

A kutatások célpontját a glükokortikoid hatás pre-receptor szabályozásában kulcsszerepet játszó  $11\beta$ -hidoxiszteroid dehidrogenáz ( $11\beta$ -HSD) enzimet kódoló, illetve a glükokortikoidok hatását közvetítő glükokortikoid-receptort kódoló gének természetes variánsai képezték. A kortikoszteroid bioszintézis és metabolizmus faj-specifikus jellegzetességei és a humán adatok feltételezett fontossága miatt a vizsgálatokat humán mintákon, illetve humán cDNS-t expresszáló in vitro rendszerekben végeztük.

A kutatások alapvető célja annak a hypothesznek a vizsgálata volt, hogy a kortizol hatás, metabolizmus, ill. érzékenység változásával járó betegségek hátterében komplex genetikai tényezők állnak és a klinikai fenotípus kialakításában a  $11\beta$ -HSD enzimet és GR-t kódoló gének polimorfizmusai együttes szereppel bírnak. A kutatások legfontosabb eredményeit

I. A kortizol-metabolizmus új mérő módszerei a glükokortikoid hatás, metabolizmus, vagy érzékenység változásával járó betegségekben szenvedő betegekben

II. Glükokortikoid receptor gén polimorfizmusok fiziologiás és pathofiziologiás szerepének vizsgálata

III. HSD11B1 gén polimorfizmusok fiziologiás és pathofiziologiás szerepének vizsgálata

címszavak alatt mutatjuk be.

## **I. A kortizol-metabolizmus új mérő módszerei a glükokortikoid hatás, metabolizmus, vagy érzékenység változásával járó betegségekben szenvedő betegekben**

I.1. Az utóbbi évek nemzetközi vizsgálatainak alapján a szérumban nagyrészt fehérjéhez kötött formában jelenlevő kortizol koncentrációjához képest a nyál kortizol koncentrációja pontosabban jelzi a biológiailag aktív kortizol mennyiségét, ezért vizsgálatainkban fontosnak tartottuk klinikai mintákban a nyál kortizol vizsgálat alkalmazhatóságának és előnyeinek pontosabb felmérését. Endogén Cushing-szindrómában ( $n=9$ ) és egyéb endokrin betegségben szenvedő betegekben ( $n=117$ ) kétféle módszerrel elemeztük a nyál kortizol vizsgálat diagnosztikai értékét és a glükokortikoid aktivitás felméréséhez használt konvencionális tesztekhez viszonyított előnyeit. Megállapítottuk, hogy a nyál kortizol vizsgálat felülmúlja az endogén Cushing-szindróma kórismézésére használt konvencionális tesztek diagnosztikai értékét, azonban a nyál kortizol vizsgálat cut-off értéke módszerfüggő.

I.2. A  $11\beta$ -hidoxiszteroid dehidrogenáz ( $11\beta$ -HSD1) enzim aktivitását mind a növekedési hormon (GH), mind az inzulin szabályozza, azonban a GH-túltermeléssel járó acromegáliában gyakran előforduló hyperinsulinizmusnak a kortizol metabolizmusára kifejtett hatását még nem vizsgálták. 76 aktív acromegáliában szenvedő és kezelés hatására gyógyult 68 acromegáliás beteg nagyszámú szérumban mintájának (562 minta) vizsgálatával kimutattuk, hogy a  $11\beta$ -HSD1 aktivitást jelző szérumban F/E hányados aktív betegségben szignifikánsan alacsonyabb, mint a kezelés hatására gyógyult acromegáliás betegekben. Kimutattuk továbbá, hogy inzulin rezisztenciával és hyperinsulinizmussal járó 2. típusú diabetesben vagy csökkent glükóz toleranciában szenvedő aktív acromegáliás betegekben az F/E hányados szignifikánsan alacsonyabb volt a normális szénhidrát anyagcserejű esetekben észlelt F/E hányadoshoz képest. Ezek a megfigyelések a nemzetközi irodalomban elsőként mutatnak rá arra, hogy a betegség aktív stádiumában levő acromegáliás betegekben gyakran észlelhető szénhidrát-anyagcsere zavarnak jelentős szerepe lehet a kortizol metabolizmus modulálásában.

I.3. Nemzetközi szaklapban felkérésre készült összefoglaló közleményben áttekintettük a szteroid bioszintézis zavarral és egyéb kórállapotokkal összefüggő androgén-túltermelés farmakológiai gátlásának lehetőségeit és elemeztük a terápiában használt pharmaconok szerkezet-hatás összefüggéseit.

## **II. Glukokortikoid receptor gén polimorfizmusok fiziologiás és pathofiziologiás szerepének vizsgálata**

II.1. Cushing szindrómában szenvedő betegekben (35 ACTH-termelő hypophysis adenoma és 25 kortizol-termelő mellékvese adenomás beteg) meghatároztuk a glukokortikoid receptor (*GR*) gén négy funkcionális variánsának (BclI, N363S, ER22/23EK, A3669G) allél-gyakoriságát és összefüggést kerestünk az allél-variánsok jelenléte és a klinikai/hormonális paraméterek között. Megállapítottuk, hogy a 4 funkcionális *GR* gén variáns gyakorisága nem különbözött a kontroll csoportban (129 egészséges egyén) észlelt gyakoriságtól. A klinikai paraméterekkel való összefüggések tanulmányozásával azonban kimutattuk, hogy a BclI allélt homozigota formában hordozó Cushing szindrómás betegekben a combnyak régióban a csont ásványianyag tartalma szignifikánsan kisebb, míg a csontbontást jelző szérumbéta-Crosslaps koncentráció szignifikánsan nagyobb volt a vad típust hordozó betegekben mért adatokhoz képest. Az N363S, ER22/23EK és A3669G polimorfizmusok esetében nem találtunk összefüggést a csontanyagcsere paraméterekkel vagy egyéb klinikai jellemzőkkel. Az eredmények közlésével a nemzetközi irodalomban elsőként mutattunk rá, hogy Cushing szindrómás betegekben a BclI polimorfizmus módosíthatja a csontszövet glukokortikoidok iránti érzékenységét.

II.2. Hormontúltermelés klasszikus tüneteivel nem járó mellékvesekéreg adenomás betegekben a glukokortikoidok iránti érzékenység növekedésével járó *GR* gén N363S polimorfizmus nagy allél-gyakoriságát korábbi vizsgálatainkban mutattuk ki. E betegekben a mellékvesekéreg daganat enyhe glukokortikoid túltermelése és az atheroscleroticus kockázati tényezők gyakori előfordulása közötti kapcsolat vizsgálatára 47 mellékvese műtéttel kezelt és 78 műtéttel nem kezelt betegben átlagosan 9,1 éves követési idő alatt elemeztük a hipertonia, csökkent glükóz tolerancia, 2. típusú diabetes, hyperlipidaemia és elhízás gyakoriságának változását. Megállapítottuk, hogy a követési idő kezdetén és végén a műtéttel kezelt és nem kezelt betegekben nem különbözött az atheroscleroticus kockázati tényezők gyakorisága. A követési idő alatt a két betegcsoportban hasonló gyakorisággal jelentkezett angina pectoris, szívizom infarktusz, és cerebrovascularis stroke. Eredményeink nem támasztották alá az enyhe glukokortikoid túltermelés pathogenetikai szerepét az e betegekben nagy gyakorisággal észlelt atheroscleroticus kockázati tényezők és komplikációk kialakulásában, ugyanakkor más tényezők, mint pl. a glukokortikoidok iránti fokozottabb érzékenység lehetséges szerepét vetették fel.

II.3. Klinikai megfigyelések szerint a terhesség alatti túlzott testsúly és testtömeg index (BMI) növekedés előrejelzője lehet a testsúly és BMI hosszú távú növekedésének és a metabolikus szövődmények kialakulásának. 300 egészséges terhes nőben a *GR* gén funkcionális polimorfizmusainak vizsgálatával kimutattuk, hogy az ER22/23EK polimorfizmus jelenléte esetén a terhességi alatti testsúly és BMI növekedése szignifikánsan kisebb a polimorfizmust nem hordozó terhesekhez képest. Ez a megfigyelés a nemzetközi irodalomban elsőként utal az ER22/23EK polimorfizmus védő szerepére a terhesség alatti túlzott testsúly és BMI növekedéssel szemben.

II. 4. A *GR* gén 4 funkcionális polimorfizmusának allél-gyakoriságát és a klinikai paraméterekkel való lehetséges összefüggéseket 150 preeclampsiaiban szenvedő terhes nőben és a preeclampsia súlyos formájának tekintett HELLP szindrómában szenvedő 17 terhes nőben vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a BclI polimorfizmus szignifikánsabb gyakoribb HELLP szindrómás nőkben a preeclampsias nőkben valamint 300 egészséges terhes nőben észlelt allél-gyakorisághoz viszonyítva. Az N363S, ER22/23EK és A3669G polimorfizmusok esetében nem találtunk összefüggést a preeclampsia vagy a HELLP szindróma előfordulása között. Eredményeink a nemzetközi irodalomban első utalnak arra, hogy a BclI polimorfizmus hordozás kockázati tényezőt jelenthet a HELLP szindróma kialakulásában. A BclI polimorfizmus lehetséges jelentősége mellett szóló adatnak tekintjük, hogy 6 további emlős fajban a *GR* gén BclI polimorfizmusának megfelelő szakasz nemzetközi adatbankokban közzétett nukleotid szekvenciájának elemzésekor egyetlen fajban sem mutattuk ki a BclI polimorfizmus jelenlétét. Utóbbi megfigyelésünket azért tekintjük figyelemre méltónak, mert a preeclampsia és a HELLP szindróma emberen kívül más emlősben nem fordul elő.

### III. *HSD11B1* gén polimorfizmusok fiziologiás és pathofiziologiás szerepének vizsgálata

A *GR* gén funkcionális polimorfizmusaival ellentétben a glükokortikoid hatás pre-receptor szabályozásában kulcsszerepet játszó 11 $\beta$ -hidoxiszteroid dehidrogenáz 1. típusát (11 $\beta$ -HSD1 kódoló ***HSD11B1* gén polimorfizmusok** spektruma, előfordulásuk gyakorisága és funkcionális jelentősége kevésbé ismert. A kutatások főbb eredményeit az alábbi pontokban foglaltuk össze.

III.1. **In silico** kutatásokat végeztünk a *HSD11B1* gén variánsok feltérképezésére. Online adatbázis segítségével (NCBI SNP, Hapmap, [www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)) a *HSD11B1* génen, ill. annak 15 kb promóter szakaszán összesen 65 polimorfizmust azonosítottunk. Ezek közül a további vizsgálatokban külön figyelmet fordítottunk azokra a polimorfizmusokra, amelyek transzkripciós faktorok kötőhelyein helyezkednek el és ezáltal befolyásolhatják a transzkripciós aktivitást.

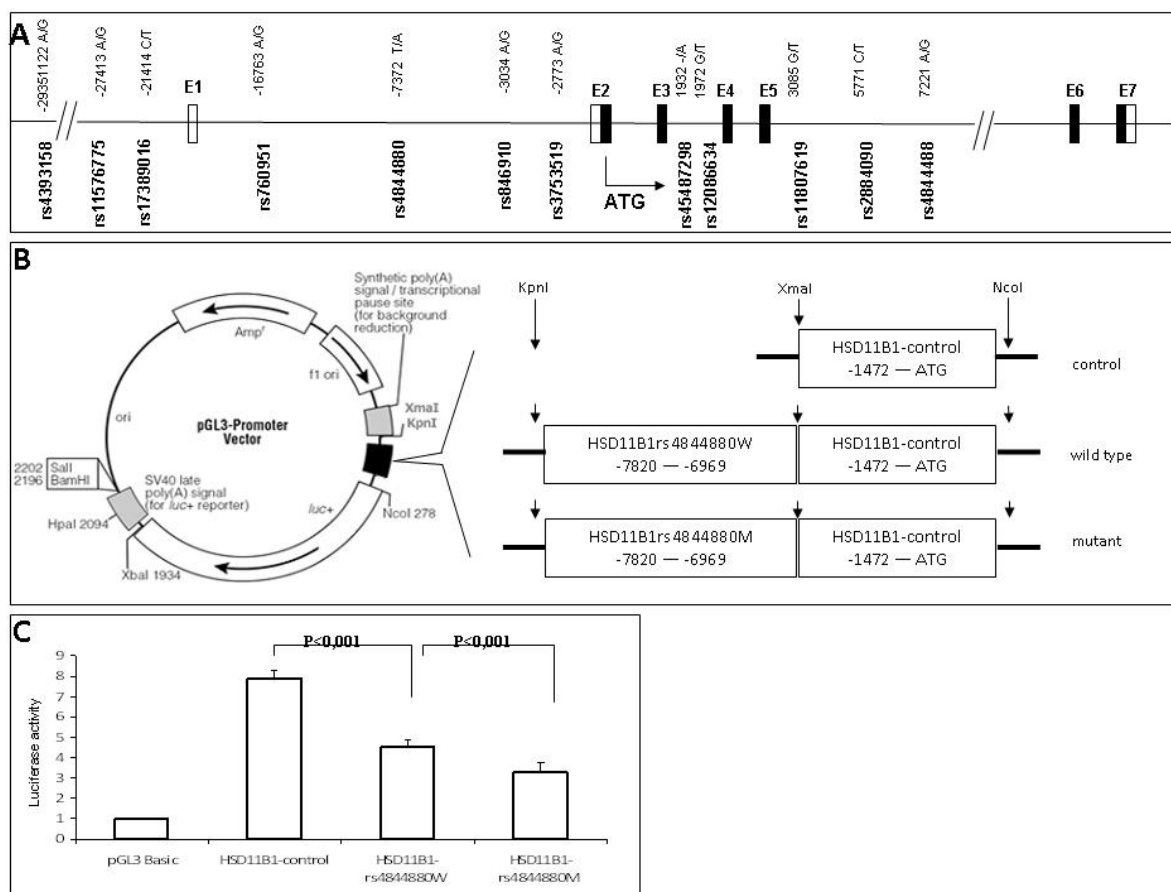
2. Az in silico kutatások alapján kiválasztott 12 *HSD11B1* gén polimorfizmus (Ábra A panel) **allél-gyakoriságának** meghatározására 129 egészséges egyén genotípus vizsgálatát végeztük el. A vizsgált 12 polimorfizmus közül 3 polimorfizmust korábban még nem tanulmányozták (rs4844880, rs173089418 és rs12143228). A genotípus vizsgálatokhoz az oligonukleotid próbákat a Primer3 software Input 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) program segítségével terveztük. A DNS mintákban a genotípus vizsgálatokat allél-specifikus PCR, restrikciós enzim emésztés, Taqman allél-diszkriminációs assay és direkt DNS szekvenálás segítségével végeztük. Megállapítottuk, hogy a vizsgált *HSD11B1* gén polimorfizmusok közül a 83,557insA variáns 18%, az rs846910 variáns 4% gyakorisággal fordul elő, míg más populációkkal ellentétben az rs846911 variáns jelenlétét nem lehetett kimutatnia. A nemzetközi irodalomban korábban már publikált többi *HSD11B1* gén polimorfizmus allél-gyakorisága hazai egészséges nőkben megegyezett a nemzetközi irodalomban közzétett allél-gyakorisági adatokkal. A mások által korábban még nem vizsgált 3 polimorfizmussal kapcsolatos eredményeink pedig új adattal szolgáltak ezen polimorfizmusok populáció-szintű előfordulásáról.

3. A *HSD11B1* gén polimorfizmusok és a glükokortikoid hatás közötti kapcsolat vizsgálatára 62 Cushing-szindrómás nő (35 betegben Cushing-kór, 27 betegben

kortizol-termelő mellékvesekéreg adenoma) genotipizálását végeztük el és 94 egészséges nő genotípus adatainak felhasználásával bioinformatikai módszerek segítségével komplex haplotípus elemzést végeztünk. A betegek klinikai adatai közül a glükokortikoid hatással, ill. annak súlyosságával összefüggő klinikai tüneteken és a hormonvizsgálatok eredményein kívül a glükokortikoid hatásra rendkívül érzékeny csontanyagcsere paramétereket (szérum csontmarker koncentráció, csontdenzitás, csonttörések) elemeztük. Megállapítottuk, hogy a vizsgált polimorfizmusok közül az rs17389016 polimorfizmus allél-gyakorisága Cushing-szindrómás betegekben szignifikánsan kisebb volt a kontroll egyénekhez képest, míg a többi polimorfizmus gyakorisága nem különbözött a Cushing-szindrómás és kontroll csoport között. Kimutattuk, hogy az rs83557insA, rs12086634 és rs11807619 kapcsolatok, egy haplotípusban fordulnak elő. Ez a haplotípus kortizol-termelő mellékvesekéreg adenoma okozta Cushing-szindrómás nőkben és egészséges nőkben nagyobb csont ásványianyag tartalommal és szérum osteokalcin szinttel jár együtt. Kimutattuk továbbá, hogy a *HSD11B1* gén promoter szakaszán lokalizált rs4844880 polimorf allél jelenléte kedvezőbb csont ásványianyag tartalommal, valamint Cushing-kóros betegekben magasabb testtömeg index-el, magasabb szérum osteokalcin szinttel, továbbá magasabb reggeli, éjjeli és kis adag dexamethason utáni szérum kortizol szinttel jár együtt. Ezek az eredmények megerősítik, hogy a glükokortikoid hatás pre-receptor szabályozásában kulcsszerepet játszó *HSD11B1* gén polimorfizmusai mind egészséges egyénekben, mind kórosan fokozott glükokortikoid termelés esetén befolyásolják a csontanyagcserét.

A *HSD11B1* gén promoter szakaszán lokalizált rs4844880 polimorf allél kedvezőbb csont ásványianyag tartalommal való összefüggését hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás betegekben is igazoltuk. 71 hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomás betegben az rs4844880 polimorfizmust hordozók körében az osteodensitometriás vizsgálattal mért lumbalis gerinc BMD és t-score értékeket szignifikánsan magasabbnak találtuk a polimorf allélt nem hordozó betegekhez lumbalis gerinc BMD és t-score értékeihez képest.

4. A *HSD11B1* gén promoter szakaszán lokalizált rs4844880 polimorf allél jelenléte és a kedvezőbb csont ásványianyag tartalom közötti összefüggés tanulmányozására sejttenyészeteket fejlesztettünk ki és vektorok konstrukciójával luciferáz expressziós rendszerben tanulmányoztuk az **rs4844880 polimorfizmus gén-transzkripcióra kifejtett hatását**. A *HSD11B1* gén rs4844880 polimorfizmust tartalmazó régióját pGL3 expressziós vektorba klónoztuk. Kontroll vektorként a gén start kodon előtti -1472 bp.-ig terjedő régióját használtuk (Ábra B panel). A polimorfizmus mutáns és vad alléljait hordozó expressziós vektorok csak az rs4844880 szekvenciájában tértek el egymástól. Az expressziós vektorokat Hela sejtbe transzfektáltuk majd promoter aktivitásokat luciferáz aktivitás mérésével határoztuk meg. Az rs4844880 polimorfizmust tartalmazó régió luciferáz aktivitása kisebb volt, mint a kontroll régió aktivitása, ami feltehetően egy represszor régió jelenlétére utal. A polimorf mutáns allél kisebb luciferáz aktivitással járt, mint a vad allél (Ábra C panel). Az rs4844880 kisebb transzkripció hatása kevesebb mRNS átírást és végül kisebb *HSD11B1* aktivitás eredményez, ami magyarázhatja a rs4844880 polimorfizmust hordozóknál észlelt kedvezőbb csontanyagcsere adatokat.



III. 5. A *HSD11B1* gén polimorfizmusok, hormonszintek, illetve a glükokortikoid hatást jelző **biokémiai és klinikai paraméterek közötti összefüggéseket** Cushing-szindrómás betegekben tanulmányoztuk. Kimutattuk, hogy a heterozigóta 83,557insA variánst hordozókban a nem hordozókhoz képest az ACTH-szekréció glükokortikoid feed-back iránti érzékenysége csökken és a glükokortikoidok iránti csökkent érzékenység az rs846910 gén-variánst hordozók esetében a glükokortikoid hatásra érzékenyen reagáló szérumszintmarker (osteokalcin, beta-crosslaps) koncentrációkon is kimutatható. Ezek az eredmények elsőként utaltak arra, hogy a *HSD11B1* gén 83,557insA és rs846910 variánsai endogén glükokortikoid túltermeléssel járó állapotokban befolyásolhatják a glükokortikoid feed-back mechanizmust és a glükokortikoid hatás iránt kifejezetten érzékeny csontanyagcserét.