

A középkorú lakosság morbiditásának és mortalitásának összefüggése az MHC centrális régiójában található egyes génvariánsokkal és haplotípusokkal

:

A pályázatban leírt, korábbi vizsgálatainkon alapuló kiinduló munkahipotézisünk a következő volt: a család- és ikervizsgálatok tanúsága szerint a középkorúak morbiditását és mortalitását jelentős részben genetikai faktorok határozzák meg, ezeket a géneket azonban a legkorszerűbb teljes genom szűrési vizsgálatokkal sem sikerült még lokalizálni. Ugyanakkor korábbi saját vizsgálataink azzal a reménnyel biztatnak, hogy létezik egy ilyen genetikai komponens: a fenotípusos C4B*Q0 allél, melynek hordozói sokkal kisebb eséllyel érik meg egészségesen 60. születésnapjukat, mint a nem hordozók. A C4B gén a komplement rendszer egyik fehérjéjét, a C4-et kódoló két gén (C4A és C4B) egyike. A két gén egymás közvetlen közelében a 6-os kromoszóma rövid karján található MHC (fő hisztokompatibilitási komplex) régió centrális (más néven MHC III osztályú) részén helyezkedik el. Mai ismereteink szerint mindkét génre jellemző a kópia szám polimorfizmus, azaz mind a C4A, mind a C4B gén 0, 1, 2 vagy igen ritkán 3 kópiaszámban lehet jelen egy kromoszómán. Azt az állapotot, amikor az illető egyénben a két kromoszómán összesen csak 1 C4A gén található, C4A*Q0-nak, amikor viszont csak 1 C4B gén van jelen, C4B*Q0-nak nevezzük, a korábbi fenotipizáláson alapuló, de még ma a genotipizálás korában is alkalmazott nomenklatura szerint.

A munkahipotézis igazolása és az összefüggés okainak feltárása céljából a következő vizsgálatokat terveztük:

1. Mivel a fenotípusos C4B*Q0 allél kimutatása azonban szubjektív meghatározáson és nem magának a génnek, hanem a génterméknek a vizsgálatán alapul, feltétlenül szükségesnek tartjuk az eredmények utánvizsgálatát korszerűbb genotipizáláson alapuló metodikával. Ezt az eljárást magunk dolgoztuk ki és vezettük be.
2. Az új, a C4A és C4B gének kópiaszámának meghatározását lehetővé tevő módszer segítségével egy nemzetközi kollaboráció keretében szeretnénk volna arra választ káni, hogy a C4B*Q0 hordozók fokozott hajlam a cardiovascularis megbetegedésekre és magasabb korai mortalitásuk egy másik kaukázusi populációban is igazolható-e?
3. A C4B*Q0 genotípus és a cardiovascularis morbiditás/mortalitás közötti összefüggés egyik magyarázata az lehet, hogy a genotípus része egy, az MHC régióban gyakori ősi, az egész régióra kiterjedő egyik haplotípusnak, így a genotípus csak markere egy, ehhez a haplotípushoz tartozó és a betegséggel összefüggő más génvariánsnak. Ezért célul tűztük ki, hogy magyar populációban családvizsgálat segítségével meghatározzuk az ősi MHC

haplotípusok előfordulási gyakoriságát (ilyen vizsgálat hazánkban még nem történt, és nemzetközileg is csak kevés hasonlót közöltek) és ezek viszonyát a C4B*Q0 hordozáshoz.

4. Részben jelen OTKA projekt részben más források felhasználásával, részben más pályázatok támogatásával egy másik lehetőséget is megvizsgáltunk: feltételeztük, hogy a C4B génnel szomszédos, a szteroid anyagcsere kulcsenzimét, a 21-hidroxyáz kódoló CYP21 gén működési zavara és a C4B*Q0 kapcsolódik egymáshoz és így a szteroid anyagcsere zavara lenne a felelős a C4B*Q0 hordozók magas cardiovascularis morbiditásáért és mortalitásáért.

5. Az a tény, hogy az OTKA projekt keretében sikerült meghatározni a magyar lakosságban az ősi haplotípusok előfordulását lehetővé vált az, hogy megvizsgáljuk az MHC haplotípusok és egy további, a középkorú és idős lakosság morbiditásáért felelős betegség a colorectalis carcinoma közötti kapcsolatot is

6 Végül a projekt címében leírt célkitűzést egy kissé tágabban (immungenetikai faktorok és emberi betegségek kapcsolata) értelmezve, több rangos nemzetközi folyóiratokban megjelent közleményben számoltunk be egy nem a 6-os kromoszómán kódolt mkomplement-komponenst az MBL (mannóz-binmding lektin) genetikai variánsai és egyes betegségek közötti asszociációról.

A továbbiakban a fenti célkitűzések szerint csoportosítva számolunk be négyéves munkánk eredményeiről.

1. Új módszer kidolgozása a C4A és C4B gének kópiaszámának meghatározására

A C4A és C4B génszám meghatározására korábban egy korszerű módszert írtak le (Blanchong et al, J.exp.Med,2000), amelyet munkacsoportunk is bevezetett, ez azonban nem alkalmas nagymennyiségű minta rövid idő alatt történő vizsgálatára. Ezért új eljárást kellett kidolgoznunk, amely 2005-ben meg is történt (Szilágyi et al, BMC Genetics, 2006) . A módszer, amely a real time PCR metodikán alapszik, napi 40 minta vizsgálatát teszi lehetővé. Az eljárás használatával elvégeztük a pályázatunkban részletesen leírt, a hazai lakosságot nemben, életkorban és morbidításban reprezentáló, a DEOEC Népegészségügyi Iskolájában összegyűjtött DNS minták egy részének analízisét. A 30-39 éves korcsoportból 169 egyén mintáját, a 60-69 éves korcsoportból 139, míg a 70-79 éves korcsoportból 75 mintát vizsgáltunk. :Később ugyanebből a mintákból meghatároztuk az MHC III osztály több genetikai opolimorfizmusát is és az a csoport szolgált a colorectalis carcinomában és myeloma multiplexben végzett, később ismertető vizsgálataink kontrolljául (Az első részjelentésben közölt eredmények a C4B*Q0 hordozók arányszámának korrallal történő

csökkenéséről sajnos, a közlés előtt történő ellenőrzés során tévesnek bizonyultak).

2. A C4B*Q0 és a fokozott cardiovascularis morbiditás és mortalitás közötti kapcsolat megerősítése az új genotipizálási módszer segítségével, a dohányzással való kapcsolat kimutatása

Az izlandi kollaboráció során először azt vizsgáltuk, hogy a C4B*Q0 hordozók kisselektálódhatnak-e az egészséges izlandi populációból is, majd azt, hogy ebben a népességben is összefügg-e C4A és C4B génszám a coronaria betegség és a myocardialis infarctus iránti fokozott hajlammal (Arason et al, Clin. Exp. Immuno., 2007) Egy további vizsgálatunkban pedig a myocardialis infarctus korai halálozása és a C4B*Q0 genotípus közötti kapcsolatot igazoltuk (Blaskó et al. Intzernat Immuno, 2008) E vizsgálatot elsősorban az újonnan kidolgozott genotipizálási módszerünkkel végeztük el.

Az első kérdésre azt a választ kaptuk, hogy az egészséges izlandi idős, sőt már az 50 éven felüli populációban is lecsökken C4B*Q0 hordozók előfordulási gyakorisága, ez azonban csak azokban következik be, akik a vizsgálat idején rendszeresen dohányoztak vagy 3 évnél rövidebb ideje szottak le a dohányzásról. Az eredményeket a cikk (Arason et al, 2007) 1. ábráján mutatjuk be.

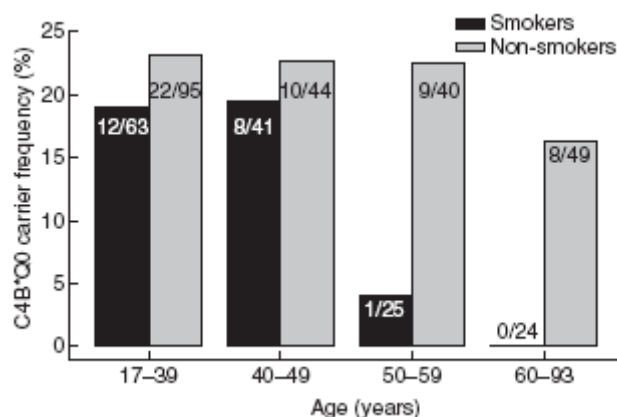


Fig. 1. Carrier frequencies of C4B*Q0 in smoking (current smokers + quitters in < 3 years) and non-smoking (never smokers + quitters in \geq 3 years) healthy Icelandic people at different ages. The decrease in smokers with age is significant ($P = 0.008$, χ^2 test for trend), while no significant changes ($P = 0.395$) occurred in the group of non-smokers (never smokers and former smokers).

A második kérdés vizsgálata során meghatároztuk a C4B*Q0 hordozók arányszámát 74 angina pectorisban (AP) szenvedő, 85 friss myocardialis infarctusos (AMI) betegben, 112 olyan betegben aki túlélte egy korábbi myocardialis infarctust, és 382 korban és nemben illesztett kontroll egyénben. Az előző vizsgálat tanúsága szerint a vizsgált egyéneket a dohányzási szokásaik alapján két csoportra osztottuk fel. A C4B*Q0 hordozó frekvencia az azonos korú egészséges egyénekhez hasonlóan szignifikánsan magasabb volt a dohányzó AP betegekben ($P=0.005$) és az AMI-ban szenvedőkben ($P=0.0003$). A nem-dohányzóknál ugyanakkor szignifikáns különbséget nem észleltünk. A dohányzás és a C4B*Q0 hordozás közötti interakciót nemcsak Izlandon, de egy újonnan gyűjtött magyar betegcsoporton is iagaolni tudtuk, mint ezt a cikk alábbi táblázata mutatja

Table 3. Carrier frequency of C4B*Q0 in ≥ 50 -year-old smoking and non-smoking Hungarian controls and patients with severe cardiovascular disease (CVD).

Group	No. (%) of C4B*Q0 carriers		P-value*
	Controls	CVD patients	
Age, years	59.6 \pm 11.0	60.7 \pm 6.4	
Non-smokers	20/54 (37%)	28/72 (39%)	0.855
Smokers	1/17 (6%)	43/130 (33%)	0.023
P-value*	0.015	0.440	

*Fisher's exact test.

A harmadik kérdés az AMI utáni halálozás és a C4B*Q0 hordozás közötti kapcsolat vizsgálatát szintén izlandi kollaborációban végeztük (Blaskó et al, Internat Immunol, 2008) A vizsgálatot 142 betegben végeztük, akiknek az AMI után egy évig regisztráltuk a halálozását. A C4génszám meghatározása mellett egy másik, szintén a centrális MHC régióban kódolt, és az AMI utáni halálozással japán populáción összefüggésben hozott génpolimorfizmussal a lymphotoxin-alpha 252 A>G promoter polimorfizmust is meghatároztuk a betegekben.

A C4B*Q0 és a halálozás közötti kapcsolat erősségét a cikk 3. ábrájával illusztráljuk. Láthatjuk, hogy a 0 vagy 1 C4B gén hordozóknak (C4B*Q0) több, mint 3-szor nagyobb volt az esélyük arra, hogy az AMI-t követő 1 éven belül meghaljanak (a halál legtöbb estében már a kórházi tartózkodás alatt bekövetkezett), mint a nem hordozóknak,. Ebben az összefüggésben is megvizsgáltuk a dohányzás hatását és kiderült, hogy míg a vizsgálat idején is rendszeresen dohányzóknál szignifikáns ($P=0.022$) esélyarányt (4.25 (1.24-14.59)) kaptunk,

addig a nemdohányzóknál ilyen összefüggés nem állt fenn. Nem bizonyítottunk szignifikáns kapcsolatot az LTA 252 A>G polimorfizmus hordozás és a korai halálozás között sem

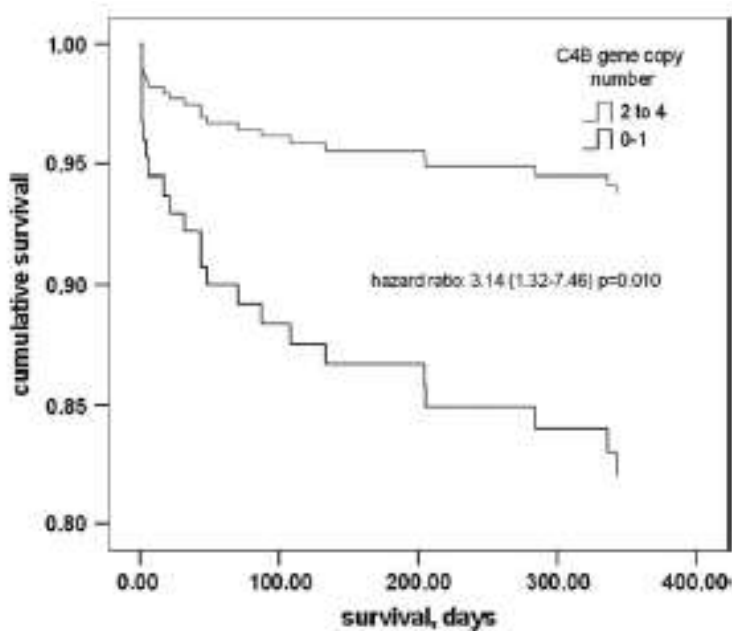


Fig. 3. Survival in 1 year after the development of AMI of Icelandic patients with AMI low (0–1) and high (2–4) C4B gene copies in the genome of patients. Results of Cox regression analysis adjusted to variables enlisted in Table 2 are indicated.

Tehát ezekben a vizsgálatokban egy új korszerű eljárást használva sikerült megerősítenünk korábbi eredményeinket a C4B*Q0 genotípus hordozók magasabb cardiovascularis morbiditására és mortalitására vonatkozóan és új megállapítást is tettünk: ezek az összefüggések csak a rendszeres dohányzókra vonatkoznak.

Összefüggést találtunk a C4B gének száma és a betegség lefolyása között egy másik, ritka, de nagy halálozással járó megbetegedés, a C1-inhibitor genetikus hiányán vagy diszfunkcióján alapuló hereditár angiooedéma lefolyása között. Vizsgálatainkban (Blaskó et al, Mol Immunol, 2007) azt találtuk, hogy a magas (3 vagy 4) C4B kópia számot hordozó betegek a ritka rohamgyakoriságúak közé tartoznak elsősorban, és ezért a diagnózis felállítására is sokkal későbbi életkorban kerül sor, mint az alacsony C4B kópiaszámú betegek esetében

*3. Ösi kiterjesztett MHC haplotípusok a magyar populációban és viszonyuk a C4B*Q0 és a C4A*Q0 genotípushoz és egyes betegségekhez*

A célkitűzéseinknek megfelelően az OVSZ (korábban Országos Gyógyintézeti Központ) Immungenetikai Osztályával együttműködésben 52 család 104 szülőjétől és 107 gyermektől gyűjtöttünk mintát (7 családban egy, a többiben legalább 2 gyermektől állt DNS preparálásra vérminta rendelkezésre). Mind a gyermekekben mind pedig a szülőkben meghatároztuk a

C4A és C4B gének számát, valamint a RAGE gén -429 T/C promoter polimorfizmusát, a HSP70-2 -1267 T/A polimorfizmusát, a TNF α -gén -308 A/G promoter polimorfizmusát, valamint a lymphotoxin- α gén 259 G/A polimorfizmusát és a centrális MHC régióban kódolt komplement B faktor slow/fast (S/F) polimorfizmusát. Minden családtag MHC I osztályú (HLA-A, -B és C) valamint MHC II. osztályú génjeit az OVSZ-ben már meghatározták, mint ezt a csontvelő donor kutatás protokolla előírja. És ez lehetővé tette, hogy egyszerű számítás segítségével meghatározzuk, hogy a szülők milyen MHC haplotípust hordoztak. Végül 100 szülő 200 kromoszómájának haplotípusát ismertük így meg. Már említettük, hogy eddig nagyon kevés ilyen vizsgálat eredményét közölték az irodalomban. Ezek közül számban kiemelkedik az a vizsgálat, amelyet Bostonban, Chester Alper munkacsoportja végzett a nyolcvanas években kb, 1000 egészséges, a kaukázusi rasszba tartozó egyén kromoszómáján. Levelezésbe kezdtünk Alperrel, akivel korábban munkacsoportunk már együtt dolgozott. Ennek során kiderült, hogy a bostoni vizsgálat teljes anyagát még sohasem közölték. Ezért elhatároztuk, hogy a bostoni és a magyar családvizsgálatok eredményét együtt közöljük. Jelenleg a már elkészült dolgozat-vázlat korrekciójának stádiumában vagyunk, a dolgozat remélhetőleg 2009 első félévében el lesz küldve közlésre egy magas impakt faktorú folyóiratba. Röviden néhány adatot és következtetést írunk itt le. 1) Három család 6 szülője cigány származású volt, ezért ezeket a további elemzésből kizártuk, végül 188 szülői kromoszómát analizáltunk. 2) 52 kromoszómán találtunk 15-féle ismert ősi haplotípust, amelyek mind a bostoni mind a magyar populációban legalább 1%-ban (ez a kiterjesztett haplotípus kritériuma) előfordultak. 2) Az ezeknek a haplotípusoknak a két kaukázusi populációban regisztrált előfordulási gyakorisága erős korrelációt ($R=0.5033$ ($p=0.020$)) mutatott egymással 3) Ezen kívül a magyar populációban 36 kromoszómán 15 olyan kiterjesztett ősi haplotípust találtunk legalább két példányban, amelyeket más populációkban még nem írtak le és nem vagy csak minimális számban voltak jelen a Bostonban vizsgált populációban is. A magyar népesség eredete szempontjából érdekesnek látszik az a megfigyelés, hogy három újonnan leírt haplotípus, amely jelen vizsgálatban 10/188 (5.5%) kromoszómán fordult elő igen gyakori (12.5%, 3.7%, ill 8.8%) egyik legközelebbi nyelvrokonainkban a manysi populációban. Ez a megfigyelés (a szegedi, Raskó István által vezetett csoport mitochondriális DNS ill. Y kromoszómán végzett vizsgálataihoz hasonlóan) arra mutat, hogy bár a magyar lakosság túlnyomó többségében a kaukázusi rasszhoz tartozik, kis százalékban hordoz a finn-ugor népekre jellemző kromoszómákat is. 4) Mivel a bostoni vizsgálat során még fenotipizálással határozták meg a C4A és C4B gének variánsait, mi pedig genotipizálás segítségével végeztük el a vizsgálatot, közvetlenül is össze tudtuk hasonlítani a

két módszert. Az összehasonlításból arra lehetett következtetni, hogy a C4A és C4B gének számának közvetlen mérésével is (néhány kivételtől eltekintve az egyes kiterjesztett MHC haplotípusokra jellemző mintázatot lehet megállapítani.

Ezután azt vizsgáltuk, hogy a C4B*Q0 (tehát a kromoszómán a C4B gén hiánya milyen gyakran mutatható ki az egyes kiterjesztett ősi haplotípusokban, és van-e olyan haplotípus amelyben a C4B*Q0 hordozók jellemzően előfordulnak. Ilyen haplotípust nem találtunk, -féle olyan haplotípus fordult elő, amely nem tartalmazott C4B gént. Ezt az eredményt a c. folyiratnak a a kópiaszám polimorfizmusokról szóló, 2009 elején megjelenő különszámában közöltük (Szilágyi and Füst, 2009) , ennek a ábrájával mutatjuk be az eredményeket. A kópiaszám polimorfizmusok későn felismert csak néhány éve vizsgált területe a humán genetikának, ez lesz az első, a témával foglalkozó újság különszám. Munkacsoportunk nemzetközi elismertségét mutatja az a megtisztelő felkérés, hogy az újság szerkesztője felkért minket egy összefoglaló megírására a különszámában.

A magyar haplotípusok meghatározásának „melléktermékeként” két, nemrég közölt dolgozat született. Az egyik (Kaur et al, Human Immunology, 2008) arról szól, hogy az ióndiai populációban az autoimmun betegségekhez társuló un. 8.1 variáns ősi haplotípus más MHC III alléleket tartalmaz, mint a kaukázusi populációban nagy gyakorisággal előforduló, az autoimmun betegségekkel asszociált ősi 6.1 haplotípus. A másik (Pozsonyi et al, Mol. Immunol, 2009 Jan 22. [Epub ahead of print]) dolgozatban arról írunk, hogy a természetes autántitestek szintjét a HLA-DR16 és –DR15 allélek hordozás ellenkező irányban befolyásolja, arra mutatva, hogy az MHC II osztályú gének az antigén-indukálta ellenanyagok mellett a természetes autoantitestek képződését is szabályozzák

Kimutattuk azt is, hogy az ischaemiás stroke egyik gyakori formájában , a lacunaris strokeban szenvedő betegekben sokkal ritkábban fordul elő a TNF2 allél, mint az egészséges kontrollokban (Harcos et al, Cytokine, 33, 100). Hasonló protektív szerepet játszik újabb vizsgálataink szerint a TNF2 allél a myeloma multiplex kifejlődésével ((Kádár et al Leukemia Res, 2008), ill a 8.1 ősi haplotípus cysticus fibrosos betegekben halálosához vezető kolonizációval szemben (Laki et al, Intern. Immunol, 2006)

*4. A C4B*Q0 genotípus és a fokozott cardiovascularis morbiditás és mortalitás között összefüggés egyik lehetséges magyarázata: a 21-hidroxiláz enzimet kódoló CYP-21 gén szekvenciája és a C4A/C4B génszám közötti összefüggés vizsgálata*

Munkahipotézisünk szerint az un. RCCX modulban a C4B gén mellett elhelyezkedő CYP21 (21-hidroxiláz) deficienciája lenne a felelős a fenti kapcsolatért. Ezért 96 egészséges

egyénben meghatároztuk a C4A és a C4B gén kópiaszámot és a CYP21 gént megszekvenáltuk. A kérdés az volt: van-e olyan polimorfizmus a 21-OH génben, amely szorosán kapcsolódik a C4B alacsony kópiaszámához. A gén 4. intronjában találtunk két ilyen SNP-t (1106 C/A and 1113 T/C), ezek ritka alléljei két mintasorozatban is csak alacsony C4B kópiaszámú egyéneknél fordultak elő (Blaskó et al, Human Immunology, közlésre elküldve). A munkát a továbbiakban funkcionális genetikai vizsgálatokkal folytatjuk, arra a kérdésre keresve választ, hogy a ritka allél hordozókban rosszabb-e az enzim funkciója, mint a vad allél hordozóiban. Ha ezt sikerül bizonyítanunk, akkor közelebb kerülünk az alacsony C4B kópiaszám és a magas cardiovascularis betegség morbiditás és mortalitás szoros összefüggésének magyarázatához.

5. A 8.1 haplotípus, mint a colorectalis carcinoma új genetikai rizikófaktora..

Mivel a 8.1 ősi haplotípus és a különböző szervek malignus daganatai közötti összefüggésről sok vizsgálat látott napvilágot az utóbbi években, az eredmények azonban ellentmondásosak, lényegesnek látszott egy ilyen vizsgálat elvégzése. A vizsgálatot az tette lehetővé, hogy (mint ezt már feljebb leírtuk) meghatároztuk a C4A/C4B kópiaszámot és néhány az MHC régióban kódolt genetikai polimorfizmust (TNF- α 2308 G > A, RAGE 429T > C, HSP70-2 21267 A > G, LTA 252 A > G) 143, az idős magyar lakosságot reprezentáló DNS mintában. A klinikánkon gondozott 183 colorectalis carcinomában szenvedő betegből nyert DNS mintában is elvégeztük ezt a meghatározást majd a kapott eredményeket összehasonlítottuk a 8.1 ősi haplotípus szignifikánsan ($P < 0.006$) gyakrabban fordult elő betege (19.1%), mint a kontrollok (7.7%) csoportjában. A 8.1 ősi haplotípus hordozóinak a nemhez és életkorhoz illesztett esélye arra, hogy a colorectalis carcinoma csoportba tartozzanak 2.514 (1.130–5.594). volt, Ez a kockázat magasabb volt nőkben (3.771 (1.302–10.927)). és a 87 évnél fiatalabbak esetében (4.073 (1.317–12.596)). A cikk (Tóth et al, Int. J. Cancer, 2000) 1 ábráján mutatjuk be ezt az összefüggést

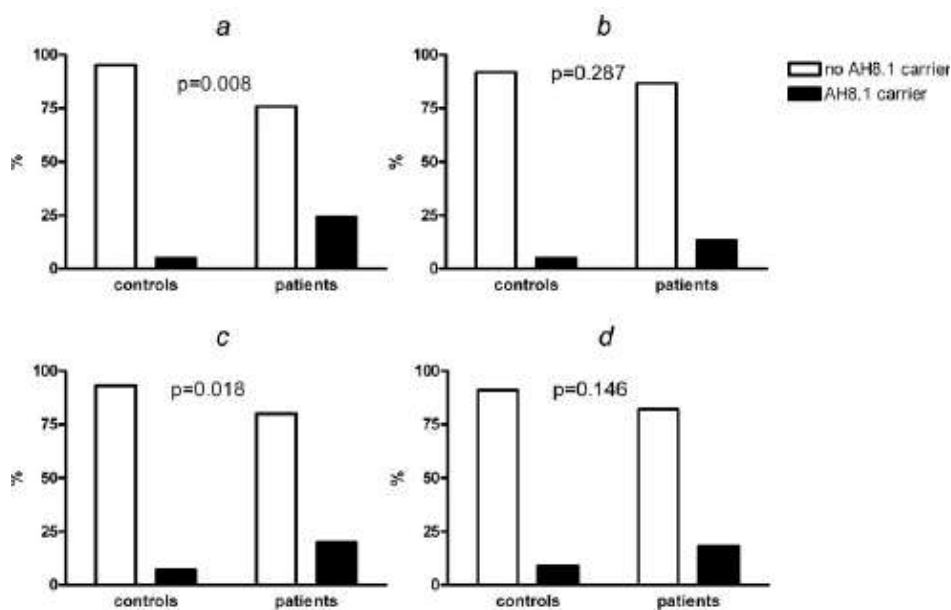


FIGURE 1 - Percentage of the carriers and non-carriers of LTA 252A + TNF α -308A + HSP70 1267G + RAGE -429T haplotype in controls and patients with colorectal cancer ≤ 67 years (a) and >67 years (b) old; in females (c) and males (d).

Ez az eredmény megfelel az ovarium carcinomás betegek esetében nemrégiben közölt megfigyeléseknek és magyarázatot szolgáltat arra, hogy míg a 8.1 ősi haplotípust hordozó férfiak életkilátásai jobbak, mint a nem-hordozóké, a nők esetében ellenkező irányú az összefüggés

6. Egyéb vizsgálatok

Nemzetközi kollaboráció keretében sikerült igazolnunk, hogy a korai kezdetű szisztémás lupus erythematosusban szenvedő betegek sokkal gyakrabban hordozzák a mannóz-binding lektin (MBL) egy X-nek nevezett promoter allélját homozigóta formában, mint azok a betegek, akikben a betegség későbbi életkorban került felismerésre (Jakab L. et al, Clin Immunol., 2007)

Legújabb vizsgálatunkban (Széplaki et al, Atherosclerosis, 2008) bizonyítani sikerült, hogy a korai komplement aktiváció jelentős szerepet játszik az ischaemiás stroke okozta agyi szövetkárosodás mechanizmusában. Az aktiválódás mértéke összefüggött a betegek MBL genotípusával.

Pályázatunkban projektől várható legfontosabb eredményeket a következőkben fohóglaltuk össze:

- A középkorúak korai morbiditásáért és mortalitásáért felelős, eddig nem karakterizált allélek vagy haplotípuso(ok) megismerése.
- Az MHC III régió ősi haplotípusainak feltérképezése

- Az MHC I és II régió (HLA I és II osztály) és a centrális MHC régió közötti kapcsolatok feltárása

A fentiekben leírtak szerint ezeket a célkitűzéseket sikerült teljesíteni és a kapott eredményeinket számos, rangos nemzetközi folyóiratokban megjelent közleményben publikáltuk.