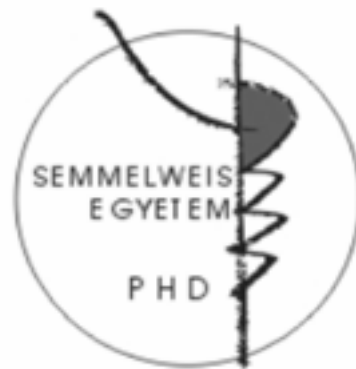


ABC transzporterek genetikai polimorfizmusainak vizsgálata aszimmetrikus PCR-t követő olvadáspont analízis alkalmazásával

Doktori tézisek

Szilvási Anikó

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Sarkadi Balázs, kutatóorvos, MTA rendes tagja;
Dr. Tordai Attila, laboratóriumvezető, MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Krikovszky Dóra, Ph.D.
Dr. Karcagi Veronika, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Fekete György, egyetemi tanár,
MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Vásárhelyi Barna, laboratóriumvezető,
MTA doktora;
Dr. László Glória egyetemi adjunktus,
tudományok kandidátusa

Budapest
2011

Bevezetés

Az ischaemiás szívbetegség (ISZB) a vezető halálok világszerte, a gyakorisági lista 3. helyén pedig a stroke áll. Az említett két multifaktoriális betegség klasszikus rizikófaktorai közé tartoznak a magas vérnyomás, az emelkedett szérum koleszterin és LDL (low density lipoprotein) szint, a fokozott alkoholbevitel, és a dohányzás. Ezzel szemben az emelkedett HDL (high density lipoprotein) szint protektív hatású. A klasszikus rizikófaktorok az esetek kialakulásának kb. 60-75%-ért felelősek, a fennmaradó esetek kialakulásában egyéb (pl. örökletes) tényezők is szerepet kapnak. A genetikai predispozíció bizonyítéka a betegségek gyakran észlelhető családi halmozottsága, és az ikervizsgálatok eredményei. Emellett a genetikai tényezők fontossága szempontjából az sem elhanyagolható, hogy a klasszikus kockázati tényezők kialakulásának hátterében is sok esetben örökletes tényezők állhatnak.

A multifaktoriális betegségek genetikai hátterének felderítése segítséget nyújthat a betegség patomechanizmusának és a kóros folyamatban részt vevő fehérjék funkciójának megértésében, hosszú távon hozzájárulhat az egyénre szabott orvoslás lehetőségének megteremtéséhez, illetve új gyógyszeres kezelési célpontok azonosításához.

Az ABC (ATP Binding Cassette) transzporterek egy igen népes géncsaládot alkotnak, melynek tagjai a szubsztrátok széles skáláját képesek transzportálni a sejtmembránon és az intracelluláris membránokon keresztül. Eddig 13 olyan humán betegséget ismerünk, amelyek hátterében 14 ABC transzporter defektusa áll. Az ABC transzporterek közül több fehérje játszik szerepet a szervezet lipid metabolizmusában, ezek közül három (az ABCA1 és az ABCG5/ABCG8 heterodimer) mutációi két igen ritka, autoszomális recesszív öröklésmenetet mutató kórkép, a Tangier betegség és a sitosterolémia kialakulásához vezetnek. A Tangier betegség

jellemzője a szérumban HDL csökkent szintje, vagy akár teljes hiánya. A betegség kialakulásáért az ABCA1 transzporter mutációi felelősek. Az ABCA1 fehérjét többféle sejttípus (makrofág, endotél sejt, hepatocita és hízósejt) expresszálja. A funkcionális transzportert két ABCA1 fehérje homodimere alkotja. A transzporter a koleszterin apolipoprotein A1-re történő effluxban működik közre, ezáltal alapvető szerepet tölt be a HDL partikulumok kialakulásában. A szisztémában nagy mennyiségben jelen lévő növényi szterol (főként β -sitosterol) és xantómák korai megjelenése jellemző. A betegség kialakulásáért az ABCG5 és az ABCG8 gének mutációi felelősek. A két fél-transzporter egymással heterodimert képezve alkot egy funkcionális egységet, amely az enterociták és májsejtek apikális membránjában lokalizálódik, ahol a növényi szterolok és a koleszterin transzportját végzi a vékonybél és az epecsatornák ürege felé. Mindkét említett betegség szövődményeként előfordulhat korai atherosclerosis, vagy későbbi szövődményként akár ISZB is.

Az ABCA1, ABCG5 és ABCG8 gének defektusai tehát a lipid-anyagcsere zavarához, és ezen keresztül a lipid-metabolizmussal összefüggésbe hozható betegségek kialakulásához vezetnek. Ugyanakkor kérdés, hogy a génekben nagy számban azonosított missense polimorfizmusok hatással vannak-e a szérumban lipid szintjére, esetleg van-e kapcsolatuk a lipid-anyagcsere zavarával társuló betegségek (pl. stroke, ISZB) kialakulásával. A polimorfizmusok közül az ABCA1 R219K, V771M és I883M variánsait, továbbá az ABCG8 D19H, Y54C, T400K és A632V variánsait számos asszociációs tanulmányban vizsgálták. Többek között vizsgálták a genotípusok összefüggéseit a szérumban lipid szinttel és az ISZB kialakulásával is, viszont a közölt eredmények a legtöbb kérdésfeltevés tekintetében ellentmondásosak.

Célkitűzés

Munkánk célja két, a lipid metabolizmusban fontos szerepet betöltő ABC transzporter polimorfizmusai és két multifaktoriális betegség, az ischaemiás stroke és az ISZB összefüggéseinek elemzése, továbbá a polimorfizmusok és a lipid szintek kapcsolatának vizsgálata volt.

A módszertani háttér fejlesztés részeként a munka egyik célja az allél diszkriminációs technika optimalizálása: korábbi vizsgálataink alapján egy, a megbízhatóság és értékelhetőség szempontjából ígéretesnek tűnő körülmény, az aszimmetrikus PCR vizsgálata, ezen belül az optimális primer arány meghatározása, továbbá a körülmény egyéb genotipizáló rendszerekre adaptálhatóságának vizsgálata volt.

Másrészt célunk volt, az ABCA1 transzporter három (R219K, V771M, I883M) és az ABCG8 transzporter négy (D19H, Y54C, T400K, A632V) aminosav cserével járó variánsának vizsgálata cerebro- és cardiovasculáris betegségben szenvedők csoportjaiban. Ezen belül, az esetleges polimorfizmus-betegség kapcsolat(ok) azonosítására az alábbi célokat tűztük ki: (1) a stroke, ISZB és az egészséges kontroll csoportokban az allél- és genotípus gyakoriságok meghatározása; (2) az AF és genotípus gyakoriság értékek összehasonlítása a beteg és a kontroll csoportok között; (3) az AF és genotípus gyakoriság értékek összehasonlítása a nem és/vagy a diagnózis felállításának időpontja szerint képzett alcsoportokban. Végül, az esetleges polimorfizmus-lipid korreláció(k) azonosítására, vagyis annak vizsgálatára, hogy a genotípusoknak befolyásolják-e a lipid szinteket, célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk, a variánsok mutatnak-e összefüggést az egyedi csoportokon (stroke, ISZB, kontroll) belül a szérum lipid (koleszterin, triglicerid [TG], LDL, HDL) szintekkel.

Módszerek

Vizsgált személyek

Az ABCA1 és ABCG8 polimorfizmusainak vizsgálatába egymással rokon kapcsolatot nem mutató, 241 stroke-kal diagnosztizált beteget (164 férfi és 77 nő; átlag életkor a diagnózis felállításakor: $53,4 \pm 14,5$ év), 148 ISZB beteget (107 férfi és 41 nő; átlag életkor a diagnózis felállításakor: $61,4 \pm 9,3$ év) és 191 egészséges véradót (92 férfi és 99 nő; átlag életkor: $35,3 \pm 11,8$ év) vontunk be.

Alkalmazott laboratóriumi módszerek

A DNS-t alvadásgátolt perifériás vérmintából izoláltuk, „kisózásos” módszert alkalmazva. A genotípus meghatározás LightCycler készüléken történt hibridizációs szondák olvadáspont analízisével. A lipid paraméterek (koleszterin, TG, HDL) meghatározása standard kolorimetriás módszerrel történt. Az LDL szintet a Friedewald képlet szerint számoltuk.

Statisztikai módszerek

Az aszimmetrikus PCR vizsgálatánál a görbe alatti területek összehasonlítására Student-féle t-tesztet alkalmaztunk. Az ABC transzporterek polimorfizmusainak vizsgálatánál az allélgyakoriságok (AF) összehasonlítására 2 x 2-es kontingencia táblát, Fisher-féle egzakt tesztet, két-oldalú p értéket és esélyhányadost, illetve annak 95%-os konfidencia intervallumát (OR [95% CI]) használtunk. Hardy-Weinberg egyensúly vizsgálatot és kapcsoltsági analízist végeztünk. A lipid szintek eloszlás-vizsgálatára a Kolmogorov-Smirnov tesztet használtuk. A különböző genotípust mutató csoportok lipid értékeinek összehasonlítására nem-parametrikus próbát: Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk. A választott szignifikancia szint minden esetben $p < 0,05$ volt.

Eredmények

Az aszimmetrikus PCR vizsgálata

Aszimmetrikus PCR alkalmazásával sikeresen elimináltuk az V. faktor (FV) Leiden mutáció genotipizálása során, az olvadási görbén észlelt aspecifikus csúcsot, amelyet a szimmetrikus PCR körülményeket követően a normál minták egy részénél tapasztaltunk. Az aszimmetrikus PCR alkalmazása emellett jelentős mértékű (kb. 8-szoros) fluoreszcencia jelintenzitás növekedést is eredményezett, a szimmetrikus primer körülményekhez képest. Az optimális primer arány meghatározására 4 különböző genotipizáló rendszerben (ABCG2 Q141K, FII g.20210G>A, FV Leiden, HFE H63D) vizsgáltuk, hogy különböző primer arányok milyen mértékű jelintenzitás emelkedést eredményeztek az olvadási görbén a szimmetrikus PCR körülményhez viszonyítva. Minden esetben a rendszer számára „kedvező”, vagyis a hibridizációs szondákkal komplementer DNS szál arányának növekedését eredményező primer arányokat alkalmaztunk. Az 1:3,3 és 1:6,7 primer arányok mellett a jelintenzitás fokozatos emelkedését tapasztaltuk, míg az ennél nagyobb mértékű primer arány alkalmazása (1:13 és 1:16) már nem minden rendszerben eredményezett jelintenzitás növekedést. A szimmetrikus körülményhez viszonyítva az 1:6,7 arányban alkalmazott amplifikációs primerek mellett a 4 vizsgált rendszer esetében átlagosan 11,2-szeresére emelkedett a jelintenzitás. A reciprok, azaz „kedvezőtlen” primer arány használata, amely a hibridizáció során a hibridizációs szondákkal kompetícióban lévő DNS szál arányának növekedéséhez vezetett, az olvadási görbe fluoreszcencia jelintenzitásának drasztikus eséséhez vezetett már 3,3:1 primer arány mellett, lehetetlenné téve a genotípusok megkülönböztetését.

ABCA1 és ABCG8 transzporterek polimorfizmusainak vizsgálata

Az ABC transzporterek polimorfizmusai és a cerebro- illetve cardiovascularis betegségek kapcsolatának vizsgálata során összesen 580 személy genotípus meghatározását végeztük el, és elsőként állapítottuk meg a polimorfizmusok hazai allélfrekvenciáit. Az egészséges populáció ABCA1 AF értékei: R219K: 31,2%; V771M: 5,0%; I883: 12,1%; ABCG8 AF értékei: D19H: 4,7%; Y54C: 40,8%; T400K: 18,8%; A632V: 21,2%. Az ABCA1 V771M esetében az ISZB csoport alacsonyabb AF értékkel rendelkezett, mint a kontroll csoport ($1,4 \pm 1,3\%$ vö. $5,0 \pm 2,2\%$; $p=0,010$), ami a ritka allél védő szerepére utal, és amit az esélyhányados értéke is tükröz (OR [95% CI]: 0,3 [0,1-0,8]). A többi variáns esetében hasonló összefüggést nem tudtunk kimutatni, se a teljes betegcsoportokon, se a nemeket külön analizálva. A diagnózis felállításának időpontja szerint elkülönítettük a 60-ik és 50-ik életévük alatt diagnosztizált stroke, illetve ISZB betegek alcsoportjait. Az alacsonyabb életkorban (50 év alatt) diagnosztizált stroke betegek esetében (n=106) az ABCA1 R219K és V771M variánsok ritka alléljeit hordozók gyakorisága alacsonyabb volt, mint a kontroll csoportban (R219K: $35,8 \pm 4,7\%$ vö. $50,3 \pm 3,6\%$; $p=0,022$; OR [95% CI]: 0,6 [0,3-0,9]; V771M: $2,8 \pm 1,6\%$ vö. $9,9 \pm 2,2\%$; $p=0,035$; OR [95% CI]: 0,3 [0,1-0,9]). A két variáns ritka alléljét hordozók 50 éves kor alatt feltehetően védettebbek a stroke kialakulásával szemben. Hasonló eredményt a diagnózis időpontja alapján felállított alcsoportokban a többi variáns esetében nem észleltünk. A diagnózis felállításának időpontja szerint képzett alcsoportokat tovább bontottuk nemek szerint, és az így létrehozott alcsoportokban is megvizsgáltuk a betegség és a genotípusok kapcsolatát. A férfi stroke alcsoportban az 50 év alatt diagnosztizált betegek esetében (n=62) csökkent ABCG8 54YY genotípus gyakoriság

értéket tapasztaltunk a férfi kontroll alcsoporthoz képest ($24,2 \pm 5,4\%$ vö. $41,3 \pm 5,1\%$; $p=0,038$; OR [95% CI]: 0,5 [0,2-0,9]). Az 54Y allél homozigóta formában védőfaktor lehet a stroke kialakulásával szemben 50 év alatti férfiaknál.

A vizsgált populációk Hardy-Weinberg egyensúlyban voltak minden polimorfizmus esetében, kivéve a stroke betegpopulációt az R219K variáns tekintetében. Feltételeztük, hogy az egyensúlytól való eltérés a bevásztási kritériummal, vagyis a stroke érintettséggel állt összefüggésben. Az ABCA1 esetében az R219K-V771M és az R219K-I883M lókuszok között, az ABCG8 esetében a D19H-Y54C, Y54C-T400K, T400K-A632V és D19H-A632V lókuszok között mutattunk ki kapcsoltságot. A 37 fő 771M allélt hordozóból 36 fő a 219K allélt is hordozta. Azt, hogy a két allél egymástól független védőfaktor-e, vagy valamelyik allél esetében a betegségekkel mutatott összefüggés a másik alléllal való kapcsoltságának köszönhető-e, egyértelműen nem tudtuk bizonyítani.

A genotípusok lipid (koleszterin, TG, LDL, HDL) szintekkel mutatott kapcsolatának vizsgálata során a kontroll csoportban az ABCG8 Y54C variánsa esetében eltérő koleszterin értékeket tapasztaltunk. Az 54YY genotípust hordozók csökkent koleszterin szinttel rendelkeztek a többi genotípushoz képest ($n=71$; medián: 4,51 mM; 25-75 percentilis: 4,19-5,43 vö. $n=120$; medián: 4,95 mM; 25-75 percentilis: 4,42-5,88; $p=0,009$). Hasonló összefüggést a betegpopulációkon, illetve a többi polimorfizmus esetében nem találtunk.

Végül, az ABCG8 T400K genotipizálása során egy kontroll személynél a vizsgált variáns szomszédságában azonosítottunk egy új, még nem közölt, aminosav cserét okozó variánst: a T401S-t (c.1201A>T).

Következtetések

A hibridizációs szondák olvadási görbe analízisén alapuló genotipizálásra a PCR során alkalmazott primerek aránya jelentős hatást gyakorolt. A hibridizációs szondákkal komplementer DNS szál arányának növekedéséhez vezető primer arány használata jelentős mértékben növelte a módszer hatékonyságát és megbízhatóságát, míg az ellenkező arányban, a szondákkal kompetícióban lévő DNS szál arányának növekedéséhez vezető primer arány a módszer értékelhetetlenségéhez vezetett. Szimmetrikus primer arány alkalmazása mellett, ha az amplifikációs primerek hatékonysága valamilyen okból eltérő (pl. az egyik primer számára kedvezőtlen az anellációs hőmérséklet, a reagens minőségében romlás következett be, pipettázási hiba történt), akkor feltételezésünk szerint előfordulhat, hogy a kísérletünkben modellezett, kedvezőtlen aránynak megfelelő amplifikációs körülmény jön létre, ami negatív hatást gyakorol az olvadási görbe értékelhetőségére. Az aszimmetrikus PCR jelentősége abban rejlik, hogy a fenti hibák - bizonyos határokon belül - aszimmetrikus PCR alkalmazásával korrigálhatóak vagy kivédhetőek. Megítélésünk szerint, célszerű lenne, ha az optimális primer arány megállapítása minden genotipizáló rendszer esetében az optimalizálási folyamat integráns részét képezné.

Ha az ABC transzporterek variánsai (ABCA1: R219K, V771M, I883M; ABCG8: D19H, Y54C, T400K, A632V) allélgyakoriságát és genotípus megoszlását a vizsgált beteg, illetve kontroll csoportok között hasonlítottuk össze, a stroke betegséggel három polimorfizmus, az ISZB-vel egy polimorfizmus mutatott korrelációt. A V771M ritka allélje védő faktor lehet az ISZB kialakulásával szemben. Az 50 év alatti korcsoportban egyrészt az R219K vagy a V771M ritka alléljeit hordozók, másrészt az ABCG8 gén Y54C gyakoribb alléljére nézve homozigóta férfiak lehetnek

védettebbek a stroke kialakulásával szemben. Az R219K és V771M védő szerepét feltehetően mindkét nemben kifejti, míg az Y54C csak a férfiak esetében. A vizsgált polimorfizmusok közül több genetikai kapcsoltságban állt egymással, ezek közül az R219K és V771M ritka variánsai közötti kapcsoltság emelkedett ki erősség szempontjából. Vizsgálati anyagunkon nem lehetett egyértelműen eldönteni, hogy a két említett variáns védő szerepét egymástól függetlenül fejti-e ki, vagy a kimutatott összefüggésekben szerepe van-e a közöttük fennálló kapcsoltságnak. A kontroll csoportban az ABCG8 Y54C variáns különböző genotípusait hordozók eltérő koleszterin értékekkel rendelkeztek, a legalacsonyabb koleszterin szint az 54YY genotípusú csoportra volt jellemző. Az alacsony koleszterin szint klasszikus védőfaktor, így feltételezzük, hogy 50 év alatti férfiaknál az 54Y allél a koleszterin szint csökkentésén keresztül fejti ki protektív hatását a stroke-kal szemben.

Összességében arra a következtetésre jutottunk, hogy az általunk vizsgált transzporterek R219K, V771M (ABCA1), illetve Y54C (ABCG8) polimorfizmusai direkt módon (a fehérje funkciójának megváltoztatása révén), vagy esetleg indirekt módon (funkcióváltozással járó polimorfizmussal kapcsoltságban állva) szerepet játszhatnak a lipid metabolizmusban, ezáltal a vasculáris betegségek, úgy mint az atherosclerosis, stroke vagy ISZB kialakulásában. A fenti polimorfizmusok védő hatása a betegségek kialakulásával szemben kis mértékű, így hatásukat a környezeti tényezők, vagy a nemi különbségek jelentős mértékben befolyásolhatják.

Saját publikációk jegyzéke

A dolgozat anyagát képező nemzetközi tudományos közlemények

1. **Szilvási A**, Andrikovics H, Pongrácz E, Kalina Á, Komlósi Z, Klein I, Tordai A. (2010) Frequencies of four ATP-binding cassette transporter G8 polymorphisms in patients with ischemic vascular diseases. *Genet Test Mol Biomarkers*. 14:667-72.
IF 2010: 1,645
2. Andrikovics H, Pongracz E, Kalina A, **Szilvasi A**, Aslanidis C, Schmitz G, Tordai A. (2006) Decreased frequencies of ABCA1 polymorphisms R219K and V771M in Hungarian patients with cerebrovascular and cardiovascular diseases. *Cerebrovasc Dis*. 21:254-9.
IF 2006: 2,003
3. **Szilvási A**, Andrikovics H, Kalmár L, Bors A, Tordai A. (2005) Asymmetric PCR increases efficiency of melting peak analysis on the LightCycler. *Clinical Biochemistry*. 38:727-30.
IF 2005: 2,359

Egyéb témában megjelent tudományos közlemények

4. Andrikovics H, Meggyesi N, **Szilvasi A**, Tamaska J, Halm G, Lueff S, Nahajevszky S, Egyed M, Varkonyi J, Mikala G, Sipos A, Kalasz L, Masszi T, Tordai A. (2009) HFE C282Y Mutation as a Genetic Modifier Influencing Disease Susceptibility for Chronic Myeloproliferative Disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 18:929-34.
IF 2009: 4,310
5. Szamosi T, Lakatos PL, The Hungarian IBD Study Group, **Szilvasi A**, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, Papp M, Szabo O, Satori A, Tulassay Z, Miheller P, Horvath HC, Papp J, Tordai A, Andrikovics H. (2009) The 3'UTR NFKBIA Variant Is Associated with Extensive Colitis in Hungarian IBD Patients. *Dig Dis Sci*. 54:351-9.
IF 2009: 1,838
6. Lakatos PL, Szamosi T, **Szilvasi A**, Molnar E, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, Papp M, Tulassay Z, Miheller P, Papp J, Tordai A, Andrikovics H; Hungarian IBD Study Group. (2008) ATG16L1 and IL23 receptor (IL23R) genes are associated with disease susceptibility in Hungarian CD patients. *Dig Liver Dis*. 40:867-73.
IF 2008: 2,577
7. Andrikovics H, Nahajevszky S, **Szilvasi A**, Bors A, Adam E, Kozma A, Kajtar B, Barta A, Poros A, Tordai A. (2007) First and second line imatinib treatment in chronic myelogenous leukemia patients expressing rare e1a2 or e19a2 BCR-ABL transcripts. *Hematol Oncol*. 25:143-7.
IF 2007: 2,180
8. Fischer S, Lakatos PL, Group TH, Lakatos L, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, Papp M, **Szilvasi A**, Tulassay Z, Osztovits J, Papp J, Demeter P, Schwab R, Tordai A, Andrikovics H. (2007) ATP-binding cassette transporter ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) variants are not associated with disease susceptibility, disease phenotype response to medical therapy or need for surgery in Hungarian patients with inflammatory bowel diseases. *Scand J Gastroenterol*. 42:726-33.
IF 2007: 1,758
9. Patocs A, Klein I, **Szilvasi A**, Gergics P, Toth M, Valkusz Z, Forizs E, Igaz P, Al-Farhat Y, Tordai A, Varadi A, Racz K, Esik O. (2006) Genotype/phenotype correlations in Hungarian patients with hereditary medullary thyroid cancer. *Wien Klin Wochenschr*. 118:417-21.
IF 2006: 0,804
10. Andrikovics H, **Szilvasi A**, Meggyesi N, Kiraly V, Halm G, Lueff S, Nahajevszky S, Mikala G, Sipos A, Lovas N, Csukly Z, Matrai Z, Tamaska J, Tordai A, Masszi T. (2007) A 2-es típusú Janus tirozin kináz Val617Phe aktíváló pontmutáció szerepe és kimutatásának jelentősége myeloproliferatív szindrómában. *Orv Hetil*. 148:203-210.
11. Andrikovics H, Bors A, Meggyesi N, **Szilvási A**, Tordai A. (2007) Az akut myeloid leukémia molekuláris genetikai háttere. *Hemat Transzf*. S1:117-21

