

**AZ 5Q31 KROMOSZÓMA LOCUS IBD5
RÉGIÓJÁNAK SZEREPE COLITIS ULCEROSA
ÉS CROHN-BETEGSÉG KIALAKULÁSÁBAN
MAGYAR POPULÁCIÓS MINTÁKBAN**

PhD értekezés tézisei

Dr. Lakner Lilla

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Genetikai Intézet**

Témavezető: Dr. Melegh Béla

2010.

Pécs

Bevezetés

A colitis ulcerosa és a Crohn-betegség a bélrendszer idiopathiás krónikus gyulladással megbetegedése. Míg colitis ulcerosa esetén a gyulladás kizárólag a vastagbelet érinti, Crohn-betegségben a szájtól az anusig a tápcsatorna bármely részére kiterjedhet. Crohn-betegség kialakulásakor leggyakoribb a vékony- és vastagbél együttes érintettsége (40-55%). Az esetek 30-40%-ában csak a vékonybél, míg 15-25%-ban csak a vastagbél érintett. A felső gasztrointesztinális lokalizáció viszonylag ritka.

Mind a colitis ulcerosa, mind a Crohn-betegség multifaktoriális kórképek, melyek kifejlődésében fontos szerepet tulajdonítunk a környezeti tényezőknek, immunológiai és genetikai faktoroknak egyaránt.

A családvizsgálatok azt mutatják, hogy a családi anamnezisben szereplő gyulladással megbetegedések az egyik legkifejezettebb rizikófaktor a betegség kialakulása szempontjából. A Crohn-betegség elsőfokú rokonaiban ugyanezen betegség kialakulása 2,2-16,2%-ban, IBD kialakulása 5,2-22,5%-ban, míg colitis ulcerosa esetén ugyanezen betegség 5,7-15,5%-ban, IBD kialakulása 6,6-15,8%-ban várható.

A gyulladással megbetegedések előidézésében a genetikai tényezők szerepe nagyon fontos, azonban egyik kórkép sem vezethető vissza egyetlen genetikai variánsra. A teljes genomot felölelő vizsgálat („genome wide screening”) és a „linkage map” technika elterjedése az IBD-vel összefüggésbe hozható genom részletek vizsgálatában különösen informatív módszerek bizonyultak.

Az 5q31 kromoszóma IBD5 régiójának szerepét az IBD kialakulásában számos szerző tanulmányozta. Az IBD5 régióban helyezkednek el a karnitin és más organikus kationok kétirányú transzportjára felelős, az organikus kation transzporter (OCTN) 1 és 2 fehérjéket kódoló gének (SLC22A4 és SLC22A5). Az SLC22A4 variáns allél az organikus kation transzportfunkció fokozódásával jár együtt, míg az SLC22A5 allél esetén a gén promoterének hő-sokk fehérjék által kiváltott aktivációja változik meg.

Peltekova és munkatársai az 5q31 régióban írták le a TC haplotípust, melyet az SLC22A4 gén C1672T (rs1050152) és az SLC22A5 gén G-207C (rs2631367) polimorfizmusa határoz meg. A munkacsoport igazolta, hogy ezen haplotípus Crohn-betegség kialakulására hajlamosít. Silverberg és munkatársai egy nagyobb populációt vizsgálva az 5q31 régió egyéb funkcionális variánsainak szerepét tanulmányozták. Genetikai összefüggést találtak az IBD és az IGR2096a_1 (rs12521868), valamint az IGR2198a_1 (rs11739135) locusok között.

A vizsgálat célkitűzései

Munkánk célja az IBD5 régió szerepének vizsgálata colitis ulcerosa és Crohn-betegség esetén magyarországi populációban. Az IGR2096a_1 (rs12521868), IGR2198a_1 (rs11739135), IGR2230a_1 (rs17622208) genetikai variánsok, valamint az SLC22A4 (rs1050152), SLC22A5 (rs2631367) genetikai variánsok IBD-re hajlamosító szerepének tanulmányozását tűztük ki célul.

Arra kerestünk választ, hogy vajon a magyar népességben az OCTN1, OCTN2 genetikai variáns, illetve a Peltekova és munkatársai által leírt TC haplotípus-e a meghatározó az idiopathiás gyulladós bélbetegség kialakulásában vagy nagyobb szerepe van a Silverberg és munkatársai által vizsgált egyéb minor alléleknek. Ennek vizsgálata céljából az IGR2096a_1, az IGR2198a_1, valamint az IGR2230a_1 genetikai variánsokat választottuk ki és vizsgáltuk.

Betegek és módszerek

Vizsgálatunkat magyarországi colitis ulcerosás és Crohn-beteg populáción végeztük, mely gyakorlatilag az egész ország lakosságát reprezentálja. A minták gyűjtésének színhelyei Békéscsaba, Budapest, Miskolc, Pécs, Szombathely, Zalaegerszeg voltak. Genetikai adatbankunk az országos genetikai adatbank részét képezi.

Az IGR2096a_1, IGR2198a_1, SLC22A4, SLC22A5 vizsgálatához 217 Crohn-beteg (101 férfi, 116 nő, átlagéletkor $39,5 \pm 1,0$ év), valamint 252 colitis ulcerosás beteg (110 férfi, 142 nő, átlagéletkor: $46,7 \pm 1,0$ év), míg az IGR2230a_1 vizsgálatához 200 Crohn-beteg (97 férfi, 103 nő, átlagéletkor $39,4 \pm 1,1$ év), valamint 246 colitis ulcerosás beteg (108 férfi, 138 nő, átlagéletkor $44,0 \pm 1,1$ év) mintáját dolgoztuk fel. A Crohn-betegek és colitis ulcerosások típusos klinikai tünetekkel rendelkeztek, a diagnózis minden esetben a klinikai kép, endoscopos és szövettani vizsgálat alapján történt.

Kontrollként 290 klinikailag egészséges egyén (159 férfi, 131 nő, átlagéletkor $40,0 \pm 0,8$ év), az IGR2230a_1 vizsgálata esetén 187 egyén (106 férfi, 81 nő, átlagéletkor $37,7 \pm 0,8$ év) szolgált. A vizsgálat alanyai minden esetben írásban beleegyeztek a genetikai vizsgálatba. A vizsgálat etikai bizottsági engedély birtokában (ETT TUKEB) és az 1964-es Helsinkii deklaráció alapelveinek megfelelően történt.

A betegbevonás helyszínén a megelőzőleg szövettani mintavétellel egybekötött colonoscopia során igazolt colitis ulcerosás, illetve ileo-colonoscopia és vékonybél röntgen vizsgálattal igazolt Crohn-betegtől vérvétel történt EDTA-t tartalmazó csőbe.

A DNS izolálást EDTA-val alvadásgátolt vérmintákból végeztük kisozásos módszerrel. Az egyes variánsok analízisének kiindulópontja a polimeráz láncreakció (PCR) útján végzett

DNS amplifikáció volt, amelyet az IGR2096a_1 rs12521868, IGR2198a_1 rs11739135 és SLC22A5 rs2631367 mutációk esetén RFLP módszer követett, míg az SLC22A4 rs1050152 variáns meghatározását direkt szekvenálással végeztük ABI 3100 automata szekvenáló készüléken.

PCR reakciók során a következő, általunk tervezett specifikus primer párokat alkalmaztuk:

IGR2096a_1 rs12521868 variáns esetén a forward primer:

5'-CAAGATTTCTGCCATAGCCTCCT-3',

a reverse primer:

5'-GGAGGGTGGTGTAGCCAGAGTAG-3';

IGR2198a_1 rs11739135 variáns esetén a forward primer:

5'-AGACACTGGGACATCATCTGTCTG-3',

a reverse primer:

5'-GGGCAATTCTATGAGGACATTTAGA-3';

SLC22A5 gén rs2631367 variánsa esetén a forward primer:

5'-GCCGCTCTGCCTGCCAGC-3',

a reverse primer:

5'-GGTCGCTATCAGGAACACGGAGGA-3';

SLC22A4 gén rs1050152 variánsa esetén a forward primer:

5'-AGAGAGTCCTCCTATCTGATTG-3',

a reverse primer:

5'-TCCTAGCTATTCTTCCATGC-3';

IGR2230a_1 rs1762208 esetén a forward primer:

5'-CAGAAGAATGCCCTTGATGTG-3',

a reverse primer:

5'-TCAGAAGCTGTCCATCCCAC-3'.

A DNS amplifikáció során a következő termoparamétereket alkalmaztuk: elődenaturáció 95°C-on 2 perc, 35 ismétlődő ciklus, melynek lépései: denaturáció 95°C-on 30 mp, primerkötődés 58°C-on 45 mp (SLC22A4 rs1050152 esetén 54°C-on 30 mp), polimerizáció 72°C-on 45 mp, majd a ciklusok után végső lánchosszabbítás 72°C-on 5 perc.

Az IGR2096a_1 rs12521868, IGR2198a_1 rs11739135 és SLC22A5 rs2631367, IGR2230a_1 rs1762208 mutációk esetén a felsokszorozott DNS-szakaszok emésztése a következő allél-specifikus restrikciós endonukleázokkal történt: *TruII* (IGR2096a_1), *HinIII* (IGR2198a_1) és *HpaII* (SLC22A5), *Ddel* (IGR2230a_1). Minden amplifikátum tartalmazott

egy obligát hasítóhelyet is, mely az emésztés hatékonyságának ellenőrzésére szolgált. Az IGR2096a_1 normál genotípus (GG) esetén a 269 bp méretű PCR-terméket az endonukleáz két fragmentre, egy 81 és egy 188 bp hosszú szakaszra hasította. A homozigóta genotípus (TT) jelenlétekor 32, 81 és 156 bp hosszúságú szakaszok keletkeztek, míg heterozigóta egyed esetén valamennyi fragment detektálható volt. Az IGR2198a_1 polimorfizmus vizsgálata során a restriktív endonukleáz a 280 bp nagyságú PCR-terméket 38, 60 és 182 bp-os szakaszokra vágta normál genotípus (GG) esetén. Homozigóta genotípussal (CC) bíró betegekben a hasítás 60 és 202 bp méretű DNS darabokat eredményezett. Heterozigóta genotípus esetén mindegyik fragment látható volt. Az SLC22A5 normál genotípus (GG) jelenlétében az emésztés során 31 bp, 42 bp és 313 bp hosszú fragmentek keletkeztek. Heterozigóta egyedekben 31 bp, 42 bp, 313 bp és 355 bp méretű DNS-szakaszokat detektáltunk, míg homozigótákban csak a 31 és 355 bp nagyságú hasítási termékeket azonosítottuk. Az IGR 2230a_1 polimorfizmus vizsgálata során G allél esetén 122, 128 és 188 bp hosszúságú szakaszok keletkeztek, míg A allél esetén 128 és 310 bp-os fragmentumokat mértünk.

A hasítási termékek elkülönítése gélelektroforézissel, etídium-bromidos festéssel és UV megvilágítással történt.

A betegség és a vizsgált genetikai variánsok között fennálló összefüggések feltárására χ^2 -tesztet és regressziós analízist alkalmaztunk SPSS 11.5 programcsalád felhasználásával.

A genetikai kapcsoltság vizsgálatához Haploview 4.1 programot használtunk.

Eredmények

Munkacsoportunk vizsgálta az IBD5 régióban elhelyezkedő OCTN1 és OCTN2 kation transzporterek, valamint a Peltekova és munkatársai által hajlamosító tényezőként leírt TC haplotípus szerepét Crohn-betegség, valamint colitis ulcerosa kialakulásában. Emellett felmerült az IBD5 régióban elhelyezkedő további variánsok hajlamosító szerepe, melyek közül vizsgáltuk az IGR2198a_1, IGR2096a_1, valamint az IGR2230a_1 szerepét.

Az IGR2096a_1 T allél frekvenciája (47,2%), valamint az IGR2198a_1 C allél frekvenciája (45,9%) Crohn-betegség esetén szignifikánsan magasabb volt a kontrollokéhoz (38,2%, 37,7%) képest. Ugyancsak gyakoribb volt e két allél colitis ulcerosa (41,8%, 42,0%) esetén, szignifikáns különbséget kimutatni azonban nem tudtunk. Az IGR2230a_1 A allél frekvenciája mind Crohn-betegség (48,5%), mind colitis ulcerosa (47,1%) esetén magasabbnak bizonyult a kontroll populációhoz (44,6%) képest, szignifikáns eltérés azonban nem volt.

Az SLCA22A4 T allél (Crohn-betegségben 45,4%, colitis ulcerosában 45,4%), valamint az SLCA22A5 C allél gyakoriságát (Crohn-betegségben 49,7%, colitis ulcerosában 47,4%) vizsgálva egyik esetben sem találtunk szignifikáns eltérést a kontrollokéhoz (39,3%, 46,0%) képest.

A vizsgált variánsok közötti páronkénti linkage disequilibrium értékeket vizsgálva a legerősebb korrelációt az SLC22A5 (rs2631367) és IGR2230a_1 (rs17622208) között észleltük ($r^2 > 0,8$).

Vizsgálataink alapján nem találtunk kapcsolatot az OCTN1, valamint az OCTN2 genetikai variáns viszonylatában sem a colitis ulcerosával, sem a Crohn-betegséggel. Az IBD5 régióban elhelyezkedő minor variánsok vizsgálatakor szignifikáns összefüggést észleltünk a Crohn-betegség és az IGR2096a_1, az IGR2198a_1 genetikai variáns között. A colitis ulcerosa kapcsán szignifikáns eltérés nem volt. Az IGR2230a_1 genetikai variáns esetén szignifikáns összefüggést kimutatni sem a colitis ulcerosa, sem a Crohn-betegség esetén nem tudtunk. Eredményeink Noble és munkatársainak azon felvetésével hozhatók összefüggésbe, mely szerint elsősorban ezen minor alléleknek van szerepük a Crohn-betegség kialakulásában szemben a Peltekova és munkatársai által tanulmányozott TC haplotípussal.

A vizsgált variánsok között megfigyelt linkage disequilibrium értékek meglehetősen magasak, mindenképpen szoros kapcsoltságra utalnak a gének variánsai között. Az IBD5 lókuszt vizsgáló polimorfizmusai közül az SLC22A5 rs2631367 és az IGR2230a_1 rs17622208 mutatta a legszorosabb kapcsoltságot, ami összhangban van azzal, hogy ezen mutációk között van a legkisebb távolság az 5. kromoszómán. Ez felveti a kérdést, hogy mennyire különálló a vizsgált variánsok szerepe egymástól, illetve, hogy a jövőben nem célszerű-e a magas LD értékű mutációk közül csupán az egyiket kiválasztani a vizsgálathoz.

Következtetések

1. Az 5q31 régióban elhelyezkedő IGR2096a_1 T variáns, melyet Magyarországon először vizsgáltunk, hajlamosító tényező lehet Crohn-betegség kialakulásában, Silverberg, Noble és Latiano eredményeihez hasonlóan.
2. Nem találtunk összefüggést az IGR2096a_1 T variáns, valamint a colitis ulcerosa között, eredményünk megegyezik a Noble és munkatársai által vizsgált skót, valamint Latiano és munkatársai által tanulmányozott olasz populációkban találtakkal.
3. Ugyancsak elsőként vizsgáltuk Magyarországon az IGR2198a_1 C variánst, mely Crohn-betegség kialakulásában hajlamosító tényezőnek bizonyult, megerősítve a korábbi nemzetközi eredményeket.
4. Az IGR2198a_1 a magyar populációban, a skót populációhoz hasonlóan, colitis ulcerosa kialakulására nem hajlamosít.
5. Az IGR2230a_1 A variáns, melyet Magyarországon szintén elsőként vizsgáltunk, a nemzetközi irodalommal ellentétben Crohn-betegségben nem bizonyult hajlamosító tényezőnek.
6. Noble és munkatársaihoz hasonlóan nem tudtunk összefüggést kimutatni az IGR2230a_1 A variáns és a colitis ulcerosa kialakulása között.
7. Kapcsoltságot találtunk az SLC22A5 (rs2631367) és IGR2230a_1 (rs17622208) variánsok között ($r^2 > 0,8$).

Közlemények

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Lakner L.**, Csöngői V., Sarlós P., Járomi L., Sáfrány E., Varga M., Orosz P., Magyarai L., Bene J., Miheller P., Tulassay Zs., Melegh B.: IGR2096a_1 T and IGR2198a_1 C alleles on IBD5 locus of chromosome 5q31 region confer risk for Crohn's disease in Hungarian patients. *Int. J. Colorectal Dis.*, 2009; 24:503-507. **Impakt faktor: 1,767**
2. Talián G., **Lakner L.**, Bene J., Komlósi K., Horváth K., Gasztonyi B., Miheller P., Figler M., Mózsik Gy., Tulassay Zs., Melegh B.: Plasma carnitine ester profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis patients with different IGR2230a_1 genotypes. *Int. J. Immunogenet.*, 2009; 36(6):329-335. **Impakt faktor: 1,160**
3. **Lakner L.**, Csöngői V., Magyarai L., Varga M., Sarlós P., Orosz P., Bári Zs., Takács I., Járomi L., Sáfrány E., Sipeky Cs., Bene J., Tulassay Zs., Döbrönte Z., Melegh B.: Az 5q31 IBD5 régióban található IGR és SLC22A4/SLC22A5 variánsok lehetséges szerepe gyulladássos bélbetegség kialakulásában. *Orv. Hetil.*, 2009; 150:1373-1378.
4. Magyarai L., Bene J., Komlósi K., Talián G., Faragó B., Csöngői V., Járomi L., Sáfrány E., Sipeky Cs., **Lakner L.**, Varga M., Gasztonyi B., Melegh B.: Prevalence of SLC22A4 1672T and SCLC22A5-207C combination defined TC haplotype in Hungarian ulcerative colitis patients. *Pathol. Oncol. Res.*, 2007; 13:53-56. **Impakt faktor: 1,272**

7.2. Egyéb közlemények

1. Csöngői V., Járomi L., Sáfrány E., Sipeky Cs., Magyarai L., Faragó B., Bene J., Polgár N., **Lakner L.**, Sarlós P., Varga M., Melegh B.: Interaction of major IBD susceptibility alleles in Crohn's disease patients. *World J. Gastroenterol.*, 2010;16(2):176-183.

Impakt faktor: 2,081

2. Járomi L., Csöngői V., Polgár N., Szolnoki Z., Maász A., Horvatovich K., Faragó B., Sipeky Cs., Sáfrány E., Magyarai L., Kisfali P., Mohás M., Janicsek I., **Lakner L.**, Melegh B.: Functional variants of glucokinase regulatory protein and Apolipoprotein A5 genes in ischemic stroke. *J. Mol. Neurosci.*, 2009; [Epub ahead of print]

Impakt faktor: 2,061

3. **Lakner L.**, Döbrönte Z.: A 24 órás pH-monitorozás és a nyelőcső-manometria szerepe felső gastrointestinalis panaszokkal jelentkező betegek kivizsgálásában. *Orv. Hetil.*, 2009; 150(43):1978-1982.
4. Sipeky Cs., **Lakner L.**, Szabó M., Takács I, Tamási V., Polgár N., Falus A., Melegh B.: Interethnic differences of CYP2C9 alleles in healthy Hungarian and Roma population samples. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2009; 43(3):239-242. **Impakt faktor: 2,749**
5. Sipeky Cs., Csöngéi V., Járomi L., Sáfrány E., Polgár N., **Lakner L.**, Szabó M., Takács I., Melegh B.: Vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKRC1) haplotypes in average Hungarian and in Roma population samples. *Pharmacogenomics*, 2009; 10:1025-1032.
Impakt faktor: 3,551
6. Magyar L., Faragó B., Bene J., Horvatovich K., **Lakner L.**, Varga M., Figler M., Gasztonyi B., Mózsik Gy., Melegh B.: No association of the cytotoxic T-lymphocyte associated gene CTLA4+49A/G polymorphisms with Crohn's disease and ulcerative colitis in Hungarian population samples. *World J. Gastroenterol.*, 2007; 13:2205-2208.
7. Döbrönte Z., **Lakner L.**, Sarang K.: Posztinfekciós irritábilis bélszindróma. *Orv. Hetil.*, 2006; 147:2077-2080.
8. Sarang K., **Lakner L.**, Döbrönte Z., Soroncz M., Kovács L.G.: A szérum-ascites albumingradiens szerepe az ascites differenciáldiagnosztikájában. *MOTESZ Magazin*, 2004; (Suppl.3-4):5-7.
9. Czakó L., Takács T., Hegyi P., Prónai L., Tulassay Zs., **Lakner L.**, Döbrönte Z., Boda K., Lonovics J.: Quality of life assessment after pancreatic enzyme replacement therapy in chronic pancreatitis. *Can. J. Gastroenterol.*, 2003; 17:597-603.
Impakt faktor: 1,265
10. Czakó L., Takács T., Lonovics J., **Lakner L.**, Döbrönte Z., Prónai L., Tulassay Zs.: Az életminőség vizsgálata a krónikus pancreatitis enzimszubsztitúciós kezelése során. *Orv. Hetil.*, 2002; 143:1521-1527.
11. **Lakner L.**, Jáger R., Toldy E., Sarang K., Varga L., Kovács L.G., Döbrönte Z.: A *Helicobacter pylori* infectio seroepidemiológiai vizsgálata Vas megyében. *Magyar Belorv. Arch.*, 1999; 52:467-470.

12. Toldy E., **Lakner L.**, Döbrönte Z., Kovács L.G.: Helicobacter pylori antitest kimutatása két módszer összehasonlítása kapcsán. Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina, 1998; 25:112-113.
13. Döbrönte Z., **Lakner L.**: Comparison of late complications after endoscopic sphincterotomy in patients with gallbladder in situ. In: 22nd Congress of the International Society of Internal Medicine, (Ed.: V. Varró, R. de Chatel) Monduzzi Editore, Bologna, 1994; pp: 151-154.

Összesített impakt faktor: 15,906

(ebből az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények: 4,199)

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Melegh Béla Professzor Úrnak, hogy a Pécsi Tudományegyetem Genetikai Intézetének csapatához kapcsolódva ezen munkát elvégezhettem. Köszönöm az intézet összes dolgozójának, közöttük is kiemelkedően közvetlen munkatársaimnak, Csöngéi Veronika, Magyar Lili és Sáfrány Enikő kollégáimnak, hogy munkámban támogattak.

Köszönöm gastroenterológus mesteremnek, Dr. Döbrönte Zoltán Professzor Úrnak, hogy szakmámban a számomra szükséges útmutatást megadta nekem. Köszönöm a Vas Megyei Markusovszky Kórház Endoscopy Laboratóriumában dolgozó asszisztensnőknek, Mersich Ibolya vezető asszisztensnek, valamint Takács Beatrix endoscopy szakasszisztensnek, hogy a mintagyűjtésben segítségemre voltak.

Köszönöm az ország számos kórházában és klinikáján dolgozó kollégáknak: Dr. Varga Márta Főorvosnőnek a Réthy Pál Megyei Kórházból, Békéscsabáról, Dr. Miheller Pál adjunktusnak a Semmelweis Orvostudományi Egyetem II. Sz. Belgyógyászati Klinikájáról, Dr. Gasztonyi Beáta Főorvosnőnek a Zala Megyei Kórház Belgyógyászati Osztályáról, Dr. Orosz Péter Főorvos Úrnak a Borsod-Abaúj-Zemplén Megyei Kórház Belgyógyászati Osztályáról, Dr. Sarlós Patrícia doktornőnek a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar III. Sz. Belgyógyászati Klinikájáról, hogy a minták gyűjtésében segítségemre voltak.

Köszönetemet fejezem ki mindazon kollégáimnak a Vas Megyei Markusovszky Kórházban, valamint szerte az ország különböző egészségügyi intézményeiben, akikhez szakmai problémáimmal bármikor segítségért fordulhattam.

Köszönöm családomnak a megértő türelmet, odafigyelést, pótolhatatlan segítséget, mely nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.