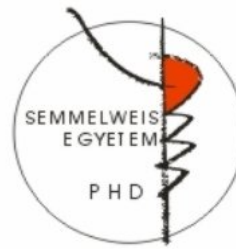


Genetikai polimorfizmus és haplotípus vizsgálatok különböző humán modellrendszerekben

Doktori tézisek

Kiszel Petra

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:	Prof. Dr. Füst György
Hivatalos bírálók:	Dr. Prechl József Dr. Vásárhelyi Barna
Szigorlati bizottság elnöke:	Prof. Dr. Kalabay László
Szigorlati bizottság tagjai:	Prof. Dr. Sármay Gabriella Dr. Treszl András

Budapest
2007

Bevezetés

Multifaktoriális betegségek genetikai hátterének felderítésében nagy segítséget nyújthat a humán genom haplotípusainak feltérképezése. Haplotípus blokkok meghatározásakor leggyakrabban az egy pontos nukleotid polimorfizmusok (SNP) különböző alléljainak együttes előfordulását vizsgálják. Az SNP-k a humán genom leggyakrabban előforduló polimorfizmusaihoz tartoznak. Egy haplotípus blokkban több SNP is jelen van, amelyek közül az adott haplotípusokat legjobban elkülönítő, leginformatívabb SNP-ket célszerű betegség asszociációs tanulmányokban továbbvizsgálni. A betegségekkel asszociálódó SNP-k kiválasztása után, az SNP-k valódi funkcionalitását *in vitro* modellrendszerekben bizonyítják be.

Munkám során e genetikai módszerek gyakorlati alkalmazásait és nehézségeit három különböző humán modellrendszerben mutatom be.

A humán genom egy speciális területén, a 6-os kromoszóma MHC génkomplex régiójában, a lókuszok között rendkívül szoros kapcsoltság áll fenn, amelyből kifolyólag a betegséggel asszociált kandidáns gének kiválasztása még nehezebb feladat. E régió belül a haplotípus blokkok azonosítása helyett a rekombinációs hot-spot területek behatárolása tűnt hatékony módszernek. Az MHC régió pontosabb LD szerkezetének megismerésében és az MHC régióval asszociált betegségek kandidáns génjeinek azonosításában segítséget nyújthat a 8.1 ősi haplotípus és rekombinációkkal létrejött haplotípusvariánsainak eloszlás vizsgálata.

Következő tanulmányunkban egy multifaktoriális betegség, az érlemeszesedés autoimmun kórfolyamatainak genetikai hátterét vizsgáltuk. Számos kutatócsoport számolt be szív és artéria betegségekben a szolubilis Hsp60 hőszokkfehérje és anti-Hsp60 autoantitestek emelkedett szérumszintjéről. A Hsp60 elleni autoimmun reakciók kialakulásának különböző okai lehetnek. A Hsp60 molekula egy rendkívül konzervált fehérje. Mikrobiális fertőzések során, a patogén Hsp60 molekulák ellen kialakult specifikus ellenanyagok keresztreakálhatnak humán Hsp60 molekulákkal. Továbbá különböző stresszhatásokra a Hsp60 autoantigéné válhat, mivel fiziológiás, intracelluláris formájától eltérően a sejtek felszínén, valamint a vérplazmában is megjelenhet. Az autoantigén reaktív B-sejtek plazmasejteké alakulásában fontos szerepet játszhat az IL-6, amely egy B-sejt növekedési faktor. Számos érlemeszesedéses és autoimmun betegségben számoltak be az IL-6 emelkedett szérumszintjéről. A magas IL-6 szérumszinteket előidéző folyamatok háttere azonban még ma sem tisztázott. Első lépésként génexpressziós folyamatokat befolyásoló tényezőket vizsgáltak. A kutatók többsége az *IL-6* promóter régiójában az *IL-6* - 174 G/C egy pontos nukleotid polimorfizmust vizsgálták a leggyakrabban, mivel ez az SNP egy fontos transzkripciósfaktor kötőhely közelében helyezkedik el.

Célkitűzések

I. Modellrendszer

Vizsgálatunk fő célja, hogy a 8.1 ősi haplotípus és haplotípusvariánsainak gyakoriságát határozzuk meg és hasonlítsuk össze két különböző kaukázusi populációban és egy családvizsgálatban.

II. Modellrendszer

Egy független, egészséges magyar populációban vizsgáljuk meg az *IL-6* -174 polimorfizmus és az anti-Hsp60 autoantitest szintek közötti kapcsolatot. Az analízist az *IL-6* gén kódoló és promóter régiójában elhelyezkedő több új polimorfizmussal bővítjük ki, majd ezen haplotípusok kapcsolatát vizsgáljuk az autoantitest szintekkel.

III. Modellrendszer

Az általunk vizsgált *IL-6* -174 G/C SNP funkcionalitását egy direkt biológiai modellrendszerben is vizsgáljuk. Proinflammatorikus stimulációt követően humán köldökzsinór véna endotél sejtek (HUVEC) *IL-6* termelését az *IL-6* -174 G/C SNP genotípusának függvényében hasonlítsuk össze.

Anyagok és módszerek

Az I. modellrendszerben 127 egészséges budapesti lakos, 101 egészséges ohioi nő és 9 I-es típusú diabetes mellitus kórképpel jellemzett család vett részt. A 6-os kromoszóma MHC II és III régiójában *DQ*, *DR* allélek, *RAGE* -429 T/C, *C4A/B* (L/S), *HSP70-2* +1267 A/G, *TNFA* -308 G/A polimorfizmusok genotípusát PCR-RFLP és Southern blot módszerekkel határoztuk meg.

A II. modellrendszerben 313 egészséges budapesti lakos, 399 egészséges finn vradó vett részt. A humán anti-Hsp60 autoantitest szérum szinteket szilárd fázisú ELISA módszerrel mértük meg. Az *IL-6* -174 G/C polimorfizmus genotípusát PCR-RFLP, az *IL-6* gén kódoló és promóter régiójában a többi egy pontos nukleotid polimorfizmus genotípusát (*IL-6* -9316 T/C, -7164 C/A, -1363 G/T, -597 G/A, +1753 C/G, +2954 G/C) TaqMan allélspecifikus PCR segítségével határoztuk meg.

A III. modellrendszerben 33 HUVEC sejtvonalat gyűjtöttünk. A HUVEC sejtek *IL-6* -174 G/C polimorfizmusát PCR-RFLP segítségével határoztuk meg. IL-1 β és LPS kezelések hatására a HUVEC sejtvonalak megfelelő aktiváltságát ICAM-1 sejtes ELISA-val ellenőriztük, majd a felülcszók IL-6 koncentrációját szendvics ELISA-val mértük.

Eredmények

Meghatároztuk a 8.1 ősi haplotípus és haplotípusvariánsok gyakoriságát nyolc egészséges és nyolc diabetes mellitusban szenvedő gyermek szüleinél, összesen kilenc családban.

A 8.1 ősi haplotípust alkotó markerek előfordulási gyakorisága között lényeges különbségeket találtunk mind magyar, mind ohioi kaukázusi populációban.

A magyar és az ohioi populációban a valódi 8.1 ősi haplotípus gyakoriságok megegyeztek.

A 8.1 ősi haplotípus markerek közül a *HSP70-2* +1267 G allél fordult elő legnagyobb gyakorisággal variáns egy markeres 8.1 ősi haplotípusban.

A *HSP70-2* +1267 G allél és a 8.1 ősi haplotípus markerek között külön-külön alacsony, míg a *HSP70-2* +1267 G allél és a 8.1 ősi haplotípus fragmentumok között szoros kapcsolat állt fenn.

Korábban, finn populációban kapott eredményeinket sikerült megismételni egy új független, magyar egészséges populációban, miszerint az *IL-6* -174 G allélt hordozók magas anti-Hsp60 ellenanyag szintekkel rendelkeztek.

Az *IL-6* gén és promóter régióban hat új egy pontos nukleotid polimorfizmust genotipizáltunk a magyar populáció egy kisebb csoportjában, amelyet randomszerűen választottunk ki. Összesen 7 SNP segítségével két 2000 bp hosszú haplotípusblokkot találtunk -9316 és -7164 pozíciók között, valamint -597, -174 és +1753 pozíciók között.

A teljes magyar populációban már csak 5 SNP-t (-9316T/C, -1363G/T, -174G/C, +1753C/G, +2954G/C) genotipizáltunk tovább, mivel a haplotípusblokkok ismerete feleslegessé tette az összes SNP genotípusának meghatározását. Az *IL-6* -174 G/C polimorfizmuson kívül egyik SNP sem mutatott összefüggést az anti-Hsp60 autoantitest szintekkel.

A leggyakrabban előforduló (-9316C/-1363G/-**174C**/+1753C/+2954G) haplotípust, diploidként hordozók alacsonyabb anti-Hsp60 autoantitest szintekkel rendelkeztek, mint a populáció összes többi tagja.

Az *IL-6* -174 G/C genotípustól függetlenül, a HUVEC sejtek IL-1 β stimuláció hatására szignifikánsan magasabb IL-6 expresszióval válaszoltak, mint LPS stimuláció hatására.

Az *IL-6* -174 G/C pozícióban különböző genotípusú HUVEC sejtek IL-6 termelésében nem volt szignifikáns különbség sem IL-1 β , sem LPS stimulust követően.

Következtetések

Az általunk vizsgált 8.1 AH markerek közül a *HSP70-2* +1267 G allél fordult elő legnagyobb arányban egymarkeres 8.1 ősi haplotípusvariánsként. Ebből arra következtethetünk, hogy a *HSP70-2* gén körül helyezkedhetnek el a legfrekvenciáltabb rekombinációs hot-spot szakaszok.

Következő vizsgálatunkban az *IL-6* -174 G allélt hordozók szignifikánsan magasabb autoantitest szintekkel rendelkeztek, mint a CC genotípust hordozók. Az *IL-6* gén promóter és kódoló régiójában további hat SNP genotipizálásával két 2000 bp hosszú haplotípus blokkot sikerült azonosítanunk. A leggyakrabban előforduló haplotípus, amely *IL-6* -174 pozícióban C allélt hordozott, alacsony anti-Hsp60 autoantitest szintekkel rendelkezett. A fenti eredmények háttérben állhat az is, hogy a magas autoantitest szintekért magas *IL-6* szintek felelősek, valamint az is, hogy az *IL-6* gén polimorfizmusai a 7-es kromoszómán más génekkel kapcsoltságban lehetnek, amelyek indirekt módon befolyásolják az autoantitest termelést.

Az *IL-6* -174 G/C polimorfizmus funkcionalitását *in vitro* modellrendszerben is vizsgáltuk, ahol HUVEC sejtek *IL-6* termelését hasonlítottuk össze. Nem kaptunk szignifikáns különbséget a különböző *IL-6* -174 G/C genotípusú HUVEC sejtek *IL-6* fehérje expressziója között. Ez az eredmény azonban nem zárja ki azt a lehetőséget, hogy más sejtípusokban az *IL-6* -174 SNP genotípusa szignifikáns különbséget okoz az *IL-6* fehérje expressziójában.

Közlemények

Értekezésben összefoglalt saját közlemények

- I. Kiszel P, Fust G, Pessi T, Hurme M, Prohaszka Z. Associations between Interleukin-6 genetic polymorphisms and levels of autoantibodies to 60-kDa heat-shock proteins. *Human Heredity* 2006; 62:77-83; **IF: 2.051**
- II. Kiszel P, Mako V, Prohaszka Z, Cervenak L. Interleukin-6 - 174 promoter polymorphism does not influence IL-6 production after LPS and IL-1beta stimulation in human umbilical cord vein endothelial cells. *Cytokine* 2007 Oct; 40 (1): 17-22; **IF: 2.355**
- III. Kiszel P, Kovacs M, Szalai C, Yang Y, Pozsonyi E, Blasko B, Laki J, Prohaszka Z, Fazakas A, Panczel P, Hosszúfalusi N, Rajczy K, Wu YL, Chung EK, Zhou B, Blanchong CA, Vatay A, Yu CY, Fust G. Frequency of carriers of 8.1 ancestral haplotype and its fragments in two Caucasian populations. *Immunol Invest.* 2007; 36 (3): 307-19; **IF: 1.276**

Értekezés témájában megjelent egyéb közlemények

- IV. Harcos P, Laki J, Kiszel P, Szeplaki Z, Szolnoki Z, Kovacs M, Melegh B, Szeplaki G, Fust G, Blasko B. Decreased frequency of the TNF2 allele of TNF-alpha -308 promoter polymorphism is associated with lacunar infarction. *Cytokine* 2006 Jan; 33(2):100-5; **IF: 2.355**
- V. Laki J, Kiszel P, Vatay A, Blasko B, Kovacs M, Korner A, Madacsy L, Blatniczky L, Almassy Z, Szalai C, Rajczy K, Pozsonyi E, Karadi I, Fazakas A, Hosszúfalusi N, Panczel P, Arason GJ, Wu YL, Zhou B, Yang Y, Yu CY, Fust G. The HLA 8.1 ancestral haplotype is strongly linked to the C allele of -429T>C promoter polymorphism of receptor of the advanced glycation endproduct (RAGE) gene. Haplotype-independent association of the -429C allele with high hemoglobin(A1C) levels in diabetic patients. *Mol. Immunol.* 2007 Jan; 44 (4): 648-55; **IF: 4.768**

Más témában megjelent közlemények

- VI. *Fust A, Veres A, Kiszel P, Nagy ZZ, Cervenak L, Csakany B, Maka E, Suveges I, Grus FH.* Changes in tear protein pattern after photorefractive keratectomy. ***Eur J Ophthalmol.*** 2003 Jul; 13(6): 525-31; **IF: 0.519**