

A gyermekkori asztma patomechanizmusát befolyásoló genetikai variációk és gén-környezet interakciók vizsgálata

Doktori tézisek

Ungvári Ildikó

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Szalai Csaba, egyetemi tanár, D.Sc

Hivatalos bírálók:

Dr. Halász Adrien, főorvos, Ph.D

Dr. Rónai Zsolt, egyetemi adjunktus, Ph.D

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Sasvári Mária, egyetemi tanár, D.Sc

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Mészáros Tamás, egyetemi adjunktus, Ph.D

Dr. Vizler Csaba, tudományos főmunkatárs, Ph.D

Budapest
2013

Bevezetés

Az asztma etiológiáját tekintve multifaktoriális megbetegedés, kialakulását az egyéni genetikai variációk és a környezeti tényezők kölcsönhatásai határozzák meg. Kapcsoltsági és asszociációs vizsgálatok már számos asztma gént és asztma lókuszt azonosítottak, ám ezen genomterületek némelyikén máig nem tisztázott hogy pontosan melyik gén, illetve génvariáns vesz részt az asztma és annak endofenotípusainak megjelenésében.

Egyre több kutatás támasztja alá, hogy az utóbbi évtizedekben megnövekedett asztma prevalencia és incidencia értékek javarészt környezeti és életvezetéssel kapcsolatos tényezőknek köszönhetőek. A légszennyezés légúti funkciókra gyakorolt kedvezőtlen hatásának vizsgálata az utóbbi időkben kiemelt figyelmet kapott. Kutatások igazolták, hogy a nitrogén-dioxid (NO₂), ózon, valamint a lebegő részecskék a szervezetbe kerülve szabad-gyök termelést és gyulladással választ indítanak el, ezáltal az oxidatív stresszválaszban szerepet játszó molekulák különböző variánsai potenciális meghatározói a légszennyező anyagok légúti hatásait megszabó egyéni érzékenységnek. Az oxidatív stresszválasz központi szabályozó elemei az NFE2L2 (nuclear factor erythroid-derived 2-like-2) transzkripció faktor és a fehérje negatív regulátora, a KEAP1 protein (Kelch-like ECH-associated protein-1). A légszennyező anyaggal való találkozást követő alacsony szintű oxidatív stresszválasz során az NFE2L2 fehérje aktiválja több mint 200 antioxidáns vagy II-es fázisú detoxifikáló enzim, valamint stresszválasz fehérje átírását. A molekula asztmában betöltött szerepére ovalbumin (OVA)-indukált egér asztma modellben megfigyelt eredmények hívják fel a figyelmet, melyek szerint az Nfe2l2-deficiens egerek nagyobb mértékű légúti gyulladással, légúti hiperreaktivitással és Th2 irányba eltolódott citokin profillal rendelkeznek OVA-indukciót követően, mint a vad típusú egerek.

Az allergiás betegségek gyakoriságának emelkedéséért a korai életévekben elszenvedett fertőzések számának és gyakoriságának csökkenése, valamint bizonyos mikroorganizmusok által termelt anyagok kisebb mértékű expozíciója is felelőssé tehető. Ugyanakkor a légúti vírus és baktériumfertőzések bizonyos esetekben fontos szerepet töltenek be az asztma kialakulásában, és az asztma exacerbációk fellépésében, ám az infekciók és a kórkép közti kapcsolatot számos tényező módosítja. Ezek egyikét az asztma pathomechanizmusában szerepet játszó gének variánsai jelentik, melyek egyes esetekben, a mikroba-expozíció mértékétől, időtartamától vagy a vizsgált populációtól függően egyaránt lehetnek hajlamosító, vagy éppen védő hatásúak.

A szervezetet érő különböző triggererek hajlamosító genetikai háttér esetén számos, részben átfedő mechanizmus beindításával vezetnek el a légúti gyulladás kialakulásához. Az asztmás gyulladásban központi szerepet töltenek be az apoptotikus folyamatok. Kimutatták, hogy rhinovírus fertőzést követően az asztmások tüdejének epitél sejtszövetjei nem lépnek az apoptózisba, hanem az osztdó vírus direkt citopátiás hatásának köszönhetően pusztulnak el. Emellett több tanulmány igazolta, hogy az eozinofilsejtek bronchiális szövetekben történő felhalmozódása az asztmás folyamat során, egyrészt az apoptózis, másrészt az eozinofilek makrofágok általi eltakarításának („eosinophil-clearance”) hibás működésének köszönhető. Az eozinofil sejtek apoptózisának mértéke pedig korrelációt mutat az asztma súlyossági fokával. A sejt túlélése és az apoptózis közötti egészséges egyensúly fenntartásában és kontrollálásában számos szabályozó molekula vesz részt. Ezek egyike az apoptózis inhibitor fehérjecsald (inhibitor of apoptosis protein family, IAP), mely tagjairól bebizonyosodott, hogy a kaszpáz-függő apoptotikus útvonalak gátlásán túl fontos szerepet töltenek be a sejtciklus és sejtosztódás szabályozásában is. A BIRC5 (Baculoviral IAP repeat containing 5), másnéven survivin, az apoptózis inhibitor fehérjecsald egyik fontos tagja. Sokáig úgy tartottuk, hogy a BIRC5 leginkább a magzati szövetekben expresszálódik, és csak elhanyagolható mértékben van jelen a terminálisan differenciálódott felnőt szövetekben. Újabb tanulmányok szerint azonban fontos résztvevője lehet különbözö gyulladásos folyamatoknak, és az asztma patogenezisében betöltött szerepére utaló adatok is megjelentek. Munkacsoportunk és más kutatók egér asztma modellből származó eredményei szerint a Birc5 mRNS szintje allergizálás hatására jelentősen megemelkedik. Emellett, a molekula eozinofil felhalmozódásban betöltött szerepére utal az a megfigyelés, mely szerint a bronchoalveoláris folyadékából kinyert eozinofil sejtekben a Birc5 mRNS és fehérje szintje korrelációt mutat a BAL folyadék eozinofil sejttségével. Mindezek alapján feltételezzük, hogy a BIRC5 meghatározó szerepet tölt be az asztma pathomechanizmusában.

Célkitűzések

Doktori dolgozatom célkitűzései az alábbiakban foglalhatóak össze:

- 1. A genetikai és környezeti tényezők interakciójának vizsgálata az asztma kialakulásában**
 - Annak vizsgálata, hogy az asztma patomechanizmusában fontos szerepet játszó *CCR5* valamint *RANTES* gének gyakori polimorfizmusai módosítják-e a *Mycoplasma pneumoniae* fertőzésre, illetve az asztmára való hajlamot.
 - Az oxidatív stresszválaszban központi mediátor szerepet betöltő *NFE2L2* és a *KEAP1* gének szabályozó régióiban elhelyezkedő polimorfizmusok és a légszennyezettségi markerként használt NO₂ koncentráció közötti összefüggések feltárása az asztma kialakulásában betöltött szerepükre nézve.
- 2. Asztmára hajlamosító genetikai tényezők vizsgálata olyan, korábbi kapcsoltsági elemzések alapján azonosított ún. asztma-régiókon, mint a 11q13 illetve a 14q22.**
 - Mivel a sok SNP-t nagyszámú mintán vizsgáló elemzésekben származó adatmennyiség a klasszikus statisztikai eljárásokon túl az interakciós elemzéseket is lehetővé teszi, célunk az adatainkat a többszintű elemzésre is alkalmas Bayesi statisztika eszközeivel is megvizsgálni.
 - A betegségasszociációt mutató polimorfizmusokat hordozó gének expressziós szintjének meghatározása és összehasonlítása egészséges és asztmás populációban.
- 3. A munkacsoportunk által korábban előállított ovalbumin-indukált egér asztma modell eredményei alapján az antiapoptotikus *BIRC5* gén asztma-asszociációjának vizsgálata humán mintákon.**
 - A gén szabályozó régióiban található polimorfizmusainak asszociációs vizsgálata.
 - A gén expressziós szintjének megállapítása és összevetése egészséges és asztmás populációban.

Alkalmazott módszerek

Vizsgált populációk

Az asszociációs vizsgálatokban résztvevő asztmás gyermekek a Budai Gyermekkorház Allergológiai szakambulanciáján jelentkeztek. Mindegyik gyermeknek szakorvos által diagnosztizált asztmája volt. A kontroll gyermekeket véletlenszerűen választottuk ki a Budai Gyermekkorház Ortopédiai Osztályáról illetve a Heim Pál Gyermekkorház Urológiai Osztályáról. A felnőtt kontrollok egészséges véradók közül kerültek ki. Az indukált köpet génexpressziós vizsgálatába bevont asztmás pácienseknél a diagnózist a GINA nemzetközi útmutató, a Global Initiative for Asthma guidelines alapján szakorvos állította fel. Légzésfunkció adataik alapján enyhe illetve közepestől súlyosig terjedő asztma stádiumba sorolta őket. Tíz beteg rendszeres inhalatív kortikoszteroid kezelés alatt állt. A páciensek asztma kontroll értékeit a nemzetközi Asthma Control Test™ hitelesített magyar fordítása alapján vettük fel. Az egészséges kontrollok budapesti egyetemek dolgozói és hallgatói közül kerültek ki. Légzésfunkció értékeik normális tartományba estek, és esetükben semmilyen légzőszervi betegség nem állt fenn.

Genomiális DNS szeparálás, genotipizálási módszerek

A genomiális DNS-t a perifériás vérből származó mononukleáris sejtekből *Qiagen DNA Blood Mini kit* illetve *iPrep PureLink gDNA Blood Kit* segítségével izoláltuk a gyártók utasításainak megfelelően. A *RANTES* -403 G/A polimorfizmusának meghatározásához PCR-RFLP módszert alkalmaztunk. A *CCR5Δ32* esetében a 32 bázispárnyi deléció kimutatása hasítás nélkül, 2%-os töménységű agaróz gélelektroforézissel történt. A 11q12.2-q13.1 és 14q22.1-q22.3 genomterületeken kiválasztott 145 polimorfizmusból 144-et az intézetünkben korábban működő SNP Core Facility keretein belül, egy nagy áteresztő-képességű GenomeLab SNPstream® Genotyping System segítségével genotipizáltuk. A 11q13 genomrégióban található rs545659 egy pontos nukleotid polimorfizmus nem volt alkalmas a GenomeLab SNPstream rendszerrel történő genotipizálásra, ezért ennek genotípusát TaqMan 5' nukleáz allélspecifikus PCR módszerrel határoztuk meg. A *BIRC5*, *NFE2L2* és *KEAPI* gének szabályozó régióiban elhelyezkedő polimorfizmusok genotipizálása Sequenom iPLEX Gold MassARRAY technológiával történt egy kanadai kutatóközpontban (McGill University and Génome Québec Innovation Centre, Montréal, Québec, Canada).

Laboratóriumi paraméterek meghatározása

A *Mycoplasma pneumoniae* (MP) specifikus antitestek meghatározása szérumból történt Sero MP-IgA, IgG protein ELISA kitek segítségével a gyártó utasításai szerint. A szérum teljes, valamint több mint 100 allergénre specifikus IgE szintjét *Pharmacia CAP System* műszerrel határoztuk meg. A teljes IgE szintet akkor tekintettük kórosnak, ha az alábbi, kor-specifikus referencia tartományokon kívül esett: 0-1 év: <15 kU/L; 1-5 év: < 60 kU/L; 5-10 év: < 90 kU/L; felnőttek: < 100 kU/L. Az allergén specifikus IgE-t

0,35 kU/L-t meghaladva vettük pozitívnak. A vér eozinofil granulocita koncentrációkat Coulter MAXM Analyser műszerrel határoztuk meg. A relatív értékeket 1-6% közötti tartományban, az abszolút eozinofil sejttség értékét 0,05 és 0,200 G/l között tekintettük normálisnak.

Köpetindukció

Az indukciót 10 perces időközönként, háromszor végeztük el és azt minden alkalommal légzésfunkció mérése követte. A vizsgált személyek 400 µg salbutamol inhalációt követően a De Vilbiss Nebulizer (Ultra-NebTm 2000 model 200HI) által porlasztott hipertóniás (4,5 %-os) nátrium klorid oldatot lélegeztek be 5 percen keresztül. Ezt követően a felköhögött köpetet (alsó légúti szekrétumot) steril tartályban gyűjtöttük, majd kiválogattuk a nagyobb plakkokat. A mintákat 0.1% dithiotreitol-tartalmú PBS-sel hígítottuk (Sigma, St Louis, MO, USA), vortexeltük, és 30 percre rázóra helyeztük. Ezt követően a mintákat 40 µm nylonhálón (BD Biosciences, Falcon cell strainer) szűrtük át, és 1500 rpm-en centrifugáltuk 10 percen keresztül. A sejteket 1 ml PBS-ben vettük fel, majd a sejtuszpenzió egy részét azonos mennyiségű 0,4%-os tripánkék festékkel kevertük össze. A sejteket Bürker kamrában számoltuk meg. A maradék sejtuszpenziót tovább hígítottuk PBS-sel és citocentrifugával (Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Németország) tárgylemezre centrifugáltuk. A preparátumokat Quick Panoptic (Cypress, Langdorp, Belgium) hematológiai festékkel festettük, és a sejtes összetételt fénymikroszkóp alatt határoztuk meg minimum 300 sejt azonosításával. A sejtösszetétel megállapítását követően a sejteket lízis pufferben vettük fel, és -80°C-on tároltuk.

Légzésfunkció, FENO mérés

Az FVC és FEV1 értékeket spirométerrel mértük, a kilélegzett levegő nitrogén monoxid (FENO) szintjét NO szenzorral detektáltuk.

Légszennyezettségi értékek megállapítása

A légszennyezettség markereként az ilyen jellegű kutatásokban leggyakrabban alkalmazott légköri NO₂ koncentráció adatokat használtuk fel. A vizsgálatba olyan személyeket vontunk be, akiknél az asztma kialakulása (a kezelésre történő jelentkezés) 2003 és 2006 közötti intervallumban történt. Ezen periódust megelőző évek részletes légszennyezettségi adatait az Országos Légszennyezettségi Mérőhálózat munkatársai közreműködésével gyűjtöttük be és elemeztük. A vizsgálatban olyan személyek szerepeltek, akik lakóhelyének közelében volt NO₂ koncentrációt is detektáló automata mérőállomás. Elemzéseink során a NO₂ koncentrációt diskretizáltuk, és a 32 µg/m³ alatti átlagértéket mutató területeket alacsony légszennyezettségűnek, az e feletti átlagértékkel rendelkező területeket magas légszennyezettségűnek tekintettük. A 32 µg/m³-es határt a vizsgált geográfiai területeken mért átlagolt NO₂ koncentrációk mediánjánál húztuk meg.

RNS szeparálás, koncentrációmérés és minőség-ellenőrzés

Az RNS izolálása az indukált köpet mintákból RNeasy (Qiagen, Valencia, CA) szeparáló oszlopok felhasználásával történt, a gyártó utasításai szerint. A kinyert RNS mennyiségét NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) mértük meg, minőségét Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) készülék segítségével határoztuk meg. A továbbiakban csak azokat a mintákat használtuk fel a különböző microarray valamint valós idejű PCR mérésekhez, melyek RNS integritás száma meghaladta a 8,0-as értéket, tiszta gélszerű képet mutattak, nem tartalmaztak DNS kontaminációt, valamint a NanoDrop készüléken mért 260/280 és a 260/230 arányuk nagyobb volt, mint 1,8.

Reverz transzkripció és mRNS expresszió mérés TaqMan valós idejű PCR módszerrel

Az indukált köpet minták esetében a cDNS átírást a High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) alkalmazásával végeztük. A valós idejű PCR reakciókat ABI 7900HT Fast Real-Time PCR készüléken végeztük a gyártó utasításai szerint. Háztartási kontrollként a *β -actin* génjét használtuk. A háztartási génhez normalizált szignálértékeket az összehasonlító Ct (delta CT) módszer felhasználásával határoztuk meg.

Alkalmazott statisztikai módszerek

A genotipizálási eredmények kiértékelését logisztikus regresszióval végeztük. A haplotípusokat és ezek frekvenciáját a Haploview 4.1 programmal becsültük meg. A szérum, és köpet eozinofil szintek, valamint az IgE értékek esetében a fenotípusok genetikai hátterének meghatározásához lineáris regressziós modellt használtunk. A normalizált génexpresszió szinteket Mann-Whitney U teszt és Kruskal-Wallis teszt segítségével hasonlítottuk össze. A kontingencia táblákat Fisher exact teszttel elemeztük. A korrelációk mérésére a Spearman-féle rangkorrelációt alkalmaztuk. Többszörös hipotézis tesztelés esetén a p értékeket a Bonferroni-korrekciónak megfelelően korigáltuk az összehasonlítások számával. A bayesi statisztikai számításokat a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Méréstechnika és Információs Rendszerek Tanszékén, dr. Antal Péter kutatócsoportja végezte a két csoport által közösen kidolgozott BN-BMLA (Bayesian network based Bayesian multilevel analysis of relevance) módszerrel.

Eredmények

A *RANTES* -403G/A és a *CCR5Δ32* polimorfizmusok, és a *Mycoplasma Pneumoniae* fertőzés asztma kockázatra gyakorolt hatását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az asztmás gyermekek között szignifikánsan nagyobb arányban fordul elő *Mycoplasma p.* pozitivitás, mint az egészséges gyermekek között (31,1% vs. 18,1 %, $p = 0,0009$), a két csoport azonban nem mutatott szignifikáns különbséget sem a *RANTES*, sem a *CCR5* gének vizsgált variánsainak eloszlásának tekintetében. A vizsgált változók közötti kapcsolatot tekintve azt találtuk, hogy a *CCR5Δ32* allélja szignifikánsan gyakrabban fordult elő a MP szeropozitív gyermekekben a MP szeronegatív gyermekekhez képest (18% vs. 8,6%, $p = 0,006$). Hasonló eredményt kaptunk mikor a *CCR5Δ32* allélját homozigóta formában hordozó gyermekek arányát hasonlítottuk össze a MP szeropozitív és MP szeronegatív csoportok között (2,4% vs. 1,3%). Ezzel szemben a *RANTES* -403A allélja és a *Mycoplasma p.* fertőzöttség között nem találtunk összefüggést.

Többszörös logisztikus regressziós elemzés során azt találtuk, hogy a MP fertőzöttség szignifikáns asszociációt mutat az asztmára (OR = 2,0, 95% CI = 1,3-3,1, $p = 0,001$), illetőleg az atópiára (OR = 1,7, 95% CI = 1,1-2,6, $p = 0,01$) való megnövekedett hajlammal, és kimutattuk, hogy a MP szeropozitivitás és a *CCR5Δ32* ritka alléljának együttes előfordulása véd az asztmával szemben (OR = 0,4, 95% CI = 0,2-0,7, $p = 0,003$). A MP szeropozitivitás és a *RANTES* -403A alléljának együttes előfordulása esetén nem találtunk hasonló asszociációt.

Az *NFE2L2* és *KEAPI* gének szabályozó régióiban lokalizálódó polimorfizmusok allél- és genotípus eloszlását vizsgálva nem mutattunk ki szignifikáns különbséget az asztmás és kontroll csoportok között. Az asztma endofenotípusokat is figyelembe véve a legerősebb asszociációt az infekció-indukált asztma (IIA) és az *NFE2L2* 3' régiójában elhelyezkedő rs2588882 között találtuk, mely SNP ritka allélja (G) szignifikánsan ritkábban fordult elő az IIA csoportban a nem IIA csoporthoz képest (9% vs. 26%, OR = 0,28, 95% CI = 0,13-0,60, $p = 0,0005$). A ritka allélt hordozó genotípusok (12 és 22) mind a domináns (OR = 0,28 95% CI = 0,12-0,62, $p = 0,002$), mind az additív modellt (OR = 0,29, 95% CI = 0,13-0,62, $p = 0,002$) alkalmazva ritkábbnak bizonyultak az IIA csoportban, ami a G allél (mintsem a G allélt hordozó genotípusok) infekció-indukált asztma fenotípus elleni védő hatására utal. A *KEAPI* gén SNP-i esetében nem találtunk szignifikáns különbséget az allélgyakoriságokban és a genotípusok megoszlásában a vizsgált

csoporthoz. A polimorfizmusok és az NO₂ koncentráció interakciójának hatását az asztma kialakulására az asztmás csoporton belül elemeztük. Eredményeink azt mutatják, hogy az rs2588882 és az rs6721961 (*NFE2L2* -617G/T) SNP-k ritka alléljai, pontosabban a ritka allélt hordozó heterozigóta és ritka homozigóta genotípusok egybevéve szignifikánsan gyakrabban fordulnak elő azokban a gyermekekben, akik lakóhelye kisebb légszennyezettségű régióban helyezkedik el. Az alacsony vs. magas légszennyezettségű területeken a heterozigóta és ritka homozigóta genotípusok összevont frekvenciája az rs2588882 esetében 25,8% vs. 13,9% (OR (95% CI) = 0,43 (0,23-0,82), p = 0,01); az rs6721961 esetében 30,5% vs. 20,0% (OR (95% CI) = 0,51 (0,29-0,90) p = 0,02). Az *NFE2L2* gén 8 vizsgált SNP-je által létrehozott haplotípusok gyakoriságát megvizsgálva azt találtuk, hogy az rs2588882 és rs6721961 ritka allélját is hordozó haplotípus (GTCCTCTG) szignifikánsan gyakoribb az alacsony légszennyezettségű területeken (5,6% a magas, 12,3% az alacsony légszennyezettség esetén, OR (95% CI) = 0,42 (0,30-0,59), p = 0,007). Mivel ezen haplotípus frekvenciái közötti eltérés enyhén szignifikánsabb, mint az egyedi SNP-k genotípus frekvenciái közti eltérések, feltételezhetjük, hogy az említett polimorfizmusok ritka alléljai szinergista módon vesznek részt az allélt hordozó egyének légszennyezettségre adott eltérő válaszkészségében.

A 11q12.2-q13.1 és 14q22.1-22.3 kromoszómaregiók parciális genomszűrése során 145 SNP-t genotipizáltunk, melyek közül 102 SNP eloszlását elemeztük, frekventista és BN-BMLA (Bayesian network based Bayesian multilevel analysis of relevance) statisztikai módszerrel.

A frekventista elemzés során szignifikáns asszociációt találtunk az asztma és az *FRMD6* (FERM domain containing 6) gén promóterében elhelyezkedő rs3751464 SNP ritka (T) allélja (OR = 1,43, 95% CI = 1,18-1,75, p = 0,0003), és a PTGDR (Prostaglandin D receptor gén) 3' UTR régiójában elhelyezkedő rs17831682 ritka genotípusa (CC) között (OR = 27,23, 95% CI = 1,55-478,07, p = 0,00039). Emellett a *PRPF19* génben található rs7928208 az asztma fiatalkori kialakulásával/diagnózisával mutatott kapcsolatot.

A BN-BMLA elemzés során a fenti eredmények megerősítése mellett a *PTGER2* (Prostaglandin E2 receptor) gén két intronikus SNP-je bizonyult relevánsnak az asztmára való hajlam tekintetében. A nagy affinitású IgE receptor β-láncát kódoló *MS4A2* gén E237G missense SNP-je, az rs569108 a klinikai paraméterek (IgE-, eozinofil szint, allergiás rhinitis és asztma), mint többszörös célváltozók alkalmazáskor mutatott erős asszociációt az asztmával. Az *AHNAK*

(desmoyokin) gén két SNP-je (rs11231128 és rs11827029) csak rhinitis fennállása esetén mutatott asszociációt az asztma megjelenésével. Az SNP-k közötti lehetséges interakciókat vizsgálva statisztikailag releváns interakciókat találtunk génen belül (*PTGER2*-ben elhelyezkedő rs17197 és rs708502), gének között (pl. rs17197 a *PTGER2*-ben és rs3751464 az *FRMD6* génben), és kromoszómák között is (pl. rs7928208 a *PRPF19* génben a 11-es kromoszómán és rs3751464 az *FRMD6*-ban a 14-es kromoszómán). Eredményeink alapján az *FRMD6* génjében elhelyezkedő rs3751464 bizonyult a legjelentősebb polimorfizmusnak az általunk vizsgált SNP-k közül. Az asztmára való hajlamot önmagában, és más SNP-vel kölcsönhatásban is befolyásolja. Az SNP ritka genotípusával (TT) való interakció minden esetben megnöveli az asztma kockázatát (3,22 és 3,52 közötti OR értékek), míg a gyakori genotípus (CC) csökkenti azt (0,65 és 0,66 OR értékek). Minden SNP esetében meghatároztuk a valószínűségi értékeket azokra az esetekre, amikor az SNP közvetlenül vagy tranzitív módon, vagy mással fenotípus változóval kölcsönhatásban befolyásolja az asztma fenotípust. A számított valószínűségi értékek alapján elmondhatjuk, hogy az általunk megfigyelt asszociációk nagy része inkább tranzitív, mintsem közvetlen hatásnak tulajdonítható, vagyis az SNP és az asztma közti kapcsolat egy másik SNP vagy fenotípus-változó ismeretétől függ.

Az SNP elemzések során az asztmával, vagy annak valamely endofenotípusával asszociációt mutató gének expresszióját egészséges és asztmás személyekből származó indukált köpet mintákban hasonlítottuk össze. Az összesen 31, köpetindukción átesett személy mintáiból az asztmások közül 12, a kontrollok közül 9 esetben tudtunk expressziós elemzéshez megfelelő minőségű RNS-t izolálni. A vizsgált gének közül egyedül az *FRMD6* esetében találtunk szignifikáns eltérést, a kontroll mintákban átlagosan 2,73-szor magasabb értékkel a beteg mintákhoz viszonyítva ($p = 10^{-6}$). A többi vizsgált gén (*PTGDR*, *PTGER2*, *MS4A2*, *AHNAK*, *PRPF19*, *TXNDC16*) esetében nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget az asztmás és a kontroll csoport mintáiban mérhető mRNS szintek között. Az *FRMD6* expressziójának hasonló csökkenését figyeltük meg a csoportunkban korábban allergizált egérmodellben is az OVA indukciót követően (fold change= 1,53).

A *BIRC5* gén asztmában betöltött szerepének vizsgálatának első lépéseként az egér tüdőszövetek génexpressziós szintjét detektáló microarray elemzésből származó adatainkat real-time PCR technikával validáltuk, majd a molekula humán asztmában betöltött szerepének

alátámasztása céljából a BIRC5 mRNS szintjét 13 asztmás és 10 egészséges kontroll személytől gyűjtött indukált köpet mintában hasonlítottuk össze. Az átlagos gén-expresszió szint szignifikánsan magasabbnak bizonyult az asztmás személyek mintáiban a kontroll mintákban mért mRNS szinthez képest ($p = 0,03$). Az asztma súlyossági foka (GINA stádiumok) és a köpet BIRC5 mRNS szintje között nem találtunk összefüggést. A gén expressziós szintje szignifikáns korrelációt mutatott a köpetben jelenlévő eozinofil sejtek arányával ($r = 0,468$, $p = 0,02$). A nem, életkor és a dohányzási szokások nem mutattak összefüggést a köpetben kimutatható BIRC5 mRNS szintjével. Eredményeink alapján a köpet eozinofil sejtaránya a súlyosabb asztma stádiumokban lévő vizsgálati személyek esetében szignifikánsan magasabb, mint a kontroll, illetve az enyhébb asztma stádiumba sorolható személyek esetében ($p = 4 \cdot 10^{-4}$). A BIRC5 mRNS szintje nem mutatott összefüggést az asztma kontroll teszt, a kilélegzett nitrogén-monoxid (FENO), és az alkalmazott kortikoszteroid dózis (ICS) értékeivel sem. Statisztikailag szignifikáns, ám eltérő irányú korrelációt tapasztaltunk a FENO értékek és a köpet relatív eozinofil ($p = 0,006$, $r = 0,742$) illetve neutrofil ($p = 0,048$, $r = -0,58$) sejt száma között. Gyenge korrelációt figyeltünk meg a köpet relatív eozinofil sejt száma és az asztma kontroll teszt értékek között ($p = 0,048$, $r = -0,55$), míg az ICS dózis nem állt összefüggésben a köpet sejtarányokkal.

A *BIRC5* gén szabályozó régióiban elhelyezkedő polimorfizmusok genotípus elemzésének eredményeként azt találtuk, hogy az rs8073903 SNP-k ritka allélja (C) szignifikáns asszociációt mutat az asztmára való megnövekedett hajlammal (OR = 1,458, 95% CI = 1,126-1,889, $p = 0,004$). A nemeket külön vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az asszociáció a nők körében még kifejezettebb. Az asztma endofenotípusok tekintetében az rs8073903 és az rs8073069 SNP-k ritka alléljai a nem-allergiás asztmára való fokozott hajlammal asszociáltak szignifikáns mértékben (OR = 1,887, 95% CI = 1,238-2,878, $p = 0,003$ az rs8073069, és OR = 1,872, 95% CI = 1,232-2,843, $p = 0,003$ az rs8073903 esetében). Hasonlóan a kontroll-asztma vizsgálatokhoz, a kontroll és a nem allergiás asztma csoportok között megfigyelhető genotípus eloszlás a két említett SNP esetében szignifikánsan erősebb asszociációt mutatott a nők alpopulációjában. Statisztikailag szignifikáns korrelációt találtunk az rs9904341 SNP és a szérumban eozinofil szintek között, mind a relatív, mind pedig az abszolút sejt szám értékek tekintetében. Adataink alapján az rs9904341 SNP vad genotípusát hordozó vizsgálati személyek szignifikánsan magasabb szérumban eozinofil szinttel rendelkeznek, mint azok a személyek, akik a ritka allélt is hordozzák (66,2% vs. 58,9%, $p = 0,004$ az abszolút, 43,6% vs. 24,2%, $p = 0,002$ a relatív eozinofil szint esetében). A

polimorfizmusok által alkotott haplotípusok közül a legmarkánsabb különbségeket az rs8073903 és az rs8073069 által alkotott haplotípusok mutatták. Az asztmás és kontroll populáció között erősen szignifikáns különbséget találtunk a két polimorfizmus vad alléljai által alkotott haplotípus (TG) megoszlásában (57% vs. 65%, a beteg vs. kontroll csoportban, $p = 0,004$), ami a vad haplotípus asztmában betöltött védő szerepére utal. A ritka allélek kombinációjából létrejövő haplotípus (CC) szignifikánsan gyakrabban fordult elő a nem-allergiás asztmás alpopulációban az egyéb asztmás alpopulációhoz képest (47% vs. 27%, $p = 5 \cdot 10^{-5}$).

Következtetések

A gyermekkori asztma genetikai hátterét vizsgáló kutatásaink során az alábbi eredményekre jutottunk.

Genotípus-környezet interakciós vizsgálataink első részében kimutattuk, hogy a CCR5 kemokinreceptor deléciós formájának hordozása megnöveli a krónikus *Mycoplasma pneumoniae* fertőzésre való hajlamot, azonban a *Mycoplasma p.* ellenes IgG pozitív gyermekekben a CCR5Δ32 allél jelenléte csökkenti az asztma kialakulásának kockázatát. Megerősítettük a *Mycoplasma p.* fertőzés és az asztma kialakulása között fennálló asszociációt, melyről már korábbi tanulmányokban beszámoltak. A CCR5Δ32, illetve a RANTES -403A allélek hordozása és az asztma megjelenése között az általunk vizsgált populációban nem találtunk direkt kapcsolatot.

Az oxidatív stresszválasz szabályozásában központi szerepet betöltő *NFE2L2* és *KEAP1* gének vizsgált SNP-inek eloszlásának tekintetében nem találtunk különbséget az asztmás és kontroll csoportok között. Az *NFE2L2* regulátor régióiban elhelyezkedő polimorfizmusok vizsgálatokor azt találtuk, hogy az rs2588882 G és rs6721961 T alléleit hordozó genotípusok ritkábban fordulnak elő az infekciós asztmások körében, mint más asztma endofenotípusú csoportoknál, ami ezen allélek infekciós asztmával szembeni lehetséges védő hatására utal. A genetikai variánsok és a levegő NO₂ koncentráció együttes szerepét tanulmányozva azt tapasztaltuk, hogy az alacsonyabb légszennyezettségű régiókban élő asztmás gyermekek között az rs2588882 G, valamint az rs6721961 T (ritka) allélek gyakrabban fordulnak elő. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az *NFE2L2* gén polimorfizmusai befolyásolhatják az infekció által kiváltott asztma kockázatát, és gén-környezet kölcsönhatásban befolyásolhatják a környezeti (légszennyezettségi) faktorok hatását az asztma kialakulására.

A 11q12.2-q13.1 és 14q22.1-22.3 genomrégiók vizsgálata során az asztma és az *FRMD6* gén egyik 5'UTR polimorfizmusának (rs3751464) pozitív asszociációját frekventista és bayesi statisztikai eljárás alkalmazásával is igazoltuk. Kimutattuk, hogy az SNP ritka allélja (T) önmagában, más polimorfizmusokkal interakcióban és haplotípus szinten is megnöveli az asztma kockázatát. Az *FRMD6* gén expressziós szintjét alacsonyabbnak találtuk OVA-indukált egér asztma modellben az allergizálást követően, és humán asztmások tüdőszövetében a kontroll

egyénekhez képest. Kimutattuk, hogy az *AHNAK* génben lokalizálódó rs11231128 és a *TXNDC16* gén 3'UTR régiójában elhelyezkedő rs1565970 polimorfizmusok indirekt módon, csak fennálló rhinitis esetén befolyásolják az asztma kockázatot. Erős, direkt asszociációt detektáltunk az asztma és a *PRPF19* gén rs7928208 SNP-jének ritka allélja (G) között, ráadásul a polimorfizmus asszociációt mutatott az asztma 6 éves kor alatti megjelenésével is. A BN-BMLA módszert használva megerősítettük a már korábban publikált asszociációkat az asztma és a *PTGDR* (rs17831682), *PTGER2* (rs708502 és rs17197), valamint az *MS4A2* gén (E237G, rs569108) variánsai között. Megállapítottuk, hogy ezen gének közül csak a *PTGDR* SNP-je befolyásolja közvetlenül az asztma megjelenését, míg a *PTGER2* polimorfizmusai csak interakcióban vagy közvetve, és az *MS4A2* E237G variánsa tranzitív módon befolyásolja az asztma kialakulását. Megfigyeléseink igazolják az interakciók és közvetett asszociációk kimutatására is alkalmas bayes hálós elemzések alkalmazásának igényét a komplex etiológiájú kórképek tanulmányozásában.

Egér allergiás asztma modellben detektált eredményeinket megerősítve kimutattuk, hogy az asztmások légutaiban szignifikánsan magasabb az antiapoptotikus hatású *BIRC5* mRNS szintje, mint ami az egészséges személyek légutaiban mérhető. Megállapítottuk, hogy a *BIRC5* mRNS szintje szignifikáns korrelációt mutat az indukált köpetben jelenlévő eozinofil sejtek arányával. Az eozinofil szint ezen túlmenően korrelációt mutatott az asztma kontroll teszt értékekkel, az asztma súlyossági fokával, valamint a kilélegzett nitrogén-monoxid értékekkel. A gén regulátor régióiban elhelyezkedő polimorfizmusok allél- és genotípus eloszlását vizsgálva az rs8073903 és az rs8073069 SNP-k ritka allélei és az asztma között szignifikáns asszociációt mutattunk ki, mely a nők körében még kifejezettebbnek bizonyult. Az említett SNP-k vad allélei által alkotott haplotípusról (TG) kimutattuk, hogy az szignifikánsan gyakrabban fordul elő az egészségesek körében, mint az asztmások között. Az egyes asztma endofenotípusokat külön elemezve azt találtuk, hogy a fenti SNP-k ritka allélei a nem-allergiás asztmára való fokozott hajlammal asszociálnak szignifikáns mértékben. Statisztikailag szignifikáns korrelációt találtunk az rs9904341 és a szérum relatív és abszolút eozinofil szintje között, mely szerint az SNP vad genotípusát (GG) hordozó személyek magasabb szérum eozinofil szinttel rendelkeznek, mint azok, akik a ritka allélt is hordozzák genomjukban. A fenti eredmények alátámasztják, hogy a *BIRC5* molekula fontos komponense a légutak normális működésének és módosulásai hozzájárulhatnak az asztmás fenotípus megjelenéséhez.

Saját publikációk jegyzéke

Értekezésben összefoglalt saját közlemények:

1. **Ungvári I**, Tölgyesi G, Semsei AF, Nagy A, Radosits K, Keszei M, Kozma GT, Falus A, Szalai C. CCR5 Delta 32 mutation, Mycoplasma pneumoniae infection, and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Jun;119(6):1545-7. IF: 8,115
2. **Ungvári I**, Hadadi É, Virág V, Nagy A, Kiss A, Kalmár Á, Zsigmond G, Semsei AF, Falus A, Szalai C. Relationship between air pollution, NFE2L2 gene polymorphisms and childhood asthma in a Hungarian population. *J Community. Genet.* 2012; 3:(1) pp. 25-33.
3. **Ungvári I**, Hadadi É, Virág V, Bikov A, Nagy A, Semsei AF, Gálffy G, Tamási L, Horváth I, Szalai C. Implication of BIRC5 in asthma pathogenesis. *Int Immunol.* 2012; 24:(5) pp. 293-301. IF: 3,415
4. **Ungvári I**, Hullám G, Antal P, Kiszél PS, Gézsi A, Hadadi É, Virág V, Hajós G, Millinghoffer A, Nagy A, Kiss A, Semsei ÁF, Temesi G, Melegh B, Kisfali P, Széll M, Bikov A, Gálffy G, Tamási L, Falus A, Szalai C. Evaluation of a Partial Genome Screening of Two Asthma Susceptibility Regions Using Bayesian Network Based Bayesian Multilevel Analysis of Relevance. *PLoS One.* 2012;7(3):e33573. IF: 4,092

Más témában megjelent közlemények:

1. Tölgyesi G, Keszei M, **Ungvári I**, Nagy A, Falus A, Szalai C. Involvement of TNFalpha - 308A promóter polymorphism in the development of asthma in children infected with *Chlamydomytila pneumoniae*. *Pediatr Res.* 2006 Nov ; 543-8. IF: 2,619
2. Nagy A, Keszei M, Kis Z, Budai I, Tölgyesi G, **Ungvári I**, Falus A, Szalai C. *Chlamydomytila pneumoniae* infection status is dependent on the subtypes of asthma and allergy. *Allergy Asthma Proc,* 2007. 28(1): p. 58-63. IF: 0,970
3. Szalai C., **Ungvári I**, Pelyhe L, Tölgyesi G., Falus A. Asthma from a pharmacogenomic point of view. *Br J Pharmacol,* 2008. 153(8): p. 1602-14. IF: 4,902
4. Semsei AF, Erdélyi DJ, **Ungvári I**, Kámory E, Csókay B, Andrikovics H, Tordai A, Cságoly E, Falus A, Kovács GT, Szalai C., Association of some rare haplotypes and genotype combinations in the MDR1 gene with childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res.* 2008 Aug;32(8):1214-20. IF: 2,390

5. Tölgyesi G, Molnár V, Semsei AF, Kiszél P, **Ungvári I**, Pócza P, Wiener Z, Komlósi ZI, Kunos L, Gálffy G, Losonczy G, Seres I, Falus A, Szalai C. Gene expression profiling of experimental asthma reveals a possible role of paraoxonase-1 in the disease. *Int Immunol.* 2009 Aug;21(8):967-75. IF: 3,403
6. Simon T, Semsei ÁF, **Ungvári I**, Hadadi É, Virág V, Nagy A, Vángor MS, László V, Szalai C, Falus A. Asthma endophenotypes and polymorphisms in the histamine receptor HRH4 gene. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;159(2):109-20. IF: 2,403
7. Semsei AF, Erdelyi DJ, **Ungvári I**, Csagoly E, Hegyi MZ, Kiszél PS, Lautner-Csorba O, Szabolcs J, Masat P, Fekete G, Falus A, Szalai C, Kovacs GT. ABCC1 polymorphisms in anthracycline induced cardiotoxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cell Biol Int.* 2012 Jan;36(1):79-86. IF: 1,482
8. Weiszhár Z, Bikov A, Gálffy G, Tamási L, **Ungvári I**, Szalai C, Losonczy G, Horváth I. Elevated complement factor H levels in asthmatic sputa. *J Clin Immunol.* 2013 Feb;33(2):496-505. IF.: 3,077