

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A kataláz és a GRB10 gén polimorfizmusainak kapcsolata
a 2-es típusú diabéteszrel Magyarországon**

Vitai Márta

Témavezető: Prof. Dr. Góth László, az MTA doktora



**DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola**

Debrecen, 2011

**A kataláz és a GRB10 gén polimorfizmusainak kapcsolata a 2-es típusú diabéteszszel
Magyarországon**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Vitai Márta okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia programja keretében

Témavezető: Prof. Dr. Góth László, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Somogyi Anikó, az MTA doktora
Dr. Lakatos Ágnes, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2011. május 27.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus
bírálók: Prof. Dr. Szabó Antal, az MTA doktora
Dr. Káplár Miklós, Ph.D.
tagok Prof. Dr. Somogyi Anikó, az MTA doktora
Dr. Lakatos Ágnes, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2011. május 27.

BEVEZETÉS

A 2-es típusú diabétesz (2DM) előfordulása olyan mértékben nő, hogy ma már diabétesz világvilágjáróvnyról beszélünk, de ez a járvány talán lefékezhető, megállítható. Nagy nemzetközi vizsgálatok ugyanis bizonyítják, hogy a 2DM megelőzhető, de csak a korai szakban, akkor, amikor még a glükóz intolerancia kezdődik. Ez az IFG (Impaired Fasting Glucose) és az IGT (Impaired Glucose Tolerance) időszak, amit manapság összefoglalóan „prediabéteszként” említene, illetve az ezt megelőző szakasz, amikor még csak az *inzulin rezisztencia* áll fenn. Ebben az időszakban életmódbeli, diétás megszorításokkal és néhány, inzulinérzékenyítő gyógyszerrel a 2DM kialakulása megelőzhető vagy eltolható. A világszerte óriási erővel folyó genomikai vizsgálatok szinte napról napra igazolnak a 2DM-el összefüggő gén kapcsolatokat, melyek részben a hajlam feltárását, részben pedig a fehérjék szerkezetében, funkciójában eltérést okozó génmutációk esetében, a betegség igen korai időszakban történő felismerését, valamint az érszövödmények iránti fogékonyság megállapítását ígérnek.

Definíció szerint az inzulin rezisztencia olyan állapot, amikor normális mennyiségű inzulin szubnormális választ eredményez. A 2-es típusú cukorbetegség többségében az inzulin hatása a vártnál kisebb, inzulinérzékenységük csökkent, vagyis inzulin rezisztensek. Az inzulin érzékenység szokatlanul nagymértékű variációt mutat az egészséges lakosság vizsgálatokor is. A különbségeknek azonban mindössze csak egyharmadért felelősek az inzulin hatását ismerten befolyásoló tényezők (elhízás, táplálkozás, fizikai aktivitás, környezeti tényezők stb.), jelezvén, hogy az inzulin érzékenységért döntő mértékben genetikai tényezők felelősek.

Az inzulin rezisztencia gyakorlatilag még alig diagnosztizálható. Az inzulin érzékenység nemzetközileg elfogadott mérési módszere, a „gold standard”, a hiperinzulinémiás, euglikémiás infúziós klempe (HEK) technika, azonban ez a módszer időigényessége, invazív volta és magas költsége miatt nem alkalmas diagnosztikus szűrővizsgálatokra. Az alternatív megoldás a HOMA érték használata lenne, mely egy éhomi vércukor és inzulin szint ismeretében számolható ($HOMA-R = (\text{éhom}i \text{ glükóz } \text{mmol/l} \times \text{éhom}i \text{ inzulin } \mu\text{E/ml}) / 22,5$). Ez a széles körben használt paraméter azonban gyenge kapcsolatot mutat a HEK módszerrel mért M értékekkel (ahol $M = \text{mg glükóz/min/testtömeg kg}$, vagy izomtömeg , vagy a test zsírtömege), ezért számos komplikáltabb variációja ismert, ahol a szabad zsírsav, zsírparaméterek, adipokinek mérésével próbálták az eljárás használhatóságát – nem sok sikerrel – növelni. Ezen problémák megoldására kínál alternatív utakat a genetika. Így azon

gének genetikai vizsgálata, melyek összefüggésben lehetnek a diabétesz kialakulásával, közelebb vihetnek bennünket az inzulin rezisztencia korai diagnosztizálásához.

Az inzulin rezisztencia nemcsak a 2DM-et megelőző állapot és a 2DM jellemzője, hanem számos betegségben kimutatható klinikai tünet. Ilyen a metabolikus szindróma, elhízás, starváció, terhesség, acromegália, szepszis, égési taruma, carcinoma, cachexia, vagyis az olyan állapotok, ahol a patomechanizmusban az oxidatív stressz jelenléte és a reaktív oxigén gyökök (ROS) szerepe valószínűsíthető, sőt igazolt. A H_2O_2 -t átalakító kataláz enzim szerepe ebben a folyamatban pedig kulcsfontosságú. A kataláz génnek több polimorfizmusa is ismert, melyek különböző betegségekkel kapcsolhatók össze, de ismerünk számos olyan mutációt is, amelyek nem befolyásolják a fehérje expressziót, nincsenek hatással az enzim aktivitásra, és nincs asszociációjuk betegségekkel (benignus polimorfizmusok). Az oxidatív stressz szerepet játszhat az osteoporózis kialakulásában is. Számos adat szól arról, hogy a korral összefüggő csontvesztés nem kizárólag a hormonális állapot változását tükrözi, hiszen fiatal nők és férfiak 20-as éveiben - minden hormonális változás nélkül is- már kimutatható a trabekuláris csontvesztés. A sex szteroidoktól független, korral összefüggő csontvesztés legnagyobb rizikója az életkor és az anyagcsere eltérésekkel folyamatosan növekvő oxidatív stressz, és az oxidatív stressz elleni védekezés csökkenése. Az ösztrogének és androgének csontvédő hatását is részben e hormonok direkt antioxidáns hatásával magyarázhatjuk, hiszen az ovariectomizált állatokban a csontvesztés felgyorsul, mert csökken csontok glutation és thioredoxin szintje, ami viszont külső ösztrogén vagy antioxidánsok adásával visszaállítható. Számos in vitro- és állatkísérlet bizonyítja, hogy az oxidatív stressz csökkenti a csontépülést, és serkenti a csont leépülését, mivel a stressz hatására csökken az osteoblastok differenciálódása és az élettartama. A csökkent kataláz aktivitással rendelkező egyéneknél, a fokozott oxidatív stressz miatt dislipidemia is kialakulhat, mert a csökkent antioxidáns kapacitás miatt a mitokondriális H_2O_2 emisszió fokozódik. Ez történik a magas zsírtartalmú diéta fogyasztásakor is, amikor a fokozott lipid oxidáció okozza az oxidatív stresszt. Az oxidatív stressz aktiválja az NF- κ B gént, és ezen keresztül az angiotensin-II aktivitást, az inzulin jelátvitelt gátló (TNF α) cytokin képzést, az izomsejtekben a PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor) és a lipoxigenáz enzim fokozott expresszióját okozza a WNT szignál rendszer egyidejű csökkentésével, mely a csontképzés romlásával és inzulin rezisztencia kialakulásával jár. Koreai szerzők vizsgálták a kataláz gén 9-es exonjának 111-es pozíciójában lévő C \rightarrow T polimorfizmust (+22348C>T, RS769217) és összefüggést találtak a genotípusok, valamint a csontállapotot jelző paraméterek (Bone Mineral Density, BMD) és a szérum oszteokalcin között. Az oszteokalcin (bone- γ -carboxyglutamic acid protein, BGP) 50

aminosavat tartalmazó csontspecifikus protein. Az oszteokalcint az oszteoblasztok termelik, és az oszteoblasztokból történő kiválasztódás után egyrészt a csont mátrixba, másrészt a véráramba kerül, így a szérumban lévő oszteokalcin mennyisége függ a csont átépülés (épülés-bomlás) folyamataitól. Egerekben az oszteokalcin hiányakor nemcsak a csontképződés csökken, de a pankreász β -sejtek proliferációja, és bennük az *Inzulin*-, a zsírsejtekben pedig az *Adiponectin* gén expressziója is. A csontállapot és a metabolikus paraméterek között kapcsolat van. A glükóz anyagcsere, inzulin érzékenység és a csontok állapota között az egészséges, változó korban lévő nőkben igazolt az összefüggés. Ez az összefüggés azonban a glükóz tolerancia romlásával és az inzulin rezisztencia kialakulásával megbomlik. Az oszteokalcin szérumszintnek független és szignifikáns prediktora több metabolikus paraméter. Nők esetében többek között az éhomi glükóz szint, a teljes test és az izomtömeg glükóz felhasználás, a glükóz felhasználás sebessége és az LDL-koleszterin koncentráció, míg a férfiaknál a szérum kalcium szint, az OGTT görbe alatti terület, a szabad zsírsav szint.

A „kandidáns gén” keresése az a folyamat, amikor „egészséges” és diabéteszes populáción keressük az eltérően expresszáldott géneket (differential display), majd vizsgáljuk az eltérően expresszált gének szerkezeti eltéréseit és kapcsolatot keresünk a génelterés és az anyagcsere paraméterek között. Az egyik ilyen „kandidáns gén” a GRB10 (Growth Factor Receptor Binding Protein).

Számos in vitro kísérlet bizonyította, hogy az IR (inzulin receptor) kötődése a GRB10-hez csökkenti az inzulin hatását. A GRB10 overexpressziója visszaszorítja az inzulin stimulált PI-3 (foszfatidilinozit) kináz, Akt/PKB (protein kináz B), a MAPK (mitogén aktivált protein kináz) aktivációt, a glikogén szintáz aktivitást és a glükóz felvételt. GRB10 génkiütött egereken végzett kísérletek in vivo is bizonyítják, hogy a GRB10 hiánya egyértelműen erősíti az inzulin hatását, az inzulin stimulált Akt és a MAPK foszforilációját. A hiperinzulémiás-euglikémiás klempt vizsgálatok pedig azt mutatják, hogy a GRB10 expressziójának a csökkenése a perifériás szövetekben (izom és zsír) növeli az inzulin szenzitivitást, míg az inzulin és az éhgyomri glükóz koncentráció nem változik. Ezen eredmények a GRB10 negatív regulátor szerepét támasztják alá. A GRB10 génkiütött egerek születése utáni súlygyarapodása szignifikánsan magasabb, mint a vad típusú egereké, ami viszont az endogén GRB10-nek a növekedési faktorokra kifejtett szupresszor hatásával magyarázható. A GRB10-nek tulajdonítanak egy olyan speciális szerepet is a jelátvitelben, hogy képes integrálni és összegyűjteni (scaffold protein) a bejövő külső jeleket. A jelátviteli komplexben a GRB10 specifikus szerepe attól függ, hogy éppen milyen a hozzákötődött mediátor proteinek

mennyisége és affinitása. Így a GRB10 képes arra, hogy miközben a mennyisége azonos, hol pozitív, hol negatív regulátorként tűnjön fel. A GRB10 génnek számos egy pontos nukleotid polimorfizmusa (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) ismert, amelyek közül több összefüggésbe hozható a 2-es típusú diabéteszszel. Kimutatták, hogy a RS2237457 polimorfizmus (+11275G>A) jelenlétekor az egyes genotípusok GAUC értéke (Glucose Area Under Curve; az orális glükóz tolerancia teszt során kapott görbe alatti terület) szignifikánsan eltér a nem diabéteszes egyének esetében. Az RS494710 (1209A>G) polimorfizmus gyakorisága a 2-es típusú diabéteszes betegek csoportjában szignifikánsan magasabb, és az A allélt hordozó egyéneknél a diabétesz kialakulása kisebb valószínűségű.

CÉLKITŰZÉSEK

- **A vér katalázaktivitás referens tartományának a meghatározása, a hipo- és akatalázémia definiálása.**

Mivel a vér katalázaktivitás referens tartományára nem volt adat a vizsgált geográfia területen, ezért a hipo- és akatalázémia definiálásához először meg kellett állapítani a referens értékeket. Megvizsgáltuk, hogy van-e különbség a nők és férfiak referens tartománya között, nincs-e változás az életkorral.

- **Hipo- és akatalázémiás családok felderítése, DNS bank létrehozása a genetikai vizsgálatokhoz.**

Közel 5000 minta vér katalázaktivitás eredményét felhasználva kerestük a hipokatalázémiás családokat és határoztuk meg a hipokatalázémia gyakoriságát.

- **A kataláz gén ismert mutációinak magyarországi vizsgálata.**

A megtalált két akatalázémiás testvér kataláz enzimje a molekulasúly és elektroforetikus mobilitás alapján a japán típusú akatalázémiához volt hasonló, ezért a mutáció vizsgálatot Japánban talált mutációk vizsgálatával kezdtük. A promoter régió -21-es pozíciójában lévő A→T mutációt kerestük.

- **A kataláz gén polimorfizmusai és a 2-es típusú diabétesz közötti kapcsolat vizsgálata.**

A Magyarországon detektált csökkent kataláz aktivitású egyén közül 8 volt 2-es típusú diabéteszes (kettő akatalázémiás és hat hipokatalázémiás), míg a normál kataláz aktivitásúaknál egy sem. Ezért a már időközben ismertté vált mutációkat kerestük diabéteszes populációban. A vizsgálatainkat a 2. exon és közvetlen környezetén végeztük.

- **A gén polimorfizmusok hazai előfordulásának vizsgálatára génbank kialakítása.**

A világirodalomban publikált géneltérések, „kandidáns gének” betegség és populáció specificitásának vizsgálatára hazai mintákon, „betegség specifikus” expressziós markerek feltárására olyan DNS bank létrehozása volt szükséges, amely a magyarországi populációt reprezentálja.

- **A kataláz gén +22348C>T polimorfizmusának kapcsolata a glükóz és csontanyagcserével**

A kataláz gén 9. exonján lévő +22348C>T polimorfizmus és a szérum oszteokalcin koncentráció között koreai szerzők összefüggést találtak, ezért ezt hazai populáción is megvizsgáltuk, és megnéztük, hogy az általunk kapott összefüggések milyen egyezőséget mutatnak az irodalmi adatokkal. Az összefüggések keresését kiterjesztettük az oszteokalcin mellett egyéb csont markerekre és a glükóz anyagcsere paramétereire is.

- **Differenciáltan expresszáló gének keresése állatmodellen**

Gyógyszerjelölt molekulák hatásmechanizmusának vizsgálatához ma már hozzátartozik a gén szintű vizsgálat is. A vizsgálatához a differential display technikát választottuk, így jutottunk el a differenciáltan expresszáló gének megtalálásához. Mivel egy, a 2-es típusú diabétesz szövődményeinek a megelőzésére kifejlesztett molekula hatásmechanizmusát vizsgáltuk, ezért a „kandidáns gének” expressziójának visszaigazolására már diabéteszes állatmodelleket használtunk.

- **A GRB10 protein polimorfizmusának vizsgálata magyarországi populációban és kapcsolata a glükóz anyagcserével**

A populációs genom vizsgálatok a GRB10 mint „kandidáns gén” polimorfizmusai és a 2-es típusú diabétesz között összefüggéseket tártak fel, így hazai populáción is megvizsgáltuk a GRB10 gén +11275G>A polimorfizmusának gyakoriságát az egészséges és diabéteszes populációban és összefüggést kerestünk a polimorfizmus és a glükóz anyagcsere paramétere között.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Vér katalázaktivitás referens tartományának meghatározása

A referens aktivitás értékek meghatározására Sümeg környékéről (7 település, nem ipari terület) 880 nő és 876 férfi (életkor: 14-90 év) mintáját használtuk fel. A hipokatalázémia jellemzésére 3300 egészséges és 1630 kórházi fekvőbeteg (Sümeg és környéke) vér katalázaktivitás eredményeit használtuk fel.

A vér kataláz aktivitást - a hidrogén-peroxid szubsztrát időegység alatti koncentráció csökkenés mérésével - egyszerű spektrofotometriás assay-vel mértük.

2. A DNS izolálás

A DNS izolálást limfocitákból végeztük. Az izolálást kezdetben a standard módszerként ismert lizálásos-kisózásos technikával végeztük, majd áttértünk a kereskedelmi kit-ek használatára.

3. A kataláz gén 2-es exonjának Hinfl polimorfizmusának vizsgálata

Összesen 87 mintát vizsgáltunk, ebből 52 személy volt hipokatalázémiás, 35 személy pedig normokatalázémiás kontroll. PCR reakciót követően a termékeket Hinfl restrikciós enzimmel emésztettük és RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analízist végeztünk poli-akrilamid gélen.

4. SSCP (Single Strand Conformational Polymorphisms) és PCR heteroduplex vizsgálatok a kataláz gén 2.exonjában

Összesen 308 diabéteszes esetet vizsgáltunk Magyarország különböző régióiból. Az életkoruk 45 és 70 év között volt, az átlagéletkor: $58,4 \pm 6,5$ év. Az SSCP analízissel mutációkat kerestünk, míg a PCR heteroduplex analízissel a kataláz gén GA illetve a G inzercióját detektáltuk a 2. exonban.

5. A Korányi András Dunántúli Diabétesz Génbank kialakítása

A génbankba csak azoknak a családoknak a mintáit gyűjtöttük össze, ahol legalább 6 olyan személy vállalkozott a mintaadásra, akik első fokú rokonaik voltak egymásnak (nagyszülők, szülők, gyerekek). A diabéteszes családok esetében további kritérium volt, hogy legalább egy személy a családban 2-es típusú diabéteszes legyen. A génbankban tároljuk azon személyek genomialis DNS, plazma és mononukleáris sejt mintáit is, akiknél hiperinzulinémiás-euglikémiás klempt vizsgálatot végeztünk. A mintatár részét képezi még a korai (perimenopauzában már meglévő) oszteoporózisos nők és családtagjaik mintái is.

6. A glükóz anyagcsere jellemzőinek meghatározása

Az inzulin érzékenység mértékét, a teljes test és alkotórészeinek (zsír és izomszövet, zsírmentes testtömeg) glükóz felhasználását a hiperinzulinémiás-euglikémiás klempt (HEK) módszerrel mértük (DeFronzo et al, 1979). Az inzulin érzékenységet az M értékekkel ($M = \text{az egész testtömegre vagy a különböző szövetekre vonatkoztatott glükóz felhasználás}$), és a HOMA indexszel ($\text{HOMA-IR} = G_o \times I_o / 22,5$, ahol $I_o = \text{éhomei inzulin } (\mu\text{U/ml})$ és $G_o = \text{éhomei glükóz (mmol/l)}$), $\text{HOMA-IS} = 1 / \text{HOMA-IR}$) jellemeztük. A testösszetétel mérése DEXA (DPX- MD+, GE-Lunar, USA) készülékkel történt. A glükóz és csontanyagcserevel kapcsolatos általános klinikai laboratóriumi paramétereket Cobas Mira laboratóriumi automatával (Roche Diagnostics, Németország) mértük szérumból Roche tesztek felhasználásával. A hormonokat és a csont markereket a Roche Elecsys 2010-es automatájával mértük elektrochemilumineszcens immunoassay-vel, illetve ELISA módszerrel határoztuk meg.

7. A kataláz gén +22348C>T és a GRB10 gén +11275G>A polimorfizmus vizsgálata

A vizsgálathoz összesen 141 olyan személy DNS mintáját használtuk, akik hiperinzulinémiás-euglikémiás klempt vizsgálaton vettek részt. A vizsgált személyeket az orális glükóz terhelési teszt (75 g glükóz OGTT) alapján az ADA kritériumoknak megfelelően csoportosítottuk. A kataláz gén +22348C>T polimorfizmusának meghatározásához egy egyszerű szűrő módszert használtunk. A polimorfizmust tartalmazó génszakaszt PCR segítségével felsokszorozítottuk, majd a PCR termékeket akril-amid gélen (6%-os) megfuttattuk és ezüstoffestéssel tettük láthatóvá. Mivel a kapott PCR fragmentumok a belső hurkoknak köszönhetően nem válnak teljes egészében duplaszálúvá, így denaturálás nélkül is

szétválnak az poliakril-amid gélen. A GRB10 gén +11275G>A (RS 2237457) polimorfizmusának vizsgálatához target specifikus FRET próbákat használtunk és a Roche LightCycler 2.0 készüléke segítségével detektáltuk. A GRB10 gén +11275G>A polimorfizmusának hazai allél gyakoriságát. 77 egészséges és 85 2DM beteg DNS mintáján vizsgáltuk.

8. Differential display

Spontán hipertóniás patkányokat kezeltünk egy gyógyszer jelölt molekulával (Bimoclolol, 20 mg/kg/nap; kezelt csoport), ill. fiziológias sóoldattal (kontroll csoport) három hónapig. A kezelés letelte után az állatokat elaltattuk, és kivettük a mellkasi aortájukat és az ebből izolált RNS mintákat használtuk differential display analízishez. A differential display analízist Liang P et al. (1992) leírása alapján végeztük. A real-time PCR-al történő megerősítéshez Wistar patkányokat streptozotocinnal kezeltünk a diabétesz kialakulásáig (inzulin hiányos, 1-es típusú diabéteszhez hasonló modell), valamint genetikailag diabéteszes (GK, 2-es típusú diabéteszes modell) patkányokat használtunk. A glükóz toxikus hatásának vizsgálatához normál és magas glükóz tartalmú tápfolyadékban differenciáltatott L8 (myoblast→myotube) kultúrákat használtunk. A real time PCR-al végzett visszaigazolásokat TaqMan próbákkal végeztük. A gén expressziók mértékét belső kontrollhoz történt normalizálás elvégzése után számítottuk ki.

9. Statisztikai analízisek

A referens értékek kiszámításánál az eloszlás vizsgálatokat Kolgomorov-Smirnov teszttel végeztük SPSS számítógépes program segítségével.

A csoportok közötti különbségeket (nők-férfiak, egészséges kontroll-beteg, genotípus stb.) Student féle kétmintás t teszt segítségével állapítottuk meg. (MS Excel). Az allél frekvenciák különbségét χ^2 teszt elvégzésével illetve az Odds arány (www.meta-numerics.net/Samples/ContingencyCalculator.aspx) kiszámításával jellemeztük.

Az anyagcsere-, a metabolikus-, az antropometrikus paraméterek egymáshoz viszonyított korrelációját egyváltozós lineáris korrelációs analízissel (MS Excel), többváltozós lineáris regresszióval és Spearman féle rangkorrelációs analízissel állapítottuk meg (STATISTICA Trial Version 2010, StatSoft Inc.). A szignifikancia szintet általánosságban $p < 0,05$ szinten állapítottuk meg.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A vér katalázaktivitás referens tartományát mintegy 1700 aktivitáseredményből határoztuk meg. A férfiakat és a nőket külön vizsgáltuk, a nőknél szignifikánsan ($p < 0,001$) alacsonyabb értékeket ($107,7 \pm 14,4$ MU/l) kaptunk, mint a férfiak esetében ($117,9 \pm 16,9$ MU/l). Hipokatalázémiásnak tekintettük azokat az egyéneket, akiknél a katalázaktivitás a referens tartományéhoz viszonyítva 50 %-al csökkent.

Közel 5000 minta eredményét felhasználva 9 olyan családot sikerült felderíteni, amelyeknél csökkent kataláz aktivitást tudtunk detektálni. Meghatároztuk a hipokatalázémia gyakoriságát is. A családok tagjai között 37 személy hipokatalázémiás ($57,5 \pm 11,7$ MU/l), míg 47 személy normokatalázémiás ($98,6 \pm 17,9$ MU/l) volt. Az egyik család két testvérpárját akatalázémiásnak minősítettük. A hipokatalázémia gyakorisága 0,18 %, ami hasonló a Japánban és Koreában tapasztalttal, de kevesebb, mint az Iránban mért 5%. A családok tagjainak vérmintáiból DNS-t izoláltunk és ez a DNS gyűjtemény képezte a mutáció vizsgálatokhoz az alapot.

Az akatalázémiás és hipokatalázémiás egyének genetikai jellemzését először az ismert japán mutációk vizsgálatával kezdtük, így a promoter régió -21-es pozíciójában lévő A→T mutációt vizsgáltuk. A 87 vizsgált személy eredménye váratlanul nagyon nagyszámú mutációt eredményezett, amire a magyarázatot a későbbi szekvencia analízisek adták meg. A -21-es pozícióban lévő A→T szubsztitúció mellett két új, eddig nem ismert pontmutáció is jelen volt a hazai populációban. C→T mutáció a -18-as pozícióban, egy C→A mutáció a -20-as pozícióban. Az A→T mutáció a hipokatalázémiás egyéneknél szignifikánsan ($P < 0,001$) magasabb volt, mint a normokatalázémiás betegeknél (2/36 vs. 14/18). Ez a mutáció megegyezik a japánban találtakkal, és a Magyarországon megtalált két akatalázémiás testvér is homozigóta mutáns. Mivel azonban ez a mutáció megtalálható a kontroll csoportban is, így az A→T mutáció a -21-es pozícióban nem lehet egyértelmű és kizárólagos magyarázata a magyarországi akatalázémiának. A két újonnan megtalált mutáció közül az egyik az alacsony frekvencia (-20 C→A, 3/35 vs. 0/32) miatt a hipokatalázémiás egyéneknél, a másik viszont a magas kontroll frekvencia miatt (-18 C→T, 18/20 vs. 20/12) nem tűnik úgy, hogy hatással lenne a csökkent katalázaktivitásra.

A diabéteszes betegcsoportban (308 fő) az SSCP analízis a kataláz gén 2. exonjában 5 új pontmutációt eredményezett. Ezek közül kettő, a T→G (96-os pozíció) és a G→C (135-ös pozíció) missense mutációk, így ezek jelenlétekor megváltozik az adott helyen lévő aminosav és ezek az aminosav szubsztitúciók katalázaktivitás csökkenést eredményezhetnek. A két

frameshift mutáció (GA illetve G inzerció az 2-es exonban) stop kodon beépülését okozza a 134-as, illetve 57-es aminosav pozícióban (az 517-es pozícióban lévő stop kodon helyett), így trunkált kataláz proteinek keletkeznek, amelyek szintén felelősek lehetnek a csökkent katalázaktivitásért. Az aktivitáscsökkenés a hidrogén-peroxid koncentráció emelkedését és folyamatos oxidatív stresszt eredményezhet a sejtekben, amely hozzájárulhat a 2-es típusú diabétesz kialakulásához.

A kataláz gén +22348C>T polimorfizmusát vizsgálva azt találtunk, hogy a férfiaknál a különböző genotípusokban eltérő a csontsűrűség. A csak C alléllal (vad*CAT*) rendelkező férfiak csontdenzitása magasabb, mint a mutáns*CAT* genotípusban (CT+TT=mutáns*CAT*).

Az irodalom adatainak megfelelően a csontdenzitás szignifikánsan különbözött a két nem között ($p < 0,001$). Amikor azonban a genotípusokat is figyelembe vettük, a mutáns*CAT* genotípusban a csontdenzitás közötti különbség a nemek között kiegyenlítettődött (BMD-F férfi mutáns*CAT* vs. nő mutáns*CAT*: $p = 0,247$; BMD-L₁₋₄ férfi mutáns*CAT* vs. nő mutáns*CAT*: $p = 0,279$). A kataláz gén 22348-as pozícióban lévő C nukleotid cseréje T-re szignifikáns oszteokalcin szérum koncentrációcsökkenést és csontdenzitás növekedést (BMD-F és BMD L₁₋₄) okozott a koreai postmenopauzás nőkben. A hazai vizsgált populáción ezt az összefüggést nem tapasztaltuk, ami felhívja a figyelmet arra, hogy a genetikai vizsgálatok populáció specifikus eredményeket hozhatnak, emiatt feltétlenül szükséges minden polimorfizmust a hazai populáción is megvizsgálni. A kataláz gén +22348C>T polimorfizmusát az oszteokalcin koncentrációjának, az inzulin érzékenységet kifejező egésztest glükóz felhasználás (M1), zsírmentes testtömeg glükóz felhasználás (M2) és zsírszövet glükóz felhasználás (M3) vonatkozásában is vizsgáltuk. Előzetes eredményeink azt bizonyították, hogy a glükóz felhasználás és az oszteokalcin szint között meglévő szignifikáns korreláció az inzulin érzékenység romlásával mindkét nemből megszűnik. Azonban ha ezt a korrelációt a +22348C>T polimorfizmus függvényében vizsgáljuk, akkor azt látjuk, hogy a nőkben a vad típus esetén (CC) pozitív korreláció van az oszteokalcin és a M értékek között, a mutáns*CAT* genotípusban viszont ez a korreláció megszűnik, férfiaknál pedig a helyzet fordított. A +22348C>T nukleotid szubsztitúció az exon 9-ben nem okoz aminosav változást, így ez a polimorfizmus jelenleg még csak egy markernek tekinthető, és talán nem járul hozzá a kataláz aktivitás változásához, vagy eddig ismeretlen módon, az intronon elhelyezkedő eltérésekhez hasonlóan változtatja meg a gén átírását. A kapott összefüggéseket nem nagyszámú mintán kaptuk, így nagyon merész lenne azt kijelenteni, hogy a kataláz gén ezen polimorfizmusának eredménye predesztinálhatja az oszteokalcin, a csontmetabolizmus és a glükóz anyagcsere közötti állapotot, de okot adhat a vizsgálat szélesebb körben való

kiterjesztésére. Vizsgálatunkban a *mutánsCAT* gént (T allél) hordozó nőkben a változó anyagcsere (adiponektin, leptin –M2) és csont kapcsolatok (adiponektin - BMD) nem jártak szignifikáns csontdenzitás változásokkal. Férfiakban a T allél megjelenése, talán a megváltozó adipokin – anyagcsere (M2) kapcsolatok miatt, denzitás csökkenést okoz a femuron. A többszörös korrelációs számítások során észlelt adatok (a leptin/adiponektin arány nők esetében a femur, férfiak esetében az L1-4 BMD értékét befolyásolta, és ezek a kapcsolatok a T allél megjelenésekor megszűntek), valamint a T allél megjelenésével eltűnő negatív leptin- anyagcserehatás, és az ugyancsak megszűnő pozitív leptin-DHEAs és DHEAs-femur denzitás kapcsolat alapján felvetődik az ismerten nemi különbségeket hordozó leptin szerepe.

A differential display analízis célja alapvetően gyógyszerjelölt molekulák hatásmechanizmusának a vizsgálata volt, amelyhez olyan géneket kellett találnunk, amelyek eltérően expresszálódnak bizonyos patológiás modellekben és a gyógyszerjelölt molekulák képesek ezt az expressziós különbséget kiegyenlíteni. Az analízis eredményeként három olyan gént találtunk, amelyekkel a további vizsgálatokat folytattuk, visszaigazolván az expressziós különbségeket. A legkecsegtetőbb génnek a GRB10 bizonyult. Megállapítottuk, hogy mind az 1-es, mind a 2-es típusú diabéteszes állatmodellekben eltérően expresszálódik, és a magas glükóz koncentráció is növeli a mRNS mennyiségét.

Munkánk során hazai egészséges, és kezelést nem igénylő 2DM populáció esetében vizsgáltuk a GRB10 RS 2237457 (+11275G>A) allél frekvencia hazai előfordulását; valamint az allél típusok összefüggését a biokémiai paraméterekkel, a glükóz anyagcsere mutatóival, a hormon, az adipokin, a citokin szintekkel és az inzulin érzékenységet tükröző, egészséges glükóz felhasználással. A magyarországi 2DM betegek esetében nincs különbség a GRB10 gén vizsgált polimorfizmusában (+11275G>A) az allél gyakoriság között a kontroll csoporthoz viszonyítva, ami összhangban van a Skandináviában és Amerika több népcsoportjában mért adatokkal, de eltér az amerikai Amish közösségben talált adatoktól (magyarországi populáció egészséges G: 62% vs. 2DM G: 70 %; Amish közösség egészséges G: 68 % vs. 2DM G: 53 %). Az amerikai Amish népesség körében végzett vizsgálat során a GRB10 gén +11275G>A polimorfizmusa szoros összefüggést mutatott a nem diabéteszes személyek orális glükóz terhelése során számított glükóz AUC értékével ($p = 1.07 \times 10^{-5}$). Mi a vizsgálataink során „prediabéteszes” személyeket, azaz az egészségestől az IFG és IGT-n keresztül a kezelést nem igénylő 2DM-ig vizsgáltunk. Ebben a populációban nem volt összefüggés a genotípus és glükóz AUC között, de a férfiaknál kapott nagyobb inzulin szekréció a vad típusban alátámasztja, hogy a gén polimorfizmusa az inzulin jelátvitelt befolyásolja, és ez összecseng

azon állatkísérletes adatokkal is, amelyek a GRB10-t az inzulin-elválasztással hozzák kapcsolatba. Mivel ez a jelenség az intravénás glükóz terhelés során nem észlelhető, feltételezhető, hogy a GRB10 hatása az inzulin-elválasztásra az inkretin jelátvitelen keresztül valósul meg. Eredményeink megerősítésére nagyobb esetszámra lenne szükségünk, azonban a klemm vizsgálatok magas költsége ezt megnehezíti. Az allél variációkkal összefüggő, leptin/adiponektin és lipidprofil alapján feltételezhetjük, hogy a GG homozigóták esetében egy funkciójában erősebb alléllal állunk szemben. Az aktívabb GG allél a posztnatális időszakban a zsírkumulációt (zsírsejt proliferáció elősegítése a MAP kináz úton) és a metabolikus inzulin jelátvitelt (IR-IRS1 szinten) képes befolyásolni, így az egyéb poligénes és környezeti hatásokkal együtt szerepet kaphat az inzulin rezisztencia és a 2DM kialakulásában. Vizsgálatunk alapján egyértelmű, hogy a nemek között jelentős különbség van a glükóz felhasználás, inzulinérzékenység és az adipokin kapcsolatok vonatkozásában. Bár az esetszám alacsony, úgy tűnik, hogy ezt a nemhez kötött kapcsolatot a jelenleg vizsgált GRB10gén polimorfizmusa nem befolyásolja.

ÖSSZEFOGLALÁS

Meghatároztuk a vér kataláz enzim referens tartományát nőkben és férfiakban egyaránt.

Megtaláltuk a magyarországi hipokatalázémiás betegekben a japán típusú akatalázémiában is megtalálható A→T szubsztitúciót a kataláz gén promoter régiójának -21-es pozíciójában, valamint két új mutációt detektáltunk a -20-as és -18-as pozícióban.

5 új pont és 2 ismert frameshift mutációt detektáltunk a 2. exon és közvetlen környezetének vizsgálata során diabéteszes betegekben. Két új pontmutáció, a 96-os pozícióban lévő T→G és a 135-ös pozícióban lévő G→C missense mutáció olyan helyen okoz aminosav cserét, ami enzim aktivitás csökkenéshez vezethet. A két frameshift mutáció (GA illetve G inzerció a 2-es exonban) stop kodon beépülését okozza, így trunkált kataláz proteinek keletkeznek, ami csökkent kataláz aktivitást okozhat.

Megállapítottuk, hogy a kataláz gén +22348C>T polimorfizmusának hatása glükóz anyagcserére és a csontok állapotára nemhez kötött. A T allél megjelenése protektív anyagcsere hatású, ami a fajfejlődés során kialakult negatív energia- és csont -metabolizmus kapcsolatnak megfelelően a férfiak esetében kedvezőtlen a femur állapotára. A kataláz gén polimorfizmus gender specificitásában a nemek közötti zsírmegoszlás (viscerális és szubkután zsír eltérő aránya) és az adipokin (leptin) hatásban megmutatkozó különbségek játszhatnak szerepet. Adataink nem erősítették meg a koreai nőkön tett megfigyeléseket, miszerint a T allél alacsonyabb osteocalcin vérszintekkel és magasabb femur denzitással társul.

Eltérően expresszáldott géneket mutattunk ki diabéteszben differential display analízissel, melyek jelentőségét a későbbi genom vizsgálatok is igazolták.

Nem találtunk szignifikáns eltérést a GRB10 +11275G>A polimorfizmusát vizsgálva a kontroll és diabéteszes csoport között a magyarországi populációban. A nemekre jellemző testzsír, inzulin érzékenység, leptin/adiponektin arány és az allél variációk közötti összefüggések alapján feltételezhető, hogy a GG allélnak szerepe van a 2-es típusú diabétesz kialakulásában.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban köszönetemet szeretném kifejezni a témavezetőmnek, Prof. Dr. Góth László egyetemi tanárnak és a mentoromnak, Prof. Dr. Korányi László címzetes egyetemi tanárnak. Ahogy mondani szokás, nélkülük ez a dolgozat „nem jöhetett volna létre”.

Góth László volt, aki először megszerettette velem a humán diagnosztikát, megtanította a szakmát, megkövetelte tőlem, hogy a rutin feladatokon kívül mással is foglalkozzak, képezsem magamat, rendszerezem ismereteimet. Végig figyelemmel kísérte a munkámat, ösztönzött a dolgozat elkészítésére, szakmai tanácsokkal látott el, biztosította a kísérletek egy részének elvégzéséhez szükséges anyagokat és helyet. Miután más munkahelyre kerültem, Korányi László vette át az „atyai” szerepet, gondoskodott az újabb és újabb témákról, anyagokról, eszközökről és irányított. Híven követve Góth László példáját, ő is mindig arra inspirált, hogy ne hagyjam abba a kutatómunkát, írjak cikkeket, írjam meg a dolgozatomat. Mindketten rendszeresen és tisztán jóindulatból számon kérték rajtam a munkát. Az ő kettejük buzdítása nélkül sohasem lett volna erőm a napi munka mellett a dolgozatot megírni. Ők hitették el velem, hogy ezek az eredmények érdemesebbek annál, mintsem egy fiókban tároljam.

Köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Kurucz Istvánnak is, aki megtanított a molekuláris módszerek alapjaira, a kitartásra, a szisztematikus munkára, a hibakeresésre és a gondolkodásra.

Köszönöm azoknak a kollégáknak és kolléganőknek a segítségét, akik részt vettek a kísérleti munkák elvégzésében.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a Mamának, a családomnak, a barátaimnak, hogy kibírták velem ezt a hosszú időt és megértették, hogy néha a „tudomány” miatt nem készült el valami, vagy a miatt nem mehetünk kirándulni, túrázni.



Jelölt: Dr. Vitai Márta
Neptun kód: Q37SRW
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

- Vitai M.**, Kocsordi K., Buday B., Literáti-Nagy B., Kulcsár E., Bezzegh K., Péterfai É., Koltay L., Korányi L.: Nemhez kötött a katalázgén-polimorfizmus (RS769217) hatása az energia-háztartásra és a csontok állapotára.
Orv. Hetil. 151 (23), 923-931, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2010.28893>
- Vitai M.**, Buday B., Kulcsár E., Literáti-Nagy B., Vecsei I., Bezzegh K., Péterfai É., Kurucz I., Korányi L.: A GRB10 gén (+11275G > A) polimorfizmusának hazai előfordulása és kapcsolata a cukoranyagcserével.
Orv. Hetil. 150 (40), 1845-1851, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2009.28729>
- Góth, L., **Vitai, M.**, Rass, P., Sükei, E., Páy, A.: Detection of a novel familial catalase mutation (Hungarian type D) and the possible risk of inherited catalase deficiency for diabetes mellitus.
Electrophoresis. 26 (9), 1646-1649, 2005.
IF:3.85
DOI: <http://dx.doi.org/DOI 10.1002/elps.200410384>
- Vitai, M.**, Fátrai, S., Rass, P., Csordás, M., Tarnai, I.: Simple PCR heteroduplex, SSCP mutation screening methods for the detection of novel catalase mutations in Hungarian patients with type 2 diabetes mellitus.
Clin. Chem. Lab. Med. 43 (12), 1346-1350, 2005.
IF:1.918
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/CCLM.2005.230>
- Vitai M.**, Sükei E.: A vér kataláz referencia tartományának vizsgálata
Klin. Kísér. Lab. Med. 31, 89-95, 2004.



6. Góth, L., **Vitai, M.**: Polymorphism of 5' of the catalase gene in Hungarian acatalasemia and hypocatalasemia.
Electrophoresis. 18 (7), 1105-1108, 1997.
IF:2.848
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.1150180714>
7. **Vitai, M.**, Góth, L.: Reference ranges of normal blood catalase activity and levels in familial hypocatalasemia in Hungary.
Clin. Chim. Acta. 261 (1), 35-42, 1997.
IF:1.067
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0009-8981\(97\)06514-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-8981(97)06514-5)

További Közlemények

8. Buday B., Kulcsár E., Literáti-Nagy B., Horváth T., **Vitai M.**, Vecsei I., Bezzegh K., Kiss J., Péterfai É., Koltay L., Korányi L.: Az osteocalcin helye a humán cukor- és csontanyagcsere kapcsolatában.
Orv. Hetil. 149 (52), 2453-2461, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2008.28518>
9. Buday B., Horváth T., Kulcsár E., Salamon C., Literáti-Nagy B., Barta K., **Vitai M.**, Józsa R., Vecsei I., Bezzegh K., Kiss J., Péterfai É., Koltay L., Korányi L.: A progrediáló inzulinrezisztencia hatása a glükózyanyagcsere csontállapot kapcsolatokra.
Orv. Hetil. 148 (24), 1127-1133, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2007.28072>
10. Buday, B., Horváth, T., Kulcsár, E., Salamon, C., Literáti-Nagy, B., Barta, K., **Vitai, M.**, Józsa, R., Vecsei, Z., Bezzegh, K., Kiss, J., Koltay, L., Korányi, L.: The Effect of Progressive Insulin Resistance on the Relationship between Glucose Metabolism and Bone Status.
Hungarian Med. J. 1 (3), 295-305, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH-HMJ.2007.28072>
11. Rass P., **Vitai M.**, Tarnai I., Sükei E., Páy A.: A humán kataláz gén mutációi Magyarországon.
Klin. Kísér. Lab. Med. 31, 129-135, 2004.



12. Góth, L., **Vitai, M.**: The effects of hydrogen peroxide promoted by homocysteine and inherited catalase deficiency on human hypocatalasemic patients.
Free Radic. Biol. Med. 35 (8), 882-888, 2003.
IF:5.063
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00435-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00435-0)
13. Kurucz, I., Tombor, B., Prechl, J., Erdő, F., Hegedűs, E., Nagy, Z., **Vitai, M.**, Korányi, L., László, L.: Ultrastructural localization of HSP-72 examined with a new polyclonal antibody raised against the truncated variable domen of the heat shock protein.
Cell Stress Chaperones. 4 (2), 139-152, 1999.
IF:2.847
14. Góth L., **Vitai M.**, Mészáros I.: A hidrogénperoxid polarográfiás féllépcsőpotenciáljának változása a szérum fehérje mátrixának hatására.
Klin. Kísérl. Lab. Med. 24, 203-206, 1997.
15. Góth, L., **Vitai, M.**: Hypocatalasemia In Hospital Patients.
Clin. Chem. 42 (2), 341-342, 1996.
IF:3.422
16. Góth, L., **Vitai, M.**: Hungarian hereditary acatalasemia and hypocatalasemia are not associated with chronic hemolysis.
Clin. Chim. Acta. 233 (1-2), 75-79, 1995.
IF:1.101
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0009-8981\(94\)05957-T](http://dx.doi.org/10.1016/0009-8981(94)05957-T)

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudánymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.02.04

