

Cytokin gén polimorfizmus vizsgálata mikrobiális, valamint komplex aetiológiájú betegségekben

Célkitűzések

A cytokin termelést befolyásoló ún. egy nukleotidos polimorfizmusok (SNPk) szerepét vizsgáltuk olyan betegségekben, ahol a tünetek hátterében feltételezhető a túlméretezett cytokin cascade beindítása akár kórokozók részéről, akár egyéb ágensekkel - pl. szöveti nekrozissal, vagy ezek kombinációjával. A túlméretezett cytokin aktiváció nemcsak szisztémásan, de lokálisan is megnyilvánulhat, fertőző ágensek hatására ugyanúgy, mint pl. egyes haematológiai betegségekben. Így elsősorban az

- a) inficiált pancreas nekrozissal járó szeptikus kórformákat tanulmányoztuk, ahol generalizált cytokin robbanásnak lehetünk tanúi, de érdeklődésünk kiterjedt azokra gastrointesztinális megbetegedésekre is, ahol a cytokin aktiváció lokálisan okozhat problémát, így
- b) *Helicobacter pylori* által kiváltott fekélybetegségekben és
- c) Chron betegségben
- d) A tumor necrosis faktor (TNF- α) és a TGF- β szerepe hematológiai betegségekben is feltételezhető; ezek polimorfizmusait myelodysplastikus szindrómában (MDS) szenvedő betegek esetében vizsgáltuk.
- e) megvizsgáltuk, hogy az ant-TNF terápia eredményessége és a TNF- α SNP között van-e összefüggés.
- f) A humán monocyta-*M.bovis* BCG törzs kölcsönhatását vizsgálva *in vitro* modellben összehasonlítottuk a TNF- α termelést különböző genotípusú donorok esetében.

Elsősorban a TNF- α , az IL-10 az IL-8 és a TGF- β szerepét, valamint ezen cytokinek termelését befolyásoló gének ún. egy nukleotidos polimorfizmusát (SNP) vizsgáltuk a fenti betegségekben, (illetve a BCG törzs tekintetében *in vitro* modellben), aszerint, hogy főként melyik cytokin vagy cytokinek jelentőségét feltételezzük a pathogenezisben. Vizsgálatainkat kiegészítettük a hő-sokk protein- Hsp-70, valamint a szignalizációban fontosnak ítélt CD14, TLR4 és NOD1 receptorokkal kapcsolatos SNP meghatározásokkal.

Módszerek

A betegek perifériás fehérvérsejtjeiből nyertünk DNS-t (ROCHE.) és az így nyert DNS mintákat használtuk fel a genetikai vizsgálatokhoz. Kontrollként egészséges véradók DNS mintáit alkalmaztuk.

Az IL-8 promoter illetve TGF- β un. codon gén polimorfizmusainak vizsgálatokhoz. ARMS módszert alkalmaztunk. A CD14 és a TLR4 SNP vizsgálatokat olvadáspont analízissel végeztük, míg a TNF- α , Hsp-70, IL-10, valamint NOD1 SNP-eket RFLP módszerrel vizsgáltuk.

Eredmények

Cytokin és NOD1 gén polimorfizmusok vizsgálata *H.pylori* pozitív gastritises és ulcusos betegek esetében

A TNF- α és a CD14 promoter polimorfizmusok és a *H.pylori* fertőzést követő betegségek manifesztációja között nem volt szignifikáns összefüggés. Az IL-8 -251 polimorfizmusával kapcsolatosan a magas IL-8 termeléssel járó A/T heterozigota mutánsok előfordulásának frekvenciája viszont szignifikánsan magasabb (65.2%) ulcusban, mint *H.pylori* pozitív, de panaszmentes véradók esetében (36.1%). (Gyulai Z, Klausz G, Tiszai A, Lenart Z, Kasa IT, Lonovics J, Mandi Y. Genetic polymorphism of interleukin-8 (IL-8) is associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulcer. Eur Cytokine Netw. 2004 Oct-Dec;15(4):353-8.) Ezen eredmények birtokában további vizsgálatokat végeztünk a NOD1 receptor E277K SNP meghatározására. A *H.pylori* ugyanis –újabb irodalmi adatok alapján– az intracellulárisan található NOD1 receptort aktiválja, és az így elindított szignalizációs utak IL-8 transzkripcióhoz vezetnek. Vizsgálataink azt bizonyították, hogy magának a NOD1 un.. E277K SNP-nek inkább van relevanciája az ulcus kialakulásában, mint a Toll-like receptor 4- (TLR4) kétféle SNP-jének. (Hofner, P., Gyulai, Zs., F. Kiss Zs., Tiszai, A., Tiszlavicz, L., Tóth, G., Szőke, D., Molnár, B., Lonovics, J., Tulassay, Zs., Mándi Y. : Genetic Polymorphisms of NOD1 and IL-8, but not Polymorphisms of TLR4 Genes, Are associated with *Helicobacter pylori*-Induced Duodenal Ulcer and Gastritis *Helicobacter* **12** 124-131. 2007-).

SNP vizsgálatok acut pancreatitisben

A tumor necrosis factor minden bizonnyal fontos szerepet játszik az acut pancreatitis pathomechanizmusában (Farkas Gy., Márton J., Mándi Y., Leindler L.: Surgical management and complex treatment of infected pancreatic necrosis: 18 year experience at a single center. *J. Gastrointest. Surg.* J Gastrointest Surg. 2006 Feb;10(2):278-85). A TNF- α -308 promoter polimorfizmus tekintetében a súlyos, necrotizáló pancreatitis betegcsoport vizsgálatánál találtunk szignifikáns különbséget az un. TNF2 allél előfordulási gyakoriságában egészséges donorokhoz képest, valamint a pancreatitis viszonylag enyhe lefolyású eseteihez képest.

Bevezettük a Hsp70-2 polimorfizmus vizsgálatokat is, tekintettel arra, hogy éppen korábbi, kooperációban végzett kutatásaink felhívták a figyelmet a stressz proteinek szerepére is. Eredményeink szerint a Hsp70-2 A/G polimorfizmusnak szerepe van a betegség súlyos, vagy enyhe kimenetelében, ugyanis a G allél frekvencia szignifikánsan gyakoribb (53%) a súlyos szövődeményekkel járó pancreatitis eseteiben, mint az. enyhe lefolyású pancreatitis esetekben (18.9 %). Az A allélt mintegy „protektív” allélként tekinthetjük, akár prognosztikai értékkel is. (Balog A., Gyulai Z., Boros L.G., Farkas G., Takács T., Lonovics J., Mándi Y.: Polymorphism of the TNF-alpha, HSP70-2, and CD14 genes increases susceptibility to severe acute pancreatitis. *Pancreas* **30**: 46-50, 2005.). Azt is megállapítottuk, hogy szignifikáns összefüggés van az IL-8 termelést determináló -251 promotor polimorfizmus és a pancreatitis súlyossága között. A magasabb IL-8 termelést determináló A/T heterozygoták száma ugyanis szignifikánsan gyakoribb a súlyos szövődeményekkel járó pancreatitis eseteiben (60 %), mint az. enyhe lefolyású pancreatitis esetekben (42 %). Sem a CD14 -159 sem a TLR4 promotor polimorfizmusok (Asp299Gly és Thre 399Ile) nem mutattak összefüggést az akut pancreatitis súlyos, vagy enyhe lefolyású eseteivel, Az egy nukleotidos mutációk gyakorisága nem tért el szignifikánsan az egészséges kontrollok genotípusától sem. (Hofner P, Balog A, Gyulai Z, Farkas G, Rakonczay Z, Takacs T, Mandi Y. Polymorphism in the IL-8 Gene, but Not in the TLR4 Gene, Increases the Severity of Acute Pancreatitis. *Pancreatology*. 2006 Nov 23;6(6):542-548)

SNP vizsgálatok Crohn betegségben

Az akut pancreatitisben elvégzett SNP vizsgálatokat kiterjesztettük a Crohn betegségben szenvedők csoportjára is. A cytokin gén polimorfizmus vizsgálatainkat kiegészítettük az IL-10 (-1082 G/A) SNP vizsgálattal is. Annak ellenére hogy a cytokin termelés hiányának jelentőséget tulajdonítanak Crohn betegségben, adataink, 133 beteg vizsgálata után nem mutattak correlációt az IL-10 polimorfizmus és a betegség megléte, vagy akár annak súlyossága között. Összefüggést találtunk viszont a Hsp70-2 polimorfizmus és a betegség kimenetele, ill. súlyossága között, amennyiben az A allél hordozás enyhébb esetekben volt szignifikánsan gyakoribb, illetve azokban az esetekben ahol sebészi beavatkozásra nem került sor. (Klausz G., Molnár T., Nagy F., Gyulai Zs., Boda K., Lonovics J., Mándi Y.: The polymorphism of heat-shock protein gene HSP70-2, but not the polymorphisms of the IL-10 and CD14 genes, is associated with the outcome of Crohn's disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **40**: 1197-1204, 2005)

TNF- α és TGF- β gén polimorfizmusok vizsgálata myelodysplasticus syndromában

Egészséges véradókkal összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a refracter anaemiával járó myelodysplastikus szindrómás esetekben nem volt eltérő a TNF- α -308 genotípusok megoszlása. Különbséget figyeltünk meg viszont a TGF- β gén 10-es codonját érintő SNP tekintetében, ha a súlyos, pancytopeniával járó eseteket hasonlítottuk össze az enyhébb lefolyású esetekkel, illetve az egészséges kontrollokkal. Ezek szerint a TGF- β T-29-C SNP-je inkább befolyásolhatja a myelodysplastikus syndroma előrehaladását, mint a TNF- α termelést moduláló genotípus. A magas TGF- β termeléssel járó TT genotípus vizsgálataink szerint közel 7-szeresre emeli a bi-vagy pancytopenia valószínűségét refrakter anaemiás betegekben. (Balog A., Borbényi Z., Gyulai Z., Molnár L., Mándi Y.: Clinical importance of transforming growth factor-beta but not of tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in patients with the myelodysplastic syndrome belonging to the refractory anemia subtype. *Pathobiology* 72: 165-170, 2005)

A TNF- α genetikai polimorfizmus prognosztikai jelentősége ant-TNF (Infliximab) kezelés esetén

-Az igen költséges ant- TNF –Infliximab- terápiát elsősorban rheumatoid arthritisben és Crohn betegségben alkalmazzák. A terapia rezisztencia igen nagy probléma lehet, és nem elhanyagolható az anyagi háttere sem. Az általunk vizsgált betegek közül az un. non-responderek(12 beteg) közül 8 hordozta az A allélt, mely a-308 promotor gén esetében együtt jár a transzkripció fokozódásával. Úgy gondoljuk, a jövőben érdemes lenne a potenciális, anti-TNF terápiában részesülő betegek genotípusának előzetes meghatározása prognosztikai szempontból. (Balog A, Klausz G, Gal J, Molnar T, Nagy F, Ocsovszky I, Gyulai Z, Mandi Y. Investigation of the prognostic value of TNF-alpha gene polymorphism among patients treated with infliximab, and the effects of infliximab therapy on TNF-alpha production and apoptosis. *Pathobiology*. 2004;71(5):274-80) Ehhez természetesen jóval nagyobb számú, és más munkacsoportokkal összehangolt vizsgálatok lennének szükségesek

A TNF- α SNP összefüggése lábszárfekélyel*

*Ez a vizsgálat alapvetően az SZTE Bőrgyógyászati Klinika témája, munkacsoportunk csak kooperáló partnerként vett részt a munka egy részében.. (Nagy N, Szolnoky Gy, Szabad G, Bata-Csörgő Zs, Balogh A, Klausz G, Mándi Y, Dobozy A, Kemény L, Széll M :Tumor Necrosis Factor- α -308 polymorphism and leg ulceration — possible association with obesity

J. Invest. Dermatol. in press) A TNF- α -308 SNP nek jelentősége van a lábszárfekély kialakulásával, amennyiben ezekben a betegekben nagyobb százalékban fordul elő az A allél. Ennek a megfigyelésnek elsősorban obes betegeknél van relevanciája.

A BCG-vel fertőzött monocyták TNF- α termelése; összefüggés a gén polimorfizmussal

A *Mycobacterium bovis* BCG törzs TNF alpha indukáló képességét *in vitro* kísérletekben vizsgáltuk, 50 véradó fehérvérsejt kultúráiban. Humán perifériás vérből származó monocytákat fertőzünk *M. bovis* BCG törzsszel. A human monocyták felülúszóiban meghatároztuk a termelt TNF- α -t (ELISA). Ezzel párhuzamosan flow cytometeres vizsgálatokkal detektáltuk a fagocitált baktériumokat (Erre az ad lehetőséget, hogy a *M. tuberculosis* BCG törzsünk a pMV262 plazmidot hordozza, és U.V. fény alatt pirosan fluoreszkál)Ezzel párhuzamosan teszteltük az egyének DNS mintáiból a TNF-alpha -308 promoter polymorphizmust RFLP segítségével. Igen nagy individuális különbségeket tapasztaltunk TNF termelés terén (351-10.000 pg/ml). A TNF-308 SNP és a mért TNF koncentrációk azonban csak *Staphylococcus aureus* inducer alkalmazása esetén mutattak összefüggést, a BCG által indukált TNF mennyisége és a promoter polymorphizmus azonban nem mutatott hasonló correlációt. Ennek oka valószínűleg az, hogy a különböző kórokozók különböző aktivációs utakon indukálnak TNF-et. (Hofner, P., Gyulai, Zs., Kovács, L., Miczák, A., Mándi, Y.: The role of TNF-alpha polymorphism in Mycobacterium bovis BCG induced TNF production. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **52**: 58. (Abstr).

Összefoglalás

A genetikai polimorfizmusok vizsgálatának jelentősége, hogy egyrészt hozzá segít egyes betegségek pathomechanizmusának megismeréséhez, amennyiben alátámasztja vagy éppen elveti bizonyos mediátorok szerepének jelentőségét. Másrészt prognosztikai tényező szerepét töltheti be a betegségek súlyosságának, előrehaladásának megítélésében.

A témával kapcsolatosan a közleményeken kívül 2 PhD értekezés, 10 előadás külföldi, nemzetközi kongresszusokon, számos előadás hazai kongresszusokon, valamint és 2 TDK előadás született 2004 és 2006. között.

Az alábbi táblázat jelzi, hogy mely betegségekben találtunk összefüggést valamely citokin, illetve receptor, vagy Hsp70 genetikai polimorfizmusával.

SNP	Betegség					
	Duodenalis Fekély n= 69	Gastritis n = 136	Pancreatitis n = 92	Crohn n=133	Myelodysplasticus syndr. n=50	RA* n=50
TNF-α						
-308 G/A	-	-	+	-	-	+
IL-8						
-251 T/A	+	+	+	n.v.	n.v.	n.v.
TGF-β						
T29C	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	+	n.v.
IL-10						
-1082 G/A	n.v.	n.v.	n.v.	-	n.v.	n.v.
CD14						
-159 C/T	-	n.v.	-	-	n.v.	n.v.
TLR4						
A12874G	-	-	-	n.v.	n.v.	n.v.
C13174T	-	-	-	n.v.	n.v.	n.v.
NOD1						
E277K	+	-	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.

+ van összefüggés

- nincs összefüggés

n.v. nem vizsgáltuk

A genotípusokat egészséges véradók genotípusaival , vagy egy adott betegségen belül különböző alcsoportokkal hasonlítottuk össze.