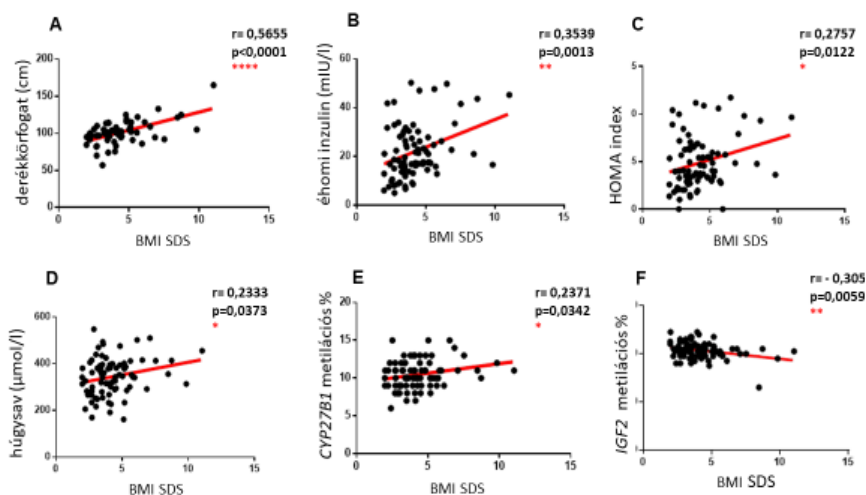
#### **IV.3. Az elhízás mértékének és a D-vitamin metabolizmussal kapcsolatos (*VDR*, *CYP27B1*) gének DNS metiláltsági fokának összefüggései**

A D-vitamin metabolizmusban szerepet játszó gének közül a *VDR* metiláltsága nem mutatott összefüggést az elhízással ( $p=0,5595$ ,  $r=-0,06579$ ), azonban az 1-alfa-hidroxiáz aktivitásért felelős *CYP27B1* gén metiláltsági szintje, az általunk vizsgált promóter régióban pozitív korrelációt mutatott az elhízás mértékével ( $p=0,0342$ ,  $r=0,2371$ ). Tehát minél nagyobb fokú volt az elhízás, annál nagyobb mértékben metilálódott az adott génszakasz (1.ábra).

#### **IV.4. Az elhízás mértékének és a metabolizmussal kapcsolatos (*POMC*, *IGF2*) gének DNS metiláltsági fokának összefüggései**

Az elhízás mértékét BMI SDS-ben fejeztük ki és megvizsgáltuk a metabolizmust befolyásoló gének metiláltsági szintjével való összefüggését (Pearson korrelációs analízis). Az anorexián hatást közvetítő neuropeptidet kódoló *POMC* gén metiláltsági foka nem mutatott kapcsolatot az elhízás mértékével ( $p=0,1334$ ,  $r=0,2321$ ), míg a növekedést közvetlenül befolyásoló *IGF2* gén esetében szignifikáns negatív összefüggést találtunk ( $r=-0,305$ ,  $p=0,0059$ ). Tehát minél nagyobb volt az elhízás mértéke, annál kevésbé volt metilált az *IGF2* génszakasz (1.ábra).

A *CYP27B1* és *IGF2* gének metiláltsági mértékének és a 25OHD3 vitamin, valamint a BMI SDS kapcsolatának további elemzése céljából lineáris regressziós modellt alkalmaztunk. Mivel ismert, hogy az *IGF2* befolyásolja a növekedést és a testösszetételt és a D-vitamin hiány társulhat magasabb BMI-hez, a *CYP27B1* pedig az 25OHD3 vitamint aktív 1,25(OH)<sub>2</sub> D-vitaminná alakítja, ezeket a változókat használtuk elemzésünk során. Lineáris regressziós modellünket lépésről lépésre (stepwise) bővítettük a fenti változókkal, ha egy változó nem javította a modell magyarázhatóságát, akkor kizárásra került (backward elimination). Tehát a végső modell alapján a BMI SDS és a *CYP27B1* valamint az *IGF2* gének metiláltsági státusza között statisztikailag igazolható a kapcsolat.



**1.ábra: A BMI SDS és metabolikus paraméterek, valamint a DNS metiláció mértékének összefüggése**

#### **IV.5. Prader-Willi szindrómás illetve Prader-Willi like fenotípusú gyermekeknél a Holm kritérium rendszer klinikai jelentőségének bizonyítása**

A genetikai vizsgálatok eredményeit az általunk regisztrált Holm score-al összevetve, a genetikailag igazolt PWS betegek esetében a kritérium rendszer szerinti pontszám nagyobbak bizonyult a Prader-Willi like fenotípussal rendelkező, de a Prader – Willi szindrómára jellemző genetikai eltérésekkel nem rendelkezők pontszámánál.

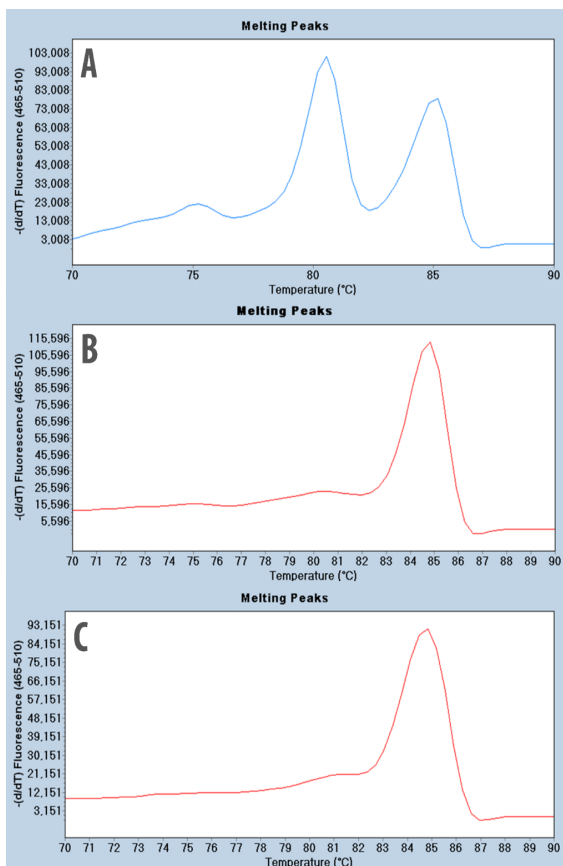
#### **IV.6. A Prader-Willi szindróma elsődleges igazolására alkalmazható, általunk kidolgozott DNS metilációs vizsgálat eredményei**

A saját tervezésű HRM és a nemzetközileg elterjedt MS-MLPA módszerekkel 17 PWS-gyanús beteg DNS mintáját teszteltük, Prader-Willi-szindróma 6 esetben igazolódott. Ezekben az esetekben a további besorolás érdekében MSA vizsgálatot végeztünk, amellyel 1 betegnél deléció, 2 betegnél pedig uniparentális diszómiát igazoltunk. Egy beteg esetében az imprinting defektust az uniparentális diszómiától nem tudtuk elkülöníteni, mivel a hiányzó szülői DNS minta miatt MSA nem volt kivitelezhető. A HRM és az MS-MLPA vizsgálatok eredményei minden esetben megegyeztek (2.ábra).

#### **IV.7. Limitációk**

A DNS metilációs vizsgálatok során a genomális DNS-t perifériás vérmintából izoláltuk, ami több különféle sejtípust is tartalmaz és az egyes minták pontos sejtösszetétele nem volt ismert. Mivel a DNS metiláció szövetspecifikus, a zsíresejtek metilációs mintázata eltérhet az általunk vizsgált vérsejtektől. Az elhízás kialakulásában szerepet játszó epigenetikai mechanizmusok közül mi csak a DNS metilációt vizsgáltuk, ám egyéb epigenetikai útvonalak, úgy mint, hiszton modifikáció ill. miRNS általi szabályzás is szerepet játszhatnak a pathogenezisben. Az általunk vizsgált

elemszám reaktív kicsi, illetve a D vitamin szint jelentősen függ az évszaktól és az etnikai hovatartozástól, ezért további, nagyobb elemszámú vizsgálatok szükségesek eredményeink alátámasztására. A PWS genetikai diagnosztikájára kidolgozott methodikánk szintén nagyobb elemszámú vizsgálatban történő ellenőrzése javasolt.



**2.ábra:** SNRPN lókuszt HRM vizsgálat során detektált metilációs görbéi



*A: két olvadási csúcs (nem metilált apai:  $T_m = 80,63 \pm 0,24^\circ\text{C}$ , metilált anyai:  $T_m = 84,97 \pm 0,35^\circ\text{C}$ ) detektálható egészségesekben, Járulékos minor olvadási csúcsok LIS1 lókuszra ( $T_m = 76,0^\circ\text{C}$ ) illetve anyai és apai SNRPN heteroduplex produktumokra utalnak, B: Deléciós PWS ( $T_m = 84,48 \pm 0,99^\circ\text{C}$ ), C: nem deléciós PWS ( $T_m = 84,5 \pm 0,6^\circ\text{C}$ ), Minden PWS esetben hiányzik az apai (nem metilált) csúcs,  $T_m$ : olvadási hőmérséklet = melting temperature*

## **V. Következtetések**

1. Jelen munkánk során vizsgált elhízott gyermekek mire kórházi kivizsgálásra és ellátásra kerültek, jelentős részükben már kialakultak az elhízással összefüggő kóros laboreltérések és szövödmények. Eredményeink alapján a hipertónia és a diszlipidémia önállóan 18,29-18,29 % -ban, míg a szénhidrát anyagcsere zavar 13,41% - ban fordult elő. Összesen 36 esetben, tehát az összes (82) általunk vizsgált elhízott gyermek 43,9 %-ában volt jelen legalább egy, elhízáshoz kapcsolható szövödmény.

2. Annak tényét, hogy mivel a D-vitamin anyagcsere jellegzetesen megváltozik elhízásban és az alacsony D-vitamin-szint gyakran fordul elő elhízással együtt, valamint, hogy a betegekben a vérből meghatározható 25OHD3 vitamin szintje és az elhízás mértéke között szignifikáns kapcsolat áll fenn, nem sikerült bizonyítanunk.

3. A D-vitamin aktivációjában szerepet játszó *CYP27B1* gén DNS metiláltsági szintje szignifikánsan pozitív korrelációt mutatott a gyermekkori elhízás mértékével. Tehát az aktív D-vitamin-szint kialakításában fontos 1-alfa-hidroxiláz génje (*CYP27B1*), amely számos más génnel együtt részét képezheti az „obez epigenetikus mintának”. Így a D-vitamin az epigenetikus szabályozáson, ezen belül is a DNS metilációs útvonalon keresztül kapcsolódhat be az obezításban és metabolikus szindrómában jellemző mintázatba. A D-vitamin receptor

(*VDR*) gén DNS metiláltsági szintje és az elhízás mértéke között szignifikáns összefüggést igazolni nem tudtunk.

4. A metabolizmust, növekedést és testösszetételt közvetlenül befolyásoló *IGF2* gén metiláltsági szintje és a gyermekkori elhízás mértéke között szignifikáns negatív összefüggést igazoltunk, így az *IGF2* metiláltsági foka jelentős szereppel bírhat a gyermekkori elhízásban. Tehát az „elhízásra hajlamos alkat” több komponensből tevődik össze, átörökítésében epigenetikai mechanizmusok is fontos szerepet játszanak. Az anorexigén neuropeptidet kódoló *POMC* gén metiláltsága és a gyermekkori elhízás mértéke között szignifikáns összefüggést igazolni nem tudtunk.

5. A Prader- Willi szindrómás és a Prader - Willi like fenotípusú gyermekek esetében a Holm kritérium rendszer klinikai hasznosságát igazolni tudtuk azáltal, hogy a genetikaiilag igazolt Prader- Willi szindrómás betegek összesített pontszáma lényegesen magasabbnak bizonyult, a Prader – Willi like fenotípussal rendelkező, ám PWS-re jellemző genetikai eltérést nem mutató betegeknél. A *SNRPN* génlókusz promoter régiójának DNS metilációs mintázata magas olvadáspont elemzés során egyértelműen elkülönült a Prader-Willi szindrómás és a nem Prader – Willi szindrómás esetekben.

6. Az általunk kidolgozott, magas olvadáspont elemzésen (HRM) alapuló molekuláris biológiai eljárás a Prader- Willi szindróma első vonalbeli szűrésére alkalmas. Validálás során a nagy pontosságú, nemzetközileg elterjedt multiplex ligáció függő próba amplifikáció (MS-MLPA) metodika eredményeit vetettük össze saját eredményeinkkel, ennek során a diagnózis minden esetben megegyezett.

Vizsgálatunk alapján az *IFG2* gén hipometilációja és a *CYP27B1* gén hipermetilációja jelentős szereppel bírhat a gyermekkori elhízás mértékének alakulásában. Feltevésünk szerint a *CYP27B1* gén hipermetiláltságából fakadó alacsonyabb aktív 1,25(OH)<sub>2</sub> D-vitamin

szint és megemelkedett IGF2 szint együttesen, olyan módon módosítják a zsírszövet működését és metabolizmusát, hogy az a BMI SDS növekedéséhez vezet.

Prader-Willi szindróma gyanúja esetén eredményeink alapján, az általunk használt DNS-metiláció alapuló módszer, amelyben együttesen alkalmaztunk egyedi tervezésű primereket és módosított biszulfid szekvenáló polimeráz-lánreakciót, egyszerű, gyors, megbízható és hatékony vizsgálatnak bizonyult a Prader-Willi-szindróma elsődleges igazolására. Vizsgálatunk alapján a HRM megfelelő elsődleges genetikai vizsgálat lehet, amennyiben az MS-MLPA technikai vagy anyagi okok miatt nem elérhető. A Holm score szerinti besorolás pedig valóban segítség lehet a klinikai diagnózis felállításában és abban, hogy a továbbiakban mely betegeknél szükséges a genetikai vizsgálat elvégzése.

## **VI. Saját publikációk jegyzéke**

### **A saját témában megjelent közlemények**

Ács O, Péterfia B, Hollósi P, Luczay A, Török D, Szabó A. (2017) Methylation Status of CYP27B1 and IGF2 Correlate to BMI SDS in Children with Obesity. *Obes Facts*, 10:353-362.

Ács OD, Péterfia B, Hollósi P, Haltrich I, Sallai Á, Luczay A, Buiting K, Horsthemke B, Török D, Szabó A, Fekete Gy. (2018) Rapid first-tier genetic diagnosis in patients with Prader–Willi syndrome. *Orv Hetil*, 159: 64–69.

### **Egyéb témában megjelent közlemények:**

Grolmusz VK, Ács OD, Feldman-Kovács K, Szappanos Á, Stenczer B, Fekete T, Szendei G, Reismann P, Rácz K, Patócs A. (2014) Genetic variants of the HSD11B1 gene promoter may be protective against polycystic ovary syndrome. *Mol Biol Rep*, 41:5961-9.

Pap D., Sziksz E., Rokony R., Ács O, Szabó A. (2014) D-vitamin szerepe a vesefibrózis patomechanizmusában. *Gyermekgyógyászat*, 65: 137-139.

Ács TB, Szappanos Á, Likó I, Majnik J, Ács O, Boyle B, Tóth M, Rácz K, Patócs A. (2011) Glükokortikoidok iránti rezisztencia: új molekuláris mechanizmusok, új klinikai ismeretek. *Magy Bel Arch*, 64: 257-265.