

# **Az idiopathiás scoliosis molekuláris biológiai vizsgálata**

**Czibula Ágnes**

Ph.D. értekezés tézisei

Témavezető: Dr. Raskó István

MTA Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézet

*Biológiai Ph.D. Iskola, SZTE TTIK*

**Szeged, 2010**

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik a munkámban és a dolgozatom elkészítésében segítettek.

Először is hálásan köszönöm Dr. Raskó Istvánnak, hogy lehetővé tette a kutatómunkám végezését a csoportjában, köszönöm a tudományos irányítást és az anyagi támogatás biztosítását.

Nagyon köszönöm a Humán Molekuláris Munkacsoport minden volt és jelenlegi tagjának a jó munkahelyi légkört, a segítőkészséget és azt a támogatást, amit a hosszú évek alatt nyújtottak. Külön köszönöm Dr. Mórocz Mónikának, Szécsényi Anitának, Dr. Álmos Péternek, Dragon Annamáriának és Grózer Zsuzsannának, hogy a dolgozat megírásához szakmai segítséget nyújtottak. Nem tudok elég hálás lenni Lehőcz Istvánnénak és Radóné Dudás Máriának az asszisztensi munkájukért és barátságukért.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Endreffy Emókének és Dr. Illés Tamásnak a munkához szükséges mintákért; Dr. Zvara Ágnesnek a microarray kísérletekben nyújtott baráti segítségért és végül, de nem utolsó sorban Dr. Monostori Évának az irántam való türelméért és a dolgozat megírásához szükséges baráti támogatásért.

Köszönöm szüleimnek, férjemnek és gyerekeimnek, hogy a munkámmal járó nehézségeket elviselték, a dolgozat megírását türelemmel fogadták és mindenben támogattak.

## BEVEZETÉS

Napjainkban az orvostudomány egyik kihívása a társadalom nagy részét érintő betegségek etiológiai kutatása. Ezek közé tartoznak például a szív-és érrendszeri megbetegedések, a II. típusú cukorbetegség, az elhízás és az egyes pszichiátriai betegségek. Komplex betegségeknek is nevezzük őket, jellemző rájuk a nem mendeli törvényszerűségeket követő multifaktoriális öröklődésment: több gén hibás működése a környezeti hatásokkal kölcsönhatásban alakítja ki manifesztációjukat. A genetikai háttérük vizsgálatának lehetősége a Humán Genom Programmal kezdődött módszertani újításoknak köszönhető. A beteg és az egészséges populáció polimorfizmusainak összehasonlítása az asszociációs vizsgálatokban a betegség kialakulásához hozzájáruló gének hajlamosító alléljeinek azonosítását teszi lehetővé a megfelelő statisztikai eljárások használatával.

Az általunk vizsgált, a felnőttkor elején valamely ismert ok nélkül kialakuló gerincferdülés (AIS), amely a gerincoszlop strukturális, oldalirányú elhajlása, szintén a komplex betegségekhez tartozik; genetikai háttéréről a kiterjedt kutatások ellenére nem tudunk sokat. Az AIS klinikai kórképe változatos, eltérő lehet a kialakulás ideje, a görbület progressziójának mértéke, sebessége és nagysága. Az esetek döntő többségében a gerincferdülés kezdete a serdülőkorra tehető, ezért valószínűsítik, hogy az AIS pathomechanizmusában a növekedéssel kapcsolatos hormonális, metabolikus és biomechanikai változások szerepet játszhatnak. Az elmúlt 40 év alatt számos területen keresték a gerincdeformitás kialakulásának okát, vizsgálták: a csont- és a kötőszövet, valamint a harántcsíkkolt izmok strukturális eltéréseit; a betegséggel együtt járó neurológiai rendellenességeket; a hormonháztartás egyensúlyát; a genetikai tényezőket. A feltárt rendellenességek alapján mára már közel 20 elmélet létezik, amely az AIS kialakulására próbál magyarázatot adni, de egyetlen elmélet sem tudta a megfigyelt eltérések mindegyikét beilleszteni az AIS kórfejlődésébe, ami azt

sugallja, hogy a gerincferdülés, mint a legtöbb komplex betegség pathomechanizmusa összetett. Az etiológiai kutatások kezdetén kevés figyelem irányult a genetikai háttér felé, mivel a betegség többnyire szórványosan lépett fel, és gyakran a családon belül halmozódó esetek sem mutattak egyértelmű öröklődést. Az AIS-t ma már genetikai betegségnek tekintik és a legtöbbször által elfogadott modell szerint a betegség kialakulása két szakaszra osztható, egy iniciációs és egy progressziós fázisra. A feltételezések szerint más-más gének hibái felelősek az AIS-re való hajlamosításért és a gerincferdülés súlyosbodásáért. Annak ellenére, hogy számos, az AIS-ben tapasztalt eltérésért esetleg felelősnek tekinthető gént már megvizsgáltak, eddig nem tudtak azonosítani az AIS-re hajlamosító géneket. A legújabb kutatási eredmények alapján egy amerikai cég kifejlesztett olyan genetikai tesztet, amely alkalmas annak az eldöntésére, hogy mennyi a kockázata a görbület további súlyosbodásának.

## **CÉLKITŰZÉSEK**

Célul tűztük ki, hogy molekuláris szintű vizsgálatokban, két megközelítéssel az AIS-re jellemző további eltéréseket tárjunk fel és az eltérések hátterében álló genetikai tényezőket vizsgáljuk.

**A.1** A gerincoszlop stabilitásáért felelős paravertebrális izmok génexpressziós mintázatát CHIP microarray módszerrel kívántuk megvizsgálni a következő két aspektusból:

- I. Egészséges és scoliotikus paravertebrális izmok génkifejeződési mintázatának összehasonlításával**
- II. Scoliotikus izmokban a görbület konvex és konkáv oldali génkifejeződésének összehasonlításával.**

A további vizsgálatokhoz az alábbi szempontok alapján választottuk ki a jelölt géneket, melyek:

1. Bioinformatikai módszerekkel meghatározott, a háttér eloszlástól eltérő génontológiai kategóriába esnek
2. Közös, az AIS szempontjából érdekes biológiai, metabolikus folyamatban vesznek részt
3. Az AIS vonatkozásában elvégzett kapcsoltsági analízisek által jelölt kromoszómaszakaszra lokalizálódnak
4. Az általuk termelt fehérje a funkciója alapján beilleszthető az AIS etiológiájába

**A.2** Valós idejű polimeráz láncreakció (QRT-PCR) felhasználásával kívántuk ellenőrizni, hogy valóban fennáll-e a megfigyelt génkifejeződésbeli különbség.

**B.1** Az A. pont szerint kiválasztott gén/gének egy pontos nukleotid-polimorfizmusának (SNP) asszociációs analízisét eset-kontroll tanulmányban terveztük vizsgálni.

**B.2** A genotipizálás eredményeit különböző, a gének közötti interakciók kimutatására alkalmas statisztikai módszerekkel szándékoztuk kiértékelni. A fenti adatok statisztikai analízise lehetőséget ad annak meghatározására, hogy a gén/gének adott allélja a gerincferdülés kialakulásához vagy súlyosbodásához köthető-e.

## **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### Kísérletbe bevont személyek adatai és mintái

Az AIS-es betegek mintáit a PTE ÁOK Ortopédiai Klinikájáról kaptuk, ahol az ortopédiai vizsgálat és a gerincrontgen készült. Az AIS diagnózisát bizonyított genetikai szindróma, metabolikus, neurológiai-, kollagén- vagy izombetegség hiányában állapították meg. A DNS és az RNS mintákat a korrekciós műtét során nyert bilaterális musculus latissimus dorsi

izombiopsziából preparáltuk. A betegeket minden esetben tájékoztattuk a kísérletbe történő bevonásukról és a beleegyezésükkel történtek a mintavételek.

A kontroll személyek mintái egyrészt az SZTE Gyerekgyógyászati Klinikájáról származnak, másrészt az SZBK Genetika Intézet dolgozóitól. DNS mintákat perifériás vérből kinyert fehérvérsejtekből, szájnyalvákahártya kenetből és hajszálak végén lévő hajhagymákból készítettük. A kontroll személyek sem egymással, sem az AIS betegekkel nem állnak rokonságban.

### Alkalmazott módszerek

1. DNS és RNS minták készítése különböző forrásokból
2. A minták minőségi ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel
3. Az RNS minták reverz transzkripciója után fluoreszcensen jelölt próbák készítése a cDNS-ből
4. Microarray hibridizáció
5. Microarray adatainak statisztikai kiértékelése
6. Microarray adatainak gén annotációs feldolgozása
7. Kvantitatív valós idejű reverz polimeráz láncreakció (QRT-PCR)
8. Polimeráz láncreakciót követő restrikciós fragment hosszpolimorfizmus detektálása (PCR-RFLP)
9. A genotipizálás adatainak statisztikai kiértékelése

## **EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK**

### **A.1.**

A transzkriptoma szintű eltérések detektálására 95, korrekciós műtéten átesett személy paravertebrális izombiopszájából teljes RNS preparátumot készítettünk. Az SZBK Funkcionális Genomika munkacsoportjával közösen két **microarray analízist végeztünk** el. Az elsőben AIS-es és egészséges, trauma miatt operált személyekből származó mintákban, a másodikban pedig

a gerincferdülésben szenvedő személyek gerincoszlopának két oldaláról (konvex és konkáv oldal) vett mintákban hasonlítottunk össze a génkifejeződés mintázatát. A két microarray analízis eredményeként **egy 187, illetve egy 63 tagból álló génlistát kaptunk**, amelyekben a gének expressziós mintázatában különbséget találtunk. A génlista tagjait négy szempont alapján elemeztük annak eldöntésére, melyek azok a gének, amelyek számításba jöhetnek a további vizsgálatokban.

1. Először a biológiai folyamatokat jelölő génontológiai (GO) kategóriákhoz rendeltük a génlista tagjait és olyan kategóriákat kerestünk, amelyekben a vizsgált gének a humán genom átlagos GO eloszlásához képest magasabb arányban vannak jelen és szerepük lehet az AIS kialakításában. A gerincferdüléssel betegek gerincoszlopának konvex és konkáv oldalán génkifejeződésbeli különbséget mutató gének két GO kategóriában, **a lipid anyagcserében (GO:0006629) és a morfogenezisben (GO:0007275) nagyobb arányban jelentek meg**, ezekbe a kategóriákba a 63 génből összesen 18-at tudtunk besorolni.
2. A génlisták tagjainak közös biológiai, metabolikus útvonalban való részvétele és együttes génexpressziós változásuk jelzi az adott folyamat fontosságát. Ilyen jellegű vizsgálatokban több gén is génkifejeződésbeli változást mutatott az **adipociták jelátviteli mechanizmusában (KEGG\_Pathway: hsa04920)**, ami a lipid anyagcsere érintettségét az AIS-ben alátámasztja.
3. Meghatároztuk a génlistáinkon lévő gének kromoszóma lokalizációját és kiválogattuk azokat a géneket, amelyek olyan kromoszóma szakaszra esnek, amit családokon kapcsoltsági analízissel a szakirodalom az AIS-hez kötöttek tekint. **Nyolc megfelelő kromoszómaregióra térképeződő gént találtunk.**
4. Irodalmi kutatásokat végeztünk és a vonatkozó GeneCards leírások és számos publikáció alapján összefüggést kerestünk a gének jelenleg

ismert funkciója és az AIS pathomechanizmusára vonatkozó jelenleg ismert modellek között. Az érdekesnek talált gének közül kettőt emelhetünk ki: az izomerő meghatározásában szereplő a **disztonint** (DST) és a sérült izmok regenerálódásában fontos **tenzint**.

## **A.2.**

A microarray kísérletek alapján további vizsgálatra kiválasztott **13 gén közül egyedül a leptin (LEP) esetén tudtunk kimutatni eltérést a QRT-PCR-rel** is. A scoliosisos betegekben a görbült gerincoszlop konvex oldalán a leptin relatív mRNS mennyisége 2,5-szerese a konkáv oldalénak és ennek az eredménynek kapcsán kezdtük el vizsgálni a LEP gént.

### **B.1.**

A leptin szerepe az AIS kialakításában napjainkban merült fel a szakirodalomban és eddig egyetlen közlemény jelent meg, amelyben az AIS-es lányokban alacsonyabb leptin szérumszintet találtak az egészséges kontrollokhöz viszonyítva. Egy eset-kontroll tanulmányban asszociációs analízissel a leptin gén promóter régiójában vizsgáltuk annak az egynukleotidos polimorfikus helynek (SNP) az előfordulási gyakoriságát, amelynek szerepe lehet a leptin gén szabályozásában. Az asszociációs vizsgálatba bevontuk az interleukin-6 (IL6) szabályozó régiójában lévő polimorfizmust is, mivel egy közlemény szerint a gerincferdüléssel asszociációt mutatott. **A két SNP, a LEP G-2548A és a IL6 G-174C kimutatására a PCR-RFLP módszert használtuk és 126 idiopathiás scoliosisos beteg és 197 egészséges, egymással nem rokon személy esetében határoztuk meg a jelenlévő allélokot.** Mindkét populációban valamennyi genotípus Hardy-Weinberg egyensúlyban volt. Egyik SNP esetén sem találtunk szignifikáns különbséget sem az allélgyakoriságban, sem a genotípus gyakoriságban az AIS-es és a kontroll csoport között. A különböző genotípusok esélyhányadosainak (OR) meghatározása, amely egy adott allél hordozásának relatív kockázatbecslésére szolgáló statisztikai módszer,



alkalmas arra, hogy a hajlamosító allélokot kimutassa, eszerint **a LEP-2548A allél jelenléte lehet hajlamosító faktor az AIS-ben**. Vizsgálatainkban az AA vs GG: OR=1.513(CI:0.894-2.562), ami a komplex betegségek esetén a hajlamosító allélokra jellemző értéknek tekinthető. Az esélyhányados értéke megnőtt akkor, ha külön vizsgáltuk a lányokat (AA vs GG: OR=2.02(CI:0.824-4.961)), ami azt jelzi, hogy a lányokban nagyobb szerepe lehet az AIS kialakításában a LEP-2548A allélnak, mint a fiúkban. Ugyanakkor nem találtunk összefüggést a görbület mértéke (Cobb<sup>o</sup>) és az SNP által meghatározott allélok között. Az IL6 G-174C polimorfizmusát vizsgálva nem tudtuk megerősíteni a korábban, mások által leírt asszociációt. A reprodukálhatóság hiánya egyáltalán nem egyedi, sőt a komplex betegségekre jellemzőnek tartja a szakirodalom, ezért szükséges több, megfelelő statisztikai erővel rendelkező, független populáción elvégezni az asszociációs vizsgálatokat.

## **B.2.**

Mivel multifaktoriális öröklődésű betegségekben a gének nem önmagukban hatnak, hanem egymással kölcsönhatásban, ezért megvizsgáltuk létezik-e epiztatikus kapcsolat az általunk vizsgált két gén alléljei között. A gén-gén kölcsönhatás feltárásához két eljárást is használtunk, az első az MDR analízis, amely kisszámú mintaelem esetén is kimutatja az episztázist és alkalmas a gének közötti szinergizmus kimutatására akkor is, ha az allél eloszlásban nem mutatkozik eltérés a beteg és a kontroll csoport között. Az analízis eredményeként megkaptuk azokat a genotípus kombinációkat, amelyek előfordulása esetén nagyobb a kockázata az AIS kialakulásának. A másik statisztikai módszer, ami a génkombinációk hatásának *maximum likelihood* becslését alkalmazva megadja, hogy egy adott génkombináció milyen mértékben emeli meg a betegség kialakulásának esélyét egy másik génkombinációhoz viszonyítva. Az elemzés után **a leginkább hajlamosító allélkombináció (IL6 CC-LEP AA) hordozójának 4.667-szor nagyobb az**

**esélye az AIS kialakulására, mint az (IL6 GG-LEP GG) kombináció hordozójának.** Az esélyhányados értéke még magasabb a lányok esetén, tehát a hajlamosító allélkombináció (IL6 CC-LEP AA) hordozása még nagyobb kockázatot jelent náluk (OR= 6.667 (CI:0.597-74.506). Statisztikai módszerrel megvizsgálva nem találtunk semmiféle összefüggést a genotípus kombinációk és a Cobb° között. A vizsgálati eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a LEP AA-IL6 CC genotípus kombináció az AIS kialakulására hajlamosít, nem pedig a progressiójában játszhat szerepet.

Jelen dolgozatban az AIS kutatásában újszerű megközelítést használva a paravertebrális izmok génexpressziós mintázatát vizsgáltuk és sikerült transzkriptoma szinten megjelenő eltéréseket feltárni és független módszerrel visszaigazolni a leptin gén esetén. A további genetikai és statisztikai elemzések az AIS kialakításában szerepet játszható gén-gén kölcsönhatás felderítéséhez vezetett és elsőként sikerült kimutatnunk, hogy két adipokint (leptint, interleukin-6-ot) termelő gén szabályozását befolyásoló polimorfizmus együttes jelenléte szóba jöhet, mint hajlamosító faktor az AIS etiológiájában.

## **KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE**

### **1. Czibula, A; Leiker, G; Rasko, I**

Changes in alkylation damage removal during in vitro neuronal differentiation

ACTA BIOLOGICA HUNGARICA Volume: 48 Issue: 1 Pages: 113-120 (1997),

### **2. Czibula, A; Morocz, M; Bachrati, CZ, et al.**

Hunt for genetic susceptibility in a complex disease

JOURNAL OF MOLECULAR STRUCTURE-THEOCHEM Volume: 666 Pages: 681-686 (2003), IF:1.027

- 3. Gervain J, Czibula A, Simon J, Kalmár T.**  
Structural analysis of the PKR-binding region of HCV 1b samples from patients with chronic hepatitis C and the correlation with IFN-sensitivity  
ORV HETIL. Volume:144 Issue: 24 Pages: 1179-84( 2003) Hungarian.
- 4. Bogácsi-Szabó E, Kalmár T, Csányi B, Tömöry G, Czibula A, Priskin K, Horváth F, Downes CS, Raskó I.**  
Mitochondrial DNA of ancient Cumanians: Culturally Asian steppe nomadic immigrants with substantially more western Eurasian mitochondrial DNA lineages  
HUMAN BIOLOGY Volume: 77 Issue: 5 Pages: 639-662 ( 2005), IF: 0.960
- 5. Ion G, Fajka-Boja R, Kovács F, Szebeni G, Gombos I, Czibula A, Matkó J, Monostori E.**  
Acid sphingomyelinase mediated release of ceramide is essential to trigger the mitochondrial pathway of apoptosis by galectin-1  
CELLULAR SIGNALLING Volume: 18 Issue: 11 Pages: 1887-1896 (2006), IF: 4.887
- 6. Hegedus Z, Czibula A, Kiss-Toth, E**  
Tribbles: novel regulators of cell function; evolutionary aspects  
CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES Volume: 63 Issue: 14 Pages: 1632-1641 (2006), IF: 4.655
- 7. Zana M, Szécsényi A, Czibula A, Bjelik A, Juhász A, Rimanóczy A, Szabó K, Vetró A, Szucs P, Várkonyi A, Pákáski M, Boda K, Raskó I, Janka Z, Kálmán J.**  
Age-dependent oxidative stress-induced DNA damage in Down's lymphocytes  
BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS Volume:345 Issue:2 Pages: 726-733 (2006), IF: 2.855
- 8. Hegedus Z, Czibula A, Kiss-Toth, E**  
Tribbles: A family of kinase-like proteins with potent signalling regulatory function  
CELLULAR SIGNALLING Volume: 19 Issue: 2 Pages: 238-250 (2007), IF: 4.147

- 9.** Tömöry G, Csányi B, Bogácsi-Szabó E, Kalmár T, **Czibula A**, Csoosz A, Priskin K, Mende B, Langó P, Downes CS, Raskó I  
Comparison of maternal lineage and biogeographic analyses of ancient and modern Hungarian populations  
AMERICAN JOURNAL OF PHYSICAL ANTHROPOLOGY Volume: 134  
Pages: 354-368 (2007), IF: 2.273
- 10.** Sung HY, Guan H, **Czibula A**, King AR, Eder K, Heath E, Suvarna SK, Dower SK, Wilson AG, Francis SE, Crossman DC, Kiss-Toth E.  
Human tribbles-1 controls proliferation and chemotaxis of smooth muscle cells via MAPK signaling pathways  
JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Volume: 282 Issue: 25 Pages: 18379-18387 (2007), IF: 5.581
- 11.** Almos PZ, Horváth S, **Czibula A**, Raskó I, Sipos B, Bihari P, Béres J, Juhász A, Janka Z, Kálmán J.  
H1 tau haplotype-related genomic variation at 17q21.3 as an Asian heritage of the European Gypsy population.  
HEREDITY Volume: 101 Issue: 5 Pages: 416-419 (2008), IF: 3.823
- 12.** Csányi B, Bogácsi-Szabó E, Tömöry G, **Czibula A**, Priskin K, Csosz A, Mende B, Langó P, Csete K, Zsolnai A, Conant EK, Downes CS, Raskó I  
Y-chromosome analysis of ancient Hungarian and two modern Hungarian-speaking populations from the Carpathian Basin  
ANNALS OF HUMAN GENETICS Volume: 72 Pages: 519-534 (2008), IF: 2.195
- 13.** Matusek,T.; Gombos,R.; Szecsenyi,A.; Sanchez-Soriano,N.; **Czibula,A.**; Pataki,C.; Gedai,A.; Prokop,A.; Rasko,I.; Mihaly,J.  
Formin proteins of the DAAM subfamily play a role during axon growth  
JOURNAL OF NEUROSCIENCES Volume: 28 Issue: 49 Pages: 13310-13319 (2008), IF: 7.452
- 14.** Nagy,D.; Bogacsi-Szabo,E.; Varkonyi,A.; Csanyi,B.; **Czibula,A.**; Bede,O.; Tari,B.; Rasko,I.  
Prevalence of adult-type hypolactasia as diagnosed with genetic and lactose hydrogen breath tests in Hungarians

EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION Volume: 63 Issue: 7  
Pages: 909-912 (2009), IF: 2.686

**15. Mórocz M, Czibula A \***, Grózer Zs, Szécsényi A, Álmos P, Dragon A, Raskó I, Illés T

Association study of MMP-3, IL-6, Leptin, BMP4, MTNR1B Gene Promoter Polymorphisms and Adolescent Idiopathic Scoliosis

Elfogadás alatt a SPINE folyóiratban

\*megosztott első szerzőség

Összesített IF: 40.268

### **Konferencia kiadványok**

**1. Regulation of the bovine leukemia-virus basal transcription**

Kiss-Toth E, Unk I, Bachrati C, **Czibula A**

JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY Pages: 48-48 Supplement:  
18C (1994), IF: 2.849

**2. Repair of alkylation damage by differentiating mouse teratocarcinoma cells**

**Czibula A**, Leiker G, Margison GP, T, Rasko I

JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY Pages: 278-278  
Supplement: (1995), IF: 3.075

**3. Changes of DNA repair during in vitro cellular differentiation**

Czibula A, Gerencser A, Bachrati C, Borda S, Johnson RT, Rasko I

CELL BIOLOGY INTERNATIONAL Volume: 20 Pages: 220-220  
(1996), IF: 1.018

**4. A putative molecular genetic susceptibility allele for idiopathic scoliosis**

**Czibula A**, Morocz M, Csiszar A, Bachrati C, Olah E, Szeszak F, Morava E, Szappanos L, Rasko I

EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS Volume: 10 Pages: 76-77 (2002), IF:3.136

**5. The correlation of genom mutations in HCV-1b with IFN-sensitivity in Hungarian patients**

Gervain J, Simon J, **Czibula A**, Kalmar T

JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY Volume:  
21 Pages: A139-A139 Supplement: 2 (2006), IF:1.785

Összesített IF: 11.863