

A glukokortikoid érzékenységet befolyásoló genetikai eltérések

Doktori tézisek

dr. Molnár Ágnes

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Patócs Attila, Ph.D, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Dénes Judit, Ph.D, klinikai orvos
Dr. Medvecz Márta, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Buzás Edit, MTA doktora, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Hubina Erika, Ph.D, főorvos
Dr. Nagy Bálint, az MTA doktora,
tudományos főmunkatárs

Budapest
2018

I. Bevezetés

A glukokortikoidok a stresszre adott válaszáért felelős szteroid hormonok, melyeknek jelentős hatása van a szénhidrát-, fehérje-, zsír-, kalcium- és csontanyagcserére, az immunrendszer működésére, a növekedésre és a viselkedés szabályozására. Jelentőségük van számos betegség gyógyszeres terápiájában, például az autoimmun megbetegedések, súlyos infekció, nefrózis szindróma, egyes bőrgyógyászati kórképek, allergiás betegségek, légzőszervi és hematológiai betegségek, gyermekkori akut leukémia, idegrendszeri elváltozások kezelésében, és pl. a szervtranszplantációt követő kilökődés gátlásában. Hiánya esetén, például Addison kórban vagy hipopituitarizmusban, a betegeknek akár életre szóló hormonpótló terápiára lehet szükségük, melynek pontos beállítása elengedhetetlen a mellékhatások minimalizálása érdekében. Egészségesekben a szérum kortizol szint diurnális ritmust mutat, melyet a mai rendelkezésre álló terápiás lehetőségekkel gyakorlatilag lehetetlen reprodukálni. A ritmust befolyásolja a kor, a nem, a kortizolt kötő fehérje (cortisol binding globulin, CBG) szintje, a testtömeg, az egyéni glukokortikoid érzékenység és metabolizmus.

A glukokortikoidok intracellulárisan elhelyezkedő receptor kötődve fejtik ki hatásukat. A glukokortikoid receptor génje az 5. kromoszóma hosszú karján helyezkedik el. Napjainkban több mint 3000 GR génpolimorfizmusát (single nucleotide polymorphism; SNP) azonosítottak. A leggyakrabban vizsgált GR SNP-k (N363S, BclI., ER22/23EK és A3669G) összefüggéseket mutattak a csökkent vagy fokozott glukokortikoidok iránti érzékenységgel.

A glukokortikoidok szövet-specifikus, lokális hatását prereceptorális szinten a 11- β -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim (11HSD) modulálja. Ennek 2-es típusa a biológiailag aktív kortizolt inaktív kortizonná alakítja, ezzel védve a mineralokortikoid receptort a túlzott glukokortikoidok általi aktiválástól. Az enzim 1-es típusa egy NADPH dependens, bidirekcionális enzim, melynek mind dehidrogenáz, mind pedig reduktáz aktivitása van. A reduktáz hatás dominál, a kortizol átalakításáért felelős a biológiailag inaktív kortizonból, ezáltal biztosítva a GR ligandját. Az enzim szövet szintű expressziója és az enzimaktivitás lokális regulációjának szerepe lehet egyes betegségek patomechanizmusában, úgy mint elhízás és metabolikus szindróma, policisztás ovárium szindróma, glukokortikoid indukálta osteoporózis és reumatoid arthritisz. A HSD11B1 gén polimorfizmusai befolyásolhatják az enzim aktivitását, ezáltal prereceptorálisan szabályozhatják a GR-hoz hozzáférhető hormon mennyiségét, amelynek

végeredményeként módosulhat a szöveti glukokortikoid érzékenység. A *HSD11B1* gén variánsai a receptor különböző mértékű ellátottságának, a *GR* gén polimorfizmusok pedig a receptor érzékenységének modulálásával befolyásolhatják a hormonhatás mértékét, amelyeknek fontos szerepe lehet az egyéni hormonigény kialakításában. Az optimális dozírozás elengedhetetlen a mellékhatások megelőzése mellett a szükséglet biztosítása érdekében.

A primer mellékvesekéreg-elégtelenség, vagy más néven Addison kór prevalenciája 93-140/1.000.000 lakos. Napjainkban az elsődleges patogenetikai faktor a kialakulásában az autoimmun adrenalitisz. A hipadrénia vezető tünetei a fokozatosan kialakuló gyengeség, fáradtság, hipotenzió és kollapszus hajlam, hányinger, hosszabb ideig fennálló, kezeletlen betegség esetén testsúly-vesztés, akár anorexia, illetve hiperpigmentáció a nyomásnak kitett testfelületeken. Előfordul, hogy Addisonos krízis tünetei hívják fel elsőként a betegségre a figyelmet. Az Addison kór kezelésének alapja a mineralokortikoid és glukokortikoid hormonok pótlása. Mind a betegség, mind az emiatt szükséges, élethosszig tartó glukokortikoid hormonpótló kezelés kóros lehet a betegek életminőségére.

A glukokortikoid rezisztencia, vagy más néven Chrousos szindróma egy ritka, familiáris vagy sporadikus megbetegedés, melynek fő jellemzője a részleges, szövet specifikus vagy generalizált tünetek, melyek okozója a parciális érzéketlenség a glukokortikoidok iránt. Az inszenzitivitás következtében a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg tengely (HPA) a negatív feedback gátlás alól felszabadul, ami emelkedett ACTH, és ennek következtében emelkedett szérum kortizol szintekkel jár. A betegség egyik fő jellemzője a hiperkortizolizmus ellenére a Cushingoid tünetek hiánya. A megnövekedett ACTH szint emelett egyéb mellékvese eredetű szteroidok termelését is serkentik, melyek androgén illetve mineralokortikoid hatásokkal bírhatnak, ezáltal a hormontúlprodukciónak mértékétől függően különböző súlyosságú tünetekkel járó kórképet okozhatnak. A betegség molekuláris alapjaként a glukokortikoid receptor génjében megjelenő mutációknak tulajdonítottak jelentőséget. Napjainkig a *GR* génnek több, mint 15 mutációját azonosították, amik kórokozó szerepet játszhatnak.

II. Célkitűzés

Munkám során a glukokortikoid receptor és a prereceptorálisan a glukokortikoid hormonhatást befolyásoló 11- β -hidroxiszteroid dehidrogenáz enzim genetikai variánsainak hatását vizsgáltam a hormonpótló terápiára, illetve a terápia asszociált mellékhatások megjelenésére a Semmelweis Egyetem II. számú Belgyógyászati Klinikáján gondozott Addison kóros betegek csoportjában. Célul tűztem ki:

1. Az irodalmi adatok alapján leggyakrabban vizsgált glukokortikoid receptor polimorfizmusok (BclI., N363S és A3669G), illetve a *HSD11B1* gén két polimorfizmusának (rs12086634 és a munkacsoportunk által elsőként leírt rs4844880) allélgyakoriság-vizsgálatát, illetve ennek összehasonlítását a nemzetközi irodalomban közöltekkel
2. A vizsgált polimorfizmusok hordozói státuszának és a klinikai paraméterek összefüggéseinek leírását, az SNP-k a hormonpótló terápia kapcsán felmerülő mellékhatások megjelenésének tanulmányozása céljából
3. Az SNP-k hordozása illetve a betegség időbeli megjelenése közötti összefüggés vizsgálatát az esetleges hajlamosító tényezők felderítése érdekében
4. A polimorfizmusok hormonpótló dóziséigényt befolyásoló szerepének felderítését, az egyénre szabott terápia kialakításakor egy további szempont felállítása érdekében
5. A *HSD11B1* polimorfizmusok hordozásának csontanyagcserét befolyásoló hatásának leírását
6. A *HSD11B1* polimorfizmusok metabolikus paramétereket befolyásoló hatásának szeparált vizsgálatát dexamethasont szedő és nem szedő Addison kóros betegekben, tekintettel arra, hogy a 11- β -HSD enzim 2-es típusa a hydrocortisone aktív bontásával szemben a dexamethasont nem oxidálja
7. Az rs4844880 polimorfizmus csontanyagcserére gyakorolt hatásának vizsgálatát szeparáltan 50 év feletti és alatti, női betegcsoportban annak felderítése érdekében, hogy a menopauza okozta hormonális változások megváltoztatják-e az SNP klinikai paramétereket módosító hatását
8. A teljes *GR* gén mutáció vizsgálatát egy a Semmelweis Egyetem II.számú Belgyógyászati Klinikáján diagnosztizált és kezelt, 31 éves, Chrousos szindrómás nőbetegben, a mutációhoz társuló genotípus-fenotípus összefüggések összegezése érdekében.

III. Módszerek

III.1. Vizsgált beteg-és kontroll csoport

Munkám során a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikáján diagnosztizált és kezelt Addison kóros (n=68) betegeket vizsgáltam. A vizsgált betegcsoportban a primer mellékvesekéreg-elégtelenség oka autoimmun adrenalitisz, az egyéb okból glukokortikoid hormonpótlásra szoruló betegek (kongenitális adrenális hiperplázia, mellékvesekéreg tuberkulózis, szarkoidózis, amiloidózis, hemokromatózis, malignus vagy hematológiai megbetegedések, mellékvese hemorrhágia) adatai nem kerültek feldolgozásra, illetve izolált ACTH hiány, vagy más, hipofízist érintő kórkép sem merült fel a laboratóriumi adatok alapján. A diagnózis klinikai tüneteken (fáradtság, hiperpigmentáció, gyengeség, hipotenzió, súlyvesztés és gasztrointesztinális panaszok), elektrolit eltéréseken (hyponatraemia, hypokalaemia) alapul, melyet további laboratóriumi vizsgálatok erősítettek meg: alacsony szérumszintű kortizol, mely Synactennel végzett stimuláció hatására sem mutat kellő emelkedést. A diagnóziskor mért plazma ACTH szintről 56 beteg esetében voltak elérhetőek az adatok (12 beteg diagnózisa évtizedekkel ezelőtt született meg, ebből az időszakból nem állnak rendelkezésre laboratóriumi adatok), ezeknek mindegyike meghaladta a referencia tartomány felső határát (1381 ± 1523 pg/ml), alátámasztva a primér mellékvesekéreg-elégtelenség diagnózist. A diagnóziskor mért 21-hidroxiláz ellenes antitest szint eredményei csak 5 esetben álltak rendelkezésre, ezek erős pozitivitást mutattak. Azok a betegek, akik egyéb okokból (pl. reumatoid arthritisz) további szteroid terápiaiban részesülnek, vagy a hydrocortisone metabolizmusát befolyásoló gyógyszereket szednek, nem kerültek be a vizsgálati csoportba. A glukokortikoid receptor gén polimorfizmusok vizsgálatához egy 160 fős, a *HSD11B1* SNP-k vizsgálatához egy 250 fős, egészséges, hazai populációból származó kontrollcsoportot használtam. Endokrin megbetegedés nem szerepelt csoportok résztvevőinek anamnézisében.

III.2. Klinikai és laboratóriumi paraméterek

A betegek esetében regisztrálásra kerültek a metabolikus státusz megítélése céljából szükséges antropometriai paraméterek: életkor, magasság (cm), testtömeg (kg), illetve az utóbbi kettőből számított testtömeg index (body mass index, BMI). Továbbá rögzítettem a betegek életkorát a betegség kezdetekor, a testtömeg változását a terápia során (kg/év), a glukokortikoid hormonpótló dózist hydrocortisone ekvivalens értékben megadva (mg/nap), illetve ez utóbbit a testtömegre korrigálva (mg/ttkg/nap). Feljegyeztem a betegek által szedett egyéb, a

metabolikus státuszt befolyásoló gyógyszereket (antihipertenzív, koleszterincsökkentő, antidiabetikus terápia), illetve hormon készítményeket (pajzsmirigy-, növekedési-, illetve nemi hormon szupplementáció).

A laboratóriumi és hormon vizsgálatokhoz éjszakai éhezést követően a betegeknél reggel 8 és 9 óra között történt vérvétel perifériás vérből. A mérések a Semmelweis Egyetem Központi Laboratóriumában történtek. A következő adatok kerültek összegyűjtésre: vérkép (Advia 2120, Siemens, Németország), máj-és vesefunkciós paraméterek, szérum glükóz, koleszterin, triglicerid, LDL-koleszterin és HDL-koleszterin szintek, szérum-, nyál- és vizeletkortizol, plazma ACTH, szérum ösztadiol, progeszteron, nemi hormont kötő fehérje (sex hormone binding globulin, SHBG), tesztoszteron, luteotrop hormon (LH), follikulus-stimuláló hormon (FSH), tiroidea stimuláló hormon (TSH), szabad tiroxin (free thyroxin, fT4), prolaktin és növekedési hormon (growth hormone, GH), szérum dehidroepiandroszteron szulfát (DHEAS) és androsztendion.

III.3. Csontsűrűség mérés

A csont ásványi anyag sűrűségének mérése DEXA módszerrel történt (QDR 4500C, Hologic Inc., Waltham, MA, USA; Software version 9.03) femur nyak és a lumbális csigolyák (L1-4) régiójában. Meghatározásra került a csontok felületi sűrűsége (bone mineral density, BMD, g/cm²), amit összehasonlítva az azonos nemű, fiatal populáció csúcs-csontsűrűségével, és az ettől való eltérés alapján került meghatározásra a régiókhöz szórásegységben számított T-score értékeket. Szintén számításra került az életkor- és nem-specifikus átlagtól való, szórásegységben kifejezett eltérés (Z-score). A mérésekhez a gyártó által megadott referencia értékek kerültek felhasználásra. A kapott adatokat összehasonlítva a betegek azonos gépen mért korábbi eredményeivel kiszámítottam az éves BMD, T- és Z-score változást.

III.4. Molekuláris biológiai módszerek

III.4.1. DNS izolálás

A DNS izolálást perifériás vérmintákból végeztem a kereskedelemben forgalmazott kitek segítségével (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, ROCHE Gmb Basel, Svájc; Qiamp DNA Blood Kit, Qiagen, USA). A DNS mintákat a felhasználásig -80°C-on tároltam.

III.4.2. Allél specifikus PCR reakció

A BclI. és N363S polimorfizmusok vizsgálatához allél specifikus PCR reakciót alkalmaztam. Az amplifikációhoz a BclI. polimorfizmus esetében az alábbi primereket használtam: forward (F): 5'-GAGAAATTCACCCCTACCAAC-3'; reverz (R): 5'-AGAGCCCTATTCAAAGT-3'; vad forward (VF): 5'-CAATTCCTCTCTTAAAGAGATT-3'; mutáns reverz (MR): 5'-GACAAGTTATGTCTGCTGATG-3' (Invitrogene Life Technologies, Glasgow, UK).

A PCR reakciót ThermoCycler (ProFlex PCR System, ThermoFisher Scientific, USA) segítségével végeztem, 25 μ l-es végtérfogatú PCR elegyen, mely tartalmazott 0.3 μ mol/l-t minden felsorolt oligonukleotid primerből, 10mmol/l Tris-HCl-t, 2.5 mmol/l MgCl₂-t, 50 mmol/l KCl-t, 0.2 mmol/l deoxinukleotid trifoszfátot, 0.5U Taq polimerázt (2 \times ImmoMix, Bioline, UK) és 5% glicerolt. A program egy 7 perces denaturációval kezdődik 95°C-on, majd ezt egy 3 lépcsőből álló, 38 ciklusos fázis követi: 95°C, 56°C és 72°C 45-45 másodpercig, és végül egy 10 perces, 72°C-on történő extenzió zárja le.

Az N363S polimorfizmus vizsgálatokor a következő primereket alkalmaztam:

2/4 F: 5'-CCAGTAATGTAACACTGCCCC-3'; 2/4 R: 5'-TTCGACCAGGGAAGTTCAGA-3'; 363-MR: 5'-ATCCCTGGCACCTATTCCAAC-3' (Invitrogene Life Technologies, Glasgow, UK)

A PCR reakciót a BclI. polimorfizmusnál leírt berendezés segítségével végeztem a munkacsoportunk által korábban kidolgozott protokoll szerint, 50 μ l-es végtérfogatú, a BclI. polimorfizmusnál részletezett összetételű PCR elegyen. A program egy 5 perces denaturációval kezdődik 95°C-on, majd ezt egy 3 lépcsőből álló, 34 ciklusos fázis követi: 95°C, 61°C és 72°C 1-1 percig, és végül egy 10 perces, 72°C-on történő extenzió zárja le.

Az amplifikált DNS szakaszokat a BclI. polimorfizmus esetében 2%-os, az N363S polimorfizmus esetében 3%-os agaróz gélen, gélelektroforézis segítségével választottam szét, és ethidium-bromid segítségével, ultraibolya transzilluminátor alatt vizualizáltam.

III.4.3. Valós idejű (real time) PCR reakció

A glukokortikoid receptor gén 9-es exonján található A3669G és a *HSD11B1* génjében fellelhető rs12086634 és rs4844880 polimorfizmusok vizsgálatához valós idejű PCR reakciót használtam, gyártó javaslatának megfelelően, 7500 Fast Real-Time PCR System gépen (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, California, USA), Taqman SNP Assay segítségével (Applied Biosystems). Az eljárás lényege, hogy az SNP-k helyének megfelelően

a vad és mutáns nukleotid szekvenciához két különböző, fluorofór festékkel (jelen esetben FAM és VIC) jelölt próba köthet be, melyeket a gyártó által elkészített reakcióelegy tartalmaz. Az SNP hordozása, illetve nem hordozása (vad típus) esetén a reakció során a két próba egyike köt be, a fluorofór festék felszabadul a gátlás alól és fluoreszcens jelintenzitást bocsát ki, mely a PCR termék mennyiségével arányos és mérhető, az idő függvényében megjeleníthető, grafikonon ábrázolható. Homozigóta vad típus esetén csak az egyik (jelen esetben FAM) festék intenzitása mérhető, homozigóta mutáns genotípus esetén a másik festék (VIC) ad jelintenzitást, heterozigóta hordozói státusz esetén pedig mindkét festék jelintenzitása detektálható. A program paraméterei a következők voltak: 2 perc 50°C-on, majd egy 10 perces denaturáció 95°C-n, ezt egy 2 lépcsőből álló, 40 ciklusos fázis követi: 95°C 15 másodpercig és 60°C 1 percig.

III.4.4. Direkt DNS szekvenálás

A glukokortikoid receptor kódoló régiójának nukleotid szekvenciáját az esetleges mutációk felderítés céljából direkt DNS szekvenálással határoztam meg. Első lépésben PCR-t végeztem, melyhez a Koper és munkatársai által leírt eredeti forward és reverz oligonukleotid primereket használtam. A reakciót ThermoCycler (ProFlex PCR System, ThermoFisher Scientific, USA), 50µl-es végtérfogatú PCR elegyben végeztem. A PCR 0.3 µmol/l-t minden felsorolt oligonukleotid primerből (Invitrogene Life Technologies, Glasgow, UK), 10mmol/l Tris-HCl-t, 2.5 mmol/l MgCl₂-t, 50 mmol/l KCl-t, 0.2 mmol/l deoxinukleotid trifoszfátot, 0.5 U Taq polimerázt (2×ImmoMix, Bionline, UK) és 5% glicerolt, és 100 ng DNS-z tartalmazott. A program egy 10 perces denaturációval kezdődik 95°C-on, majd ezt egy 3 lépcsőből álló, 35 ciklusos fázis követi: 95°C, 60°C és 72°C 45-45 másodpercig, és végül egy 10 perces, 72°C-on történő extenzió zárja le. Az így kapott PCR termékeket 1%-os agaróz gélelektroforézis segítségével vizualizáltam, majd a terméket kivágtam és tisztítottam (DNA extraction kit, Viogene, New Taipei City, Taiwan). Az így nyert terméket BigDye Terminator Cycle-Sequencing Kit segítségével (Applied Biosystems, Foster City, CA), 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems) készüléken szekvenáltam, ezt követően gél-filtráció segítségével tisztítottam (NucleoSEQ, Macherey-Nagel, Düren, Germany).

III.5. Statisztikai módszerek

Az allélfrekvenciák eloszlásának vizsgálatokor Chi-négyzet és Fischer tesztet alkalmaztam. A *GR* és *HSD11B1* polimorfizmusok és a folyamatos változók átlagainak összefüggés-vizsgálatakor egy utas ANOVA-t használtam SPSS statisztikai program segítségével (IBM SPSS Statistics version 19.0, IBM Corp., Armonk, New York, USA). A statisztikai próbák erejének ellenőrzése céljából power analízist alkalmaztam egy online elérhető algoritmus segítségével (<https://www.dssresearch.com/KnowledgeCenter/toolkitcalculators/statisticalpowercalculators.aspx>). $P < 0.05$ és $\text{power} > 80\%$ értékeket tekintettem szignifikánsnak.

III.6. Három dimenziós protein modellezés

A *GR* génben beazonosított variánsnak a fehérjeszerkezetre gyakorolt hatásának vizsgálatára molekula modellezést és analízist az UCSF Chimera package segítségével végeztünk. A *GR* ligandkötő domén koordinátáit a 4UDC PDB struktúrából nyertük.

IV. Eredmények

IV.1. GR polimorfizmusok hatásai

IV.1.1. BclI. polimorfizmus

A 2. intronikus régióban elhelyezkedő BclI. polimorfizmus allélfrekvenciája nem tért el a betegség és kontrollcsoport között. Az SNP szignifikáns összefüggést mutatott a testtömeg-indexszel (BMI, kg/m^2). Homozigóta hordozók esetében a BMI szignifikánsan magasabb volt, mint a heterozigóta genotípussal rendelkezők esetében ($p=0.007$, $\text{power}: 100\%$). Emellett a homozigóta hordozók hydrocortisone ekvivalensre számított napi szubsztitúciós hormondózisa szignifikánsan kisebb volt, mint a heterozigóta hordozóké vagy a vad genotípusú betegeké ($p=0.002$, $\text{power}: 98.9\%$).

IV.1.2. N363S polimorfizmus

Az N363S polimorfizmus allélfrekvenciája szignifikánsan magasabbnak bizonyult az Addison-kóros betegcsoportban, mint a kontroll csoportban (8.0% vs. 3.1%; $p=0,019$), de a klinikai paraméterekkel nem mutatott összefüggést.

IV.1.3. A3669G polimorfizmus

Az A3669G polimorfizmus allélfrekvenciája nem tért el a beteg- és kontrollcsoport között. A betegség a hordozók körében szignifikánsan korábbi életkorban jelentkezett, mint a nem-hordozók esetében (34.5 ± 12.2 vs. 41.05 ± 12.35 év, $p=0.04$) függetlenül a többi SNP hordozói státuszától. Emellett a polimorfizmust hordozók esetében szignifikánsan magasabb volt a diagnóziskor mérhető plazma ACTH szint a nem-hordozókhöz képest (1944 ± 478 vs. 984 ± 144 pg/ml, $p=0.031$, power: 100%).

IV.2. HSD11B1 polimorfizmusok összefüggései

IV.2.1. rs12086634 polimorfizmus

Az rs12086634 polimorfizmus allélfrekvenciája nem tért el a beteg- és kontrollcsoport között. A polimorfizmus szignifikáns összefüggést mutatott az éves Z-score változással a lumbális régióban, hordozókban az éves Z-score csökkenés szignifikánsan nagyobb mértékű volt, mint a nem-hordozókban (-0.12 ± 0.18 vs. -0.07 ± 0.13 , $p=0.01$). Emellett a hordozókban szignifikánsan alacsonyabb denzitás, T- és Z-score értékeket észleltünk a femorális régióban, és szignifikánsan magasabb T-és Z-score értékeket a lumbális régióban, de ezeket az eredményeket a power analízis nem erősítette meg.

IV.2.2. rs4844880 polimorfizmus

Az rs4844880 polimorfizmus allélfrekvenciája nem tért el a beteg- és kontrollcsoport között. Az eredmények alapján az SNP szignifikáns hatást gyakorol a testtömeg-indexre és a testtömeg változására a hormonpótló terápia során. A polimorfizmust hordozókban a BMI szignifikánsan magasabb volt, mint nem-hordozók körében (29.9 ± 3.7 vs. 25.1 ± 5.1 kg/m², $p=0.002$, power: 95.5%). A hormonpótló terápia mellékhatásaként észlelhető testtömeg növekedés hordozók esetében szignifikánsan nagyobb mértékű volt, mint a nem-hordozóknál (17.5 ± 9.87 vs. 4.05 ± 9.95 kg, $p=0.02$, power: 84%). Mindezek mellett a testtömegre korrigált hormon-szubsztitúciós dózis szignifikánsan alacsonyabb volt hordozók körében a nem-hordozókkal összehasonlítva (0.278 ± 0.06 vs. 0.371 ± 0.14 mg/kg/nap, $p=0.018$, power: 94.9%).

A polimorfizmus pozitív hatása volt megfigyelhető az éves denzitás, T- és Z-score változás esetében a lumbális régióban. A denzitás esetében a növekedés szignifikánsan nagyobb mértékű volt hordozóknál, míg a T- és Z-score értékek hordozók esetében növekvő, nem-

hordozók esetében csökkenő tendenciát mutattak (0.024 ± 0.03 vs. 0.001 ± 0.03 , $p=0.017$; 0.22 ± 0.23 vs. -0.03 ± 0.13 , $p=0.005$; 0.26 ± 0.22 vs. -0.003 ± 0.1 , $p=0.003$; power: 92.1%, 90.7%, 96.2%).

Tekintettel arra, hogy a 11- β -HSD enzim 2-es izotípusa (NAD dependens dehidrogenáz, mely a kortizol inaktiválása által védi a mineralokortikoid receptort a túlzott, glukokortikoidok általi aktiválástól) nem metabolizálja a dexamethasont, a betegeket két csoportra osztottam attól függően, hogy a hormonpótló terápiájuk tartalmaz-e dexamethasont. A két csoport között nem volt szignifikáns eltérés az életkor, hormon szubsztitúciós dózis, éhomi vércukor és szérum lipid koncentrációk tekintetében. A dexamethasont nem szedők körében továbbra is szignifikánsan magasabb BMI és nagyobb testsúlygyarapodás volt megfigyelhető az rs4844880 polimorfizmust hordozók esetében, a nem-hordozókkal összehasonlítva (31.2 ± 5 vs. 23.8 ± 4.9 kg/m² illetve 16.2 ± 12.5 vs. 3 ± 8.9 kg). Ezzel szemben a dexamethasont szedőknél ez az összefüggés nem volt megfigyelhető, bár észlelhető volt, hogy a BclII polimorfizmus a dexamethasonnal nem kezelt csoportban szignifikánsan gyakrabban fordult elő, mint a dexamethasont is szedőknél (34.2% vs. 18.3%, $p=0.03$), ami az rs4844880 polimorfizmus hatását tovább árnyalhatta.

Nőbetegek esetében a betegcsoportot két alcsoportra osztottam a fertilitástól függően, a pre- és posztmenopauzális csoport közötti határt az 50. betöltött életévnél húztam meg. Az 50 év feletti, női betegcsoportban az rs4844880 polimorfizmusnak főként a csontsűrűsége gyakorolt jótékony hatása, míg az 50 év alattiakban a testtömeget és BMI-t befolyásoló hatása került előtérbe, és a csontsűrűséget jelző paraméterek között nem volt szignifikáns eltérés.

IV.3. Esetismertetés – R714Q mutáció

31 éves nőbeteg kivizsgálása infertilitás miatt kezdődött meg a Semmelweis Egyetem II. számú Belgyógyászati Klinikán. Anamnézisében érdemi megbetegedés nem szerepelt, 2.5 éves sikertelen gyermekvállalási próbálkozást követően került az egészségügy látóterébe. 13 éves kora óta rendszeres és szabályos menstruációs ciklus jellemezte. A klinikai vizsgálat során a testtömeg-indexe (19.8 kg/m²) és vérnyomása a normál tartományban volt, laboratóriumi leleteiben ioneltérés nem mutatkozott (normokalaemiás volt). Semmilyen Cushing-szindrómára vagy hiperandrogenizmusra utaló fizikális és klinikai tünet nem volt fellelhető, galaktorrhoea sem jelentkezett. Családi anamnézise nem volt érdemi. A kezdeti hormonális vizsgálatok során emelkedett prolaktin érték volt fellelhető (93ng/ml, referencia tartomány: 1.4-

24 ng/ml). További vizsgálatok során ez az eltérés makroprolaktinémiának bizonyult (polietilén glikol – PEG precipitációs érték: 76%), sella MR vizsgálat során két alkalommal sem ábrázolódott kóros eltérés. Az infertilitás apai oka kizárható, hiszen a férjnek az előző házasságából két gyermeke született. Részletes hormonális kivizsgálás eredményei részleges glukokortikoidok iránti rezisztenciára utaltak (**8. Táblázat**). Többször ismételt hormonvizsgálatok során a szérumban a kortizol szint mindig emelkedettnek bizonyult a reggeli órákban (az értékek 35.4 és 26 µg/dl között mozogtak, referencia tartomány: 8-25 µg/dl), míg a plazma ACTH koncentráció vagy a normál tartományban mozgott, vagy azt éppen meghaladta (28.5 és 65 pg/ml között, normál tartomány: 7.2-63.3 pg/ml). A reggeli nyálkörtizol érték kétszer került meghatározásra, mindkét alkalommal emelkedettnek bizonyult (1.36 és 1.13µg/dl, normál tartomány: <0.69), ezzel szemben az éjjeli nyálkörtizol a normál tartományban volt (0.21 és 0.23 µg/dl, normál tartomány: <0.43), ami megtartott kortizol ritmusra utal. Kis dózisú (1mg) dexamethason szuppressziós teszt két alkalommal került elvégzésre, az eredmények inadekvát szérumban a kortizol szuppresszióra utalnak (10 és 15µg/dl, normál: <5µg/dl). A 24 órás vizelet szabad kortizol szint (UFC, urinary free cortisol) 280 és 513 nmol/nap között változott (normál tartomány: 100-379). A szérumban a DHEAS (dehidroepiandrosteron szulfát) szint ismételt mérések során a normál tartományban mozgott, vagy azt éppen meg is haladta (163 és 342 µg/dl, normál tartomány:130-330). A szérumban a androsztendion koncentráció emelkedett volt (344 ng/dl, normál tartomány: 80-280). A szérumban a GH, SHBG, TSH, fT4, LH, FSH, progeszteron és ösztadiol értékek a referencia tartományban voltak.

Genetikai tanácsadást és írásos beleegyező nyilatkozat aláírását követően elvégeztem a GR gén (*NR3C1*, [NM_000176](#)) kódoló régióinak mutáció analízisét. A *GR* gén szekvenálása során egy misszense, heterozigóta mutációra derült fény (c.2141G→A), ami a GR fehérjében egy Arg714Glu aminosavcsere eredményez a 8-as exon régióban, melyet Nader és munkatársai 2010-ben publikáltak elsőként, és patogénnek tekintették. A patogén mutáció azonosítását követően családszűrés keretében a beteg 35 éves, klinikailag egészséges lánytestvérénél is elvégeztem a vizsgálatot. A testvér szintén hordozza a mutációt, ennek ellenére normál szteroid hormonszintekkel rendelkezik, és nincs fertilitási problémája. A család többi tagja nem egyezett bele a genetikai szűrésbe.

Három dimenziós modellezés során a 714 pozícióban lévő arginin a GR ligandkötő doménjének (LBD) 10-es helixében helyezkedik el, a ligand kötő zsebbel ellentétes oldalon, viszonylag messze bármely, ismert funkcionális régiótól. Az arginin nagy, pozitív töltésű

oldallánccal rendelkezik, ami benyúlik a 7-10 hélixek által alkotott részbe. Ezzel szemben a glutaminnak kicsi, töltés nélküli oldallánca van, ami felszabadítja a 10-es hélixet az eredeti pozíciójából, ami további konformációs változásokat hoz létre a ligandkötő zseb szerkezetében. Nader és mtsai. elvégezték a mutáció komplex funkcionális vizsgálatát, melynek során kimutatták, hogy a szimuláció időtartama alatt a mutáns LBD mérete megnövekedett a vad típushoz képest, ami csökkent ligand kötési affinitáshoz vezethet.

A beteg vizsgálata során detektált, és korábban patogénként publikált mutációt nem észleltük korábban, a munkacsoportunk által glukokortikoid rezisztencia és Cushing szindróma irányába vizsgált 60 beteg, illetve kontroll egyén esetében sem. Ezenkívül hiányzott a leggyakrabban használt genetikai adatbázisokból is.

V. Következtetések

1. A glukokortikoid receptor gén BclI. polimorfizmusát homozigóta hordozók esetében a BMI-t szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint a heterozigóta genotípussal rendelkezők esetében. Emellett a homozigóta hordozók hydrocortisone ekvivalensre számított napi szubsztitúciós hormondózisa szignifikánsan kisebb átlagértéket mutatott, mint a heterozigóta hordozóké vagy a vad genotípusú betegeké.
2. A GR gén N363S polimorfizmusának allélfrekvenciája szignifikánsan magasabb volt az Addison-kóros betegcsoportban, mint az egészséges kontroll csoportban.
3. Addison kóros betegcsoportban az A3669G polimorfizmust hordozók körében a betegség szignifikánsan korábbi életkorban jelentkezett, mint a nem-hordozók esetében, függetlenül a többi SNP hordozói státuszától.
4. Az A3669G polimorfizmust hordozó Addison kóros betegek esetében szignifikánsan magasabb volt a diagnóziskor mérhető plazma ACTH szint a nem-hordozókhöz képest.
5. Az rs12086634 polimorfizmus szignifikáns összefüggést mutatott az éves Z-score változással a lumbális régióban, hordozó Addison kóros betegekben az éves Z-score csökkenés szignifikánsan nagyobb mértékű volt, mint nem-hordozókban.
6. Az rs4844880 polimorfizmus szignifikáns hatást gyakorolt a testtömeg-indexre és a testtömeg változására Addison kór hormonpótló terápiája során. A polimorfizmust hordozókban a BMI szignifikánsan magasabb volt, mint nem-hordozók körében, a

testtömeg növekedés hordozók esetében szignifikánsan nagyobb mértékű volt, mint a nem-hordozóknál. Mindezek mellett a testtömegre korrigált hormonszubsztitúciós dózis szignifikánsan alacsonyabb volt hordozók körében a nem-hordozókkal összehasonlítva.

7. Az rs4844880 polimorfizmus pozitív hatása volt megfigyelhető az éves denzitás, T- és Z-score változás esetében a lumbális csigolya régióban. A denzitás esetében a növekedés szignifikánsan nagyobb mértékű volt hordozóknál, míg a T- és Z-score értékek hordozók esetében növekvő, nem-hordozók esetében csökkenő tendenciát mutattak
8. Az rs4844880 polimorfizmust hordozók esetében, dexamethasont nem szedők körében továbbra is szignifikánsan magasabb BMI és nagyobb testsúlygyarapodás volt megfigyelhető a nem-hordozókkal összehasonlítva, ezzel szemben a dexamethasont szedőknél ez az összefüggés nem volt megfigyelhető.
9. Az rs4844880 polimorfizmus az 50 év feletti, női betegcsoportban főként a csontsűrűsége gyakorolt jótékony hatást, míg az 50 év alattiakban a testtömeget és BMI-t befolyásoló hatása került előtérbe, és a csontsűrűséget jelző paraméterek között nem volt szignifikáns eltérés.
10. Direkt DNS szekvenálási módszer segítségével egy korábban már Nader és mtsai által publikált, R714Q mutációt azonosítottam a GR gén 8. exon régiójában, mely a klinikailag enyhe glukokortikoid rezisztenciában szenvedő, klinikánkon infertilitás miatt vizsgált, 31 éves nőbeteg kórképének etiológiai tényezője lehet.

VI. Saját publikációk jegyzéke

1. Molnar A, Patocs A, Liko I, Nyiro G, Racz K, Toth M, Sarman B. (2018) An unexpected, mild phenotype of glucocorticoid resistance associated with glucocorticoid receptor gene mutation case report and review of the literature. BMC Medical Genetics, 19(1):37.
2. Molnar A, Kovesdi A, Szucs N, Toth M, Igaz P, Racz K, Patocs A. (2016) Polymorphisms of the GR and HSD11B1 genes influence body mass index and weight gain during hormone replacement treatment in patients with Addison's disease. Clin. Endocrinol., 85(2):180-188.
3. Molnár Á, Kövesdi A, Sarkadi B, Rác K, Patócs A. (2016) A krónikus glükokortikoidhormon-pótlás aktuális kérdései. Magyar Belorvosi Archivum, 69(1):38-45.

VII. A disszertáció témájától független saját publikációk jegyzéke

Nincs ilyen publikáció.