

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**LIPIDANYAGCSERE ZAVAROK FOKOZOTT  
ATHEROSCLEROSISSAL JÁRÓ BETEGSÉGEKBEN, KLINIKAI  
ÉS MOLEKULÁRIS GENETIKAI VIZSGÁLATOK**

**Dr. Katona Evelin**

**Témavezetők:**

**Prof. Dr. Paragh György**

**Dr. Remenyik Éva**

**DEBRECENI EGYETEM  
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM  
I.sz. BELGYÓGYÁSZATI KLINIKA  
DEBRECEN**

**2005.**

## **1. Irodalmi áttekintés**

### **1.1. Bevezetés**

Az atherosclerosis patomechanizmusában az érfal endothel sérülését követi a gyulladásos folyamat, melynek progresszióját a sejtes (endothel, simaizomsejt, fibroblaszt, monocyta, lymphocyta, thrombocyta, dendritikus sejtek) és a nem sejtes elemek (citokinek, akut fázis proteinek, alvadási faktorok) közötti kölcsönhatás határozza meg. Az érfal szerkezeti eltérések kialakulásában lokálisan a subendotheliális területben jelen lévő extracelluláris mátrix elemei (kollagének, elasztin, glükózaminoglikánok) játszanak kulcsszerepet. Az életkor előrehaladtával és az atherosclerotikus plakkok progressziójával az érfal rugalmasságát biztosító elasztikus rostok mennyisége csökken, az elasztint hasító elasztáz aktivitás nő, ennek következtében az elasztin degradációs produktumok mennyisége nő, melynek következtében az extracelluláris mátrix bioszintézise több ponton károsodik.

Az utóbbi évtizedekben számos tanulmány igazolta, hogy az emelkedett LDL koleszterin és más ApoB tartalmú lipoproteinek, és az alacsony HDL szint jelentősen megnövelik az atherosclerosis kialakulásának valószínűségét.

Vizsgálatainkban olyan különböző etiológiájú betegségben szenvedő betegcsoportokat vizsgáltunk, ahol az eltérő eredet ellenére hasonló, az atherosclerosis patomechanizmusával rokon lipid metabolizmus-, oxidatív környezet- és extracelluláris mátrix változások észlelhetők. Az általunk vizsgált betegek közül az Alzheimer kórban és vaszkuláris dementiában szenvedő betegek gyakrabban előforduló kórállapotokat képviselnek, a Pseudoxanthoma elasticum (PXE) jóval ritkábban fordul elő, patomechanizmusa és genetikai háttere jelenleg még nem ismert részleteiben.

### **1.2. Az LDL partikula és az oxidált LDL szerepe az atherosclerosisban**

Az atherosclerosis kezdeti fázisának, az ún. fatty streak laesio kialakulásában, majd ezt követően a folyamat progressziójában az oxidált LDL jelentős szereppel bír. Az LDL zsírsavtartalmát az oxidatív károsodás ellen az LDL-hez asszociált alfa-tokoferol, karotinoid, ubiquinol, stb. védi. Az LDL oxidációjában fémionok ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ), lipoxigenázok, myeloperoxidázok és reaktív nitrogén gyökök játszanak szerepet. Az oxidált LDL legnagyobb hányadban a CD36 B típusú scavenger receptoron keresztül kerül felvételre a makrofágokba, ahol a negatív feedback ezen az útvonalon keresztül nem érvényesül, így habos sejtek képződnek, majd kialakul a fatty streak laesio. Ezen

kívül az oxidált LDL számos egyéb proatherogen hatással rendelkezik: fokozza a VCAM-1, ICAM-1, az IL-1, az IL-8, és a MMP1 expresszióját, NF $\kappa$ B-t, gátolja az NO felszabadulását és hatását, fokozza a thrombocyták aggregációját és prokoaguláns hatással is bír.

### **1.3. A HDL partikula és a HDL antiatherosclerotikus hatása**

Az alacsony HDL szint szoros összefüggést mutat a kardiovaszkuláris betegségek rizikójával. Az elmúlt évtizedekben a HDL számos antiatherosclerotikus tulajdonsága vált ismertté. A HDL komplexhez asszociált fehérjék lényegesen meghatározzák a HDL antiatherogen hatékonyságát.

A HDL antiatherogen szerepében hatást fejt ki az érfalra, gátolja a monocyták a VCAM-1 és ICAM-1 által mediált endotheliális adhézióját. A HDL in vitro fokozza az NO szintetáz (NOS) aktivitását és Nitrogén-monoxid (NO) kiáramlást okoz. Elősegíti az endothel sejtek által termelt posztganglandin I<sub>2</sub> (prostacyclin) képzését, csökkentve ezzel a thrombocyták aggregációját, így az atherosclerotikus plakk progresszióját.

A HDL antioxidáns hatásáért jelentős részben a HDL-hez kötött enzimek felelősek. Közülük legjelentősebb a humán paraoxonáz-1 (PON1), de jóval kisebb mértékben néhány egyéb HDL-hez kötött enzim pld. thrombocyták aktiváló faktor acetil hidroláz (platelet-activating factor acetil hidroláz, PAFAH), lecitin-koleszterol aciltranszferáz (LCAT), glutation peroxidáz (GPX) és az ApoA-I is hozzájárul a HDL lipid peroxidációt gátló hatásához. A HDL antioxidáns hatásához továbbá hozzájárul a lipid hidroperoxidok eltávolítása az LDL-ből, azok elszállítása a májba a reverz transzportmechanizmus részeként, valamint egyes prooxidáns hatású átmeneti fémek megkötése.

### **1.4. Az antiatherogen hatású paraoxonáz**

A paraoxonáz (PON) 1 egyike a HDL asszociált fehérjéknek, melyek hozzájárulnak a HDL antiatherogen tulajdonságaihoz. A PON1 HDL-hez kapcsolódó, 45 kDa méretű Ca<sup>++</sup> dependens arilészteráz, mely szorosan asszociált az ApoA-I-hez és a clusterinhez (ApoJ). A PON1 több támadásponton fejt ki antioxidáns hatását: in vitro gátolja az LDL-partikulumok oxidálódását, melynek következtében hatékonyan csökkenti a szérumban az oxidált lipidek mennyiségét, melyeknek jelentős szerepe van az atherosclerosis kialakulásában. Gátolja az oxidált LDL által indukált proinflammatorikus folyamatokat. Kimutatták, hogy a tisztított PON1 meggátolta az

oxidált LDL endothel aktiváló hatását. A PON1 továbbá gátolja a HDL lipoproteinjeinek oxidációját is, így segíti a HDL fiziológias antiatherosclerotikus funkciójának megőrzését is. A PON1 „knockout” egérből származó HDL-ről kimutatták, hogy képtelen meggátolni az LDL oxidációt, érfaluk és makrofágjaik oxidált lipid tartalma és LDL oxidáló kapacitása szignifikánsan növekedett a „vad” típusú testvéreikhez képest, atherosclerotikus plakkjai kiterjedtebbek mint a kontroll társaiké.

A PON szubsztrátjai a szerves foszfátok, aromás karbolsavészterek, karbamátok. A PON1 képes szerves foszfátok, így az inszekticid parathion hidrolízisére is.

A PON géncsalád 3 tagja a *PON1*, *PON2* és a *PON3* szorosan egymás mellett helyezkednek el a 7-es kromoszóma q21.3 és q22.1 közötti régiójában. A PON2 számos szövetben expresszálódó 44kDa molekulatömegű intracelluláris protein, mely valószínűleg szintén antioxidáns szereppel bír, képes gátolni in vitro az LDL oxidációt, melynek pontos mechanizmusa jelenleg tisztázatlan. A PON3 HDL-hez asszociált 40 kDa molekulatömegű antioxidáns protein.

A PON aktivitás részben genetikailag determinált. A *PON1* két ismert gyakori polimorfizmusa: a metionin-leucin (M55L) szubsztitúció az 55-ös pozícióban inkább a PON1 mRNS szintjével áll összefüggésben, a 192-es aminosav glutamin-arginin (Q192R) szubsztitúciója a PON1 enzimaktivitását befolyásolja.

Számos klinikai tanulmányban csökkent PON aktivitást találtak szívinfarktuson átesett egyéneknél, fokozott atherosclerosisral járó állapotokban, familiáris hyperkoleszterinémiában, 1-es és 2-es típusú diabetes mellitusban, HDL deficienciában. A csökkent enzimaktivitás részben köszönhető a genetikai háttérnek, az egyes polimorfizmusok előfordulása és a kórképek kialakulása közötti összefüggést vizsgáló tanulmányok eredményei nem egybehangzóak. A PON1 szintje szignifikánsan csökkent ISZB-s esetekben a genotípustól függetlenül. A PON1 aktivitása pontosabban jellemzi a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának valószínűségét, mint a PON1 genotípusa.

A PON1 aktivitását számos tényező befolyásolja: diéta, életmód, dohányzás, életkor és különböző kórállapotok. Az enzim aktivitását csökkentik a gyulladáshoz vezető citokinek, és az oxidált LDL is. A PON1 aktivitása, genotípusa (hisz a 192-es pozícióban lévő polimorfizmus az enzim aktivitását befolyásolja) meghatározza az egyéneknél a PON1 detoxifikáló képességét, a káros oxidált lipidek elleni protektív szerepet. Így jelentőséggel bírhat minden olyan tényező és állapot, melyről sikerül kimutatni, hogy megváltoztatja az antiatherosclerotikus enzim viselkedését.

Munkacsoportunk korábban több betegcsoportban vizsgálta a PON1 jellemzőit. Uraemiás betegcsoportban és vesetranszplantált betegekben szignifikánsan alacsonyabb HDL-re standardizált PON1 aktivitás értéket találtunk. A 2-es típusú diabeteses betegek esetében a szignifikánsan alacsonyabb PON1 aktivitást a 3 hónapon át alkalmazott gemfibrozil terápia szignifikánsan növelte, és a hyperlipidaemiás betegek körében szintén hasonló hatást észleltünk gemfibrozil terápiát követően.

### **1.5. Az Alzheimer kór és a vaszkuláris demencia**

A populáció előregedésével egyre nagyobb jelentősége van a különböző eredetű demenciáknak. A gyakoriságot tekintve nagy jelentőségű az Alzheimer típusú (AD) és a vaszkuláris (VD) eredetű demencia. A lipid metabolizmus eltéréseit összefüggésbe hozták számos neurodegeneratív betegség kialakulásával. Az emelkedett szérum LDL-koleszterol szint, oxidatív stressz, lipid peroxidáció és az Alzheimer betegség patomechanizmusa közötti összefüggést mutattak ki korábban. A pontos mechanizmus mellyel a lipid eltérések az AD patomechanizmusához hozzájárulnak még nem ismertek teljes egészében. Az Alzheimer kór fő patológiai jellemzői:  $\beta$ -amyloid extracelluláris depozíciója a szenilis plakkokban, neurofibrilláris csomók képződése (akkumulálódott  $\tau$ -proteinekből) és az inflammatorikus folyamatok felerősödése. Az oxidált LDL lerakódik a szenilis plakkokban, a neuronok strukturális változását és pusztulását okozva. Az AD kialakulásában a lipoproteinek jelentősége jól ismert, hiszen az ApoE-2 és ApoE-3 jelenléte véd, míg az ApoE-4 elősegíti az AD kialakulását. Az ApoE-2 és ApoE-3 a  $\tau$ -proteinekhez kötődve stabil kötést hoz létre, ezáltal gátolja annak foszforilációját, így a sejt microtubuláris és citoskeletális struktúráját stabilizálja. Az ApoE-4 a  $\tau$ -proteinnel instabil kötést hoz létre és így nem védi meg azt a foszforilációtól, melynek következtében neurofibrillum képződés indul meg a sejt károsodásával együtt.

Az utóbbi évek vizsgálatai egyre inkább hangsúlyozzák az oxidatív folyamatok jelentőségét mind Alzheimer kórban, valamint a vaszkuláris eredetű demenciákban egyaránt. Vaszkuláris demenciában az atherosclerosis következtében elzáródnak az agyi erek, ez okoz következményes cerebrális károsodást, az oxidatív folyamatok szerepe ebben, pedig jól ismert. Behl és mtsai kimutatták, hogy az amyloid szabadgyököket termel, ami károsítja a neuront. Dyrks és mtsai azt találták, hogy az oxidatív stressz hozzájárul a szolubilis amyloid inszolubilis plakká történő alakításához. A szérum

ApoA-I koncentráció és az Alzheimer betegség súlyossága között összefüggést találtak, továbbá a HDL in vitro gátolja a  $\beta$ -amyloid képződését.

A fentiek alapján az atherosclerosis, a VD és az AD patomechanizmusa között hasonlóságok fedezhetők fel, hisz mindkét esetben fontos a progresszió szempontjából a lipid-, és az oxidatív homeosztázis. A pathomechanizmus szempontjából nem csak a fokozott oxidatív folyamatok és lipid eltérések játszhatnak szerepet, hanem az antioxidatív rendszer működésének hiányosságai is, mint pl. a HDL-hez kötött PON1 aktivitásának változása. Klinikai tanulmányokban nem találtak összefüggést a PON1 genotípusa és az Alzheimer betegség előfordulása között.

### **1.6. ABC transzporter fehérjecsald, ABCA1, ABCC6**

Az ABC transzporter fehérjecsald tagjai konzervatív membrán transzporterek, melyek ATP hidrolízisével különböző molekulákat szállítanak a sejtmembránon. Jelenleg 48 képviselőjük ismert, melyet 7 alcsoportba soroltak. A fehérjecsald egyes tagjainak a fiziológiai funkciója, a szubsztrátjai még nem pontosan ismertek, több képviselőjüknek a celluláris lipid transzportban van szerepe. Az ABCB1 és az ABCB4 foszfolipidek transzportját képes lebonyolítani a sejtmembránon át, az ABCA1 foszfolipid/koleszterol ko-transzporter. A fehérjék génjeinek defektusa különböző hereditér betegségeket okozhat: ABCA1 (Tangier betegség), ABCA4 (Stargardt betegség, retinitis pigmentosa), ABCC2 (Dubin-Johnson szindróma), ABCC6 (pseudoxanthoma elasticum), ABCC7 (cisztikus fibrózis). A makrofág differenciációra, a lipid homeosztázisra kifejtett hatás következtében az ABC transzportereknek potenciális szerepük van az atherogenesisben.

Az ABCC6 (multidrug resistance associated protein 6, MRP6) fehérje defektusát a közelmúltban azonosították a Pseudoxanthoma elasticum (PXE) hátterében. Az ABCC6 fehérje a bazolaterális plazmamembránra lokalizálódik polarizált sejtekben, a sejtmembránon keresztül történő,  $Mg^{++}$  és ATP dependens efflux transzport funkcióval rendelkezik. In vitro körülmények között kimutatták, hogy szubsztrátja a glutation S-konjugált leukotrién  $C_4$ , a S-(2,4-dinitrofenil) glutation és az anionos ciklopentapeptid BQ123. Az ABCC6 fehérje pontos funkciója, természetes szubsztrátja jelenleg is ismeretlen, továbbá nem ismert a fehérje defektus és a klinikai tünetek kialakulása közötti kapcsolat sem.

## 1.7. A Pseudoxanthoma elasticum

A PXE monogénes, öröklődő betegség, melyre bőr-, szemtünetek és korai kardiovaszkuláris történések jellemzőek, fokozott atherosclerosissal kísérvé. A fő patológiai jellegzetessége a morfológiailag kóros, mineralizált, különböző szövetekben akkumulálódó töredezett elasztikus rostok.

A PXE (OMIM 264800) hátterében 2000-ben írták le az ATP binding cassette transporter C6 (ABCC6) (MIM #603234) fehérje génjének (kromoszóma lókus: 16p13.1) a mutációját mint oki tényezőt. Ezidáig közel 80 mutációt azonosítottak a 31 exont tartalmazó *ABCC6* génben, ezek közül 3 nagyobb deléciót írtak le (15 exon, 23-29 exon, 1-31 exon delécióit). A mutációk többsége a 24. és 30. exon között helyezkedik el, ez a régió kódolja a fehérje konzervatív nukleotid kötő doménjét (NBD), melynek épsége a fehérje működéséhez elengedhetetlen.

Az *ABCC6* fehérje által transzportált eddig még ismeretlen anyagnak valószínűleg fontos szerepe van az extracelluláris mátrixban az elasztikus rostok képződésében és stabilitásában, hiszen a tünetek kialakulásának az alapja az elasztikus rostok károsodása a különböző szervekben. Az elasztikus rostok károsodásán kívül az extracelluláris mártix egyéb komponensei is károsodnak PXE-ben, mint pld.: kollagének, proteoglikánok. A PXE tehát egy olyan örökletes anyagcserebetegség, melyben a metabolikus eltérések az extracelluláris mártix homeosztázisát károsítják.

A PXE hisztológiai jellemzője a bőrben az akkumulálódott pleiomorf elasztikus anyag és a töredezett kalcifikálódott elasztikus rostok. A különböző szervekben kialakuló tünetek szintén a kötőszövetben felhalmozódó töredezett, kalcifikálódott kóros elasztikus rostok felhalmozódásával összefüggésben alakulnak ki.

A betegség bőrmanifesztációi: sárga összefolyó papulák, rugalmatlan, laza bőr, elasztin-szerű akkumulálódott amorf anyag, melyek leginkább a nyakon az axillában, a könyök és a térd hajlító felszínén, ill. a periumbilikális régióban találhatóak meg. A szemben a legfőbb elváltozás az „angiooid streak” léziók megjelenése, mely a retina elasztinban gazdag rétegének, a Bruch membrán patológiás feltöredezésének az eredménye. A choroidea és a retina ereinek a károsodása további neovaszkularizációt, vérzést, hegesedést okoz, melyek komoly látáskárosodáshoz, akár vaksághoz is vezethetnek. A kardiovaszkuláris rendszerben az erek károsodása következtében a PXE korai szívinfarktushoz, klaudikációhoz vezethet.

A PXE klinikai megjelenése nagyfokú változatosságot mutat a PXE-ben szenvedő betegek között a tünetek megjelenésében, mely szervrendszer károsodása dominál, és az egyes esetek genetikai heterogenitást is mutatnak.

A 6 klinikailag jól karakterizált és a diagnosztikus kritériumoknak megfelelő PXE-s betegünk genetikai hátterének vizsgálatával az eddig ismert genetikai eltéréseket igyekeztünk bővíteni. A klinikai megjelenés és a genetikai defektus között próbáltunk kapcsolatot találni, valamint fel szeretnénk hívni a figyelmet a genomális deléciók jelentőségére ebben a betegségben. Végül a betegek bőrbioptizás mintáiból származó fibroblasztokon végzett funkcionális vizsgálatokkal próbáltunk közelebb jutni ahhoz, hogy az ABCC6 defektusa következtében hogyan alakulnak ki az atherosclerosisral rokon extracelluláris mátrix eltérések.

## **2. Célkitűzések:**

A fentiek azt mutatják, hogy a különböző betegségekben hasonlóképpen módosulhat a lipidanyagcsere, az antioxidatív rendszer, az extracelluláris mátrix, ezáltal elősegíthetik ezen betegségekben az atherosclerosis kialakulását, progresszióját, ill. az alapbetegség patomechanizmusában is szerepet játszhatnak az atherosclerosisral rokon folyamatok.

A PhD értekezés gyakori elbutulással járó betegségekben, valamint egy ritka genodermatózis vizsgálatával azok patomechanizmusának megértéséhez kíván adatokat szolgáltatni.

### **Részletes célkitűzések:**

I. Alzheimer betegségben (AD) és vaszkuláris dementiában (VD) vizsgálni

1. a lipid paramétereket, az ApoE polimorfizmust
2. a szérumbiliverin aktivitást
3. összefüggést keresni a fenti paraméterek és a betegségek kialakulásával, valamint súlyosságával

II. Pseudoxanthoma elasticumban

1. szenvedő családok klinikai vizsgálata, családfa elemzése, az öröklődés menet azonosítása
2. a családtagok genetikai analízisével mutációk detektálása
3. az eddig még nem közölt új mutációk oki szerepének bizonyítása, jelentőségének értékelése
4. PXE fibroblasztok tenyésztése, funkcionális vizsgálata, az elasztáz aktivitás és IL-1 szerepének tisztázása az extracelluláris mátrix eltérései hátterében.

### 3. Módszerek

A szérumban koleszterin és triglicerid szintet Boehringer Mannheim enzim kittel, a HDL-koleszterint foszforvolframát-magnézium kicsapásos módszerrel határoztuk meg. Az LDL-C értékét a Friedewald formula alapján számítottuk ki (4,5 mmol/l szérumban triglicerid szint alatt). Az apolipoproteinek mérése immun-nefelometriás módszerrel történt (Orion Diagnostica kit) a DEOEC Központi Klinikai Kémia Laboratórium rutin diagnosztikus laboratóriumában.

#### *Szérumban paraoxonáz aktivitás meghatározása*

A szérumban paraoxonáz aktivitás mérésekor paraoxont (O,O-dietil-O-p-nitrofenilfoszfát Sigma) alkalmaztunk szubsztrátként, amely a szérumban levő paraoxonáz enzim hatására 4-nitrofenollá alakul át, abszorpciónövekedést okozva 412 nm-en. Mérésre 50 µl szérumban 1 ml Tris/HCl puffert (100 mmol/l, pH: 8,0) adunk, mely 2 mmol/l CaCl<sub>2</sub>-t és 5,5 mmol/l paraoxont tartalmazott. A 4-nitrofenol keletkezését 412 nm-en, 25°C-on követtük Hewlett-Packard 8453 UV-Visible spektrofotométerrel. Az enzimaktivitás számítása a moláris extinkciós koefficiens (17100 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) segítségével történt. Az enzimaktivitást U/ml egységben adtuk meg. 1 U az enzimaktivitás ha 1 perc alatt 1 nmol 4-nitrofenol keletkezik. 1 M NaCl jelenlétében az enzim aktív helyének konformációs állapota megváltozik, amely a paraoxon könnyebb kötődését és gyorsabb átalakulását eredményezi. Az egységnyi HDL-re jutó paraoxonáz aktivitást a PON/HDL hányados képzésével határoztuk meg.

#### *Arilészteráz aktivitás mérése:*

Fenilacetát szubsztrát hidrolízisével spektrofotometriásan végeztük. 1 mM fenilacetátot 20 mM Tris/HCl (pH: 8,0) pufférhez adva szérumban mintát, 270 nm-en mértük az abszorpciónövekedést. Az enzimaktivitás számítása a moláris extinkciós koefficiens (17100 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) segítségével történt. Az enzimaktivitást U/ml egységben adtuk meg. 1 U az enzimaktivitás ha 1 perc alatt 1 µmol fenilacetátot hidrolizál.

#### *ApoE polimorfizmus meghatározása*

ApoE polimorfizmus meghatározása PCR-RFLP módszerrel: A vizsgálatokat perifériás vér leukocytáiból, sóextrakciós módszerrel nyert genomiális DNS-n PCR technikával, illetve az azt követően HhaI restrikciós enzimemésztéssel nyert fragmentek polyacrilamid elektroforézisével végeztük el.

### *Statisztikai módszerek*

A statisztikai analízishez a PC SAS rendszert (6.12 verzió) használtuk (SAS Institute, Cary NC 275313 USA), leíró statisztikát alkalmaztunk a vizsgált paraméterekre (átlag $\pm$ SD), míg a paraméterek időbeli változását ANOVA teszttel, illetve kétmintás t-próbával vizsgáltuk. A  $p < 0,05$  valószínűségi szintet tekintettük szignifikánsnak. Az egyes paraméterek között korrelációs számítást végeztünk.

### *Genetikai analízis*

A PXE-t okozó mutáció azonosítása érdekében az *ABCC6* gén mind a 31 exonját szekvenáltuk a betegek genomiális DNS mintájából.

A genomiális DNS preparálását a betegek EDTA-val alvadásgátolt perifériás vénás véreből végeztük Qiagen Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével. Az *ABCC6* gén 31 exonjának nukleotid szekvenciáját a korábban publikált cDNS szekvenciához (GenBank accession number AF076622) és BAC (Bacterial artificial chromosome) klónhoz CIT987SK-A-962B4 (GenBank accession number U91318) hasonlítottuk.

A polimeráz láncreakcióhoz felhasznált primerek az *ABCC6* exonjaihoz Charles D. Boyd-tól származtak (Pacific Biomedical Research Center, University of Hawaii, Honolulu). A deléció detektálásához használt primereket a 1. Táblázatban tüntettük fel. A 31 exon amplifikációjához Qiagen Taq PCR Core Kit-et használtunk (Qiagen, Hilden, Germany), reakcióelegyünk a gyártó utasításainak megfelelő volt. A PCR-t Perkin Elmer Thermocycler-ben végeztük a következő paraméterekkel: 2 min 94 °C, 35 cikluson át 40 sec 94 °C, 1 min 55 °C 10-31 exonok esetén, (1 min 60 °C 1-9 exonok esetében), 1 min 72 °C, majd végül 5 min 72 °C. A PCR termékeket QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével tisztítottuk, etídium-bromiddal jelölve 2%-os agaróz gélen vizualizáltuk. A ciklus-szekvenálást ABI Prism Genetic Analyzer 3100 capillary automata fluoreszcens szekvenátoron (PE Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) végeztük, Big-Dye Terminator (DNA sequencing kit, PE Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) ciklus szekvenálás reakció után az amplifikált genomikus szakaszokat DyeEx 96 kit segítségével tisztítottuk, majd mindkét szálát szekvenáltuk az ABI szekvenátoron, a gyártó utasításainak megfelelően.

A deléció detektálása során a PCR reakció a fentiekkel megegyező paraméterekkel történt.

ABCC6ex22F	5'-CAT CTG CCA TGG GCA TGT TT-3'	Boyd CD
ABCC6ex23F	5'-GGG TGG CCA AGC CAT AAG AT-3'	Boyd CD
ABCC6ex23FR	5'-TAG AAT TCC CAG GGA CAG GG-3'	Boyd CD
ABCC6ex26FR	5'-AAC CTT TTC TGG GAG GCC AG-3'	Boyd CD
ABCC6ex26R	5'-GCC TGT AGC AGA TGT CAA CA-3'	Boyd CD
ABCC6ex31a	5'-CGT GTG GAG CTA TCG ATG AC-3'	Boyd CD
23int1F	5'-CAA GTA GCT GGG ACT ACA GG-3'	-
23int2F	5'-AAT TCC TGG CCC AAG TGA T-3'	-
25int1R	5'-TCA CAC CTA TAA TCT CAG CA-3'	-
25int2R	5'-TCC TTA AGC TTA GCA GCC TT-3'	-
25int3R	5'-TAG CAG CTC TAG CCC TGC CA-3'	-
IVS22F	5'-TCC CCT AAA GAT GGA GAG AT-3'	Le Saux 2001
IVS29R	5'-CTG TAG GCA GGT CAT TCA AA-3'	Le Saux 2001

## 1. Táblázat A deléción azonosításához használt primerek

Egyedi nukleotid polimorfizmus (single nucleotide polymorphisms) (SNP), és pont mutáció detektálást végeztünk az *ABCC6* génben TaqMan real-time PCR assay-használatával. A TaqMan primereket és hibridizációs primereket az ABI assay-by-design szolgálata tervezte. A hibridizáló primerek a következők voltak:

**Leu 495 His** :L495H-f: 5'-GCA AAT GAG GCA GAA GGA CTC A-3', L495H-r: 5'-CCC AGC CAT GGA ACT TGA TG-3', L495H-VIC: 5'-VIC-CTA TCC TCA GGA ACT C-MGB-NFQ-3', L495H-FAM: 5'-FAM-CTA TCC ACA GGA ACT C-MGB-NFQ-3';  
**Arg 1064 Trp** : R1064W-f: 5'-ACG GTT GAC GTG GAC ATT CC-3', R1064W-r: 5'-GGA GTC CAA AGG CGT ACA TCA-3', R1064W-VIC: 5'-VIC-AAC TCC GGT CCC TG-MGB-NFQ-3', R1064W-FAM: 5'-AAA CTC TGG TCC CTG C-MGB-NFQ-3').

A PCR reakciót standard thermocycler-ben (MWG Primus) végeztük, 5 µl-es reakció eleggyel, végpont fluoreszcenciát detektáltunk ABI Prism 6700HT Analyser (TaqMan) készülékkel. A reakcióelegy térfogata 5 µl volt, 5 ng DNS-t tartalmazott, a primerek koncentrációja 0,9 µM, a hibridizációs primereké 0.2µM volt. Standard PCR paramétereket alkalmaztunk: 10 perc kezdeti denaturációt követően 40 cikluson át: 15 sec 92°C-on és 1 min 60°C-on. Kontrollként előzetesen megszekvenált, ismert nukleotidszekvenciájú mintákat használtunk.

### *Fibroblaszt tenyésztés és stimulálás*

PXE-s betegek bőrbioptis mintájából fibroblaszt tenyésztést végeztünk 5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub> mellett 37°C-on, Dulbecco's modified Eagle's mediumban (DMEM) (Biochrom AG, Berlin), mely 10% fetal calf serum-ot (FCS) és 5% MEM-et tartalmazott (GIBCO). A sejteket az 5-10. passzázs között használtuk. A fibroblasztokat vizsgálatainkhoz szubkonfluens állapotban használtuk fel. In vitro stimulációhoz a mediumot 0,2% BSA-t (bovine serum albumin) és rekombináns humán IL-1β-t (100 I.U./mL) (R&D Systems) tartalmazó DMEM-ra, vagy a kontroll esetén phosphate buffer saline-ra (PBS) cseréltük, és további 48 ill. 72 órán át inkubáltuk a sejteket. Az inkubálás befejezése után jéghideg PBS-el lemostuk a sejteket, és 1 ml PBS-ben vettük

fel őket. A sejteket ultracentrifugálással homogenizáltuk 5000 g mellett 10 percen át, és a felülúszót használtuk az elasztáz aktivitás meghatározására.

#### *Elasztáz aktivitás meghatározása*

Az elasztáz aktivitás meghatározást Szendrői és mtsai. által korábban leírt módon végeztük, kis módosítással. Szukcinil-trialanin paranitroanilidot (Suc(Ala)<sub>3</sub>pNA, SIGMA) használtunk szintetikus szubsztrátként. N-etil-pirrolidonban (Fluka), 125 mM-os koncentrációban oldottuk fel a Suc(Ala)<sub>3</sub>NA-t, ezt az oldatot 1:10 arányban hígítottuk 0,1% Brij 35-t (Calbiochem) tartalmazó 100 mM koncentrációjú Tris-HCl pufferben, a pH:8,0 volt. A szubsztrát oldatából 20 µl-t adtunk 30 µl sertés pancreas elasztáz oldatához (Sigma) (0,286 mU/mL sertés pancreas elasztázt oldottunk fel 1:100 arányban 0,1% Brij 35-t tartalmazó 100 mM koncentrációjú Tris-HCl pufferben, pH:8,0) és 220 µL 0,1% Brij 35-t tartalmazó 100 mM-os Tris-HCl puffert adtunk hozzá. Ezt a reakcióelegyet 37°C-on inkubáltuk és a spektrofotometriásan követtük a reakciót 405 nm-en Sunrise, Tecan spektrofotométerrel (Crailsheim, Németország). 1 U elasztáz aktivitás definíciója: 1 nmol nitroanilin felszabadulása óránként (a moláris koefficiens  $\epsilon_M=8800$ ).

## 4. Eredmények

### 4.1. A PON aktivitása és lipid eltérések AD és VD betegekben

A vizsgálatban 30 (20 nő, 10 férfi) Alzheimer kórban szenvedő, 40 (27 nő, 13 férfi) vaszkuláris demens beteg és 40 (26 nő, 14 férfi) korban illeszkedő egészséges önkéntes vett részt. A beválasztáskor a BNO-10 (és DSM-IV) diagnosztikus rendszert használtuk.

#### *Lipid eltérések*

Mind az VD, mind az AD betegek koleszterin szintje szignifikánsan magasabb volt (K:  $4.71 \pm 0.89$ , VD:  $6.3 \pm 0.8$ , AD:  $6.52 \pm 0.7$  mmol/l;  $p < 0.001$ ) a kontroll csoporttal összehasonlítva. Hasonló eltérést találtunk az LDL koleszterin értékekben (K:  $2.6 \pm 0.6$ , VD:  $3.96 \pm 0.8$ , AD:  $3.84 \pm 0.6$  mmol/l;  $p < 0.001$ ). A triglicerid szint átlagértéke mindkét betegcsoportban magasabb volt, de ez nem volt szignifikáns (K:  $1.06 \pm 0.52$ , VD:  $1.47 \pm 0.8$ , AD:  $1.68 \pm 0.1$  mmol/l). A védő lipoprotein frakció, a HDL szint az AD betegekben szignifikánsan magasabb volt, mint a K és a VD csoportban (K:  $1.47 \pm 0.1$ , VD:  $1.43 \pm 0.31$ , AD:  $1.95 \pm 0.1$ , mmol/l;  $p < 0.001$ ).

#### *A szérum PON aktivitás*

A HDL-hez kötött paraoxonáz aktivitás szignifikánsan csökkent az Alzheimer és vaszkuláris demenciában szenvedőknél az egészséges kontrollhoz képest (K:  $188 \pm 55$ , VD:  $151 \pm 47$ , AD:  $131 \pm 40$  U/l;  $p < 0.05$ ). A só stimulálta paraoxonáz aktivitás szignifikánsan alacsonyabb volt mind az AD, mind a VD csoportban (K:  $422 \pm 120$ , VD:  $343 \pm 89$ , AD:  $272 \pm 100$  U/l;  $p < 0.05$ ), míg az arileszteráz aktivitás szignifikánsan nem változott (K:  $130 \pm 35$ , VD:  $128 \pm 40$ , AD:  $123 \pm 34$  U/l). Az egységnyi HDL-re jutó paraoxonáz aktivitás (PON/HDL) mind az AD, mind a VD csoportban szignifikánsan csökkent (K:  $194 \pm 79$ , VD:  $98.4 \pm 34$ , AD:  $88.4 \pm 34$ ;  $p < 0.001$ ).

#### *ApoE isoformok eloszlása*

Az ApoE isoformok közül 44%-ban fordult elő az E3/4, 33%-ban az E3/3, 19%-ban a E4/4, 4%-ban az E2/3 az Alzheimer betegcsoportban, míg a vaszkuláris demenciában szenvedőknél az ApoE megoszlása a következő volt: 56%-ban E3/3, 38%-ban E3/4, 6%-ban E2/3. Az egészséges kontrollokban 65%-ban E3/3, 23%-ban E3/4, 8%-ban E2/3, 1%-ban E4/4, 1%-ban E2/4, 2%-ban E2/2 ApoE isoform fordult elő (2. Táblázat).

## 4.2. PXE-ban szenvedő betegek klinikai jellemzői

### *Pseudoxanthoma elasticumban szenvedő betegek adatai*

Tanulmányunkban 6 PXE-ban szenvedő beteg vizsgálatát végeztük. A betegek közül ketten Németországból származtak (Regensburgi Egyetem), és négyen Magyarországról (DEOEC Bőrklínika, SOTE Bőrklínika). A betegek megfeleltek a Lebwohl és mtsai által 1994-ben ajánlott PXE klasszifikációs rendszernek. Az elérhető tünetmentes hozzátartozókat szintén bevontuk a vizsgálatunkba. A genetikai vizsgálatokhoz szükséges EDTA-val alvadásgátolt vért, az elasztáz aktivitás méréséhez szükséges szérum mintát felvilágosítás és beleegyezést követően vettük le. 4 beteg (P2, P3, P4) esetén a PXE által nem érintett bőrterületből biopsziás mintavétel történt, kontrollként plasztikai műtéten átesett betegekből (n=6) műtét során nyert szövetmintát használtunk. A tanulmány a helyi etikai bizottság szabályzata alapján és jóváhagyásával készült. Vizsgált betegek közül öt betegünk kórlefolyása megfelelt az irodalom alapján várható klinikai képnek. Minden betegünk esetében bőrbiopszia is megerősítette a diagnózist. Egyéb kardiovaszkuláris érintettséget nem detektáltunk. A betegek klinikai és genetikai adatai a 2. Táblázatban találhatóak. Betegeink családtagjai között nem fordult elő manifeszt PXE. A családokban gyakori a hipertonia, a kardio- és cerebrovaszkuláris betegségek előfordulása, mely a hordozó heterozigóta genotípussal összefüggésben áll.

P6-os betegünk klinikai megjelenése szintén jellegzetes a pseudoxanthoma elasticum tüneteire, de a fenti betegektől eltérően súlyosabb, szisztémás formában jelentkezett, igen korai kezdettel (2. Táblázat). A beteg bőrtüneteit 7 éves korában fedezték fel periumbilikálisan és a nyakon, az axillában és a vállakon. Jelenleg, 27 éves korban igen kiterjedt, szisztémás bőrérzékenységgel rendelkezik. Egy éves korában derült ki hypertóniája, ennek hátterében renovaszkuláris eredet igazolódott, 8 éves korában az arteria renalis szűkületét sebészi úton megoldották, azóta vérnyomása normalizálódott. Szemészeti komplikációit 17 éves korában fedezték fel, „angiooid streak”, bilaterális macula degeneráció és bal oldali csökkent vízus került leírásra. Majd ezt követően mitrális prolapszust és mitrális insufficienciát diagnosztizáltak. Mindhárom jellegzetesen PXE-ben érintett szervben igen korán súlyos formában jelentkeztek tünetek az esetében. A beteg családjában nem tudtak rokonházasságról, és PXE-re jellegzetes bőrtünetei nem voltak egy családtagnak sem. Mindkét szülő anamnézisében hipertonia szerepel, az édesanyának tranzitorikus ischaemiás agyi keringészavara volt.

	Beteg	Mutáció	Exon	Aminosav	Genotípus	Betegség kezdete	Bőr-tünetek, biopszia	Szemtünetek	Kardio-vaszkuláris tünetek
1.	21 éves magyar nő	C3490T	24.	R1164X	Homozigóta	12 év	PXE-re jellemző Biopszia:+	-	-
2.	49 éves magyar nő	C3421T C4015T	24. 28.	R1141X R1339C	Kompond heterozigóta	8 év	PXE-re jellemző Biopszia:+	Angioid streak, Choroidea atrófia	-
3.	23 éves német férfi	T1484A C4015T	12. 28.	L495H R1339C	Kompond heterozigóta	4 év	PXE-re jellemző Biopszia:+	Pepper and salt fundus	-
4.	53 éves német férfi	C3421T	24.	R1141X	Homozigóta	22 év	PXE-re jellemző Biopszia:+	Angioid streak, Súlyos látásromlás	-
5.	19 éves magyar nő	C1552T	12.	R518X	Homozigóta	10 év	PXE-re jellemző Biopszia:+	-	Mitrális prolapszus
6.	27 éves magyar nő	del23-29 del24-25	23-29 24-25		Kompond heterozigóta	7 év	Súlyos, disszeminált Biopszia:+	Angioid streak, bilaterális macula degeneráció, csökkent vízus (17 é)	Hypertonia (1é), art. renalis sztenózis, mitrális prolapszus, mitrális insuficiencia

## 2. Táblázat A PXE-ban szenvedő betegek adatainak összefoglalása

### 4.3. PXE-ban szenvedő betegeink genetikai analízise, családfa elemzése

Klinikailag jól karakterizált 6 PXE-ben szenvedő beteg és elérhető családtagjaik *ABCC6* génjének genetikai analízisét végeztük.

5 betegünk esetében (P1-P5) a rendelkezésünkre álló adatok segítségével családfa vizsgálatot végeztünk. A családtagok genetikai vizsgálata minden esetben recesszív öröklődésmentet igazolt. P1-P5 betegünkben 5 különböző pontmutációt találtunk (2. Táblázat), 3 közülük homozigóta volt (P1, P4, P5), a P2 és P3 beteg esetében kompond heterozigóta genotípust sikerült igazolni. A pontmutációk között 2 misszensz R1339C, L495H, és 3 nonszensz mutációt (R1164X, R1141X, R518X) igazoltunk.

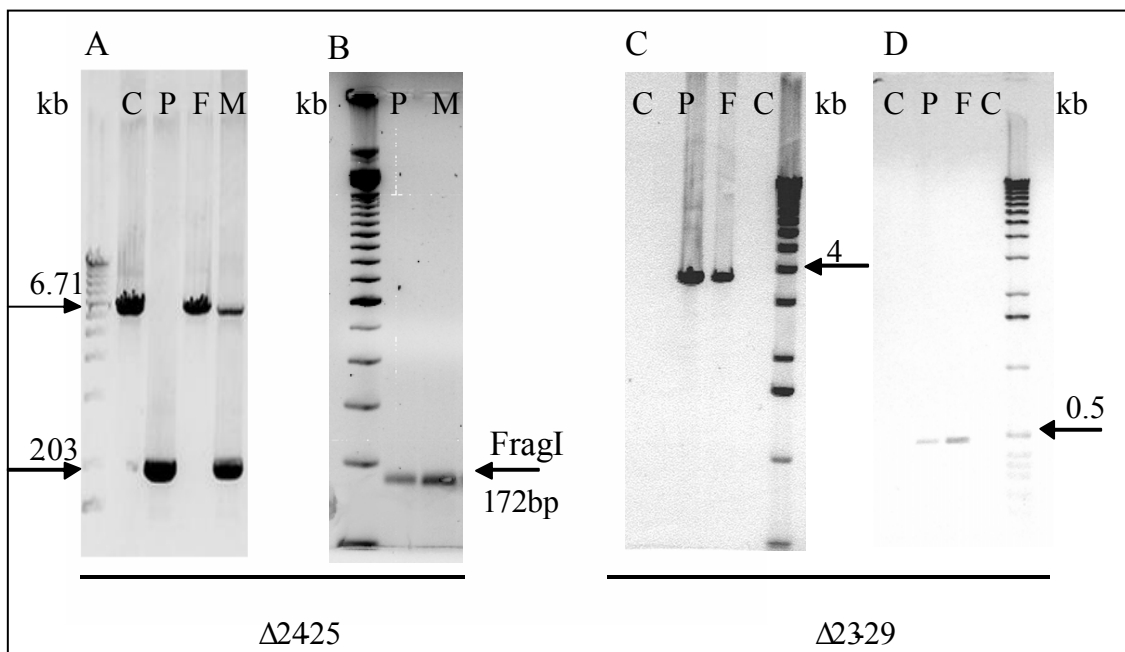
P3-as betegünk genetikai analízise során a 28-as exonban az R1339C (C4015T) misszensz mutációt azonosítottuk, erre nézve a beteg heterozigóta volt. Ezen kívül a korábban már publikált betegségokozó mutáción kívül két, eddig még nem közölt nukleotid polimorfizmust találtunk: a 23-as exonban a R1064W (C3190T), és a 12-es exonban L495H (T1484A) eltéréseket. Ezt követően SNP és mutáció detektálást végeztünk TaqMan real-time PCR assay-használatával, melynek során a T1484A

(L495H) pontmutáció, mely Leucin – Hisztidin cserét eredményez a 12-es exonban, betegségkókozó mutációnak bizonyult, melyet elsőként detektáltunk. Így a betegünk kompond heterozigóta az R1339C és a L495H mutációkra. Az L495H új mutációt a család anyai ágában sikerült azonosítani, míg az R1339C mutációt a család apai ágában.

P6-os betegünk (2. Táblázat) DNS szekvenálása során nem sikerült mutációt igazolni az 1-23 és 26-31 exonokban. A 24. és 25. exon amplifikációja során végzett PCR reakció nem eredményezett PCR produktumot, így felvetődött hogy a beteg mindkét alléljén hiányzik ez a genomális régió. Hosszú DNS templátok amplifikálására alkalmas „Long range PCR” reakcióval a 23-26-os exon régiójában a betegben (2,03 kilobázis, kb) rövidebb PCR produktum keletkezett, mint a kontrollban (6,71 kb) (1. Ábra). A beteg édesanyja heterozigóta volt erre a 24-25 -ös exont tartalmazó delécióra, mivel az ő esetében a rövidebb PCR termék mellett normál nagyságú PCR produktum is keletkezett (1. Ábra).

Betegünk édesapjának egyik alléljén intronikus primereket (1. Táblázat) kombinációban alkalmazva igazoltuk, hogy hordozza a gyakran előforduló 23-29 exonokat érintő deléciót.

Az új, eddig még nem közölt del24-25 törési pontjának azonosítása céljából a P6-os beteg DNS mintájából a 23 forward (F) és 26 reverse (R) primerekkel történt PCR reakcióból származó 2,03 kb nagyságú fúziós PCR termékben DNS szekvenálást végeztünk olyan primerekkel, melyek a 24-es és 25-ös exonok köré lokalizálódnak. Így azonosítottuk a törési pontot a 2. Ábrán látható pozícióban a megadott primerekkel. A törés mind 3', mind az 5' régióban ismétlődő timineket tartalmazó DNS szakaszban következett be. A fúzió helyének megerősítése céljából újabb PCR reakciót végeztünk a 2,03 kb nagyságú fúziós terméken, a törési ponthoz lehető legközelebb pozícióba lokalizált primerekkel: 23int1F és 25int1R (1. Táblázat). Ebben a reakcióban egy 172 bázispár hosszúságú terméket kaptunk (1. Ábra), ennek szekvenálása megerősítette az előzőekben feltételezett törési pontot (2. Ábra), ugyanazt az eredményt kaptuk, mint a 2,03 kb hosszúságú fúziós termék szekvenálása során. A deléció lokalizációja repetitív DNS szakaszok között (Alu repeat) helyezkedik el. A proximális törési pont egy 295 bázispár hosszúságú, inverz orientációjú „Alu-repeat” (AluJo) szakasz közepén helyezkedik el. A disztális törési pont egy ismétlődő T-ket tartalmazó szakaszban helyezkedik el, a 295 bázispár hosszúságú „Alu-repeat” (AluJb) szakasz közepén. A deléció pozícióit a 16-os kromoszóma teljes szekvenciájának adatbázisa alapján (2004. máj.) határoztuk meg.



1. Ábra. A P6 beteg deléciójának kimutatása PCR produktumok analizisével agaróz gélen

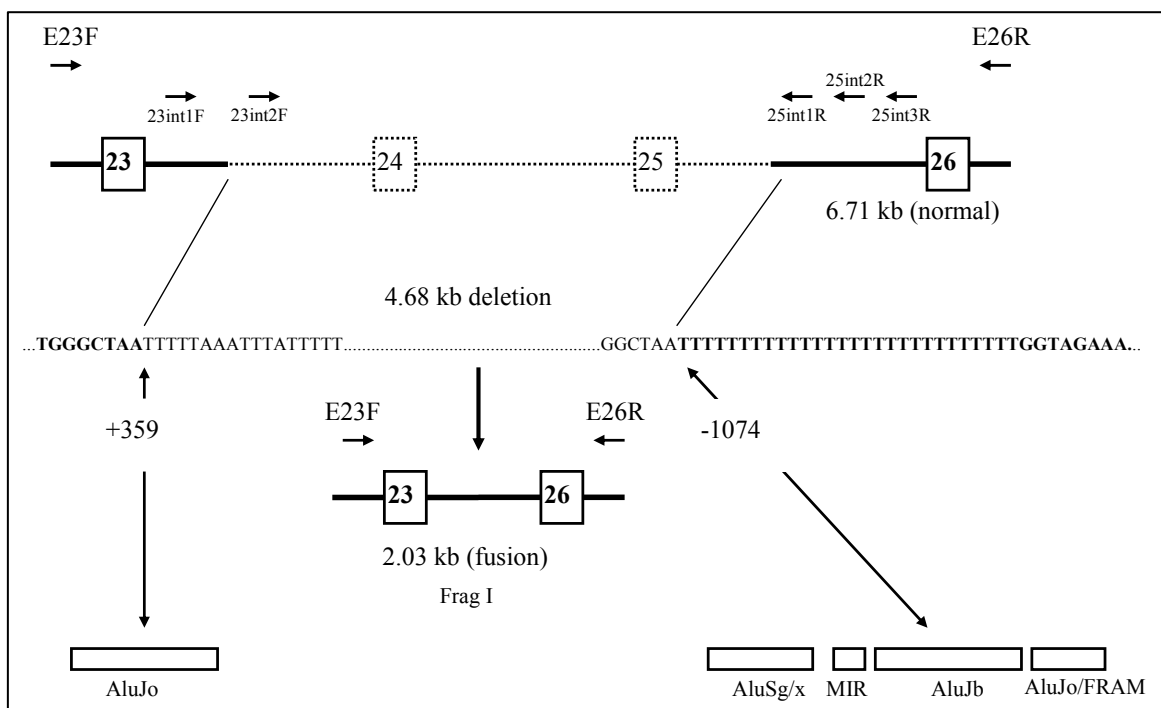
A betegen a 24-es és 25-ös exon PCR reakciója során PCR termék nem volt kimutatható (az ábrán nincs feltüntetve).

A: Hosszú DNS templátok amplifikálására alkalmas „Long range PCR” reakcióval a 23-26-os exon régiójában a 23F és 26R primerekkel (1. Táblázat) végeztünk PCR-t kontroll (C oszlop), a P6-os beteg (P oszlop), a beteg édesapja (F oszlop) és édesanyja (M oszlop) genomikus DNS mintájából, a betegen (P) 4,68 kilobázissal (kb) rövidebb, (2,03 kb nagyságú) PCR produktum keletkezett, mint a kontrollban (6,71 kb). A beteg édesanyja heterozigóta erre a delécióra, az ő esetében (M) egy normál méretű (6,71 kb) és egy rövidebb PCR produktum (2,03 kb) is keletkezett.

B: A 2,03 kb nagyságú fúziós PCR termék reamplifikációját végeztük a törési ponthoz közelebb elhelyezkedő 23int1F és 25int1R primerekkel, egy 172 bp nagyságú fúziós terméket kaptunk, mely tartalmazza a törési pontot a beteg (P) és édesanyja (M) mintájában.

C: „Long range” PCR a 22F és 31R primerekkel (1. Táblázat). A nagy távolság miatt PCR termék nem keletkezhet a kontroll DNS mintában (C). A betegen (P) és az édesapja (F) esetén egy rövidebb (4 kb nagyságú) PCR produktum volt kimutatható az allélról ahol a deléció bekövetkezett.

D: Az IVS22F és IVS29R intronikus primerek (1. Táblázat) használatával egy a törési pontot is tartalmazó 0,5 kb nagyságú PCR termék keletkezett a betegen (P) és az édesapja esetén (F), de a kontroll mintában nem volt kimutatható.



2. Ábra. Az *ABCC6*del24-25 deléció genomikus elhelyezkedése és a törési pont lokalizációja

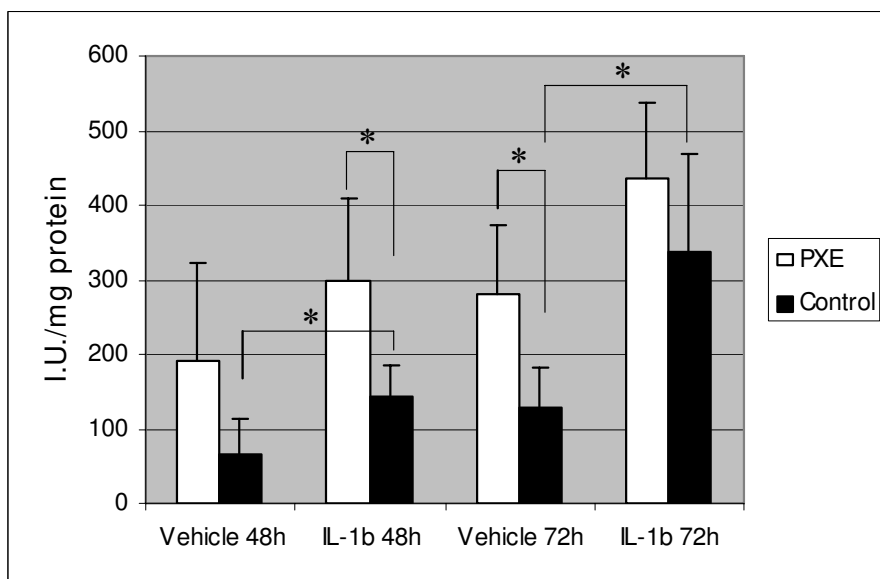
A vad típusú, 23F és 26R primerek használatával keletkező PCR termék 6,71 kb hosszúságú. A genomikus deléció, mely a betegben és édesanyjában volt kimutatható 4,68 kb nagyságú, és egy 2,03 kb nagyságú PCR produktumot eredményez a 23F és 26R primerekkel végzett PCR során. A 2,03 kb nagyságú fragmentum DNS szekvenálásával kimutattuk a törési pontokat a 23-as és 25-ös intronban két, ismétlődő timinekből álló helyen. A törési pontok pozícióját a 23-as exon 3'- végétől (+359 nukleotid) és a 26-os exon 5'- végétől (-1064 nukleotid) adtuk meg. A rekombináció két Alu-repeat szakasz közepén jött létre. A további közeli ismétlődő szakaszokat is feltüntettük (Alu, MIR).

#### 4.4. Elasztáz aktivitás

Vizsgálatainkban 4 PXE-ban szenvedő betegünk (P2,P3,P4) bőrbioptziás mintájából származó fibroblasztokból intracelluláris elasztáz aktivitást határoztunk meg, és összehasonlítottuk 6 egészséges kontrollból származó fibroblaszt mintájával.

Kísérletünkben mind a kontroll, mind a PXE fibroblasztokban nagyobb elasztáz aktivitást kaptunk 72 órás inkubálás után, mint 48 órás inkubálást követően. A PXE-sejtekben az alap elasztáz aktivitás nagyobb volt, mint a normál fibroblasztoké, ez a különbség 48 órás inkubálás után nem bizonyult szignifikánsnak T teszt alkalmazásával, de 72 órás inkubálást követően PXE sejtek elasztáz aktivitása szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontrollokban ( $p < 0,05$ ) (3. Ábra).

A szubkonfluens fibroblaszt tenyészeteket IL-1 $\beta$ -val stimuláltuk (100 U/ml), ez szignifikáns elasztáz aktivitásnövekedést eredményezett mindkét csoportban ( $p < 0,05$ ). Az IL-1 $\beta$  stimuláció nagyobb mértékű elasztáz aktivitásnövekedést idézett elő a kontroll sejtekben (48 óra inkubáció után 117%-al, 72 óra inkubáció 164%-al nőtt meg az enzimaktivitás), mint a PXE sejtekben (48 óra stimulálás után 55%-al, 72 óra stimulálás után 56%-al nagyobb enzimaktivitást detektáltunk) (3. Ábra).



### 3. Ábra

In vitro intracelluláris elasztáz aktivitás meghatározás egészséges kontroll egyének, és PXE-ban szenvedő betegek bőrbioptziás mintájából nyert fibroblasztokban IL-1  $\beta$  (100 U/ml; 48 és 72 h) stimulációval és anélkül. A „vehicle” reprezentálja az IL-1  $\beta$  stimuláció nélküli mintákat, ahol az inkubáció során a sejt kultúrához használt mediumhoz 0,2% BSA-t adtunk. Az oszlopokon a 4 PXE beteg és 6 normál kontroll minta enzimaktivitásainak átlagértékét tüntettük fel  $\pm$ S.D. egységnyi proteinmennyiségre vonatkoztatva.

## 5. Megbeszélés

### 5.1. Lipideltérések és az antioxidáns PON1 aktivitása AD és VD betegcsoportokban

Az Alzheimer betegségben, vaszkuláris dementiában, és az atherosclerosisban észlelt pathogenetikai történések sok vonatkozásban hasonlóak. Megfigyelhető a lipidanyagcsere megváltozása és az oxidatív folyamatok szerepe a kialakulásukban.

Az irodalmi adatokkal egyezően azt találtuk, hogy az ApoE-4 isoform jóval gyakrabban fordul elő AD típusú dementia esetén. Mindkét dementia-csoportban szenvedő egyének szérum koleszterin és LDL koleszterin szintje szignifikánsan magasabb volt az egészséges kontrollcsoporthoz képest vizsgálatunkban. Ezzel szemben az Alzheimer típusú dementiában szenvedő egyének HDL koleszterin szintje szignifikánsan magasabb volt, mint a vaszkuláris dementiában szenvedők és az egészséges kontroll egyéneké. Hasonló eredményekről számoltak be Kálmán és mtsai is.

Az antioxidáns hatású, LDL-protéktív, HDL-hez kötött paraoxonáz enzim aktivitás szignifikánsan nem változott a betegcsoportokban az egészséges kontrollcsoporthoz képest, csak a só stimulálta paraoxonáz aktivitás csökkent szignifikánsan a betegcsoportban, ami azt sugallja, hogy a fokozott aktivitásra kevésbé képesek a fenti betegcsoportban szenvedő egyének HDL-hez kötött enzimjei.

Mivel a paraoxonáz a HDL-hez kötődik és a korábbi vizsgálatok során azt találtuk, hogy az Alzheimer dementiában szenvedők HDL szintje szignifikánsan magasabb volt, ez felvetette azt a kérdést, hogy az egységnyi HDL-re vonatkoztatott PON aktivitás hogyan változik a betegcsoportban az egészséges kontrollcsoporthoz képest. Az egészséges kontrollcsoporthoz képest szignifikánsan csökkent mind az Alzheimer típusú, mind a vaszkuláris dementiában szenvedő egyének PON/HDL aktivitása.

Eredményeink alapján felvetődik, hogy a pathomechanizmus szempontjából fenti betegségekben nem csak a fokozott oxidatív folyamatok és lipid eltérések játszhatnak szerepet, hanem ezek kivédését szolgáló ún. antioxidatív rendszer működésének, jelen esetben a HDL-hez kötött paraoxonáz aktivitásának csökkenése is.

### 5.2. A PXE-ben szenvedő betegek klinikai manifesztációja és genetikai eltérései

P6-os 27 éves betegünk genetikai analízise során a PXE háttérében genomikus deléciókat igazoltunk az *ABCC6* gén mindkét allélján. Két deléció kombinálódása egy

betegben eddig még nem került közlésre. Az ABCC6del23-29 a 3. transzmembrán domén és az NBD2 szekvenciájának az elvesztéséhez vezet, így egy funkcióképtelen ABCC6 proteint eredményez. A legtöbb ismert mutáció a fehérje C-terminális részét érinti, különösen a 24. exonban gyakoriak az eltérések, amely a nagyobb intracelluláris hurkot kódolja a fehérjén belül, mely kulcsfontosságú a fehérje ATP kötéséhez és transzport funkciójához.

PXE klinikai megjelenése intra- és interfamiliáris változatosságot mutat. Ezigdig nem írtak le egyértelmű genotípus-fenotípus korrelációt.

P6-os, 27 éves betegünkben az *ABCC6* mindkét allélján deléció azonosítottunk genetikai elemzésünk során, és mindkét deléció a fehérje működése szempontjából kiemelkedő fontosságú lokalizációjú. A szokatlanul súlyos klinikai kép, a korai kezdet, a betegség szisztémás megjelenése megerősíti ezen régiók fontosságát. Először írtunk le kompond heterozigóta deléció PXE genetikai hátterében. A durva genetikai eltérések nagyon korai kezdettel és igen súlyos, szisztémás klinikai képpel társultak vizsgált P6-os betegünk esetében. Mindezek az adatok felvetik jelen esetünkben a genotípus-fenotípus közötti korreláció lehetőségét.

Továbbá esetünk felhívja a figyelmet a genomális deléció irányába történő vizsgálatok fontosságára a PXE-s betegek esetén, hiszen az exonspecifikus PCR és szekvenálás a delécióval rendelkező betegek esetén félrevezető lehet, elfedheti a jelen lévő deléciót.

### **5.3. A PXE fibroblasztok megnövekedett elasztáz aktivitása**

PXE-ben az elasztikus rostok kóros méretűek, deformált alakúak, feltöredeztettek és intrafibrillárisan akkumulálódtak  $Ca^{++}$  ionokat tartalmaznak. Mivel az elasztáz az elasztint hasítja, felmerül az esetleges kóros szerepe PXE-ban. Korábban kimutatták, hogy a PXE fibroblasztok elasztáz aktivitása fokozott, és a fibroblasztok elasztáz aktivitását az IL-1 $\beta$  upregulálja, ezért azt vizsgáltuk, hogy a PXE sejtek megváltozott elasztáz aktivitásában lehet-e szerepe az IL-1 $\beta$  hatásnak.

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a PXE fibroblasztok nagyobb bazális elasztáz aktivitással rendelkeztek, de relatíve rezisztensek az IL-1 $\beta$  stimulációra.

Az IL-1 $\beta$  lényegesen befolyásolja a fibroblasztok működését, hatással van az extracelluláris mátrix komponenseinek termelésére különböző szignál transzdukciós útvonalakon keresztül, melyek tartalmazzák az NF $\kappa$ B, JNK/AP1, P38 MAP kinázok és az ERK szignálokat. Kísérletünkben kóros válaszreakciót észleltünk PXE-s

fibroblasztjainkban IL-1 $\beta$  stimulációt követően az elasztáz aktivitás tekintetében. Az IL-1 $\beta$  hatékonyabbnak bizonyult az egészséges fibroblasztokban. Mindez felveti a lehetőségét annak, hogy az IL-1 $\beta$  citokinnek a gyulladásos-, autoimmun kórképeken és az atherosclerosis kivül szerepe lehet a PXE patomechanizmusában is.

## 6. Összefoglalás

Az általunk vizsgált különböző kórállapotok patomechanizmusában közös folyamatok vesznek részt, ezek az antioxidáns rendszer csökkent kapacitása, dyslipidaemia, fokozott szerin proteáz aktivitás, az extracelluláris mátrix eltérései.

A két vizsgált dementia típusban az egységnyi HDL-re jutó PON1 aktivitás csökkenését tapasztaltuk, mely a vaszkuláris dementia esetében nem meglepő, hiszen ott az elváltozások alapja az atherosclerosis folyamata. A fokozott atherosclerosisal járó állapotok és a csökkent paraoxonáz aktivitás kapcsolata ismert.

Az Alzheimer dementia esetében a fokozott oxidatív stressz, és a lipideltérések szerepét korábban az irodalomban ismertették, emellett vizsgálatunk alapján felmerül az antioxidáns rendszer csökkent kapacitásának etiológiai szerepe is, mivel az antioxidáns PON1 csökkent aktivitását detektáltuk. A PON1 aktivitásának csökkenése leginkább a megváltozott mikrokörnyezetnek köszönhető, nem pedig a genetikailag determinált polimorfizmusoknak.

A pseudoxanthoma elasticum kialakulását az ABCC6 transzporter fehérje defektusa okozza. Az ABCC6 természetes szubsztrátja ismeretlen, továbbá az sem tisztázott hogy mi az összefüggés a fehérje működése és az elasztikus rostok feltöredezése között.

Vizsgálatunkban a kórkép háttérében álló ismert mutációk sorát bővítettük, eddig még két, le nem írt mutáció azonosításával. A PXE fibroblasztok funkcionális vizsgálata során szintén sikerült az előzőekkel rokon folyamatot detektálni: a fibroblasztok emelkedett elasztáz aktivitását találtuk, melynek szerepe jól ismert az atherosclerotikus léziók kialakulásában. Ezen kívül a sejtek elasztáz aktivitása kevésbé volt érzékeny az IL-1 $\beta$  stimulációra, így felmerül a gyulladásos citokin szerepe is a tünetek kialakulásában. További vizsgálatokat tervezünk a megváltozott IL-1 $\beta$  reguláció, és az extracelluláris mátrix eltéréseinek tanulmányozására, melyekkel új adatokat nyerhetünk az ABCC6 fehérje szerepére vonatkozóan.

## TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

### AZ ÉRTEKEZÉSSEN FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK:

1. Paragh Gy, Balla P, **Katona E**, Seres I, Derdák Z, Degrell I: A paraoxonáz aktivitás változása Alzheimer betegségben és vascularis dementiában. Ideggyógyászati Szemle 54:33-37, 2001.

2. Paragh Gy, Balla P, **Katona E**, Seres I, Égerházi A, Degrell I: Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 252:63-67, 2002.

**IF: 2,076**

3. **E Katona**, C Aslanidis, É Remenyik, M Csikós, S Kárpáti, Gy Paragh, G Schmitz: Identification of a novel deletion in the ABCC6 gene leading to Pseudoxanthoma elasticum. J Dermatol Sci 40:115-121, 2005.

**IF:1.477**

### EGYÉB TÉMÁJÚ KÖZLEMÉNYEK:

1. Paragh Gy, Seres I, Balogh Z, **Katona E**, Fülöp P, Kárpáti I, Mátyus J, Kakuk Gy: Serumparaoxonáz-aktivitás vizsgálata, chronicus uraemiában szenvedő betegekben. Hypertonia és Nephrologia 3(2):106-109, 1999.

2. Paragh Gy, Asztalos L, Seres I, Balogh Z, Lőcsey L, Kárpáti I, Mátyus J, **Katona E**, Harangi M, Kakuk Gy: Serum paraoxonase activity changes in uremic and kidney transplanted patients. Nephron 83:126-131, 1999.

**IF: 1.696**

3. Paragh Gy, Seres I, Balogh Z, Harangi M, **Katona E**, Fülöp P, Kakuk Gy: A szimvasztatin hatása a szérum lipidszintekre és a paraoxonáz aktivitására. Magyar Belorvosi Archívum 3:255-258, 1999.

4. Balogh Z, Fülöp P, Seres I, Harangi M, **Katona E**, Kosztáczky B, Paragh Gy: Effects of simvastatin on serum paraoxonase activity. Clin Drug Invest 21:505-510, 2001.

**IF: 0.846**

5. Harangi M, **Katona E**, Remenyik É, Paragh Gy: Sclerosis tuberosa. Hypertonia és Nephrologia 5:144-149, 2001.

6. Audikovszky M, Pados Gy, Seres I, Harangi M, Fülöp P, **Katona E**, Winkler G, Paragh Gy: Obes betegek lipidprofiljának és paraoxonáz aktivitásának változása orlistat kezelést követően. Orvosi Hetilap 142: 2779-2783, 2001.

7. Paragh Gy, Harangi M, Balogh Z, **Katona E**, Kakuk Gy: A leptin klinikai jelentősége. Táplálkozás Allergia Diéta 2001.

8. Harangi M, Remenyik É, Seres I, Varga Zs, **Katona E**, Paragh Gy: Determination of DNA damage induced by oxidative stress in hyperlipidemic patients. Mutat Res 513:17-25, 2002.

**IF: 1.636**

9. Kárpáti I, Balla J, Szőke G, Bereczky Zs, Páll D, Ben T, Toma K, **Katona E**, Mohácsi A, Paragh Gy, Varga Zs, Kakuk Gy, Muszbek L: A hyperhomocysteinaemia gyakorisága, folsavpótlásban részesülő hemodializált betegekben. Orvosi Hetilap 143:1635-1640, 2002.

10. Szabó Z, Harangi M, Lőrincz I, Seres I, **Katona E**, Karányi Zs, Paragh Gy: A hyperlipidaemia hatása a QT diszperzióra nem ischaemiás szívbetegekben. Metabolizmus 2:175-178, 2004.

11. Kalmár T, Seres I, Balogh Z, Káplár M, Katona É, **Katona E**, Paragh Gy: Lipoprotein-lipáz, hepaticus lipáz és paraoxonáz aktivitás változása 2-es típusú Diabetes Mellitusban. Diabetologia Hungarica 11; 265-271, 2003.

12. Paragh Gy, Márk L, **Katona E**: A statinok nem lipid hatásai. Orv Hetil 145; 1903-1910, 2004.

13. Magyar MT, Paragh Gy, **Katona E**, Valikovics A, Seres I, Csiba L, Bereczki D: Serum cholesterol have a more important role than triglycerides in determining intima-media thickness of the common carotid artery in subjects below 55 years of age. J Ultras Med 23:1161-1169, 2004.

**IF: 1.010**

14. Szabó Z, Harangi M, Lőrincz I, Seres I, **Katona E**, Karányi Z, Paragh G: Effect of hyperlipidaemia on QT dispersion in patients without ischaemic heart disease. Can J Cardiol 21(10):847-50, 2005.

**IF:1.297**

15. **Katona E**, Paragh Gy: Az LDL-aferezis szerepe a hyperlipidaemia terápiájában. Metabolizmus 3: 116-123, 2005.

16. Paragh Gy, **Katona E**, Csongrádi É, Juhász A: Az elhízás komplex kezelése. Metabolizmus 3: 155-159, 2005.

**Összesített impact faktor: 10,038**

## **KONGRESSZUSI RÉSZVÉTEL (ELŐADÁS):**

1. Katona E, Seres I, Balogh Z, Fülöp P, Kakuk Gy, Paragh Gy: Az antioxidáns hatású paraoxonáz változása krónikus vesebetegekben. 1998. Magyar Atherosclerosis Társaság XII. Kongresszusa. Sopron.
2. Katona E., Fülöp P., Seres I., Balogh Z., Harangi M., Paragh Gy: A paraoxonáz aktivitás változása simvastatin kezelést követően. Debrecen, DAB, 1998. december 14.
3. Katona E, Seres I, Balogh Z, Fülöp P, Kakuk Gy, Paragh Gy: Az antioxidáns hatású paraoxonáz változása krónikus vesebetegekben. 1999. Korányi Frigyes Szakkollégium III. Tudományos Fórum (1. helyezés, a Knoll Hungária különdíja).
4. Katona E, Balla P, Seres I, Paragh Gy, Kakuk Gy: A paraoxonáz aktivitás változása Alzheimer betegségben és vascularis demenciában. Magyar Atherosclerosis Társaság XIII. Kongresszusa, Sopron, 2000. október 12-14.
5. Katona E: Hanta-vírus és Leptospira fertőzések okozta interstitialis nephritis. 2000. VI. Debreceni Nephrológiai Napok.
6. Katona E: Infekciók az akut veseelégtelenség kiváltásában. 2001. VII. Debreceni Nephrológiai Napok.
7. Katona E: Atherosclerosis krónikus veseelégtelenségben - epidemiológiai adatok 2004. IX. Debreceni Nephrológiai Napok.
8. Katona E, Remenyik É, Paragh Gy, Schmitz G: Pseudoxanthoma Elasticum (PXE) és a háttérben álló anyagcsere változások Sopron 2004. Magyar Atherosclerosis Társaság Naggyűlés.
9. Katona E, Remenyik É, Sohajda Z, Kiss B, Schmitz G, Paragh Gy: Pseudoxanthoma elasticum és a háttérben álló anyagcsere eltérések. A Magyar Belgyógyász Társaság Északkelet-Magyarországi Szakcsoportjának Tudományos ülése Nyíregyháza 2004.
10. Katona E: LDL apheretizáló módszerek. 2005. X. Debreceni Nephrológiai Napok.
11. Katona E: Pseudoxanthoma Elasticum (PXE) és a háttérben álló pathofiziológiai elváltozások. Nagyerdői Belgyógyászati Tudományos Napok. 2005. 05. 03.
12. Katona E, Balla P, Seres I, Degrell I, Paragh Gy: A paraoxonáz aktivitás és lipid profil eltérései különböző etiológiájú demenciákban. Magyar Szabadgyógyászati Társaság III. Konferenciája. 2005.10.13.

## **POSZTER:**

1. Kel A, Voss N, Konovalova T, Kel-Margoulis O, **Katona E**, Schmitz G, Wingender E: Composite modules in promoters of disease genes help to find cellular signalling network. 4th European Conference on Computational Biology. 28th Sept-1st Oct. 2005. Madrid.
2. Juhász A, Csongrádi É, Fülöp T, Bajnok L, **Katona E**, Varga Z, Karányi Z, Paragh G: Relationship of echocardiographic characteristics with anthropometric and metabolic parameters in obesity. 4th International Symposium on Obesity and Hypertension. 27-29th Oct. 2005. Berlin.

## **KÖNYVRÉSZLET:**

1. **Katona E**. Hanta-vírus és Leptospira fertőzések okozta interstitialis nephritis. Nephrologia 2000. (Szerk: Kárpáti I, Kakuk Gy) Debrecen, 2000; 207-213.
2. **Katona E**. A beteg előkészítése dialysis programba. Klinikai Nephrologia. (Szerk: Kakuk Gy) Medicina, Budapest, 2004.

## **IDÉZHETŐ NEMZETKÖZI FOLYÓÍRATBAN MEGJELENT ABSTRACT**

1. Paragh Gy, Asztalos L, Seres I, Balogh Z, Lócsey L, Kárpáti I, Mátyus J, **Katona E**, Harangi M, Kakuk Gy: Serum paraoxonase activity changes in uremic and kidney transplanted patients. 71<sup>st</sup> Congress of the European Atherosclerosis Society. Athen. 1999. május 26-29. Atherosclerosis, 144:117.
2. Paragh Gy, Seres I, Harangi M, Illyés L, **Katona E**, Varga Zs: Atorvastatin effect on HDL associated paraoxonase activity. XIVth World Congress of Cardiology, Sydney, J Am Coll Card 2002; 39:142B
3. Juhász A, Csongrádi É, Fülöp T, Bajnok L, **Katona E**, Varga Z, Karányi Z, Paragh G: Relationship of echocardiographic characteristics with anthropometric and metabolic parameters in obesity. 4th International Symposium on Obesity and Hypertension. 27-29th Oct. 2005. Berlin. Germany. Int J Obesity 2005; 29: suppl 3.