

A *HSD11B1* gén polimorfizmusainak csont metabolizmusra gyakorolt hatása osteoporosisban és mellékvesekéreg adenomás nőbetegekben

Doktori tézisek

dr. Feldman-Kovács Karolina

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Patócs Attila egyetemi docens, PhD

Programvezető: Dr. Rácz Károly egyetemi tanár, az MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Beke Artúr egyetemi adjunktus, PhD

Dr. Kovács Gábor László főorvos, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Gerendai Ida† egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Garami Miklós egyetemi docens, PhD

Dr. Spisák Sándor tudományos munkatárs, PhD

Budapest
2013

1. Bevezetés

A glükokortikoidok szabályozzák a szénhidrát és aminosav anyagcserét, fontos szerepük van a stresszre adott válaszreakciók kialakulásában és gátolják az immunrendszer működését. Jelentős élettani szerepük mellett kiemelkedő kórélettani jelentőséggel is bírnak, kulcsszereplők számos kórkép patogenezisében illetve terápiájában az endokrinológiai betegségektől kezdve, a csontanyagcsere-zavarokon át az allergiás folyamatokig. A glükokortikoid túlsúly egyik gyakori, sok beteget érintő, ezért sokat vizsgált szövődménye az osteoporosis, mely egyaránt kialakulhat valamilyen endogén folyamat következményeként vagy glükokortikoid terápia mellékhatásaként is.

A glükokortikoidok hatásainak és különösen az aktív glükokortikoid hormon, a kortizol szövetekben való elérhetőségének a szabályozása kettős. Egyik eleme a hypothalamus–hypophysis–mellékvese tengely által történő, központi szabályozás, mely alapvetően az össz-szervezeti glükokortikoid kínálatot befolyásolja. A szabályozásnak létezik egy lokális, szöveti szintje is, mely az adott szövet sejtjeire nézve specifikusan képes az össz-szervezeti glükokortikoid kínálat finomhangolására, a ténylegesen elérhető kortizol szintjének beállítására. Ez a helyi finomhangolás által beállított aktív kortizol szint lesz az, amely közvetlenül a sejtekre hatva azok glükokortikoid-függő folyamatait vezérli.

A glükokortikoidok szöveti szintű szabályozásának fontos szereplői a sejtek endoplazmatikus retikulumában elhelyezkedő 11- β -hirdoxiszteroid-dehidrogenáz (11 β -HSD) izoenzimek, melyek kulcsfontosságú szerepet töltenek be a glükokortikoid hormonok átalakításában. Az általunk vizsgált 1-es izoforma (11 β -HSD1) az inaktív kortizon átalakítását végzi az aktív hormonná: a kortizollá. Az enzimaktivitás iránya feltételezhetően az endoplazmatikus retikulum (ER) belsejében mérhető NADPH szinttől függ, ami a hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz (H6PDH) működésének eredményeként képződik. Az enzim elsősorban a májban, gonádokban, zsírszövetben illetve az agyban, csontban található meg nagyobb mennyiségben. Működése közvetve vagy közvetlenül befolyásolhatja ezen szervek állapotát, ezért annak feltérképezése lehetőséget nyújthat a glükokortikoid-függő folyamatok szerv- illetve szöveti szintű befolyásolására.

Ismert tény, hogy a *HSD11B1* gén polimorfizmusai befolyásolhatják a 11β -HSD1 enzim működését, és ezáltal szerepet tulajdonítanak nekik egyes (kór)állapotokban, mint pl. az elhízás (magas BMI), az inzulinrezisztencia, a diabetes mellitus, a hipertónia, a polycystás ovarium szindróma (PCOS), vagy az Alzheimer-kór. A leggyakrabban tanulmányozott polimorfizmus a *HSD11B1* gén 3-as intronjában, a 83.557. pozícióban beékelődött adenin (83557insA). A polimorfizmus 100%-ban kapcsolt egy másik genetikai variánssal az ún. rs12086634 polimorfizmussal. A *HSD11B1* gén nemrégiben került fel az osteoporosis kandidáns génjeinek listájára. A gén promoter polimorfizmusainak kutatása hozzájárulhat a csontritkulás genetikájának jobb megismeréséhez.

2. Célkitűzések

A 11 β -HSD1 enzim alul- vagy túlműködése számos betegség kórlefolrásában játszat kulcsszerepet, vagy azokat akár jelentős mértékben módosíthatja. Jelenlegi ismereteink alapján úgy tőnik, hogy aktivitása szabályozásának egyik legfontosabb eleme a megfelelő kofaktorellátason túl a rendelkezésre álló enzim mennyisége és annak endogén aktivitása. Ez pedig elsősorban az enzim génjének, azaz a *HSD11B1*-nek a működésétől, szerkezetétől függ.

PhD munkám során célul tűztem ki, hogy a *HSD11B1* gén korábban már azonosított, de funkcióval még nem, vagy csak részben társított genetikai változatait feltérképezem, a jelentős genotípus-fenotípus összefüggést mutató variánsok funkcióját tisztázzam. Munkám célkitűzései az alábbiak voltak:

1. In silico módszerekkel online adatbázisok segítségével (NCBI, Hapmap) a *HSD11B1* gén promoterében található genetikai variánsok feltérképezése.
2. Az így azonosított SNP-k allélgyakoriságának meghatározása egészséges nőkből álló hazai populációban.
3. A polimorfizmusok egészséges nők csontanyagcseréjére gyakorolt hatásának elemzése.
4. Annak vizsgálata, hogy ezek a hatások megjelennek-e:
 - a. postmenopuasalis osteoporosisban szenvedőkben, illetve
 - b. a hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőkben.
5. A klinikai paraméterekkel összefüggést mutató egyik génváltozat funkcionális hatásának tisztázása *in vitro* rendszerben.

3. Módszerek

3.1. Betegek és kontrollok

A Semmelweis Egyetem II. Sz. Belgyógyászati Klinikáján postmenopausalis osteoporosisal diagnosztizált 154 és 71 hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőbetegen végeztem vizsgálataimat. Kontroll csoportként 209, független mintaválasztásból származó egészséges nő DNS-ét gyűjtöttem össze.

3.1.1. Hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás betegcsoport kivizsgálása

A mellékvesekéreg adenoma diagnosztizálása hasi képalkotó vizsgálat alapján történt. A vizsgálatba bevont valamennyi beteg részletes hormonális kivizsgáláson is átesett. Mértük a reggeli (8 és 9 óra között), éjféli illetve alacsony dózisu dexamethason szupressziós tesztet követő szérumban a kortizolszinteket, valamint az egyes csontanyagcsere-markereket, az osteocalcint és a humán I-es típusú kollagén C-terminális kereszteződéseit (β -crosslaps, CTX). A szérumban a kortizon szint, vizeletben a plazma metanephrin szint meghatározása mellett a hipertóniás betegeknél a szérumban a nátrium, kálium és aldosteron/renin mérés is történt. Ezen kívül minden betegnél meghatároztuk a dehidroepiandrosteron, a 17-hidroxiprogesteron, a tesztoszteron és a plazma ACTH-szintet.

3.2. Csontsűrűség mérés

A csontsűrűség mérés kettős röntgen foton-abszorpciometria (DEXA) segítségével történt az ágyéki csigolyák (L1-L4) és a teljes femur, valamint femur-nyak, trochanterikus és intertrochanterikus régiókon. A mérésekhez a gyártó által megadott referencia értékeket használtuk.

3.3. In silico adatbázis-kutatás

A *HSD11B1* promotor polimorfizmusainak feltérképezése in silico kutatással történt online elérhető adatbázisok segítségével.

3.4. Molekuláris biológiai módszerek

3.4.1. Genotipizálás

A polimorfizmusok kimutatásához a kontrollok és betegek vérmintáiból DNS-t izoláltunk kit-ek segítségével.

A vizsgált egyéneket a *HSD11B1* polimorfizmusaira nézve genotipizáltam allélspecifikus Real Time PCR-rel illetve egyes esetekben további megerősítésként direkt DNS szekvenálással is.

3.4.1.1. Real Time-PCR

Az általam vizsgált polimorfizmusok (rs4393158, rs11576775, rs17389016, rs760951, rs4844880, rs3753519, rs12086634, rs11807619, rs2884090, rs4844488) genotipizálása Taqman SNPAssay-ekkel történt.

3.4.2. In vitro funkcionális vizsgálatok

3.4.2.1. Luciferáz riporter vektor konstrukció

In vitro funkcionális méréseimhez a *HSD11B1* promoter megfelelő szakaszait a vektorba történő klónozáshoz PCR segítségével nyertem ki, az így felamplifikált DNS szekvenciá(ka)t szükség esetén egymáshoz ligáltam DNA Ligase-zal majd restriktációs enzim emésztést követően pGL3 alap vektorba klónoztam. Az elkészült konstruktokat direkt DNS szekvenálással ellenőriztem.

3.4.2.2. Célsejtek

Kísérleteimhez humán epitheloid cervix carcinoma (HeLa) sejteket használtam.

3.4.2.3. Tranziens transzfekció

A tranziens transzfekciót 10^4 /well HeLa sejten, 96 well-es plate-en végeztem, antibiotikum-mentes médiumban. A transzfekcióhoz Lipofectamine 2000 reagenst alkalmaztam a gyártó protokolljának előírásai szerint.

3.4.2.4. Dual-luciferáz assay

A luciferáz assay-t a transzfekció után 24 órával Dual-Glo Luciferase Assay Systemmel végeztem a gyártó utasításainak megfelelően. Minden kísérletet legalább 5 alkalommal megismételtem, mérésenként 6 párhuzamossal.

3.5. Statisztikai módszerek

Az összes polimorfizmus esetében Hardy-Weinberg egyensúly ellenőrzést elvégeztem. A polimorfizmusok kapcsoltságát (LD blocks) és az r^2 értékeket HaploView program segítségével határoztam meg.

A normalitás ellenőrzéséhez Shapiro-Wilk's W-tesztet alkalmaztunk. Normális eloszlású változóknál a Student-féle t-tesztet, a nem normális eloszlásúaknál pedig a Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztuk az átlagok összehasonlítására.

Luciferáz assay-vel mért adatok kiértékeléséhez az SPSS statisztika program segítségével egy utas ANOVA-t majd Bonferroni posthoc tesztet alkalmaztam.

Az eredmények értékelése során a $p < 0,05$ értékeket tekintettem szignifikánsnak.

4. Eredmények

4.1. *A HSD11B1 promoter polimorfizmusainak feltérképezése*

Elsőként *in silico* módszerekkel azonosítottam a *HSD11B1* promoterében található polimorfizmusokat. A keresést a *HSD11B1* gén start kodonjától 5' irányban található kb. 28 kilobázis méretű területen végeztem el, az itt található polimorfizmusok száma azonban túlságosan nagy volt a további elemzésekhez, a részletes genotipizáláshoz, ezért a következőkben több lépésben szűkítettem a vizsgált polimorfizmusok számát. Mivel az egyes haplotípusokat jellemző tagging SNP-k némelyike nem a szorosán vett promoter régióban található, hanem vannak közöttük intronikus elhelyezkedésűek is, vizsgálataimat kiterjesztettem ezekre is. Az így kapott halmazt tovább szűkítettem a populációban 5%-nál gyakrabban előforduló változatokra. Így a további vizsgálataimat a *HSD11B1* gén proximális 38 kilobázisnyi szakaszának haplotípusain, illetve az azokat jellemző tagging SNP-ken végeztem.

4.2. *A HSD11B1 gén polimorfizmusainak hatása a csont anyagcserére egészséges nőkben*

Első körben kíváncsi voltam arra, hogy egészséges egyéneknél van-e bármilyen korreláció az egyes *HSD11B1* promoter haplotípusok és a csontok metabolizmusa között.

A csont anyagcserét közelítően jellemző, anabolikus/katabolikus egyensúlyra utaló értékek függetlenek a *HSD11B1* promoter genetikai változatától.

A beteg szempontjából végül is a csontok funkcionális tulajdonságai a döntők, melyek esetében a csontok ásványianyag-tartalma meghatározó fontosságú. Az ezt jellemző klinikai paraméterek közül a lumbális csigolyák csontsűrűsége (L1-4 BMD) az rs4844880 SNP-vel, míg a femurnyak BMD az rs3753519-cel mutatott szignifikáns összefüggést. A csontanyagcsere és a *HSD11B1* promoter haplotípusok összefüggése statisztikailag a legerősebbnek bizonyult az rs4844880-as SNP esetében, ezért a továbbiakban ezt a polimorfizmust vizsgáltam részletesen.

4.3. A HSD11B1 polimorfizmusok és a csontanyagcsere egyes betegségekben

A továbbiakban arra voltam kíváncsi, hogy az egészséges egyénekből tapasztalt összefüggések megfigyelhetőek-e egy manifest csontbetegség, a postmenopausalis osteoporosis esetén, illetve hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőbetegekben is.

4.3.1. Az rs4844880-as polimorfizmus összefüggése klinikai adatokkal

4.3.1.1. Postmenopausalis osteoporosis

Az egészséges postmenopausalis nőkben az rs4844880-t hordozók körében szignifikánsabb jobb a lumbális csigolyák állapotát jellemző L1-L4 BMD, Z-score és T-score. A szignifikancia a korra és a BMI-re való adjusztálás után is megmaradt.

A polimorfizmus osteoporosisra kifejtett hatását 154 csonttritkulásban szenvedő nőben vizsgáltam. Az egészséges és az osteoporoticus nők SNP allélfrekvenciájában nem volt szignifikáns különbség (0,128 illetve 0,136).

A csonttritkulásban szenvedő nőkben az rs4844880-t hordozókban jobbak voltak a femurnyak BMD, T-score és Z-score értékek. Ennek háttérében a csont felépítő és – lebontó folyamatiban bekövetkezett változás állhat, melyre a szignifikánsan nagyobb osteocalcin és alacsonyabb β -crosslaps szintek utalnak.

4.3.1.2. Hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenoma

Az általam vizsgált hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőkben az rs4844880-as SNP allélfrekvenciája nem tér el lényegesen az irodalomban fellelhető nemzetközi adatoktól.

A polimorf (minor) allélt hordozó genotípus szignifikánsan jobb lumbális BMD, T-score és femurnyak Z-score csontparaméterekkel jár együtt, amely korra és BMI-re adjusztálva is szignifikáns marad.

4.3.2. Az rs12086634-as polimorfizmus hatása a csontanyagcserére hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomában

Az rs12086634 polimorfizmust hordozók szignifikánsan magasabb lumbális BMD, T- és Z-score és femurnyak T- és Z-score értékekkel rendelkeztek a nem hordozókhoz képest. Az összefüggés korra és BMI-re történő adjusztálás után is szignifikáns maradt.

4.4. Az rs4844880 funkcionális következményei

A továbbiakban kíváncsi voltam arra, hogy mi az rs4844880 polimorfizmus hatásának celluláris mechanizmusa, magyarázata. Korábban hasonló módon ezt még nem vizsgálták. Mivel ez az SNP a promoter régióban helyezkedik el, azt feltételeztem, hogy hatását a génátírás, a transzkripció szintjén fejtí ki. Ezért megterveztem majd beállítottam egy transzkripciós aktivitási mérést a polimorfizmus vizsgálatára.

4.4.1. Luciferáz riporter vektor konstrukció

A *HSD11B1* gén start kodonjához képest az rs4844880-as polimorfizmus -7372 bázisnyira található, ennek a teljes szakasznak a bakteriális vektorba való ligálása technikai okok miatt nem megvalósítható, a szakasz túlságosan hosszú lenne ehhez. Ezért az rs4844880 vizsgálatához a transzkripciós iniciációs helyet, illetve a polimorfizmust is tartalmazó génrészletet külön plazmid konstruktokba klónoztam.

A vizsgálatokhoz 3 különböző plazmid konstrukciót készítettem: HSD11B1-control, HSD11B1- rs4844880W (vad típusú) és HSD11B1- rs4844880M (mutáns).

A transzkripciós iniciációs helyet tartalmazó HSD11B1-control konstrukthoz (-1472–+6 bázispár, bp) egy 851 bázispár hosszú, a *HSD11B1* gén (-7820 – -6969) szakaszát tartalmazó promoter-töredéket ligáltam, amely az rs4844880 SNP-t (-7372bp) tartalmazta. A forrásként felhasznált DNS-ek olyan betegektől származtak, akik homozigóta formában hordozzák a vad típusú illetve a polimorf allélt. Az összes általam használt plazmidot direkt DNS szekvenálással ellenőriztem a felhasználás előtt.

4.4.2. Az rs4844880 polimorfizmus hatása a *HSD11B1* gén promoter aktivitására

Mind a HSD11B1-rs4844880W es -M plazmid konstrukció szignifikánsan alacsonyabb luciferáz aktivitást mutatott a HSD11B1-control konstrukcióhoz képest. Ez az eredmény azt sugallja, hogy ennek a 851bp hosszú szekvenciának, amely -7820 és -6969 bázispárnnyira van a start kodontól potenciálisan represszor szerepe lehet a *HSD11B1* gén promoter régiójában.

A HSD11B1-rs4844880M plazmid luciferáz aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt a vad típusú (HSD11B1-rs4844880W) plazmid konstrukcióhoz képest.

5. Következtetések

1. A *HSD11B1* proximális 38 kilobázisnyi területén lévő tagging SNP-k allélfrekvenciája egészséges magyar nők körében megegyezik a nemzetközi populációkban tapasztaltakkal.
2. Egészséges magyar nőkben az rs4844880 és az rs3753519 tagging SNP-kkel jellemezhető haplotípusokban szignifikánsan jobb a csontsűrűség klinikai paraméterei.
3. Postmenopausalis egészséges nőkben az rs4844880 polimorfizmus jelenléte szignifikánsan jobb csont L1-4 BMD, Z-score és T-score értékekkel jár együtt. Postmenopausalis osteoporosisban a hordozókban jobb a femurnyak T- és Z-score illetve magasabb a szérum osteocalcin és alacsonyabb a β -crosslaps szintje.
4. Hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás nőkben az rs4844880-as és az rs12086634-es polimorfizmusok esetében is szignifikánsan jobb/magasabb a csont ásványianyag-tartalom.
5. A *HSD11B1* -7820 és -6969 bp közötti szakasza egy transzkripció represszor régiót tartalmaz, melynek aktivitását az rs4844880-as változat fokozza, azaz a transzkripciót jobban gátolja, mint a vad típus.
6. Postmenopausalis nőkben a *HSD11B1* -7820 és -6969 bp közötti szakasza valamilyen formában aktív.

6. Saját közlemények

6.1. A témában megjelent közlemények

1. Feldman, K., Szappanos A., Butz H., Grolmusz V., Majnik J., Likó I.,Kriszt B., Lakatos P., Tóth M., Rác K., Patócs. A. (2012). "The rs4844880 polymorphism in the promoter region of the *HSD11B1* gene associates with bone mineral density in healthy and postmenopausal osteoporotic women." **Steroids**. 77(13):1345-1351. **IF:2.83**
2. Feldman K., Likó I.,Nagy Zs.,Szappanos A.,Grolmusz V.,Tóth M.,Rác K., Patócs A. (2013) A 11- β -hidroxi-szteroid-dehidrogenáz enzim jelentősége klinikai kórképekben. **Orvosi hetilap** 2013, 154, 283–293.
3. Szappanos A, Patócs A, Gergics P, Bertalan R, Kerti A, Ács B, Feldmann K, Rác K, Tóth M. (2011) The 83557insA variant of the gene coding 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 enzyme associates with serum osteocalcin in patients with endogenous Cushing's syndrome. **J Steroid Biochem Mol Biol** 123: 79–84. **IF:3.053**

6.2. A Doktori értekezéshez kapcsolódó közlemények

- 1 Boyle B, Butz H, Liko I, Zalatnai A, Toth M, Feldman K, Horanyi J, Igaz P, Racz K, Patocs A.(2010) Expression of glükokortikoid receptor isoforms in human adrenocortical adenomas. **Steroids**. 75(10):695-700. **IF:3.106**
- 2 Beko G, Varga I, Glaz E, Sereg M, Feldman K, Toth M, Racz K, Patocs A. (2010) Cutoff values of midnight salivary cortisol for the diagnosis of overt hypercortisolism are highly influenced by methods. **Clin Chim Acta**.411(5-6):364-7. **IF:2.389**
4. Sereg M, Szappanos A, Toke J, Karlinger K, Feldman K, Kaszper E, Varga I, GlázE, Rác K, Tóth M. (2009) Atherosclerotic risk factors and complications in patients with non-functioning adrenal adenomas treated with or without adrenalectomy: a long-term follow-up study. **Eur J Endocrinol**. 160(4):647-55. **IF:3.539**