

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

AZ ETANOL ELŐSEGÍTI A HUMÁN AORTÁBÓL SZÁRMAZÓ SMAIZOMSEJTEK VASZKULÁRIS KALCIFIKÁCIÓJÁT AZ ALKOHOLFOGYASZTÁSÉRT FELELŐS GÉNEK MEGHATÁROZÁSA QUANTITATIVE TRAIT LOCUS TÉRKÉPEZÉSI ELJÁRÁSSAL

Oros Melinda

Konzulens: Prof. Dr. Nagy László
Prof. Dr. Vadász Csaba



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Sejt-és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2015

**AZ ETANOL ELŐSEGÍTI A HUMÁN AORTÁBÓL SZÁRMAZÓ
SIMAIZOMSEJTEK VASZKULÁRIS KALCIFIKÁCIÓJÁT
AZ ALKOHOLFOGYASZTÁSÉRT FELELŐS GÉNEK MEGHATÁROZÁSA
QUANTITATIVE TRAIT LOCUS TÉRKÉPEZÉSI ELJÁRÁSSAL**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Oros Melinda
okleveles molekuláris biológus/genetikus

Készült a
Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia
Doktori Iskolája keretében

Konzulens: Prof. Dr. Nagy László, akadémikus
Prof. Dr. Vadász Csaba, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora
Dr. Szabó Gábor, PhD

A doktori szigorlat időpontja, helye: 2016. február 11. 12:00,
DE ÁOK, Biokémiai- és Molekuláris Biológiai Intézet

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Váradi András, az MTA doktora
Dr. Balogh István, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Váradi András, az MTA doktora
Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora
Dr. Balogh István PhD
Dr. Szabó Gábor, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2016. február 11. 14:00
DE ÁOK Belgyógyászati Intézet, „A” épület tanterme

1. Bevezetés

1.1. Vaszkuláris kalcifikáció

Az 1990-es évek elején Franciaországban végzett epidemiológiai tanulmányok világítanak rá arra, hogy a mértékletes alkoholfogyasztás (20-30g alkohol/ nap) 40%-kal képes csökkenteni a koronária szívbetegségek kockázatát. Azóta számos országban végzett vizsgálatok erősítették meg ezt a megfigyelést, hangsúlyozva egy 20-40%-kal alacsonyabb kardiovaszkuláris megbetegedési kockázatot az alkoholfogyasztóknál az alkoholt nem fogyasztó emberekkel összehasonlítva.

A jelenleg elfogadott epidemiológiai megfigyelés az, hogy a gyakori és mértékletes alkoholfogyasztás kapcsolatba hozható a koronária megbetegedések és halálozások alacsony kockázatával. Habár a jelenlegi tanulmányok egybeesnek ezekkel a megfigyelésekkel, nevezetesen a mértékletes alkoholfogyasztás nyilvánvaló protektív hatással van a koronária szívmebetegedésekre, ezen munkák szerzői nem találtak protektív összefüggést az alkoholfogyasztás és a koronária kalcifikáció között. Valójában a vizsgálatok arra utalnak, hogy a rendszeres alkoholfogyasztás, különösen a szeszesitalok fogyasztása a koronária artériák nagyobb mértékű kalcifikációjával hozhatók összefüggésbe. A klinikai tanulmányok azt valószínűsítik, hogy az alkalmoszerű vagy rövid ideig tartó nagymértékű időszakos alkoholfogyasztás,- mely 5, vagy annál több pohár italt jelent naponta,- megnöveli a kardiovaszkuláris megbetegedések, a kalcifikáció kialakulási kockázatát, és ennek köszönhetően a következményes halálozást. Azonfelül köztudott, hogy a kalcifilaxis majdnem kizárólagosan a krónikus vesebetegség 5. funkcionális stádiumában alakul ki, azonban az utóbbi évek esetismertetései rávilágítottak arra, hogy a rendszeresen alkoholt fogyasztó, fiziológias vesefunkciókkal rendelkező embereknél is előfordulhat. Míg az eddig ismert alapmegfigyelések nagy száma arról tanuskodik, hogy az alkohol hogyan hathat jótékonyan az érlemeszesedésre, -meggátolva ezzel a kardiovaszkuláris- és cerebrovaszkuláris betegségek kialakulását-, ezzel szemben ennek a kettősségnek a molekuláris háttere mindmáig nem ismert.

A vaszkuláris kalcifikáció a kardiovaszkuláris halálozás elfogadott kockázati tényezőjének tekinthető, mértéke pedig prediktív lehet az ennek következtében kialakuló halálozásban függetlenül attól, hogy milyen hagyományos rizikófaktorokkal rendelkezik a betegség. A kalcifikáció az artériának két fő területén alakul ki.

Míg ateroszklerózisban közvetlenül az intima érintett az érfalak arra fogékony területein fokális elhelyezkedésű mineralizációval, addig a media szklerózisban a nagy- és a

közepes méretű artériafalak media rétegében diffúz mineralizáció figyelhető meg. Fontos megjegyezni, hogy a két folyamat élesen nem választható szét, és nagyon gyakran ateroszklerózisban az intima kalcifikáció velejárója a media kalcifikáció, valamint a media mineralizációját az intima kalcifikációja kísérheti. Az ateroszklerózis/intima kalcifikáció szoros összefüggésben áll az öregedéssel, az artéria fal átépülésével, - beleértve az intima és media „*remodeling*”-et -, a szívbillentyűk geometriai és funkcionális változásaival. A hidroxipatit szöveti akkumulációja miokardiális infarktusbán, koronária- és cerebrovaszkuláris artéria megbetegedésekben, posztangioplastikus értágító műtétekkel kapcsolatban, és a perifériás vaszkuláris megbetegedésben specifikus klinikai markernek tekinthető. Kimutatták, hogy mind a Farmington kockázati index, mind pedig a koronária kalcifikációs pont,- melyet elektronsugár CT-vel határoznak meg-, a kardiovaszkuláris események tekintetében prognosztikus jelentőséggel bírnak. Számos tanulmány azt igazolta, hogy a koronária kalcifikáció szoros előrejelzője lehet, avagy erősen összefüggésbe hozható a hirtelen szívhalállal. Mindezekért a következményekért a vaszkuláris kalcifikáció alapvető patofiziológiája, a szervek rendellenes vérellátása, és az érfalak és szívizom átépülése tehető felelőssé.

A kalcifilaxis a bőr és bőr alatti kötőszövet kis arterioláit érinti. A kalcifilaxis legfőbb jellemzője az érfalak mineralizációja, mely majdnem kizárólagosan az előrehaladott krónikus vesebetegség során jelenik meg. A simaizomsejtek kalcifikációját követően az endotheliumra prokoaguláns fenotípus lesz jellemző, melynek során a kis arteriolák elzáródnak. A klinikai kép tipikus jellemzője a nagyon fájdalmas, kiterjedt bőr nekrosis, mely a szepszis és az ezzel együtt járó szív- és cerebrovaszkuláris megbetegedésnek köszönhetően az életet veszélyezteti. Ezt a betegséget először a híres magyar fiziológus, Selye János írta le és tanulmányozta.

Az elmúlt évek klinikai megfigyelése, hogy a megemelkedett foszfát szint a kardiovaszkuláris megbetegedés nem-tradicionális, azonban jelentős kockázati tényezőjeként tekinthető, mely a mineralizációs folyamatok kialakulásához vezetnek. A kutatások rávilágítottak arra, hogy a szérumban a foszfát szintje szignifikáns kapcsolatban áll a koszorúér megbetegedésekkel. A hiperfoszfatémia általában a krónikus vesebetegségben jelentkezik, annak 4. és 5. funkcionális stádiumában, és szoros összefüggés áll fenn a szérumban a foszfát szintje és a krónikus hemodialízis kezelésben részesülő betegek halálozási kockázatával. Szintén szoros kapcsolat mutatkozik az artériás kalcifikáció és az érfalmerevség, vérnyomás emelkedés, vagy a halálozás között, mely hozzájárul az ezt a populációt érintő szív- és perifériás iszkémiás megbetegedés és a bal kamrai hipertrófia magas előfordulási

gyakoriságához. Kiemelendő, hogy mindezek mellett a foszfát szint kapcsolatot mutatott az aorta kalcifikációval fiziológias vesefunkcióval rendelkező egészséges egyéneknél is.

1.2. A vaszkuláris kalcifikációban szerepet játszó fehérjék és enzimek

Az elmúlt másfél évtizedben felismerésre került, hogy az inorganikus foszfát a vaszkuláris kalcifikáció fontos szabályozója. Noha a vaszkuláris kalcifikáció pontos mechanizmusa nem teljesen ismert, az ásványi anyagok rendellenes metabolizmusa szerepel a legfontosabb kockázati tényezők között. Ez egy aktívan szabályozott többlépéses folyamatnak tekinthető, melyeket bizonyos patológiai állapotokban a megváltozott sejtfenotípus indít el, amely elsősorban az érfal simaizomsejtjeit érinti. Ennek során egy transz-differenciáció figyelhető meg, ami a simaizomsejtek oszteoblaszt irányú transzformációjához vezet.

Az oszteoblasztos transzformációt követően a simaizomsejtek elveszítik simaizomsejt markereiket és oszteoblasztokra jellemző tulajdonságaik alakulnak ki. Jóno és mts.i figyelték meg elsőként, hogy a simaizomsejtek normál szérumban foszfát koncentrációjú tápfolyadékban tenyésztve eredeti funkciójukat megőrzik, azonban emelkedett foszfátszintnél ezen sejtek mineralizációja következik be. A jelenséget *in vivo*, emelkedett szérumban foszfát szinttel rendelkező betegeknél is megfigyelték. Az extracelluláris mátrixban lévő granuláris depozitumok idő- és dózisfüggő módon alakulnak ki. Azok az emberi eredetű simaizomsejtek, melyeket megemelkedett foszfáttartalmú médiában tenyésztettek nagymértékű oszteoblaszt irányú fenotípusváltáson mentek keresztül. Fiziológias foszfát szinten a sejtekre simaizomsejt eredetű markerek a jellemzőek, beleértve a SM22 α és a SM-aktint. Miután emelkedik a foszfátszint a simaizomsejt eredetű markerek dramatikus csökkenése következik be, és ezzel egyidejűleg pedig megjelennek az oszteogenikus markerek, mint például az alkalikus-foszfátáz, az oszteokalcin és a core binding factor α -1 (*Cbfa-1*).

1.2.1. A foszfát ko-transzporter , Pit-1 és a Core-binding factor- α -1, Cbfa-1

A vaszkuláris simaizomsejt megemelkedett foszfátszint hatására bekövetkező fenotípus váltásának esszenciális feltétele a nátrium-dependens foszfát ko-transzporter, azaz a Pit-1-en keresztül történő foszfát felvétel. A szerkezettől és a szabályozástól függően 3-féle foszfát ko-transzportert különböztetünk meg. Míg az I-es és II-es típusú foszfát ko-transzporterek a vesére és a bélre korlátozódnak, addig a III-as típusú transzporterek szinte minden szövetben jelen vannak, beleértve a vesét, szívet, tüdőt és a csontot is. A III-as típusú transzportereket a Pit-1 és a Pit-2 képviseli. Ezen ismert transzporterek közül a Pit-1-et a humán simaizomsejtek és a humán aorta eredetű sejtek expresszálják, mely transzporter

elősegíti az inorganikus foszfát vaszkuláris sejtekbe történő felvételét. Lévén, hogy a vaszkuláris kalcifikáció egy érzékeny és jól szabályozott sejtben zajló folyamat, - ahol is a simaizomsejtek oszteoblasztos tulajdonságot öltenek - azzal is jellemezhető, hogy a foszfát expozíció, vagy PDGF-nek kitett sejtekben a *Cbfa-1* megemelkedett expressziója következik be. A *Cbfa-1* egy olyan transzkripciós faktor, mely az oszteoblasztos differenciáció esszenciális szabályozójaként működik, és domináns funkciót tölt be más géntermékek számára. A *Cbfa-1* döntő jelentőséggel bír az oszteoblaszt és a kondrocita differenciációban fenntartva ezzel a csont- és porcszövet struktúráját. A *Cbfa-1* hiányos egerekben az intramembránózus és az endokondrális osszifikáció az oszteoblaszt irányú érési folyamat meggátolásának köszönhetően teljesen blokkolt állapotban van, ami megerősíti azt a tényt, hogy ez a transzkripciós faktor alapvető fontosságú az oszteoblasztos differenciációban, a csont mátrix génextpressziós folyamataiban és ezt követően a csont mineralizációjában.

1.2.2. Alkalikus foszfatáz (ALP)

Az oszteoblasztok egyik fenotípusos markere az alkalikus foszfatáz. Az alkalikus foszfatáz enzim aktivitása a IV-es típusú ateroszklerotikus lézióban, media kalcifikációban és a kalcifikált szívbillentyűkben volt kimutatható. Az alkalikus foszfatáz a sejtfelszínen expresszálódó enzim, a degradálódó szerves foszfáton és a keletkező inorganikus foszfáton keresztül a vaszkuláris kalcifikációhoz járul hozzá. Az enzimaktivitás jelenléte nélkülözhetetlen az oszteogenezis korai fázisában. Kimutatták, hogy a gyulladásos citokinek és a D vitamin felregulálja az alkalikus-foszfatáz aktivitást és a mineralizációt. Számos *in vitro* kutatási eredmény azt mutatta, hogy a vaszkuláris kalcifikációs sejtek megnövekedett alkalikus foszfatáz aktivitással bírnak, és ezen sejtek mineralizációs képessége a sejtek alkalikus-foszfatáz aktivitásától függ. Így tehát, a vaszkuláris sejtek alkalikus-foszfatáz indukciója nagy valószínűséggel felgyorsítja a vaszkuláris kalcifikáció folyamatát.

1.2.3. Oszteokalcin (OC)

Az oszteokalcin, az extracelluláris mineral binding Gla protein család szkeletális tagja, mely a csont mátrix fő nem-kollagén szerű fehérjéje. Ezt a fehérjét az oszteoblasztok termelik és a csontmineralizációval egyidejűleg a csont mátrix állományába szekretálják. Az oszteokalcin kalciumkötő képessége és a csontban történő expressziós mintázata azt sugallja, hogy fontos szerepet tölt be a mineralizáció folyamatában. Az oszteokalcin, a kalcifikálódott ateroszklerotikus léziókban és a mineralizált szívbillentyűkben magas koncentrációban jelenlévő gamma-karboxiglutaminsavat tartalmazó fehérjék egyike. Kísérletek kimutatták,

hogy a vaszkuláris sejtekben a magas foszfát szint hatására az oszteokalcin magas szintű kifejeződése következik be.

1.3. Az alkoholfogyasztás QTL térképezése

A csontsejtekhez közel elhelyezkedő glutamate tartalmú idegeknek funkcionális glutamát receptoraik vannak. A glutamátról már korábban bizonyították, hogy egy mechanikusan érzékeny glutamát/ aszpartát transzporter fehérjén keresztül befolyásolja a csontreszorpciót, mely a glutamátnak egy mechanikai terhelést érzékelő és csontszerkezetet átépítő funkciót tulajdonít.

A metabotropic glutamate receptor type 7 (*Grm7*) gén egy ígéretes kandidátus génként szolgál, mely a megváltozott alkoholpreferenciában, alkoholizmusban játszhat szerepet.

A központi idegrendszerben lévő excitatórikus aminosav, a glutamát egy potenciális neurotranszmitterként működve különböző membrán glutamát receptorokon keresztül fejti ki hatásait.

Munkánk során tanulmányoztuk az alkoholizmus háttérében meghúzódó genetikai háttérét. Az alkoholizmus egy komplex betegség, melyet számos gén genetikai mintázata határoz meg. Célunk az volt, hogy egy, az összes autoszómális kromoszómára kiterjedő genom vizsgálatot fejlesszünk ki és megtaláljuk az etanol fogyasztásért felelős lokuszokat (QTLs) és a kvantitatív tulajdonságokért felelős géneket (QTGs).

Az alkoholizmus és a kábítószerfüggőség alapjául szolgáló neurokémiai folyamatok mindmáig nem teljesen ismertek. A függőség neurokémiai útvonalának meghatározására alkalmas módszerek a releváns gének megtalálására irányulnak. A kvantitatív genetikai számos bizonyítéka azt sugallja, hogy a komplex tulajdonságokat és betegségeket (beleértve az alkoholizmust) alapjában véve a genetikai faktorok is befolyásolják. Az alkoholfogyasztást meghatározó genetikai varianciát McClearn és Rodgers jól megalapozott beltenyésztett egértörzsek összehasonlítása kapcsán közel egy fél évszázaddal ezelőtt írta le először. Az utóbbi évtizedben történt intenzív kutatások ellenére az alkohol orális önadagolásának biológiai alapja nem ismert. A jelenleg elérhető új genetikai eszközök, mint pl. a „high throughput SNP” genotipizálás módszere és a génexpressziós „microarray”-ek reményt keltenek arra vonatkozóan, hogy az alkoholizmusért felelős géneket a közeljövőben meghatározhatják. Ez különösen azért jelentős, mivel az egyénre szabott hatékony terápia csak akkor hozhat eredményt, ha a genetikai háttér és az érintett biokémiai útvonal között lévő molekuláris kapcsolatot alaposan megismerjük.

A rágsálók alkohol függőségét az élvezeti alkoholfogyasztás szemszögéből nézve egy fontos állatmodellként tartják számon. Az 1990-es évek elejétől kezdődően, genetikai tanulmányokban nagyszámú Mennyiségi Jellegek kialakításáért felelős Lókuszt (Quantitative Trait Loci, QTL) térképeztek fel az alkoholkedvelő, alkoholfogyasztó és alkoholelfogadó tulajdonságok tekintetében.

A C57BL/6ByJ, a BALB/cJ és a CXBI/ByJ, a progenitor- és RQI törzsek közötti alkoholivásbeli fenotípusok közötti különbségeket korábbi tanulmányokban írták le. Kifejlesztettünk egy komplex géntérképezési eljárást (Recombinant QTL Introgression, RQI), melynek során 5 kromoszómán térképeztük fel az alkoholpreferenciát és -fogyasztást érintő QTL-eket a b_{5i7} vonal 80 RQI törzsében. E korábbi munkában 5 egér kromoszómát polimorf mikroszatellita markerekkel térképeztünk fel (1, 2, 3, 9 és 15) az alkoholfogyasztás mennyiségi jegyeinek (Quantitative Trait Loci, QTLs) vizsgálatára. 44 B6.C és 36 B6.I beltenyészett kongenikus Recombinant QTL Introgression (RQI) b_{5i7} -es egértörzset használtunk, melyek a C57BL/6ByJ-es genetikai háttérén BALB/cJ és a CXBI/ByJ egértörzsből származó géneket hordoznak. A B6.C törzsekben az összetett regressziós analízis egy 3 mikroszatellita markeres modellt eredményezett, mely a genetikai variancia 32%-ára magyarázatot adott.

2. Célkitűzés

Patológias körülmények között a lágyszövetek kalcifikációja súlyos következménnyel jár, főképp, ha ez az artériákat, arteriólákat és a szívbillentyűket érinti. Ez döntő jelentőséggel bír az ateroszklerózis és a media szklerózis patogenezisében, melyek a kardiovaszkuláris betegségek és halálozás tekintetében meghatározóak. Azok az epidemiológiai vizsgálatok, melyek egy adott populáción belül jelenlévő egészség- és betegségmintázatokat, illetve a velük kapcsolatban álló faktorokat vizsgálják, rámutatnak arra, hogy az alkoholfogyasztás és a kardiovaszkuláris betegségek között közvetlen kapcsolat áll fenn. Az alkoholfogyasztás és a vaszkuláris kalcifikáció közvetlen kapcsolatát érintő folyamatok vizsgálata alkalmas lehet a betegségre való hajlamot megjósolni és a preventív mérések és hatékony terápiák létrehozására irányulóan potenciális vizsgálati célpontokat adni.

A vizsgálataink célja

1. Meghatározni, hogy az etanol hogyan befolyásolja a vaszkuláris simaizomsejtek mineralizációját, az extracelluláris mátrix kalcium felhalmozását.

2. Meghatározni, hogy az etanol befolyásolja-e a simaizomsejt oszteoblasztszerű fenotípusváltását.
3. Meghatározni azt a mechanizmust, mellyel a vaszkuláris simaizomsejtek oszteoblasztos transzformációja történik.
4. Kiterjeszteni a genom vizsgálatot az eddigi 5 kromoszómáról az összes autoszómális kromoszómára és megnövelni az alkoholpreferencia tesztben szereplő b5i7 RQI törzsek mintaszámát. Analizálni az együttes adatokat összetett intervallum térképezéssel (CIM) és többszörös intervallum térképezéssel (MIM).
5. Az alkoholpreferencia és alkoholfogyasztásban szerepet játszó lókuszok és gének azonosítása egy alkoholizmus állatmodell teljes genomjában.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Sejtkultúra és reagensek

A humán aortából származó simaizomsejteket a Cell Application Inc. cégtől (San Diego, CA, USA) és az FBS-t pedig a Gibco (Paisley, UK) cégtől vásároltuk. Minden további vegyszert a Sigma-Aldrich cégtől (Steinheim, Germany) szereztünk be. A sejt kultúrákat 15% FBS, 60 U/mL penicillin, 60 µg/mL streptomycin, 120 µg/mL neomicin és 1 mM nátrium-piruvát tartalmú DMEM-ben tartottuk fenn (növekedési médium, GM). A sejteket a konfluens növekedési állapotig tartottuk fenn és a 3-7. passzázsszámig használtuk fel őket. Primer humán köldökzsinór vénából származó endotheliális sejteket (HUVECs) humán köldökzsinór vénából diszpázzal izoláltuk és 15% FBS, antibiotikum, L-glutamin, nátrium-piruvát és endoteliális növekedési faktor tartalmú medium 199-ben tenyésztettük őket. A HepG2 sejteket 10% FBS, 100 U/mL penicillin és 100 µg/mL streptomycin tartalmú DMEM-ben tenyésztettük.

3.2. Szövetteni vizsgálat

A hisztopatológiai vizsgálatokhoz a szöveteket és ereket 10%-os formalinban fixáltuk és paraffinba ágyasztuk. Az 5 mikrométer nagyságú darabokat 8 percig xilollal deparaffináltuk és leszálló izopropil-alkoholsorral rehidratáltuk. Ezután hematoxilin/eozin festést alkalmaztunk (hematoxilin festés 6 percig, melyet egy desztillált vizes mosás követett, eozin festés 2 percig és fedőlemezzel történő lefedés). A rehidratáció után von Kossa festést is végeztünk- a szövetdarabokat 5%-os ezüstnitrát-oldatban egy 60-wattos lámpa alatt 1 óráig inkubáltuk, desztillált vízzel mostuk és 5 percig 5%-os nátrium-tioszulfát oldatban inkubáltuk, hemalaun oldattal festettük, dehidratáltuk és végül fedőlemezzel lefedtük. Zsírfestéshez friss

fagyasztott mintákat (8-10 mikrométeres nagyságú) használtunk miután a metszetet rászárítottuk a tárgylemezre. Formalin fixálás, rövid csapvizetes mosás (1-10 min) és 60%-os izopropanolos mosást követően frissen készített Oil-Red-O munkaoldattal (15 min) festettük. A szöveteket 60%-os izopropanollal mostuk és a nukleinsavakat hemalaun oldattal festettük meg. A festett metszeteket Mirax Midi szkennelrel (3D Histech, Budapest, Hungary) digitalizáltuk.

3.3. A kalcifikáció indukciója

A konfluencia eléréséig a sejteket kalcifikációs médiumban (1-4 mmol/L inorganikus foszfát (P_i) növekedési médiumhoz történő hozzáadásával hoztuk létre) tenyésztettük. Mind a növekedési, mind pedig kalcifikációs médiumot kétnaponta cseréltük. Az inorganikus foszfát jelenlétében lévő etanol által kiváltott kalcifikáció 3 mmol/L P_i koncentrációnál jelentős mértékű volt, ezért a további kísérleteink során a 3 mmol/L-es P_i koncentráció értéket használtuk a kalcifikáció folyamatának beindítására.

3.4. A kalcium felhalmozódás kvantifikálása

A 48-lyukú tenyésztőedényben növekvő sejteket kétszer mostuk PBS-ben és 0.6N HCl-val 30 percig dekalifikáltuk őket. A felülúszó kalcium tartalmát QuantiChrome Calcium Assay Kit-tel (Gentaur, Paris, France) határoztuk meg a protokoll szerint. Dekalcifikáció után a sejteket kétszer mostuk PBS-sel és NaOH (0.1 mol/L)/SDS (0.1%) tartalmú oldattal szolubilizáltuk és a minták protein tartalmát BCA protein assay kit-tel (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) határoztuk meg. A sejtek kalcium tartalmát a fehérje tartalomra normalizáltuk és $\mu\text{g}/\text{mg}$ fehérje értékben fejeztük ki. Időfüggéses kísérletek kivitelezéséhez a sejteket 5, 7, 10 és 12 napnál gyűjtöttük be. Az extracelluláris mátrix minerális depozícióját Alizarin Red festéssel is megerősítettük. Festést követően a sejteket kétszer desztillált vízzel, egyszer pedig 70%-os etanollal mostuk. A megfestődött extracelluláris granulumokat 100 mmol/L koncentrációjú cetilpiridinium-klorid oldattal 1 órán át inkubálva oldottuk fel, ezt követte a feloldott festék abszorbanciájának 570 nm-en történő mérése.

3.5. Foszfát tartalom mérés

A sejtlizátum P_i tartalmát QuantiChrome Phosphate Assay Kit-tel (Gentaur, Paris, France) határoztuk meg. Az etanolos kezelés után a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd 1% Triton X-100 oldattal szolubilizáltuk és mértük az inorganikus foszfát tartalmát. A sejtek

foszfát tartalmát a fehérje tartalomra normalizáltuk és mmol/mg sejt fehérje értékben fejeztük ki.

3.6. Alkalikus foszfatáz (ALP) aktivitás mérése

A sejteket 6-lyukú tenyésztőedényben tenyésztettük, majd kétszer mostuk HBSS oldattal, a sejtproteineket 1% Triton X-100/ 0.9% NaCl oldattal szolubilizáltuk és mértük az ALP aktivitást. Röviden, 130 µl Alkaline Phosphatase Yellow Liquid Substrate (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) reagenst adtunk 50 µg fehérje mintához. A p-nitrofenol képződés kinetikáját 405 nm-en 30 percig 37°C-on inkubálva követtük nyomon. A kinetikai görbe maximális meredekségét használtuk a számoláshoz.

3.7. Western Blot és oszteokalcin mérés

Az oszteokalcin expresszió méréséhez a sejteket 6-lyukú tenyésztőedényben 7 napig kezeltük. Az oszteokalcinra az extracelluláris mátrixot 200 µL EDTA oldatban (0.5 mol/L, pH 6.9) szolubilizáltuk, és a sejtlyúzatumot gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázra normalizáltuk. Egyenlő mennyiségű 30 µL térfogatú EDTA-s szolubilizált mintát 16.5%-os Tris-Tricine Peptide gélen (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) megfuttattuk, majd nitrocellulóz membránra (Hybond-ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) blottoltuk. Blokkolás után a membránt poliklonális anti-oszteokalcin antitesttel (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) 1:200 hígításban inkubáltuk, melyet egy peroxidáz-jelölt anti-nyúl IgG antitest követett (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázra (GAPDH) 30 µL mennyiségű sejtlyúzatumot 12.5%-os gélen (SDS-PAGE) megfuttattuk, majd nitrocellulóz-membránra blottoltuk. A membránt egér monoklonális anti-GAPDH (Novus Biologicals Inc., Camebridge, UK) antitesttel inkubáltuk, melyet egy peroxidáz-jelölt anti-egér IgG antitest követett (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Alkohol-dehidrogenáz-1 előhívására a sejtlyúzatumot 12.5%-os gélen megfuttattuk (SDS-PAGE), majd nitrocellulóz membránra blottoltuk. Blokkolás után a membránt nyúl monoklonális anti-alkohol-dehidrogenáz-1 antitesttel (Abcam, Camebridge, UK) 1:1000 hígításban inkubáltuk, melyet egy peroxidáz-jelölt anti-nyúl IgG antitest követett. Az előhívás után a membránt GAPDH-ra normalizáltuk. Az anigén-antitest komplexet a tormaperoxidáz kemilumineszcens rendszerrel a gyártó leírását követve vizualizáltuk (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). A fehérjék kvantálását számítógép-vezérelt videodenzitometrálassal végeztük (Alpha DigiDoc RT, Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA). Az EDTA-val

szolubilizált extracelluláris mátrix minták oszteokalcin tartalmát ELISA-val (Bender MedSystems, Vienna, Austria) a gyártó leírását követve mértük.

3.8. Kvantitatív-RT-PCR

A totál RNS izolálását és az RT reakciót követően *Cbfa-1* mRNS-t korábbi módszer szerint meghatároztuk. Röviden, a *Cbfa-1* mRNS szintekhez a 25 μ L reakcióelegy 5 μ L átírt mintát, 0.3 nmol/L forward (5'-ATGGCGGGTAACGATGAAAAT-3') és reverse (5'-ACGGCGGGGAAGACTGTGC-3') primert és 12.5 μ L iQ SYBR Green Supermix-et (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) tartalmazott. Az eredményeket ciklofilin mRNS-re normalizáltuk.

3.9. Sejt viabilitás vizsgálat

Miután a sejteket 20-80 mmol/L etanollal kalcifikációs médium jelenlétében vagy annak hiányában 7 napig kezeltük, a monolayert kétszer mostuk HBSS oldattal, ezt követően 550 μ L 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil-tetrazolium bromid (MTT) (0.5 mg/mL) HBSS-es oldatával újabb 6 órán keresztül inkubáltuk. Az MTT oldat eltávolítása után, 550 μ L dimetil-szulfoxidot (DMSO) adtunk a sejtekhez és 570 nm-en mértük az optikai denzitást.

3.10. Statisztikai elemzés

Az eredményeket átlag \pm SD-ként ábrázoltuk. A statisztikai elemzést one-way ANOVA teszttel, -majd ezt követte a Newmann-Keuls teszt többszörös összehasonlításra-, és a two-way ANOVA teszttel végeztük.

3.11. Recombinant QTL Introgression (RQI) törzsek

A Recombinant QTL Introgression módszerét a komplex kvantitatív törzsek genetikai elemzésére használtuk. E metodika során rövidtávú fenotipusos szelekciót, ismételt visszakeresztezés-keresztezés („backcross-intercross”) ciklust, kongenikusságot, rekombinációt és a beltenyésztés módszerét használtuk. A fenotípus vizsgálatra a mesotelencephalikus dopamin rendszerhez kapcsolódó tulajdonságot vettük alapul.

A BALB/cJ és CXBI donor törzsek QTL-jeit, melyek a mesencephalikus tirozin-hidroxiláz (TH/MES) enzimaktivitás különböző szintjeit képviselik-, vezettük be B6 háttérbe.

A CXBI egy rekombináns beltenyésztett törzs, melyek B6 és BALB/cBy géneket hordoznak. Kétféle F2 (B6XC és B6XI) nemzedéket, és minden egyes F2 alom egyenlő részre osztásával pedig kétféle vonalat (α és β) hoztunk létre. Fenotípus vizsgálatra mind a 4 vonalban legalább 45 F2 hímét teszteltünk, és 15-öt választottunk ki a B6 nőtényekkel

történő első visszakeresztezésre. Több, mint 45 visszakeresztezés 1 (b_{1i_0}) hím utódot vizsgáltunk és 15 hímet választottunk ki a nem ugyanazon alomból származó nőstényekkel történő keresztezésre, melynek során a b_{1i_1} generáció jött létre.

3.12. Viselkedési teszt

Felnőtt (11 ± 2 hetes) hím állatokat a C57BL/6By, a BALB/cJ, a CXBI és az RQI törzsekből használtunk fel. A „két-edényes választás” („two-bottle choice”) tesztet alkalmaztuk. Azért, hogy hozzászoktassuk az állatokat az etanol ízéhez, az etanol oldatokat növekvő koncentrációban kínáltuk fel.

3.13. DNS izolálás, polimeráz láncreakció, kapilláris gélelektroforézis

A DNS-t az RQI egértörzsek farok mintáiból Miller módszere alapján izoláltuk. A PCR primereket a Mouse Genom Informatics, the Jackson Laboratory cég adatbázisában található B6 és C egértörzsek polimorf markereinek információi alapján választottuk ki.

A QTL térképezésnél 396 mikroszatellita markerrel dolgozunk. A PCR termékek analizálásához az ABI Prism 310 Genetic Analyzer gépet és az IDT (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA) cég által szintetizált, fluoreszcens festékekkel (FAM, TET, és HEX) jelölt és tisztított mikroszatellita markereket használtuk. A 310 Genetic Analyzer gép segítségével 1 bp különbséget tudunk detektálni.

3.14. QTL térképezés

Térképezésre „M-estimatorokat” használtuk, mely robosztus megfelelője az átlagnak és a középértéknek, mely valószínűsíti az elhelyezkedés középpontját. Az eredeti fenotipikus adatokat az SPSS ver.13 Explore funkciójával a „Tukey’s biweight M-Estimator” segítségével kaptuk.

A CIM eljárásban a standard modellt, a Zmapqtl 6-ot használtuk. A QTL-ek szignifikanciájának küszöbértékét permutációs analízissel végeztük. Majd a törzseket a MIM (multiple interval mapping) QTL Cartographer 2.5-es verziójával analizáltuk.

3.15. Bioinformatika

A szignifikáns és feltételezhető QTL csúcsokat hordozó kromoszóma szegmensek közül a releváns QTL-eket a <http://informatics.jax.org> és a <http://omicspace.riken.jp> honlapok segítségével választottuk ki. A QTL csúcs tartományát az összes törzsben előforduló marker genotípus mintázatok vizsgálatával, a csúcs pozíciót (cM) tartalmazó összes donor szegmens meghatározásával és a durva becsléssel (a donor szegmensek minimum tartományát becsüli meg, mivel a szegmens-limitáló donor-típusú markerek pozícióját használtuk) határoztuk meg.

4. Eredmények

4.1. Az etanol dózisfüggő módon fokozza a humán vaszkuláris simaizomsejtek foszfát által kiváltott kalcifikációját

Mivel a tanulmányok kimutatták a foszfát kiemelkedő szerepét a humán vaszkuláris mineralizáció indukálásában, illetve szabályozásában, létrehoztunk egy *in vitro* modellt a humán vaszkuláris simaizomsejtek vaszkuláris kalcifikációjára, melynek során a tápfolyadékot növekvő koncentrációjú P_i -tal egészítettük ki, s ezt kalcifikációs médiumnak neveztük el. A kalcifikációs médium készítéséhez a DMEM-et, - mely 15% FBS-t, 60 U/mL penicillint, 60 μ g/mL streptomocint, 120 μ g/mL neomicint és 1 mM nátrium-piruvátot tartalmazott (GM; growth medium), 1-4 mmol/L P_i -tal egészítettük ki. A humán vaszkuláris sejteket 7 napig tartottuk fenn, majd etanol jelenlétében, vagy annak hiányában mértük az extracelluláris mátrix kalcium felhalmozódását.

Ahogy vártuk, a foszfát dózisfüggő módon indukálta a mineralizációt. Szignifikáns kalcium akkumulációt ≥ 3 mmol/L P_i értéknél figyeltünk meg. Fontos eredménynek tartjuk, hogy a humán vaszkuláris simaizomsejtek etanollal történő kezelése P_i jelenlétében elősegítette a kalcium felhalmozódását. A sejtek 60 mmol/L koncentrációjú etanollal (mely érték megfigyelhető az alkoholizmusban szenvedő egyéneknél) történő kezelése további jelentős mértékű kalcium akkumulációt eredményezett (50%). Feltételeztük, hogy az etanol önmagában hosszú ideig alkalmazva kiválthatja a humán vaszkuláris sejtek kalcifikációját P_i kezelés nélkül. A kísérletek azt mutatták, hogy az etanol 14 napig GM-ban történő kezelése nem befolyásolta a kalcifikációt.

Annak alátámasztására, hogy a humán vaszkuláris simaizomsejtek extracelluláris mátrixában következik be az etanol hatására létrejövő kalcium akkumuláció, etanol jelenlétében vagy hiányában Alizarin Red festést végeztünk. A vaszkuláris simaizomsejtek 7 napig történő kezelését követően jelentősen több granuláris depozitum jelent meg a sejt kultúra

extracelluláris mátrixában összehasonlítva az etanolmentes kalcifikációs médiummal. Ezzel ellentétben, a foszfát- és etanolmentes médiumban tenyésztett sejtekben ez idő alatt semmilyen kalciumfelhalmozódás nem volt kimutatható.

Ezt követően feltettük a kérdést, vajon specifikus sejtválaszról van-e szó, és az etanol dóziszfüggően növeli-e a foszfát által kiváltott mineralizációt. A simaizomsejtek növekvő koncentrációjú (20-80 mmol/L) etanollal 7 napig történő kezelése után mértük az extracelluláris mátrix kalcium tartalmát. A foszfát, 3 mmol/L-es koncentrációban indukálta a kalcifikációt, ezzel szemben ezen sejtek növekedési médiumban történő tenyésztése nem okozott kalcium felhalmozódást. Az etanol dózis függően tovább növelte a kalcifikáció mértékét, mely 60 mmol/L-es koncentrációnál volt a legkifejezettebb.

4.2. Az etanol fokozza a humán vaszkuláris simaizomsejtek alkalikus foszfatáz aktivitását

Felvetődött a kérdés, vajon az etanol mineralizációt fokozó hatása nem korlátozódik-e csupán a kalcium depozícióra, és a vaszkuláris simaizomsejtek oszteoblasztos transzformációjáért felelős gének felregulálódása bekövetkezik-e a stressz hatására.

Az alkalikus foszfatáz a korai oszteogenezis egyik fontos enzime, mely inorganikus foszfátot szabadít fel a mineralizációhoz, és az artériákban, arteriolákban történő megjelenése egyben a vaszkuláris kalcifikáció sajátossága, mely folyamat nagy hasonlóságokat mutat a csontmineralizációval. Ezért vizsgáltuk, hogy vajon az etanol növeli-e a vaszkuláris simaizomsejtek alkalikus foszfatáz aktivitását. Míg azokban a sejtekben, melyeket növekvő koncentrációjú P_i tartalmú médiával kezeltünk, maximálisan egy 1.61-szeres indukciót figyelhettünk meg az alkalikus foszfatáz aktivitásukban, addig a 60-80 mmol/L-es etanol koncentráció mellett pedig további 2.17-szeres és 2.12-szeres szignifikáns emelkedés volt fellelhető. Ezzel ellentétben az etanol önmagában nem befolyásolta a normál tápfolyadékban tartott vaszkuláris simaizomsejtek alkalikus foszfatáz enzim aktivitását.

4.3. Az etanol serkenti a humán simaizomsejtek kalciumkötő fehérjéjének, az oszteokalcinnak a szintézisét

Az oszteokalcin a csontmátrix fő nem-kollagénszerű fehérjéje, amely az extracelluláris mátrix kalciumkötésén keresztül szabályozza a mineralizáció folyamatát. A humán vaszkuláris kalcifikáció során kimutatták az oszteokalcin erekben történő felhalmozódását. Ezért a humán vaszkuláris simaizomsejtek etanollal történő 7 napos kezelését követően mértük a második csontspecifikus génnek, az oszteokalcinnak az expresszióját.

A normál tápfolyadékban tartott sejtek szolubilizált extracelluláris mátrixában az oszteokalcin nem volt mérhető mennyiségben jelen. Ezzel szemben a vaszkuláris simaizomsejtek magas foszfát tartalmú tápfolyadékban történő tenyésztése szignifikáns mértékű emelkedést idézett elő. A sejtek etanollal történő kezelése további oszteokalcin felhalmozódást eredményezett az extracelluláris mátrixban. Ahhoz, hogy megerősítsük, hogy az etanol elősegíti-e a vaszkuláris simaizomsejtek foszfát általi tranzícióját, az oszteokalcin kimutatására Western Blot analízist is végeztünk. Eredményeink azt mutatták, hogy az etanol tartalmú kalcifikációs médiumban tenyésztett sejtekben magasabb volt az oszteokalcin expressziója, mint az etanolt nem tartalmazó kalcifikációs médiumban tartott sejtekében. Ezzel szemben a normál tápfolyadékban tenyésztett humán vaszkuláris simaizomsejtekben etanol kezelést követően nem találtunk az oszteokalcin szintézisében változást.

4.4. Az etanol növeli a foszfát által indukált oszteoblaszt specifikus transzkripció faktorok, a Cbfa-1 mRNA szintjét

Az oszteoblasztos differenciáció esszenciális regulátora a core-binding factor alpha-1 (*Cbfa-1*), egy olyan transzkripció faktor, mely a mátrix génexpresszióját, és következésképpen a csont mineralizációt is szabályozza. Mivel ez a transzkripció faktor a felelős elsősorban a vaszkuláris simaizomsejtek magas foszfátszint által okozott oszteoblaszt irányú átalakulásáért, ezért vizsgáltuk, hogy az etanol befolyásolja-e a *Cbfa-1* expresszióját kalcifikációs médiumban tenyésztett human vaszkuláris simaizomsejtekben. Eredményeink szerint a vaszkuláris simaizomsejtek 24 órás magas foszfát tartalmú tápfolyadékban történő tenyésztése a *Cbfa-1* mRNS szintjében egy 1.62-szeres indukciót okozott a normál tápfolyadékban tenyésztett sejtekkel összevetve. A kalcifikációs médiumban 60 mmol/L, vagy ennél nagyobb etanol koncentrációt alkalmazva tovább emelkedett a *Cbfa-1* mRNS szintje, lehetséges magyarázattal szolgálva a fenotípus váltásra. Normál médiumban ez a hatás nem következett be.

4.5. Az etanol nem befolyásolta a humán vaszkuláris simaizomsejtek intracelluláris foszfát szintjét

A nátrium-dependens foszfát kotranszporter, a (Pit-1) elősegíti a foszfát bejutását a vaszkuláris simaizomsejtekbe szignált szolgáltatva a *Cbfa-1* felé. Mivel a kísérleti bizonyítékok azt sugallják, hogy a hiperfoszfátémia által kiváltott vaszkuláris kalcifikáció részben a Pit-1 funkcióján keresztül szabályozódik, ezért azt vizsgáltuk, hogy vajon az etanol befolyásolhatja-e a magas foszfáttartalmú médiában tartott vaszkuláris simaizomsejtek

intracelluláris foszfát szintjét. Ez egy lehetséges magyarázatot adhat arra a megfigyelésre, hogy az etanol miért segíti elő a simaizomsejtek oszteoblaszt irányú fenotípus váltását. 24 órás inkubációt követően mértük etanol hiányában, vagy jelenlétében a kalcifikációs médiumban tenyésztett simaizomsejtek foszfát felvételét. Az eredmények azt mutatták, hogy az etanol nem befolyásolta a magas foszfátkoncentrációjú tápfolyadékban tenyésztett vaszkuláris simaizomsejtek intracelluláris foszfát szintjét.

4.6. Az etanol hatása a humán vaszkuláris sejtek életképességére

Az utóbbi évek kutatásai szerint a vaszkuláris simaizomsejtek apoptózisa hozzájárulhat az érfalak kalcifikációjához, főként a krónikus vesebetegségben szenvedő betegekben fellépő ateroszklerózisban és a media mineralizációban. Az apoptotikus sejtek a mineralizáció egy csomópontjával szolgálhatnak megteremtve a hidroxipatit képződés fókuszpontjait. Ennélfogva MTT tesztet végeztünk az etanollal kezelt kalcifikációs médiumban tartott sejtek életképességének meghatározására. Kísérleteinkben a kalcifikációs médiumban tartott sejtek viabilitása nem mutatott csökkenést. Továbbá a 20-60 mmol/L etanolt tartalmazó kalcifikációs médiumban 7 napig tartott vaszkuláris simaizomsejtekben sem volt fellelhető szignifikáns viabilitásbeli különbség.

4.7. Az alkohol-dehidrogenáz-1 nem fejeződik ki magas szinten a humán vaszkuláris simaizomsejtekben

Az etanolt a hepatocitákban előforduló alkohol-dehidrogenáz enzim katabolizálja, mely acetaldehidet termel. Ha ez a vaszkuláris simaizomsejtekben is így történik, akkor az acetaldehid a mineralizáció létrejöttéért és az oszteoblasztos transzformációért felelős faktor lehet. Ezért megmértük ezen sejtek alkohol-dehidrogenáz-1 (ADH1) szintjét Western Blot analízis alkalmazásával. Míg a pozitív kontrollként alkalmazott humán hepatómából származó sejtvonalban (HepG2 sejtek) magas ADH1 protein expressziót találtunk, addig a humán vaszkuláris simaizomsejtekben és endotéliumban ADH1-t nem tudtunk jelentős szinten detektálni.

További kísérleteink során bizonyítottuk az alkohol ROS termelést fokozó hatását simaizomsejtek kalcifikációja során.

4.8. QTL térképezés

A QTL-eket *Eac1-6* (ethyl alcohol consumption 1-6) lókuszoknak neveztük el. A 43 B6.Cb₅₁₇ RQI törzs CIM módszerrel történő vizsgálata szignifikáns csúcsokat eredményezett

a 6-os kromoszómán 36.5 cM-nál ($p < 0.001$), 42.5 cM-nál ($p < 0.001$), 62.2 cM-nál ($p < 0.01$) és 73.5 cM-nál ($p < 0.001$), és a 12-es kromoszómán 51 cM-nál ($p < 0.01$). Szintén csúcsok jelentek meg a 1-es, 5-ös és a 15-ös kromoszómán, habár ezek a csúcsok nem érték el a szignifikancia küszöbértéket. A 15-ös kromoszómán lévő QTL-t a MIM modell vizsgálataiba is belevontuk.

A 35 RQI törzs B6.Ib_{5i7} csoportjában 2 QTL bizonyult szignifikánsnak LOD=2.0 (a 12-es kromoszómán: 21 cM-nál, a 19-es kromoszómán: 38 cM-nál). A CIM módszer számos más nem szignifikáns csúcsot eredményezett az 1, 3, 4, 12, 13 és 16-os kromoszómán LOD<2 értékkel. A 12-es kromoszómán lévő QTL-t a MIM modell vizsgálataiba is belevontuk. A QTL-ben a B6 allél fokozta az alkoholfogyasztást. A CIM számos olyan QTL-t eredményezett, ahol a donor allél összefüggésbe hozható a fokozó hatással, habár ezek közül egyik sem érte el a $p=0.05$ szintet, ahogy azt 1000 permutációval empirikus úton határoztuk meg. A QTL csúcshoz legközelebbi markereket, a donor allélt homozigóta állapotban hordozó törzsek számát és a szintén hordozó törzs donor genom kiterjedését (Q%), meghatároztuk.

A B6.Cb_{5i7} RQI törzsek MIM módszerrel történő további analízise a QTL Cartographer BIC-M0 relatív kritériumát használva egy 3 QTL-ből álló modellt eredményezett a 6-os, 12-es és 15-ös kromoszómán (genetic $R^2=0.47$). Az episztázist érintő vizsgálatok semmilyen szignifikáns additív-additív interakciót nem eredményeztek. A B6.Ib_{5i7} törzs csoport MIM módszerrel történő vizsgálata egy 3 QTL-es modellt eredményezett a 8-as, 12-es és 4-es kromoszómán (genetic $R^2=0.5$). Ahogy a B6.Cb_{5i7}-es törzs esetében, úgy a B6.Ib_{5i7}-es törzs esetében sem volt fellelhető az episztázis hatása. A MIM által azonosított QTL-ek tesztelést követően minden QTL szignifikánsnak adódott a kritériumok szerint.

A CIM módszerrel kapott eredmények érvényességét és a csúcsok sorrendjét a kvázikongénikus RQI törzsek mikroszatellita marker genotípus mintázatainak összehasonlítása alapján értékeltük ki. A 43 B6.Cb_{5i7} RQI törzsek közül az 1, 5, 6, 12 és 15-ös kromoszómák QTL-jeinek érvényességét vizsgáltuk. A nem szignifikáns 1-es kromoszómális QTL lókuszt (7.5 cM) kiiktattuk az értékelésből, mert a D1Mit167-es markerrel volt összefüggésben, melyet az 5-ös és a 14-es kromoszómára is térképezték. Ahogy a korábbi kísérleteink mutatták, az RQI törzsekben a D1Mit167-es markerek nem ko-szegregálnak az 1-es kromoszómán lévő markerekkel, az 5-ös kromoszóma proximális markereivel pedig igen (Saito et al., 2003). A nem-szignifikáns 5-ös kromoszóma QTL-je (59.01 cM) kis negatív-additív hatást (-1.29) mutatott a B6.Cb_{5i7} populációban, és szintén kizártuk a további

értékelésből. A 6, 15 és a 12-es kromoszómát pedig bioinformatikai analízisnek vetettük alá. A 35 B6.Ib_{5i7} RQI törzsben a 12-es és 19-es kromoszómán lévő QTL-eket vizsgáltuk csak tovább ($p < 0.2$). A 12-es kromoszómán lévő QTL-t kizártuk a további vizsgálatokból, mivel a csúcs marker donor allélje számos törzsben jelen volt ($N=4$) és ezeknek a törzseknek az átlag donor genom tartalma nagyon alacsony volt (1.8%), amely a kongenikus állapothoz közelített. A 19-es kromoszómán lévő QTL-t kizártuk a további vizsgálatból, mivel egyetlen donor allélt sem találtunk a csúcs pozíció közelében a törzsek egyikében sem, és a csúcsot határoló két marker között a távolság viszonylag nagy volt (7 cM).

4.9. A kongenikus törzs alkoholfogyasztása

A mikroszatellita alapú „marker-támogatott-szelekció” („marker-assisted selection”) módszerét és az alkohol-kedvelő B6By háttértörzsszel történő ismételt visszakeresztezéseket alkalmazva kifejlesztettünk egy új kongenikus törzset, a B6By.C6.132.54 (B6By.C6)-et. Ez a kongenikus törzs egy BALB/cJ (C) donor kromoszóma szegmentumot hordoz a 6-os kromoszómán a proximális D6Mit275 (25.5 cM, 51.1 Mb, a “UniSTS annotation of NCBI build 36” alapján) és a disztális D6Mit134 (57.5 cM, 125.3 Mb) markerekkel szegélyezve. Ez a kongenikus törzs a „két-edényes választás” („two-bottle free-choice alcohol preference”) tesztben szignifikánsan kevesebb 12% (v/v)-os alkoholt fogyasztott a B6By háttértörzsszel összehasonlítva, bizonyítva ezzel a donor szegmensben rejlő genetikai faktor(ok)nak a szignifikáns gyengítő hatását. Egy másik független kísérletben, ahol a „két-edényes választás” („two-bottle free-choice”) paradigmát az alkohol szakaszos hozzáféréssel kombináltuk, úgy találtuk, hogy a 12%-os alkoholfogyasztás szignifikánsan magasabb volt a B6By hímeknél (12.70 ± 1.03 , $n=13$), mint a B6By.C6 hímeknél [8.37 ± 0.96 (g/kg/day, mean \pm SE), $n=19$, négy 3-napos vizsgálat átlaga, $t_{30}=3.00$, $p=0.005$, two tailed].

Ahhoz, hogy teszteljük a hipotézist, hogy esetleg más, nem vizsgált donor kromoszóma szegmensek felelősek ezért a hatásért, egy 402 markert tartalmazó egér SNP (single-nucleotid polymorphism) gyűjteménnyel végeztünk genom vizsgálatot. Ennek során nem találtunk egyetlen donor szegmenst sem. Mivel a genom vizsgálat szomszédos háttér/recipiens markereket mutatott 75.9 Mb-nál (rs 3023093) és limitáló donor markereket 81.9 (rs 4226024) és 91.8 Mb-nál (rs 3712161), arra a következtettünk, hogy a szegmens méretének 9.9 és 46.4 Mb között kell lennie.

A 6-os kromoszómán lévő *Eac2* régió integrált genom- és transzkriptóm analízise a *Grm7* (metabotropic glutamate receptor subtype-7) gént azonosította az *Eac2* régió kvantitatív tulajdonságot (alkohol fogyasztást) meghatározó génjeként.

5. Megbeszélés

A lágszövetek patológiás körülmények között kialakuló, elsősorban az ereket és a szívbillentyűket érintő mineralizációja súlyos szövödményeket idéz elő. Az intima mineralizációja az ateroszklerózis előrehaladott stádiumában alakul ki, a komplikált léziók meghatározó sajátossága. A kórfolyamat az artériák lumenének szűkülését eredményezve akut, vagy krónikus iszkémiás keringészavarokhoz vezet. Az ateroszklerotikus plakk stabilitása és mineralizációja szoros kapcsolatban áll az ateromatózus léziók bevezésével. A keringészavar valamennyi szervet érintheti, azonban a koronária, a cerebrovaszkuláris és a perifériás artériák betegségei népegészségügyi jelentőséggel bírnak. A mechanikai folytonosság megszűnését a számos fokális lipid-felhalmozódás mellett megjelenő hidroxiapatit akkumuláció teszi kifejezetté, ezáltal jelentősen csökkentve és egyenetlenné téve az ér rugalmasságát, mely a plakk további sérülékenységét fokozhatja. Ezzel ellentétben a IVb típusú stabil ateroszklerotikus lézióban a kalcifikálódott plakk krónikus módon szűkíti be az artériák lumenét.

Media kalcifikáció során az artériafal középső simaizomsejt rétegeiben zajló diffúz mineralizációs folyamatok alakulnak ki. Míg az öregedéssel az idős emberekben gyakran megfigyelhető a media kalcifikációja, addig fiatal korban többek között a krónikus vesebetegség, cukorbetegség, magasvérnyomás betegség vezet korai érelváltozáshoz. A media mineralizációja koncentrikusan jelenik meg, nem terjed ki az artéria intima rétegére, és ennek következtében tipikus esetben az artéria lumenét nem érinti. Ez a mechanizmus az artéria rugalmatlanságának a fő okozója.

A kalcifilaxis ugyan részleteiben leírt, de a patomechanizmust tekintve kevésbé ismert, igen magas mortalitással (60-80%) jellemezhető, melynél a terápiás lehetőségeink rendkívül korlátozottak. A kórfolyamat az arteriolákat érinti, és a patofiziológia a simaizomsejt rétegek diffúz mineralizációját jelenti. Eddig úgy gondoltuk, hogy majdnem kizárólagosan a krónikus vesebetegségben szenvedő betegek rettegett szövödménye. A kiserek kalcifikációja egyértelműen kapcsolatba hozható a progrediáló szöveti iszkémiákkal, infarktusokkal, a súlyos fájdalommal, és majdnem kizárólagosan a másodlagos infekciók és szeptikus állapot okozta magas mortalitással. A mai napig nem teljesen világos, hogy mi jelenti az elsődleges kiváltó okot. Részben még mindig tartja magát az a nézet, amit eredetileg Selye János és

mts.ai írtak le a hatvanas években. Kétlépcsős folyamatnak tartották, ahol egy korai szenzitizációs szakasz (pl. foszfát, D vitamin, vagy parathormon) után egy ismeretlen szisztémás (pl. glükokortikoiddal) vagy egy helyi/lokális (pl. trauma) inzultus követ, amely egyben a kalcifikáció kezdetét jelenti.

Epidemiológiai vizsgálatok mutatnak rá arra, hogy az alkoholfogyasztás és a kardiovaszkuláris megbetegedés között kettős összefüggés van. Kevés kivételtől eltekintve számos országban végzett kutatások azt mutatják, hogy 20-40%-kal alacsonyabb volt a kardiovaszkuláris megbetegedések gyakorisága az alkoholtartalmú italokat fogyasztóknál az alkoholt nem fogyasztókkal összehasonlítva. De vajon milyen mértékű alkoholfogyasztás lehet hasznos a szervezet számára, és az ivási szokások mikéntje lényeges szempont-e a jótékony hatás kialakulásáért? A jelenleg elfogadott álláspont szerint általános populációban a kismértékű alkoholfogyasztás a kardiovaszkuláris megbetegedések és halálozás alacsonyabb kockázatával jár együtt, szemben azokkal az egyénnel, akik nem fogyasztanak alkoholt. Legfeljebb napi 2 pohár bor elfogyasztása negatív kockázati tényezőt jelent az aterómás megbetegedés, a miokardiális infarktusz és az iszkémiás stroke vonatkozásában. Ezzel ellentétben a tömény szeszesitalok nagymértékű, alkalmoszerű fogyasztása - mely napi 5 vagy annál több italt jelent - növeli a kardiovaszkuláris megbetegedések és halálozás kockázatát. Noha a korábbi megfigyelés - miszerint a kismértékű alkoholfogyasztás egy látszólagos védőhatást jelent a koszorúér elváltozások tekintetében bizonyítottan látszott, egy nemrég elvégzett tanulmányban semmilyen védőhatást nem találtak az alkoholfogyasztás és az érfalak kalcifikációja között. Ezzel szemben, bizonyítékot szolgáltatott arra vonatkozóan, hogy a nagymértékű alkoholfogyasztás, különösen a tömény szeszesitalok fogyasztása a koronária artériák nagyobb mértékű kalcifikációjával jár.

Egyre több esettanulmány lát napvilágot, amelyekben a kalcifilaxis megnövekedett kockázatát írták le alkoholfogyasztást követően azoknál az egyéneknél, akiknek fiziológiás szinten működött a veséjük, és a kalcium-foszfát anyagcseréjük is élettani volt. A kis- és közepes méretű erek súlyos kalcifikációjáról számoltak be alkoholos májbántalomban szenvedő betegekben, akiknél normál vesefunkciót észleltek, és egyéb anyagcserezavar sem volt fellelhető. A kalcifilaxist olyan alkoholos kardiomiopátiás betegekben is leírták, akiknek nem volt sem máj-, sem pedig vesebetegségük, és semmilyen eltérésük a kalcium-foszfát metabolizmusban.

Ezek a megfigyelések arra ösztönöztek minket, hogy megvizsgáljuk, vajon az etanol elősegíti-e a vaszkuláris simaizomsejtek *in vitro* mineralizációját és oszteoblaszt irányú tanszformációját. Mivel a foszfát szérumszintről már az elmúlt évtizedben leírták, hogy a

fiziológiás tartomány fölött a krónikus vesebetegségben szenvedőkben a vaszkuláris kalcifikáció legfontosabb rizikófaktora, továbbá a foszfát szint egészséges emberekben az élettani tartományon belül is korrelációt mutat a vaszkuláris kalcifikációval, ezért a mi modellünkben exogén foszfátot alkalmaztunk a mineralizáció indukciójához. A korábbi vizsgálatok azt bizonyítják, hogy a megemelkedett foszfát elősegíti a simaizomsejtek kalcifikációját és az *in vitro* oszteokondrogenikus fenotípusváltást is, valamint arra is rávilágítanak, hogy egy pontosan szabályozott sejtes folyamat áll a jelenség hátterében, ahol számos indukáló és gátló ágenssel lehet számolni. Mineralizációs modellünkben a vaszkuláris simaizomsejtek egy fenotípus váltáson mennek keresztül, oszteoblasztos markerek felregulálódása következik be, és az extracelluláris mátrixban hidroxipatit halmozódik fel. Ez magában foglalja a *Cbfa-1*-et, a kulcsfontosságú transzkripció faktor, amely kritikus jelentőségű az oszteoblasztos aktiválódásban, valamint a hozzá is tartozó transzkript fehérjét, mint az alkalikus foszfátáz (csont- és fogképződés döntő jelentőségű enzime), és az oszteokalcint (kalcium kötő fehérje, oszteoblaszt aktivitás specifikus jelzője). A *Cbfa-1* knockout egérben nem következnek be a csontmineralizációs folyamatok, amiért többek között a következményesen kialakuló alacsony alkalikus foszfátáz aktivitás és az oszteokalcin expresszió hiánya a felelős.

A kísérleteinkben kimutattuk, hogy az etanol expozíció a kalcifikációs médiumban tenyésztett humán vaszkuláris simaizomsejtek extracelluláris mátrixában dózisfüggő módon fokozódott a mineralizációs folyamat. A foszfát által indukált kalcifikációt a 60 mmol/L-es, vagy afelett lévő etanol koncentráció szignifikánsan tovább emelte. Ezek az etanol értékek megfigyelhetők az alkoholisták vérében. Mivel az alkalikus foszfátáz a mineralizációs folyamatok fontos enzime és az oszteokalcin az oszteoblasztos fenotípus jellemző nem-kollagén kalciumkötő fehérjéje, ezért mi is vizsgáltuk, hogy vajon az etanol növeli-e a vaszkuláris simaizomsejtek alkalikus foszfátáz aktivitását és az oszteokalcin szintézisét. Azt találtuk, hogy az etanol mind az alkalikus foszfátáz aktivitásában, mind pedig az oszteokalcin expressziójában szignifikáns emelkedést okozott. Továbbá kimutattuk, hogy az etanollal kezelt sejtekben, az oszteoblasztos transzformációban szereplő transzkripció faktor, a *Cbfa-1* expressziója szintén megemelkedett.

Az szintén ismert, hogy a hiperfoszfátémia által indukált oszteoblasztos differenciáció a nátrium-dependens foszfát ko-transzporterén, a Pit-1-en keresztül szabályozódik, mely elősegíti a foszfát vaszkuláris sejtekbe történő felvételét. Ezért a kísérleteinkben is megvizsgáltuk a sejtek foszfátfelvételét. Az eredményeink az mutatták, hogy az etanol hatása nem a foszfát felvételében történt változásoknak köszönhető.

Korábbi *in vitro* kísérletek azt mutatták, hogy a humán vaszkuláris simaizomsejtek apoptózisa hozzájárul az érfalak kalcifikációjához. Azt is leírták, hogy az előrehaladott léziók intima rétegében és a krónikus vesebetegek artériájának media rétegében is előfordul az apoptózis. Mostanában figyelték meg azt, hogy az alkohol a vaszkuláris simaizomsejtek apoptózisát idézi elő. Az apoptotikus simaizomsejtek a kalcifikáció kezdőpontjaként szolgálnak és aktívan koncentrálnak a kalciumot és a foszfátot a hidroxipatit kristályok kialakításához. A kísérleteinkben azonban 60 mmol/L-es etanol koncentráció értékig a sejtek nem mutattak semmilyen viabilitásbeli csökkenést, jelezvén azt, hogy nem az apoptózis okozta az etanol által elősegített mineralizációs folyamatot.

Az etanol katabolizmusa főként az alkohol-dehidrogenáz-1 enzimén keresztül acetaldehid termelésével a májban történik. Ha acetaldehid az alkohol-dehidrogenáz-1 enzim aktivitásával simaizomsejtekben is keletkezik, akkor ez az anyag a mineralizáció kiváltója lehet. Ennek tisztázására simaizomsejtekben Western Blot analízis segítségével mértük az alkohol-dehidrogenáz-1 enzim expresszióját. A humán vaszkuláris simaizomsejtekben az alkohol-dehidrogenáz-1 enzim nem volt kimutatható mennyiségben jelen, ami azt jelzi, hogy az acetaldehid nem járult hozzá az etanol által indukált mineralizációhoz. Az alkohol-dehidrogenáz-1 enzim nem volt mérhető a humán endotéliumban sem.

Az ezt követő kísérletsorozatban bizonyítottuk az alkohol ROS termelést fokozó hatását simaizomsejtek kalcifikációja során.

Giachelli és mts.i elegáns kísérletei a vaszkuláris simaizomsejtek oszteoblasztos transzformációjának reverzibilis voltát igazolták. Azt mutatták ki, hogy az osztokondrogenikus fenotípusú vaszkuláris sejtek simaizomsejtszerű tulajdonságokra tesznek újra szert és lecsökken bennük az oszteokondrogenikus gének expressziója az olyan környezetben, mely a vaszkuláris simaizomsejteknek kedvez. A *Runx2/Cbfa-1* vonatkozásban azt találták, hogy a simaizomsejtek újraprogramozásának egy meghatározó faktora. Megválaszolatlan kérdés, hogy vajon megfordítható-e a vaszkuláris simaizomsejtek etanol által fokozott mineralizációja.

Összegzésképpen az eredményeink azt mutatják, hogy a humán vaszkuláris simaizomsejtek etanol általi expozíciója elősegíti a foszfát indukálta mineralizációt és hozzájárul a sejtek oszteoblaszt irányú transzformációjához, a vaszkuláris kalcifikációs folyamatokhoz. A jelenség magyarázatot szolgáltat ahhoz a klinikai megfigyeléshez, hogy a rendszeres nagymértékű alkoholfogyasztás mellett nagyobb mértékű a vaszkuláris kalcifikáció prevalenciája. Megfigyelésünk szintén egy alternatív mechanizmust jelenthet arra vonatkozóan, hogy a rendszeres nagymértékű alkoholfogyasztókban miért fordulhat elő a

kalcifilaxis anélkül, hogy krónikus vesebetegségük lenne, vagy a kalcium-foszfát anyagcserében bármiféle kóros elváltozás észlelhető lenne. Ennek a kísérletsorozatnak klinikai jelentősége abban is megmutatkozik, hogy felveti annak lehetőségét, hogy krónikus vesebetegségben szenvedők rendszeres intenzív alkoholfogyasztása elősegítheti a vaszkuláris kalcifikáció kialakulását.

A B6.Cb_{5i7} törzsek marker haplotípus vizsgálata azt mutatta, hogy az *Eac1* és *Eac2* régió között lévő lehetséges minimális távolság a törzsek között azonos volt, 33.5-48.2 cM. Mivel limitált számú markert használtunk, és a tartományt a szegmens proximális és disztális végén lévő donor marker allélok helyzete alapján határoztuk meg, ezért a szegmens valódi mérete nem ismert. Az MGI adatbázisban a <http://www.informatics.jax.org> honlapon a releváns QTL-re vonatkozó keresés során („NCBI build 34”) az *Eila2*, *Rear1*, *Bits2* és *Taste5* lókuszokat azonosítottuk.

Egy korábbi alkohol preferenciára vonatkozó tanulmányban, mely a BcA Rekombináns Kongenikus törzseket használta Gill és Boyle szignifikáns korrelációt mutatott ki a D6Mit178 és az alkohol preferencia között egy olyan régió (26.35-38.5 cM) belül, ahol a B6 háttér A/J donor allélokat tartalmazott. Habár alkohol preferenciára vonatkozóan nem találtak 6-os kromoszómán lévő QTL-eket az AcB RC törzseknél, és a reciprok AXB/BXA RI törzseknél sem. Érdekességképpen, a centromer és a 33.5 cM közötti régió tartalmazza az *Npy* lókuszt (Neuropeptid Y, 26 cM) és az *Etlm3* lókuszt (Ethanol induced locomotion 3, 30 cM), amelyeket Gill és Boyl az általuk leírt 26.35-38.5 cM-os QTL szakaszon belül elhelyezkedő kandidátus géneknek és QTL-eknek vélték. Az RQI törzseken belül ezeknek a kandidátus géneknek a helye egy viszonylag nagy, nem-genotipizált intervallumra estek, mely a mi kandidátus régióknak a proximális donor allélja (33.5 cM) és a szomszédos proximális háttér allélja (25.5 cM) közé esett, ezért az ő szerepüket nem lehet figyelmen kívül hagyni.

A 33.5 és 48.2 cM között elhelyezkedő régió szintén gazdag kandidátus génekben. Bioinformatikai eszközöket használva, mint pl. a „Genome-Phenome Superbrain computational system” (GPS; <http://omicspace.riken.jp/gps/full.jsp>), az intervallumon belül elhelyezkedő géneket értékeltük. A szintetikus vomeronasal receptor gének potenciális kandidátusok, mivel a szaglás befolyásolhatja az alkohol preferenciát. Néhány más gén is befolyásolhatja a neurotranszmissziót, például ez a régió tartalmazza a *Grm7*-t, a metabotrop glutamate receptor type 7 gént. Mivel a glutamát funkcióból adódó különbségek tehetőek felelőssé a viselkedési zavarok patofiziológiájáért, -amely alátámaszthat bizonyos

tipusú függőséget-, a *Grm7*, további kísérletek egy ígéretes kandidátus génje lehet. Hogy teszteljük ezt a hipotézist, ennek a 33.5-48.2 cM közötti régiót hordozó a kvázi-kongenikus RQI törzsekből származtatott kongenikus törzseket hoztunk létre.

Az *Eac3* (chr. 6, 46-65.6 cM) tartományában további releváns QTL-ek helyezkednek el. Úgy tűnik, hogy a *Qui* egybeesik a 6-os kromoszóma disztális régióján elhelyezkedő, 2-es típusú ízérzékelő receptorral (*Tas2r*). A *Tas2r* lókuszt haplotípusai a kinin ízérzékenységgel változnak beltenyésztett egereknél, C57BL/6 egereknél kinin érzékenységet találtunk, míg a DBA/2J egerek nem voltak érzékenyek kininre nézve. A haplotípus variáció azt sugallja, hogy a BALB/cJ egér olyan *Tas2r* allélt hordozhat, mely a kinin inszenzitivitással hozható összefüggésbe. Habár a *Tas2r* haplotípus variációk alkoholfogyasztásra irányuló specifikus hatása még tisztázásra szorul. A *Taste8* és *Taste9* géneket rendre a 49.5 cM és 63 cM helyre térképezték, mely egérben egy általános poligénes alapot szolgáltat a kinin és a PROP elkerülésére. Az *Etohcta6* (Ethanol conditioned taste aversion 6, 63.6 cM) gént a *Taste9* gén közelébe térképezték. Egy körülbelül 1 cM nagyságú régió belül (63-64 cM) 3 keserű íz érzékeléssel kapcsolatos lókuszt találhatunk, *Tas2r* ízérzékelő receptor gén családokat, és egy *Etohcta* lókuszt (Ethanol conditioned taste aversion). Az ízérzékeléssel kapcsolatos QTL-ek és a 2-es típusú ízérzékelő receptor egy adott rövid kromoszóma szakaszon belüli halmozott előfordulása azt engedi feltételezni, hogy az *Eac3* hatással van a *Tas2r* család tagjainak variációjára, habár bizonyítékok szükségesek ennek igazolására. Mindezentúl egy komplex genotípus-alkohollal összefüggő magatartás koherens modelljének felállítása szükséges.

A 12-es kromoszómán elhelyezkedő *Eac5* lókuszt egy minimum 12 cM-os intervallumon helyezkedik el és a csúcsa 51.01 cM-nál van. Napjainkban Gill és Boyle a 12-es kromoszómán 1.0 cM-nál (tartomány: 1.0-5.0 cM) egy alkoholfogyasztással kapcsolatos QTL-t azonosított, mely nem fed át az *Eac5* régiójával. Érdekességképpen a *Marq4*, egy másik psychostimuláns (methamphetamine) *Lse* (Locomotor stimulating effect) génjét nemrégiben térképezték az egér 12-es kromoszómájának a 47 cM méretű helyére, mely egybeesik az *Eac5* régiójával.

Az *Eac6*, egy feltételezett QTL, mely permutációs analízissel vizsgálva nem érte el a szignifikancia küszöbértéket ($p < 0.05$), a B6.I törzs 12-es kromoszómáján a 21 cM-os (6-29 cM) helyre térképeztük. Nem valószínű, hogy az *Eac6* egybeesik a Gill és Boyle által a 12-es kromoszómára lokalizált alkoholfogyasztás QTL lókuszával. A felderítő magatartásban (*Rear2*), a cocaine indukálta aktivációban (*Cocia 1*), dopamin receptor kötődésben (*Drb5*), és alkohol függőségben (*Aaq2*) szerepet játszó pszichofiziológiai folyamat releváns lehet a

választásra-alapozott alkoholfogyasztással. Az *Stxbp6* (Syntaxin binding protein 6) szerepet játszik a szinaptikus vezikula mediálta folyamatban. Hasonlóan *Stxbp1* génhez, -az egér 2-es kromoszómáján lévő *-Etohp*d (Ethanol preference drinking) lókuszt-, az *Stxbp6* is egy kandidátus génje lehet az *Eac6*-nak. Érdekességképpen a MIM azonosított egy lókuszt az egér 4-es (64.2 cM) kromoszómáján, mely az *Stx12* (60cM) génhez közel helyezkedik el, potenciálisan hozzájárul az etanol preferenciához és 20 cM távolságra van az *Aq3q* géntől. Bár kísérletek bizonyítják, hogy ez a lókuszt egy gyenge kandidátus régió, mivel CIM módszerrel vizsgálva permutációs analízist követően nem adott szignifikáns eredményt.

A MIM eredmények alátámasztják a CIM eredményeket, mindazonáltal a legjobb modellnek tekinthető a 6-os és 12-es kromoszómán lévő QTL-ek alátámasztására. Habár mi azokat a QTL-eket vesszük figyelembe, melyek az egész genom szintjén adnak szignifikanciát, a 6-os és 12-es kromoszómán kívül elhelyezkedő QTL-ekről ebben a részben nem esik szó.

A B6.C és a B6.I, kvázi-kongenikus RQI törzsek esetében egész genom szintjén a composite és multiple interval mapping metodika az alkoholfogyasztás QTL-ei közül különböző csoportokat azonosított. Ez nem meglepő, hiszen a donor törzsek különböztek egymástól. A BALB/cJ és a CXBI törzsek biztosították a donor anyagot a B6.C és a B6.I törzsekhez. A BALB/cJ és a CXBI törzsek rokonsági kapcsolatban vannak, mivel a CXBI egy, a CXB rekombináns beltenyésztett törzsek egyike. A CXBI törzs átlagosan 50% BALB/cJ és 50% C57BL/6By allélt hordoz a genomjában. Egy másik differenciáló faktor az irányított szelekció, melyet a B6.C és a B6.I törzs létrehozásánál alkalmaztunk. A B6.C egértörzset 5 visszakeresztezés-keresztezés („backcross- intercross”) ciklussal és egy 13 generáción át tartó, az agy dopamin-rendszerével kapcsolatos magas szinten expresszálandó tulajdonság (tirozin hidroxiláz aktivitás a mezencefalonban) egymást követő szelekciójával hoztuk létre. A B6.I törzset hasonló gén transzferrel hoztuk létre, mint a B6.C törzset, annyi különbséggel, hogy itt ugyanannak a fenotípusnak a legalacsonyabb expressziós szintjére szelektáltuk az egyedeket. Így, az ellentétes irányba történő szelekciós nyomás a B6 háttérén lévő donor gének különböző csoportjainak kedvez. Az alkoholpreferencia és -fogyasztással kapcsolatos gének átvitele megtörténhet, egyrészt mivel a mezencefalonban lévő dopamin rendszernek kritikus szerepe van a függőség és az alkohol önadagolásában, másrészt mivel mindkét donor törzs alacsony alkohol preferenciát mutat a háttértörzssel szemben, és az

alkohollal összefüggő viselkedésben érintett „potyautas” („passanger”) géneket fixálhatjuk az RQI törzsekben.

Néhány tényező bizonyíthatja a korábbi, 5 kromoszómát érintő alkoholpreferencia QTL térképezési munkánkat. Először is a publikus adatbázis által szolgáltatott információ a legszignifikánsabb markerre (D1Mit167) nem volt megfelelő az analízis idejében, mivel ez a marker az 1-es kromoszóma proximális pozíciójához volt hozzárendelve (chr. 1: 6.5 cM) <http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/mouse/index>). A mostani eredményeink azt sugallják, hogy az RQI törzsek D1Mit167-es markere az 5-ös kromoszómán lévő markerekkel koszegregál, ami megegyezik a jelenlegi adatbázisban szereplő D1Mit167 pozíciójával. (The T32 Radiation Hybrid Maps Frameworked to TJL BSB/BSB Backcrosses; <http://www.jax.org/resources/documents/cmdata/rhmap/maps/>). Az NCBI m34 egér adatbázisa a D1Mit167-et jelenleg 3 különböző Ensemble helyre térképezi (v.37-Feb2006): 3207990-3208105 bázispárok közé az 5-ös kromoszómán, a 17728608-17728725 bázispárok közé a 14-es kromoszómán és a 7466556-7466667 bázispárok közé az 1-es kromoszómán; http://www.ensembl.org/Mus_musculus/markerview?marker=D1Mit173.1. A D1Mit167-es markerrel kapcsolatos kezdeti nem helytálló információ a publikus adatbázisban szintén magyarázattal szolgálhat arra vonatkozóan, hogy a mi kandidátus gén hipotézisünk, -melyben az Oprk1 az alkoholfogyasztás génje-, nem állja meg a helyét és melyet a jelenlegi adatok sem támasztanak alá. Másodsorban, hogy a további 14 kromoszóma genotipizálása új genotípus információt szolgáltatott számunkra és befolyással volt a térképezési statisztikákra is. Harmadrészt, egy sokkal fejlettebb géntérképezési eljárást alkalmaztunk az adatok vizsgálatára (CIM, MIM). Néhány törzsnél a megnövelt minta méret csak kismértékben változtatta meg a fenotípusos középértéket, ezért az nem tűnik valószínűnek, hogy a minta méret megváltoztatása hatással lenne a térképezési eredményekre.

A Genome-Phenome Superbrain computational system (<http://omicspace.riken.jp/>; 2006, Március) az MGI QTL adatbázisban történő alkohol- vagy etanollal kapcsolatos QTL-ekre irányuló keresése 40 találatot adott. Az alkohol preferencia és fogyasztás QTL-jei közül egyik sem volt kapcsolatban a 6-os kromoszómával, összesen csak egy idevonatkozó QTL (*Aaq2*) volt a 12-es kromoszómán. Noha az *Aaq2* nőstény specifikus, az *Eac5* és az *Eac6* lókuszt a hímekben figyeltük meg. Azt eredményeink és a mások adatai azt jelzik, hogy a gyakran használt C57BL/6J és a DBA/2J progenitor törzsekön kívül elvégzett térképezés az alkohol preferencia és fogyasztás új QTL-einek megtalálásához vezethet.

Összegésképpen az alkoholfogyasztás új QTL-jeit azonosítottuk a 6-os és 12-es kromoszómán genom-széles szignifikancia eredménnyel. Az *Eac1* és az *Eac6* lokusz rendre átfedést mutat a már korábban azonosított alkohol preferencia és alkohol elfogadás QTL-jeivel. A jövőbeli bizonyító kísérletek használhatják a majdnem kongenikus RQI törzsek adta előnyöket azáltal, hogy gyorsan megtalálják a kongenikus törzsek kandidátus szegmenseit, vagy pedig azáltal, hogy alacsony genetikai háttérzajjal rendelkező szegregáló populációkat hoznak létre. A QTG azonosítását a B6.C RQI törzsben a „The Mouse Genetic Variation Mapping (Vmap) Initiative” is segíti, melyben 15 egértörzs genomját szekvenálták meg, és mely az RQI törzsek mindkét progenitor törzsének DNS szekvencia információját tette elérhetővé.

A 6-os kromoszómán lévő *Eac2* régióját további genetikai, transzkriptóm és bioinformatikai analízisnek vetettük alá, hogy azonosítsuk a quantitative tulajdonságokat meghatározó géneket. Az eredményeink szerint a *Grm7* gén,- mely a III-as típusú metabotropic glutamate receptor 7 (mGluR7) fehérjét kódolja-, befolyásolja az alkoholfogyasztást: azok a genotípusú egerek, melyek agyában alacsony szinten expresszálódik a *Grm7* gén, az alkoholpreferencia teszt szerint több alkoholt fogyasztanak. A *Grm7*/mGluR7 molekuláris, sejtes és biológiai funkcióinak vizsgálata alátámasztják ezen megfigyeléseinket.

6. Összefoglalás

Az epidemiológiai vizsgálatok eredményeként a közmegegyezés jelenleg az, hogy a mértékletes alkoholfogyasztás kapcsolatba hozható a kardiovaszkuláris megbetegedések és halálozás alacsony kockázatával. Habár a mértékletes alkoholfogyasztásnak látszólagos protektív hatása van, például a koszorúér megbetegedés vonatkozásában, a nagymértékű alkoholfogyasztás, különösen a szeszesitalok fogyasztása kapcsolatba hozható az artériák nagyobb mértékű kalcifikációjával. Ezen kívül a kalcifilaxisról - amely köztudottan és majdnem kizárólagosan a krónikus vesebetegekben fejlődik ki - szintén leírták, hogy a fiziológiás vesefunkciókkal rendelkező alkoholistákban is kifejlődik. Amíg az elmúlt évtizedek kutatásai arra vonatkozóan, hogy az alkohol hogyan hathat kedvezően az ateroszklerózisra, a kardiovaszkuláris és cerebrovaszkuláris megbetegedésekre, igen hangsúlyozott az irodalomban, a kettős hatás a vaszkuláris kalcifikáció tekintetében nem teljesen ismert.

A vaszkuláris mineralizáció fontos kockázati tényezőt jelent a kardiovaszkuláris halálozásban. Jól ismert, hogy egy aktívan és pontosan szabályozott többlépcsős folyamatról

van szó, amelyben a hajtóerőt a patológiás folyamatok háttérben zajló sejtes transzdifferentiáció jelenti. Ebben a folyamatban a fő közreműködő sejt a simaizomsejt, és a meghatározó átmenet az oszteoblaszt irányban jelölhető meg. Ateroszklerózisban, media szklerózisban, és kalcifilaxisban az oszteoblasztokra jellemző tulajdonságok megjelenésével és a simaizomsejtekre jellemző tulajdonságok elvesztésével találkozunk. Ennek a folyamatnak az eredménye a mineralizáció, aminek letéteményese többek között az alkalikus foszfatáz, az oszteokalcin, és a *Cbfa-1* transzkripciós faktor.

Ebben a munkában bizonyítékot szolgáltatunk arra vonatkozóan, hogy az etanol magas koncentrációban hozzájárulhat a vaszkuláris simaizomsejtek oszteoblasztszerű sejtekké történő átalakulásához, és az extracelluláris mátrix kalcifikációjához. A mineralizáció együtt jár az emelkedett alkalikus foszfatáz aktivitással és az oszteokalcin szintézis szignifikáns emelkedésével. Ezen túlmenően az etanol megemeli a *Cbfa-1* expresszióját, mely transzkripciós faktor a humán simaizomsejtek oszteoblasztos transzformációjának szabályozásában játszik szerepet.

A glutamát receptorok szerepet játszanak a csontreszorpcióban és kandidátusi szerepet töltenek be a megváltozott alkoholfogyasztásban. Ebben az állatkísérletes munkában a genom vizsgálatot az eddigi 5 kromoszómáról (1, 2, 3, 9 és 15) az összes autoszómális kromoszómára kiterjesztettük, és megnöveltük az alkoholpreferencia tesztben szereplő b₅₁₇ RQI törzs mintaszámát. Az együttes adatokat összetett intervallum térképezéssel (CIM),-mely többszörösen kapcsolt QTL-ek esetében jobb megjelenítést tesz lehetővé-, és többszörös intervallum térképezéssel (MIM) analizáltuk. A kísérleteink során az alkoholfogyasztás új QTL-jeit azonosítottuk a 6-os és 12-es kromoszómán lévő teljes genomra kiterjedő szignifikancia értékkel. Az *Eac1* és az *Eac6* a már korábban azonosított alkoholfogyasztást meghatározó QTL-ekkel fed át. A metabotropic glutamate receptor type 7 (*Grm7*) gén egy ígéretes, mások által is igazolt kandidátus géneként szolgál, melynek megváltozott alkoholfogyasztásban lehet szerepe. A kvázi-kongenikus RQI törzsek a kongenikus törzsek kandidátus szegmenseinek gyors meghatározásával, vagy alacsony genetikai háttérzajjal rendelkező szegregáló populációk létrehozásával a jövőbeli bizonyító erejű kísérletek hasznára lehetnek.

7. Új eredmények

Az etanol fokozza a humán vaszkuláris simaizomsejtek inorganikus foszfát által kiváltott mineralizációját

Továbbá az etanol elősegíti a humán vaszkuláris simaizomsejtek inorganikus foszfát által triggerelt fenotípus változását és oszteoblaszt irányú tranzícióját.

Az etanol fokozza a humán vaszkuláris simaizomsejtek alkalikus foszfatáz aktivitását.

Az etanol növeli a humán vaszkuláris simaizomsejtek oszteokalcin szintézisét.

Az etanol emeli a humán vaszkuláris simaizomsejtek oszteoblaszt specifikus transzkripciós faktorának az expresszióját.

Az etanol nem befolyásolja a humán vaszkuláris simaizomsejtek intracelluláris foszfát szintjét.

Az alkohol-dehidrogenáz enzimet a humán vaszkuláris simaizomsejtek számottevő szinten nem expresszálják, és az acetaldehid a mineralizációnak és az oszteoblasztos fenotípus változásnak nem kulcsmolekulája.

Az alkoholfogyasztásban szerepet játszó új QTL-eket azonosítottunk a 6-os és 12-es kromoszómán genom-széles szignifikanciával. Az Eac1 és az Eac6-os lókuszt a már korábban azonosított alkoholpreferenciában szerepet játszó QTL-ekkel átfedést mutat.

A metabotropic glutamate receptor type 7 gén a megváltozott alkoholpreferenciában szerepet játszó ígéretes kandidátus géneként szolgálhat.

The work/publication is supported by the TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 and TÁMOP 4.2.2/A-11/1/KONV-2012-0045 project. The project is co-financed by the European Union and the European Social Fund.



8. Publikációs lista



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/285/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Oros Melinda

Neptun kód: N00W7Y

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Oros, M.**, Zavaczki, E., Vadász, C., Jeney, V., Tósaki, Á., Lekli, I., Balla, G., Nagy, L., Balla, J.:
Ethanol increases phosphate-mediated mineralization and osteoblastic transformation of
vascular smooth muscle cells.
J. Cell. Mol. Med. 16 (9), 2219-2226, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01533.x>
IF:4.753
2. Vadász, C., Saito, M., Gyetvai, B., **Oros, M.**, Szakáll, I., Kovács, K.M., Prasad, V.V.T.S., Morahan, G.,
Tóth, R.: Mapping of QTLs for oral alcohol self-administration in B6.C and B6.I quasi-congenic
RQI strains.
Neurochem. Res. 32 (7), 1099-1112, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-006-9234-4>
IF:1.811
3. Vadász, C., Saito, M., Gyetvai, B.M., **Oros, M.**, Szakáll, I., Kovács, K.M., Prasad, V.V.T.S., Tóth, R.:
Glutamate receptor metabotropic 7 is cis-regulated in the mouse brain and modulates alcohol
drinking?
Genomics. 90 (6), 690-702, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2007.08.006>
IF:3.613



További Közlemények

4. Gyetvai, B., Simonyi, Á., **Oros, M.**, Saito, M., Smiley, J., Vadász, C.: mGluR7 genetics and alcohol: Intersection yields clues for addiction.
Neurochem. Res. 36 (6), 1087-1100, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-011-0452-z>
IF:2.24
5. Zavaczki, E., Jeney, V., Agarwal, A., Zarjou, A., **Oros, M.**, Katkó, M., Varga, Z., Balla, G., Balla, J.: Hydrogen sulfide inhibits the calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells.
Kidney Int. 80 (7), 731-739, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2011.212>
IF:6.606
6. Szántó, A., Bálint, B.L., Nagy, Z., Barta, E., Dezső, B., Pap, A., Széles, L., Póliska, S., **Oros, M.**, Evans, R.M., Barak, Y., Schwabe, J., Nagy, L.: STAT6 Transcription Factor Is a Facilitator of the Nuclear Receptor PPAR γ -Regulated Gene Expression in Macrophages and Dendritic Cells.
Immunity. 3 (5), 699-712, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.009>
IF:24.221
7. Vadász, C., Smiley, J., Figarsky, K., Saito, M., Tóth, R., Gyetvai, B., **Oros, M.**, Kovács, K.K., Mohan, P., Wang, R.: Mesencephalic dopamine neuron number and tyrosine hydroxylase content: Genetic control and candidate genes.
Neuroscience. 149 (3), 561-572, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.06.049>
IF:3.352
8. Saito, M., Szakáll, I., Tóth, R., Kovács, K.M., **Oros, M.**, Prasad, V.V.T.S., Blumenberg, M., Vadász, C.: Mouse striatal transcriptome analysis: Effects of oral self-administration of alcohol.
Alcohol. 32 (3), 223-241, 2004.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.alcohol.2004.02.005>
IF:1.874



9. Saito, M., Ehringer, M.A., Tóth, R., Oros, M., Szakáll, I., Sikela, J.M., Vadász, C.: Variants of kappa-opioid receptor gene and mRNA in alcohol-preferring and alcohol-avoiding mice.
Alcohol. 29 (1), 39-49, 2003.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0741-8329\(02\)00322-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0741-8329(02)00322-1)
IF:1.585

Összesített impakt faktor: 50.055

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 10.177

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

Debrecen, 2013.08.27

