

OTKA zárójelentés 2004-2007

Humán vizsgálatok

2004.

Korábban összefüggést találtunk a monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) távoli szabályozó régiójában található polimorfizmusa és az asztma fokozott kockázata között. Ráadásul a –2518GG homozigóta asztmásoknak magasabb volt az eozinofil szintjük és súlyosabb az asztmájuk. Következően azt vizsgáltuk, hogy van-e különbség a szérumban MCP-1 szintben az asztmás és az egészséges gyerekek között, valamint a –2518 polimorfizmus befolyásolja-e a szérumban MCP-1 szintet? Eredményeink alapján az asztmásokban szignifikánsan alacsonyabb volt az MCP-1 szint, mint az egészségesekben. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy az asztmásokban a krónikus gyulladás következtében megemelkedett endogén kortikoszteroidok csökkentik (“leszabályozzák”) az MCP-1 termelést. Az asztmás csoporton belül az atópiásokban (IgE>100kU/l) szignifikánsan alacsonyabb volt az MCP-1 szint, mint a nem-atópiásokban, valamint a lányokban magasabb, mint a fiúkban. Az MCP-1 –2518 genotípus nem befolyásolta a szérumban MCP-1 szintet egyik csoportban sem. Mivel az emelkedett MCP-1 szint számos gyulladásos betegségben játszik meghatározó szerepet (pl.: SLE, atherosclerosis), az asztmások alacsony szérumban MCP-1 szintje befolyásolhatja az ezekre a betegségekre való hajlamot.

Feltételezések szerint bizonyos esetekben az asztma kialakulásában a Chlamydia pneumoniae (CP) fertőzésnek szerepe lehet. Ennek vizsgálatára asztmás, allergiás és egészséges gyerekeknél vizsgáltuk a fertőzöttséget. Mivel korábban leírták, hogy a mannose binding lektin (MBL) bizonyos polimorfizmusainak szerepe lehet a fertőzés után kialakuló betegségekben, ezeket a polimorfizmusokat is tanulmányoztuk ezekben a gyerekekben. Az asztmás és az egészséges gyerekeknél CP ellenes IgG, IgA és IgM segítségével vizsgáltuk, hogy a fertőzés a múltban játszódtott-e le, krónikus fertőzésről van-e szó, a fertőzés a vizsgálat időpontjában is fenn áll, vagy a gyermek eddig nem fertőződött CP-vel. CP fertőzés szempontjából nem találtunk szignifikáns különbséget az asztmás és a kontroll csoportok között. Az MBL-nek leírták 3 gyakori polimorfizmusát, melyek megzavarják a fehérje háromdimenziós aktív szerkezetének a kialakulását. Mivel ezek domináns negatív mutációk, hatásukra, az MBL szérumban aktivitása a heterozigóta hordozókban 10%-ra csökken, míg homozigótákban kimutathatatlan lesz.

Összehasonlítottuk a 3 polimorfizmus gyakoriságát az asztmás és az egészséges csoportban, és nem találtunk szignifikáns különbséget se az egyes genotípusok, se a mutáns/vad összehasonlítás vonatkozásában. Ezután a vizsgált gyermekeket a szerint csoportosítottuk, hogy hordozói-e az MBL polimorfizmusoknak és összehasonlítottuk az asztmás és a kontroll gyermekeket a CP fertőzöttségi állapotuk alapján. Az asztmások között szignifikánsan több olyan gyermeket találtunk, akik hordoztak legalább egy MBL mutációt és pozitívak voltak CP ellenes IgG-re, mint a kontroll csoportban. Az IgA és IgM-re pozitív gyermekek között nem találtunk ilyen összefüggést. Ez az eredmény azt jelzi, hogy a CP fertőzés hajlamosíthat asztmára, de csak abban az esetben, ha az illető hordozója legalább egy MBL defektív allélnak. Mivel az IgG pozitivitás egy múltban lejátszódtó MBL fertőzésre utal, valószínűleg a fertőzés után el kell telnie valamennyi időnek, hogy az asztma kialakuljon. Ezután a vizsgált gyermekeket fertőzöttségük szerint csoportosítottuk, és összehasonlítottuk az asztmás és a kontroll csoportokat az MBL státuszuk alapján. A genotípusok eloszlása szignifikánsan különbözött egymástól az asztmás és a kontroll csoport között akik pozitívak voltak CP ellenes IgG-re, IgA-ra, vagy

mindkettőre. A legnagyobb különbség a két csoport között akkor volt, ha azokat a gyerekeket vettük figyelembe, akik mind IgG-re, mind IgA-ra pozitívak voltak. A két antitest együttes előfordulása ismétlődő, krónikus CP fertőzésekre utal. Ezekben az esetekben az MBL mutációt hordozók aránya szignifikánsan magasabb volt az asztmás gyerekek között, mint a hasonló fertőzöttség állapotú kontroll gyerekek között. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy azoknak a krónikusan és ismétlődően CP-vel fertőzött gyerekeknek, akik hordozói valamelyik hibás MBL allélnak szignifikánsan nagyobb esélyük van arra, hogy asztmásak legyenek, mint a mutációt nem hordozóknak.

Továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy milyen összefüggés van a CP fertőzés és az allergia között. 141 asztmás, 62 allergiás és 125 egészséges gyermeket vontunk be a vizsgálatokba. A CP szintet ELISA-val mértük. Nem találtunk különbséget CP fertőzöttség alapján a három populációban, ami azt jelenti, hogy ezekben a gyerekekben a CP nem befolyásolja közvetlenül a betegségek kialakulását. Azonban az asztmás csoporton belül szignifikánsan több allergiás-asztmás beteg volt pozitív CP-specifikus IgA-ra és IgA+IgG-re, mint nem-allergiás asztmás (Odds ratio (OR) = 5.9(1.7-26.2); P = 0.01 az IgA-ra és OR = 5.2(1.6-25.8); P = 0.02 az IgA+IgG-re). Az étel és/vagy gyógyszer allergiás csoportban nem találtunk olyan beteget aki pozitív volt CP-specifikus IgA-ra. Mivel ez az ellenanyag a krónikus, vagy ismételt CP fertőzöttségre utal, ez az eredmény azt jelenti, hogy ezek a betegek valamilyen mechanizmussal védettek a krónikus (IgA pozitív) fertőzéssel szemben. Ezzel szemben az inhalatív allergiások 41,6%-a volt pozitív CP-specifikus IgA-ra.

2004-ben folytattuk az asztma biobank számára a minták gyűjtését. Ebben az évben 58 asztmás gyermektől kaptunk vért és részletes klinikai jellemzést. A vérből DNS-t vontunk ki.

2005

Kutatásainkban tovább vizsgáltuk, hogy az immunrendszer különböző polimorfizmusai befolyásolják-e a CP fertőzésre való hajlamot, illetve a fertőzöttekben az asztma kialakulását. Ebben az évben a TNF α , a RANTES és az MCP-1 gének szabályozó régióiban található polimorfizmusok hatását vizsgáltuk a fertőzésre, az asztmára és a fertőzés és az asztma közötti kapcsolatra. Eredményeink alapján a polimorfizmusok nem befolyásolják a CP fertőzésre való hajlamot. Azonban a TNF α -308A alléla jelentősen megnöveli annak az esélyét, hogy a CP fertőzött gyermekekben asztma alakuljon ki (Odds ratio (OR)=3.52(1.52-7.53); P=0.005). Az MCP-1 -2518G polimorfizmusa önmagában növeli az asztma kialakulásának az esélyét, azonban a fertőzés ezt az esélyt nem módosítja. A krónikus CP fertőzött RANTES -403A hordozóknak sokkal nagyobb esélyük van, hogy asztmásak legyenek, összehasonlítva őket a G/G (vad) homozigóta, hasonló fertőzöttségű gyermekekkel (OR=4.32(1.19-15.56)); P = 0.03), bár a Bonferroni korrekció után az eredmény nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak.

A *Mycoplasma pneumoniae* fertőzésről is kimutatták, hogy egyes emberekben hajlamosít asztmára. Ezt az összefüggést igazoltuk mi is beteganyagunkon. Jelenleg folyik a genetikai variációk hatásának vizsgálata erre a folyamatra.

Számos új genetikai polimorfizmus hatását vizsgáljuk az asztmára való hajlamra (pl.: a CC16, GSTM, GSTT és a SUMO génekben), és gén-gén kölcsönhatásokat keresünk az új és a régebben meghatározott variációk között.

Tovább folytatjuk az asztma Biobank fejlesztését. Rendszeresen kapunk asztmás gyerekek orvosától véreket, melyekből DNS-t izolálunk.

2006.

A *Mycoplasma pneumoniae* (MP) szerepét vizsgáltuk asztmában. Az asztmás és az egészséges gyerekeknél MP ellenes IgG, IgA és IgM segítségével vizsgáltuk, hogy a fertőzés a múltban játszódtott-e le, krónikus fertőzésről van-e szó, a fertőzés a vizsgálat időpontjában is fenn áll, vagy a gyermek eddig nem fertőződött MP-vel. A vizsgálatba 254 asztmás és 260 egészséges gyermeket vontunk be.

Az asztmás gyerekek között szignifikánsan magasabb volt a krónikus MP fertőzöttek aránya (31.1% az asztmás gyermekekben és 18.1% az egészséges kontrollokban; $P=0.0009$), ami arra utal, hogy egyes gyerekeknél összefüggés lehet az MP fertőzés és az asztma kialakulása között.

Ezután olyan géneket vizsgáltunk ($TNF\alpha$, RANTES, MCP-1, CCR5, mannóz binding leptin (MBL) amelyek mind az asztmában, mind az MP fertőzésre adott válaszban fontos szerepet játszanak. Azt tanulmányoztuk, hogy a génekben található, már korábban igazoltan funkcionális polimorfizmusok befolyásolják-e a fertőzöttekben az asztmára való hajlamot.

A vizsgálatoknál a CCR5 Δ 32-re kaptuk a legérdekesebb eredményeket. A CCR5 Δ 32 allélfrekvenciája szignifikánsan magasabb volt a krónikus MP fertőzöttek között, mint a nem fertőzöttekben, illetve nem-krónikus fertőzöttekben (18.0% a krónikus fertőzöttekben és 8.6% a többiekben; $P=0.006$). Ezzel szemben a krónikusan fertőzött asztmásokban alacsonyabb volt a CCR5 Δ 32 allélfrekvenciája, mint a krónikusan fertőzött kontrollokban (3.9% vs. 12.7%).

Logisztikus regresszióval elemezve az eredményeket (korra, nemre, allergiás státuszra igazítva) azt kaptuk, hogy a CCR5 Δ 32 0.4 (0.2-0.7) odds ratioval ($P=0.003$) asszociál asztmával a krónikusan fertőzöttekben, összehasonlítva őket a krónikusan fertőzött kontrollokkal. Ez azt jelenti, hogy a mutációt hordozó krónikus MP fertőzött gyerekeknek 2,5x kisebb esélyük lesz arra, hogy bennük asztma alakuljon ki, mint a mutációt nem hordozó fertőzötteknek. Összefoglalva a polimorfizmust hordozók hajlamosabbak a MP fertőzésre, viszont a fertőzött hordozóknak kisebb esélyük van az asztma kialakulására, mint a fertőzött nem-hordozóknak.

A DNS polimorfizmusok egyenkénti vizsgálatáról áttértünk a nagyáteresztő képességű SNP vizsgálatra a Beckman SNP Genotyping rendszerrel, amely 384 mintán egyszerre akár egyenként 48 SNP-t képes vizsgálni. Ezzel a készülékkel olyan genomterületeket fogunk vizsgálni, amelyeket korábban a genomszűrések megjelöltek, mint hajlamosító régiót, de még az asszociációért felelős genetikai variációkat nem tudták kimutatni.

2007

A nagyáteresztő képességű Beckman SNP Genotyping rendszerrel rövid idő alatt nagy mennyiségű SNP-t vizsgálni. Azonban ez azzal a hátránnyal jár, hogy megnő az egyes típusú statisztikai hiba esélye, azaz a vizsgálatokkal arányosan nő annak a valószínűsége, hogy hamis pozitív eredményeket kapunk. Ezt úgy lehet ellensúlyozni, ha több mintát mérünk le.

Az év elején több orvossal is felvettük a kapcsolatot, és az év végére az asztma biobankunkban közel 500 beteg DNS-e és adatai szerepeltek. Emellett, ezekhez a vizsgálatokhoz felhasználtuk 404 allergiás, de nem asztmás, illetve több mint 500 egészséges kontroll DNS-ét, illetve adatait.

Az így közel 1000 tagra bővült asztma-allergia-kontroll DNS biobankunkon az eddigiekben kettő, az asztma kialakulásában vélhetően szerepet játszó genomterület SNP-szűrését végeztük el. Először a 11q13-es genomrégióban 48 SNP genotípusát határoztuk meg. Ezen a területen helyezkedik el az asztma kialakulásában erősen vitatott Fc ϵ R-I génje, az MS4 membrán-fehérje család génjei és a tüdőben kiemelkedően expresszáldó CC16 génje.

Az SNP-szet összeállításánál a vizsgálandó SNP-k biológiai relevanciáját a következő paraméterek alapján rangsoroltuk:

- Nem-szinonim SNP-k
- A régióban található olyan SNP-k, amelyeknek az irodalomban már valami funkciót tulajdonítottak (vagy már mások vizsgálták)
- SNP-k a gének promóter, illetve 3' UTR régióiban
- SNP-k az evolúciósan konzervált régiókban
- SNP-k a régióban található RNS, illetve miRNS –ekben.
- Haplotípus blokkokat jellemző tag SNP-k.

A biológiai funkcionalitáson túl a méréseknél a SNPstream rendszer által szabott mérés technikai igényeket is figyelembe kellett vennünk, ami jelentősen korlátozta és formálta a vizsgálni kívánt SNP-k halmazát. Ezen technikai paraméterek mérésére a web-alapú adatbázisokat és szolgáltatásokat felhasználva egy informatikus diplomamunkással létrehoztunk egy labor-specifikus adatbányászó és adatintegráló szoftvert, ami a továbbiakban is könnyíti az SNP válogatás ezen részét. Az első körben 48 SNP-t mértünk le 280 asztmás és 300 kontroll gyermekben. 3 SNP-vel, 2 génben kaptunk szignifikáns összefüggést. Mivel az ilyen típusú vizsgálatokban nagyon könnyen lehet hamis pozitív eredményeket kapni, és ehhez kapcsolódóan nehéz más populáción reprodukálni az eredményeket, mi egy 2 lépcsős stratégiát dolgoztunk ki. A második lépésben egy újabb asztmás mintahalmazon néztük meg, hogy a korábban kapott asszociációk itt is igazak-e. Ezután az asszociáló SNP-k és gének környezetében a bővített mintahalmazon további 19 SNP bevonásával a géneknek a részletesebb lefedését végeztük el, egyrészt - megerősítés céljából - a haplotípusblokkok további (feltételezhető) tagjainak vizsgálatával, másrészt a gének eddig nem vizsgált, ám funkcionálisan jelentősnek ítélt SNP-inek genotipizálásával. Mivel a korábbi genomszűrések a 11q13-as genomterületet mind asztmával, mind atópiával összefüggésbe hozták, továbbá az asztmás betegek túlnyomó része (80%-a) egyben allergiás is, elhatároztuk, hogy plusz mérésekkel, illetve statisztikai elemzésekkel megpróbáljuk megállapítani, hogy az itt kapott asszociációk az asztmára, vagy az atópiára/allergiára vonatkoznak. Ezért a régiót reprezentáló SNP-k genotipizálását allergiás mintákon is elvégeztük. Az eredmények az elemzése még folyamatban van. Ezekben a vizsgálatokban a 11q13-as genom régióban összesen 32 gént vizsgáltunk. Az SNP-k közül 16 esett exonba, ebből 7 volt non-szinonim, 9 szinonim, 5 UTR-be, 3 promóter régióba, 26 intronba, és 16 intragenikus régióba. Hozzá kell tenni azonban, hogy mivel a vizsgált SNP-k nagy része egyben tag SNP is, a HapMap project eredményei alapján a mérésekkel lefedett SNP-k száma több mint 400 ($r^2 \geq 0.8$).

Az SNP genotipizálás eredményeit, a rendelkezésünkre álló klinikai jellemzők figyelembevételével, egyrészt hagyományos statisztikai módszerekkel saját magunk dolgozzuk fel, másrészt Bayes-hálós elemzéssel hozzánk kapcsolódó informatikusok elemezték. Az analízis során egyértelműen szignifikánsnak mutató eredmények rávilágítottak néhány gén feltételezhető szerepére az asztmatikus tünetegyüttes kialakulásában. Az így nyert eredmények az előzetes feltételezéseinket megerősítették, a publikálás folyamatban van, a szóban forgó gének további, genetikai (szekvenálás egyéb, magyar populációban előforduló polimorfizmusok felderítésére) és funkcionális vizsgálata a kutatócsoport közeli tervei között szerepel.

A SNPstream rendszeren végzett genotipizálásokat allél-diszkriminációs vizsgálatokkal is megerősítettük és szükségszerűen kiegészítettük.

Továbbiakban tervezzük más genom régiók szűrését is.

Állatkísérletek

Az első időszakban egy, az előzetes eredményeink alapján kiválasztott célgén, a monocita kemoattraktáns faktor-1 (MCP-1) gátlását szerettük volna elvégezni poszttranszkripcionálisan, in-vivo siRNS alapú RNS interferencia technikával. Az siRNS alapú gyógyszerek esetleges jövőbeli alkalmazhatósága a modern molekuláris medicina egyik nyitott kérdése. Az MCP-1 általunk korábban vizsgált egyik promotor polimorfizmusa összefüggést mutatott az asztmára való hajlammal, asztmában játszott fontos szerepét számos vizsgálat igazolta, szintje asztmában emelkedett. Az in-vivo kísérletek előtt szükség volt egy in-vitro modellre is, mely segítségével kiválasztottuk az MCP-1 mRNS-t legnagyobb mértékben gátolni képes génspecifikus siRNS szekvenciáját egy gyárilag a génre specifikus szekvenciákat tartalmazó siRNS készletből. Modellként tüdő adenokarcinómális eredetű tüdő epitelsejt morfológiájú LA-4 sejtvonalat használtunk. Mivel az in-vivo bejuttatás célpontja a tüdő, megpróbáltuk a tüdő epitelsejtekhez lehető legközelebb álló sejtvonalat használni az in-vitro kísérletekhez. A géncsendesítés mértékét, tehát az MCP-1 mRNS szintjét Real-Time PCR technikával határoztuk meg. Asztma modellként balb/c genetikai háttérű, ovalbumin indukált asztmás egereket használtunk. Kontroll vizsgálatokban fluoreszcensen jelölt nem génspecifikus siRNS molekulákat jutattunk intratracheális instillációval az állatokba, majd ellenőriztük tüdő szövettani metszeteken a bejutás hatékonyságát. Az intratracheális bejuttatás után a jelölt siRNS kimutatható volt az állatok tüdejének epitel rétegében, de az eloszlása nem volt egyenletes. Az általunk alkalmazott dózis emelése megfelelő számú kísérleti állatokon, megfelelő számú kontrollcsoportok mellett a kísérletek költségét drasztikusan megemelte. Az eredeti tervben a 4 évre 12 millió Ft-ot kértünk, ezzel szemben mindössze évente 1,2 millió Ft-ot kaptunk, amiből ezt a projectet nem tudtuk finanszírozni. Tervezzük, hogy új pénzforrás után nézünk, amelyből fedezni tudjuk ezeket a kísérleteket.

A vizsgálatok második felét a microarray alapú nagyfelbontású génexpressziós mérések alkották. Ezekben a vizsgálatokban szintén ovalbumin indukált asztmás egérmodelleket használtunk. A vizsgálatok célja az asztmás egerek tüdejében lejátszódó génexpressziós változások nyomon követése volt. Az asztmásított egerek tüdejéből származó mRNS génexpressziós profilját hasonlítottuk össze a kontroll, ovalbuminnal nem allergizált állatok tüdejének génexpressziós mintázatával. A méréseket Agilent kétszínű microarray technikával végeztük. Az adatok normalizálása, megfelelően szigorú statisztikai szűrése után kiválasztottuk a szignifikánsan minimum kétszeres, vagy annál nagyobb mértékben változást mutató géneket, majd ezeken pathway analízist végeztünk, és kiválasztottunk számos gént további vizsgálatokhoz. A kiválasztott gének expressziós változását a microarray mellett Real-Time PCR technikával, valamint fehérjeszintű vizsgálatokkal is validáltuk. Jelenleg a kiválasztott génekben meglévő SNP-k monitorozása folyik nagyszámú asztmás, valamint kontroll betegekből származó DNS-en.