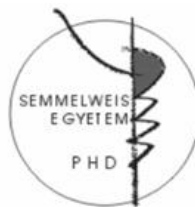


# **A kardiovaszkuláris rizikó és a *C4B* gén hiányos haplotípusok közötti kapcsolat mechanizmusának vizsgálata**

Doktori tézisek

**Bánlaki Zsófia**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Füst György egyetemi tanár, az MTA doktora

Hivatalos bírálók:

Dr. Papp Krisztián adjunktus, PhD

Dr. Pósz Zoltán tudományos munkatárs, PhD

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Ligeti Erzsébet egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Vásárhelyi Barna egyetemi docens, az MTA doktora

Dr. Prechl József tudományos főmunkatárs, PhD

Budapest  
2012

## Bevezetés

A kardiovaszkuláris betegségek korunk egyik legfőbb népbetegségének számítanak; a háttérükben meghúzódó okok feltárása intenzív kutatás tárgya. Évtizedekkel ezelőtt munkacsoportunk megfigyelte, hogy a *C4B* (a 4-es komplement komponens B izotípusát kódoló) gén hiányos, úgynevezett *C4B\*Q0* hordozó kromoszómákkal rendelkező egészséges egyének aránya lényegesen alacsonyabb az idősek (>60 évesek) körében a fiatalokhoz (18-45 évesek) képest magyar és izlandi populációban egyaránt. A későbbiek során fény derült arra, hogy a *C4B* gén hiányos haplotípusokat hordozó személyek fokozottan hajlamosak miokardiális infarktusra, stroke-ra és koronária artéria betegségekre is, illetve az infarktust követően rosszabbak a rövid távú (a kórházi bent fekvés idejére vonatkozó) életben maradási esélyeik. Mindezek az összefüggések különösen a dohányzók esetében bizonyultak erősnek.

A jelenség molekuláris szintű magyarázata azonban nem magától értetődő. Bár a *C4B\*Q0* hordozókban az átlagosnál alacsonyabb össz-*C4B* géndózis következtében a *C4B* fehérje koncentrációja is relatíve alacsony, ez nem okoz aktivitásbeli csökkenést a komplementrendszer működésében. Elméletileg elképzelhető még, hogy a viszonylag alacsony *C4*

szérumszint miatt zavart szenved az immunkomplexek eliminációja, gyulladásoz folyamatokat és ezáltal érfalkárosodást indukálva; erre áttételesen több jel is utal. Ugyanakkor a *C4A* gén hiányos haplotípusok hordozása és a kardiovaszkuláris morbiditás között nem sikerült összefüggést kimutatni, holott az immunkomplexek eltávolításában feltételezhetően a *C4A* izotípusú fehérjék játszanak nagyobb szerepet a *C4B* izotípushoz képest. Ezenkívül – a *C2* deficienciától eltekintve – még a homozigóta komplement hiányos egyének kapcsán sem számol be semminemű tanulmány fokozott kardiovaszkuláris mortalitásról illetve morbiditásról.

Mindezek alapján munkacsoportunk feltételezte, hogy a *C4B*\**Q0* hordozók megnövekedett kardiovaszkuláris rizikójának hátterében nem közvetlenül a viszonylag alacsony *C4B* géndózis áll, hanem valamely, a *C4B* gén hiányával kapcsolt genetikai variáció(k). Tekintve, hogy a *C4* gének a nagyfokú linkage disequilibriumról nevezetes MHC régióban helyezkednek el, fennáll a lehetőség, hogy a *C4B* gén hiánya kifejezetten egy adott, hosszan konzervált (ősi), gyakori MHC haplotípusra jellemző. Amennyiben létezik ilyen haplotípus, a benne megtalálható, egymással kapcsolt távoli polimorfizmusok együttesen hozzájárulhatnak a szív- és érrendszeri betegségek iránti fokozott fogékonysághoz.

Egy másik alternatíva szerint a fent vázolt jelenség oka a *C4* géneket is magába foglaló RCCX moduláris struktúrában keresendő. Az RCCX négy, fehérjetermékkel rendelkező génből áll, amelyek mindig együtt duplikálódnak vagy deletálódnak, mono-, bi-, tri- és ritkán quadrimoduláris szerkezeteket létrehozva. Normális esetben a monomoduláris szerkezet kizárólag funkcionális géneket tartalmaz, míg az esetleges extra modulokban egyedül a *C4* gének kódolnak fehérjét. Az RCCX szerkezeten belül helyezkednek el a *CYP21* gének is, melyek közül az aktív változat (*CYP21A2*) a mellékvesekéreg kortizol- és aldosteron-termeléséhez elengedhetetlen 21-hidroxiláz enzimet kódolja. A leggyakrabban előforduló, bimoduláris RCCX szerkezetekben a *CYP21A2* gén *C4B* gén után található, annak közvetlen szomszédságában. A *C4B* génen belül három kriptikus *CYP21* regulációs elemet is azonosítottak, melyek szekvenciáját *C4A* géneken mindezidáig nem vizsgálták. Ezenkívül a *C4* és *CYP21* gének szorosan kapcsolt volta miatt elképzelhető, hogy a *C4B* gén hiánya – legalábbis rendszerint – a *CYP21A2* gén valamely funkcionális polimorfizmusával társul. A 21-hidroxiláz enzim optimális mértékű expressziója és aktivitása a kortikoszteroid hormonok mobilizációján keresztül az adaptív stresszválasz lényeges eleme, márpedig ez utóbbi folyamat zavara ismert rizikótényező a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában.

## Célkitűzés

Munkám során arra kerestem a választ, hogy a C4B\*Q0 haplotípusok hordozása és a kardiovaszkuláris rizikó közötti összefüggés hátterében állhat-e genetikai kapcsoltság. A konkrét célkitűzések az alábbiak voltak:

- A kaukázusi populációban előforduló MHC haplotípusok összetételének és gyakoriságának felmérése, illetve válaszkeresés arra, hogy a *C4B* gén hiánya jellemzően egyazon vagy több ősi, kiterjesztett MHC haplotípusra jellemző-e.
- A kaukázusi populációban előforduló RCCX szerkezetek részletes jellemzése és annak vizsgálata, hogy a *C4B* gén hiánya köthető-e egy adott RCCX szerkezeti variánshoz.
- A *C4A* és *C4B* gének 35. intronjában található, *CYP2I* szabályozó régiók összehasonlítása, tekintettel arra, hogy az aktív *CYP21A2* gén rendszerint *C4B* gén után áll.
- Nyugalmi és indukált kortikoszteroid hormonszintek összehasonlítása C4B\*Q0 hordozók és nem-hordozók között, abból kiindulva, hogy a *C4* mellett található *CYP21A2* gén polimorfizmusai közvetlen kihatással lehetnek a kortizol és az aldoszteron termelésére, így a stresszválaszra is.

## Módszerek

### *Vizsgált személyek*

A kaukázusi populáció MHC haplotípusainak és RCCX szerkezeti variánsainak vizsgálatát családfa-analízis révén végeztük, csontvelő-transzplantációra váró leukémiás gyermekek, valamint egészséges szüleik és testvéreik (n=203) bevonásával. Az eredményeket egy egészséges, bostoni kaukázusi populáció adataival (2675 független haplotípussal) vetettük össze.

A *C4A* és *C4B* gének 35. intronikus bázissorrendjének összehasonlításához a munkacsoportunk által korábban gyűjtött egészséges- és betegpopulációk (n=1505) tagjaiból válogatott homozigóta *C4B\*Q0* (n=12) illetve homozigóta *C4A\*Q0* hordozók (n=10) mintáit elemeztük.

A *C4B\*Q0* hordozás és a szteroid hormonszintek kapcsolatát jóindulatú, hormonálisan inaktív mellékvese incidentalómával diagnosztizált betegcsoporton (n=76) tanulmányoztuk.

## ***Genetikai polimorfizmusok meghatározása***

A genomiális DNS-t a Miller és munkatársai által leírt kisózásos módszerrel vontuk ki perifériás vérből származó fehérvérsejtekből. A mellékvese incidentalómás betegcsoport, továbbá jórészt a családvizsgálatos minták esetében is eleve tisztított DNS preparátumokat kaptunk kollaborációs partnereinktől.

A *HLA-A*, *-B*, *-DRB1* és *-DQB1* allélok vizsgálatát kollaborációs partnereink végezték szekvencia-specifikus amplifikáció (PCR-SSP) illetve reverz dot-blot technika alkalmazásával.

Az egyponyos nukleotid polimorfizmusok (SNP-k) közül a *LTA 252A>G* (rs909253), a *HSPA1B 1267A>G* (rs1061581), a *CFB S>F* (rs641153) és az *AGER -374T>A* (rs1800624) variációkat polimeráz láncreakció – restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (PCR-RFLP) technikával, az *AGER -429T>C* (rs1800625) és a *TNF -308G>A* (rs1800629) variációkat TaqMan próbán alapuló alléldiszkriminációval vizsgáltuk.

A különböző *C4* génvariánsok (*C4A*, *C4B*, *C4L*, *C4S*), valamint a *CYP21* aktív- és pszeudogének kópiaszámát kvantitatív real-time PCR módszerrel határoztuk meg.

Az egyes haplotípusokon belül a hosszú és rövid *C4A* és *C4B* gének sorrendjét allélspecifikus long PCR reakciókkal állapítottuk meg.

A *C4* gének 35. intronjának szekvenálását a Szegei Biológiai Központban végezték. A kromatogramokat CLC DNA Workbench 5.6.1 szoftverrel értékeltük ki.

### ***Szteroid és ACTH hormonszintek analízise***

A nyugalmi és indukált hormonkoncentrációk meghatározását kollaborációs partnereink végezték elektrokemilumineszcens- illetve radioimmuneszé módszerekkel, reggel 8:00 és 9:00 óra között történő vérvételt követően.

Az ACTH stimuláció 1 mg szintetikus analóg (Cortrosyn) intramuszkuláris beadásával történt, a kortizol termelés gátlása 1 mg dexametazon orális bevételével.

### ***Statisztikai elemzések***

A statisztikai analíziseket GraphPad Prism 4.0, SPSS 13.0 és Arlequin 3.1 szoftverekkel végeztük.

A haplotípus-mintázatok összevetéséhez a korrelációs együtthatót Pearson-teszttel határoztuk meg. A kategorikus értékek összehasonlításához  $\chi^2$  tesztet végeztünk. A Hardy-



Weinberg egyensúlyt a Fisher-féle exakt teszt alapján határoztuk meg.

A szteroid hormonszintek tanulmányozása során a csoportok közötti eltéréseket Mann-Whitney tesztel elemeztük, a páronkénti összehasonlításokat Wilcoxon próbával végeztük. Az alacsony és magas kortikoszteroid reaktivitás értékek közötti optimális vágópontok keresése ROC analízissel történt. A *C4B* géndózis és a hormonszintek közötti összefüggéseket logisztikus regressziós analízissel számoltuk. Minden próba kétoldalas volt. A különbségeket  $p < 0,05$  értékek esetében tekintettük szignifikánsnak.

## Eredmények

### *Az egészséges kaukázusi populációban előforduló MHC haplotípusok*

Vizsgálataink során összesen 203, eleve ismert *HLA-A*, *-B*, *-DRB1* és *-DQB1* allélokkal rendelkező, kaukázusi populációba tartozó személy mintáján határoztuk meg az *LTA 252A>G*, *HSPA1B 1267A>G*, *CFB S>F*, *AGER -429T>C*, *AGER -374T>A* és *TNF -308G>A* polimorfizmusokat, valamint a *C4A* és a *C4B* gének kópia-számokat. A családon belüli öröklésment nyomon követésével felállítottunk 196 genetikailag független haplotípust, melyek közül – a gamétaképzés során rekombinálandó szülői kromoszómák kizárása után – a továbbiakban 188-at tudtunk értékelni.

A vizsgált populációban 17 különböző, nemzetközileg is elismert ősi MHC haplotípust azonosítottunk és további 13 olyat, amelyek legalább két független kópiában voltak jelen és minden általunk meghatározott polimorfizmusban egyeztek. A 188 kromoszómát tekintve 89 hordozott ismételt előforduló MHC haplotípust, míg 99 egyedi allélkombinációkat tartalmazott. Összességében a vizsgált MHC haplotípusok 47,3%-a volt ősi vagy ismétlődően előforduló. A kapott haplotípus-mintázatot összehasonlítottuk egy bostoni kaukázusi populáció

összesen 2675 kromoszómájának adataival. A bostoni régióban legalább 1%-os előfordulási arányt mutató 12 haplotípus közül 11-et a hazai populációban is megtaláltunk, ezek eloszlási mintázata erősen korrelált a két populáció között ( $R=0,789$ ,  $p=0,0023$ ), alátámasztva a mintavételezés reprezentatív voltát. A hazai populációban összesen 30 *C4B* gén hiányos kromoszómát azonosítottunk, melyek 26 különböző MHC haplotípust hordoztak. A *C4B* gén hiányos haplotípusok többsége tehát csupán egyetlen kópiában fordult elő.

### ***Az RCCX moduláris szerkezet variációi***

Következő lépésként a fent ismertetett családok tagjaiban meghatároztuk a hosszú és rövid *C4* génvariánsok, valamint a *CYP21A2* aktív- és a *CYP21A1P* pszeudogének kópiaszámát; illetve a hosszú és rövid *C4A* és *C4B* gének haplotípusonkénti sorrendjét is. Két mintát nem megfelelő DNS minőség miatt ki kellett zárunk a vizsgálatokból; a maradék 184 kromoszóma 15 különböző RCCX szerkezeti variánst és összesen 355 *C4* gént tartalmazott. A *C4* gének elemzésével megerősítettük azon korábbi feltevéseket, miszerint a *C4A* gének rendszerint hosszúak, a *C4B* gének pedig közel fele-fele arányban hosszúak illetve rövidek. Kimutattuk, hogy multimoduláris RCCX szerkezetek esetében a telomerikus (legelső)

modulban többnyire *C4A* gén található, de kivételesen *C4B* gén is állhat ott. Tudomásunk szerint elsőként írtunk le olyan szerkezetet, amelyben rövid *C4* gént hosszú követ. Kiemelten gyakran előforduló *C4B* gén hiányos RCCX variánst azonban nem találtunk, mivel a három ilyenfajta struktúra közül kettő közel azonos előfordulási arányban volt jelen.

### ***A C4 gének 35. intronjában elhelyezkedő CYP21 regulációs szekvenciák***

A *C4A* és a *C4B* gének 35. intronjában található három kriptikus transzkripciós faktor kötőhely bázissorrendjének összehasonlításához 12 homozigóta *C4B\*Q0* hordozó illetve 10 homozigóta *C4A\*Q0* hordozó személy összesen 32 *C4A* és 23 *C4B* génjét vizsgáltuk. Szekvenciabeli különbséget nem találtunk sem az azonos, sem az eltérő izotípust kódoló *C4* génekben található egyik *CYP21* regulációs elem esetében sem. Hasonlóképpen az MHC Haplotípus Projekt keretei között vizsgált hat, az MHC régióra nézve homozigóta sejtvonal *C4* génjeinek 35. intronikus bázissorrendje is teljes mértékben egyezett az általunk megfigyelttel.

## *A C4B géndózis és a szteroid hormonok kapcsolata*

Végezetül egy retrospektív vizsgálat során 76 hormonálisan inaktív, jóindulatú mellékvese incidentalómával diagnosztizált egyénben határoztuk meg a *C4B* génkópia-számokat és vetettük össze azokat a hormonális adatokkal. Utóbbiakat tekintve a nyugalmi és az ACTH stimulált kortizol, aldoszteron, kortikoszteron és 17-hidroxiprogoszteron, a nyugalmi ACTH, valamint a dexametazon gátlást követő kortizol szérumkoncentrációkra vonatkozóan állt rendelkezésünkre információ. A betegeket a *C4B* géndózis alapján két csoportba osztottuk; 15-en biztosan *C4B\*Q0* hordozók voltak az alacsony össz-*C4B* kópiaszámuk alapján (0 vagy 1 kópia), a többi 61 személy legalább két *C4B* génnel rendelkezett.

A nyugalmi kortikoszteroid szintek megegyeztek a két csoportban, ám az alap ACTH koncentráció alacsonyabb volt a *C4B\*Q0* hordozókban a nem-hordozókhöz képest. *C4B\*Q0* hordozókban szignifikánsan magasabb volt az ACTH stimulációt követő kortizolszint a nem-hordozókhöz viszonyítva; a stimulált és az alap kortizolszintek hányadosát tekintve ez az eltérés még kifejezettebbé vált. Amennyiben azt vizsgáltuk, hogy az ACTH stimuláció hatására magas illetve alacsony kortikoszteroid reaktivitást mutató személyek aránya hogyan alakul *C4B\*Q0* hordozók és nem-hordozók esetében (reak-

tivítás: stimulált/ alap hormonszintek hányadosa), azt tapasztaltuk, hogy a C4B\*Q0 hordozók csoportjában szignifikánsan magasabb volt azoknak az aránya, akikben a kortizol, az aldoszteron, illetve a kortikoszteron reaktivitása magasabbnak adódott. A kortizol és az aldoszteron esetében ez a különbség megmaradt a vizsgált változók közötti összefüggést befolyásolni képes „zavaró tényezők”-re (confounding variables) történő adjusztálás után is. Dexametazon hatására a C4B\*Q0 hordozókban a kortizol szekréció gyengébb mértékű gátolhatóságát tapasztaltuk. (Ezek az összefüggések a teljes *C4B* gén hiányos egyének esetében még kifejezettebbek voltak, de a kis esetszám miatt statisztikailag nem lehet külön értékelni ezt a csoportot.)

## Következtetések

Munkánk eredményeit összegezve a legfontosabb új megállapítások a következők:

- Megállapítottuk, hogy a *C4B* gén hiánya számos MHC haplotípusban és több RCCX szerkezeti variánsban megfigyelhető. Ezzel kizártuk annak lehetőségét, hogy a munkacsoportunk *C4B\*Q0* hordozás és kardiovaszkuláris betegségek kapcsolatára vonatkozó megfigyelései mögött távoli polimorfizmusok együttes hatása húzódná meg.
- Kimutattuk, hogy a kaukázusi populációban fellelhető MHC haplotípusok közel 50%-a ismételten fordul elő, illetve hogy a haplotípus-mintázat távoli, független kaukázusi populációk esetében is erősen hasonló.
- A kaukázusiakban előforduló RCCX szerkezeti variánsok részletes jellemzése révén bebizonyítottuk azon korábbi feltevéseket, hogy míg a *C4A* gének rendszerint hosszúak, a *C4B* gének gyakorlatilag fele-fele arányban hosszúak és rövidék, továbbá kimutattuk, hogy multimoduláris szerke-

zetek esetében a telomerikus modulban többnyire hosszú *C4A* gén található.

- A *C4* gének 35. intronjában található *CYP21A2* regulációs elemek bázissorrendjének vizsgálatával kizártuk a lehetőséget, hogy a *C4B\*Q0* hordozók fokozott kardiovaszkuláris rizikójának hátterében a *C4A* illetve a *C4B* génekben található transzkripciós faktor kötőhelyek szekvenciája közötti eltérés állna.
- Megvizsgáltuk a *C4B* géndózis és a *C4* génnel közvetlenül szomszédos *CYP21A2* gén befolyása alatt álló néhány szteroid hormon, valamint az ACTH kapcsolatát nem-hormontermelő, jóindulatú mellékvese incidentalómás betegcsoportban. A *C4B\*Q0* hordozók és nem hordozók között szignifikáns különbségeket kaptunk egyes hormonok nyugalmi szintje, illetve indukálhatósága és gátolhatósága tekintetében. Az eredmények arra utalnak, hogy a *C4B* gén hiánya valamely *CYP21A2* gént érintő variációval kapcsolt, ami a 21-hidroxiláz enzim expressziójának könnyebb indukálhatóságát vagy aktivitásának módosulását, így a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese (HPA) tengely hatékonyabb aktiválhatóságát eredményezi. A *C4B\*Q0* hordozókban vélhetően az átlagoshoz képest



fokozott mértékű kortizol-termelés jelentkezik a stresszválasz során, ez viszont ismert rizikótényező a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásában. Dohányzók esetében az öröklött és a környezeti faktorok hatásai összeadódnak, hiszen a nikotin úgyszintén fokozza a HPA-tengely aktiválhatóságát. Ennek megfelelően a jelen megfigyelések magyarázatot adhatnak a C4B\*Q0 hordozók körében tapasztalt megnövekedett kardiovaszkuláris mortalitásra és morbiditásra.

## Saját publikációk jegyzéke

### *Értekezéshez kapcsolódó közlemények*

Szilagyi A, Banlaki Z, Pozsonyi E, Yunis EJ, Awdeh ZL, Hosso A, Rajczy K, Larsen CE, Fici DA, Alper CA, Fust G. *Frequent occurrence of conserved extended haplotypes (CEHs) in two Caucasian populations.* Mol Immunol. 2010 Jun;47(10):1899-904; IF: 2,916

Banlaki Z, Raizer G, Acs B, Majnik J, Doleschall M, Szilagyi A, Racz K, Fust G, Patocs A. *ACTH-induced cortisol release is related to the copy number of the C4B gene encoding the fourth component of complement in patients with adrenal incidentaloma.* Clin Endocrinol (Oxf). 2012 Apr;76(4):478-84; IF:3,23

Banlaki Z, Doleschall M, Rajczy K, Fust G, Szilagyi A. *Fine-tuned characterization of RCCX copy number variants and their relation to extended MHC haplotypes.* (Genes & Immunity, közlésre elfogadva)

### ***Egyéb közlemények***

Blasko B, Banlaki Z, Gyapay G, Pozsonyi E, Sasvari-Szekely M, Rajczy K, Fust G, Szilagyi A. *Linkage analysis of the C4A/C4B copy number variation and polymorphisms of the adjacent steroid 21-hydroxylase gene in a healthy population.* Mol Immunol. 2009 Aug;46(13):2623-9; IF: 3,202

Pozsonyi E, Gyorgy B, Berki T, Banlaki Z, Buzas E, Rajczy K, Hosso A, Prohaszka Z, Szilagyi A, Cervenak L, Fust G. *HLA-association of serum levels of natural antibodies.* Mol Immunol. 2009 Apr;46(7):1416-23; IF: 3,202