

A HASNYÁLMIRIGY ENDOKRIN ÉS EXOKRIN BETEGSÉGEINEK GENETIKÁJA

Ph.D. értekezés tézisei

Dr. Németh Balázs

Témavezetők:

Prof. Dr. Mándi Yvette Ph.D. D.Sc.¹

Prof. Dr. Sahin-Tóth Miklós Ph.D.²

¹Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet
Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar

²Department of Molecular and Cell Biology
Boston University
Henry M. Goldman School of Dental Medicine

Szeged

2014.

A tézis témájához kapcsolódó közlemények:

I. Németh BC, Várkonyi T, Somogyvári F, Lengyel C, Fehértemplomi K, Nyiraty S, Kempler P, Mándi Y. (2014) Relevance of α -defensins (HNP1-3) and defensin β -1 in diabetes. *World Journal of Gastroenterology* [**Közlésre elfogadott kézirat**]

IF: 2,547 (2012)

II. Németh BC, Sahin-Tóth M. (2014) Human cationic trypsinogen (PRSS1) variants and chronic pancreatitis. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* **306**, G466-73.

IF: 3,649 (2012)

III. Németh BC, Horváth Á, Szekeres M, Mándi Y, Somogyvári F. (2013) Quantitation with allele specific amplification and realtime PCR. *Acta Biologica Szegediensis* **57**, 47-50.

IV. Németh BC, Wartmann T, Halangk W, Sahin-Tóth M. (2013) Autoactivation of mouse trypsinogens is regulated by chymotrypsin C via cleavage of the autolysis loop. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 24049-24062.

IF: 4,651 (2012)

V. Tizslavicz Z, Németh B, Fülöp F, Vécsei L, Tápai K, Ocsovszky I, Mándi Y. (2011) Different inhibitory effects of kynurenic acid and a novel kynurenic acid analogue on tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production by mononuclear cells, HMGB1 production by monocytes and HNP1-3 secretion by neutrophils. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **383**, 447-455.

IF: 2,647 (2011)

A tézis témájához nem kapcsolódó közlemények:

I. Tizslavicz Z, Somogyvári F, Szolnoki Z, Sztriha LK, Németh B, Vécsei L, Mándi Y. (2012) Genetic polymorphisms of human beta-defensins in patients with ischemic stroke. *Acta Neurologica Scandinavica* **126**, 109-115.

IF: 2,474 (2012)

II. Tizslavicz Z, Endrész V, Németh B, Megyeri K, Orosz L, Seprényi G, Mándi Y. (2011) Inducible expression of human β -defensin 2 by *Chlamydomonas pneumoniae* in brain capillary endothelial cells. *Innate Immunity* **17**, 463-469.

IF: 4,000 (2011)

RÖVIDÍTÉSEK

cDNS	komplementer DNS
CEL	karboxil-észter lipáz
<i>CFTR</i>	cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor gén
<i>CLPS</i>	prokolipáz gén
<i>CTLA4</i>	"cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4" gén
<i>CTRB2</i>	humán kimotripszinogén B2 fehérje
<i>CTRC</i>	humán kimotripszinogén C fehérje
<i>Ctrb</i>	egér kimotripszinogén B fehérje
<i>Ctrc</i>	egér kimotripszinogén C fehérje
<i>DEFA1</i>	humán α 1-defenzin gén
<i>DEFA3</i>	humán α 3-defenzin gén
<i>DEFB1</i>	humán β 1-defenzin gén
DM1	1-es típusú diabetes mellitus, inzulin-függő diabetes mellitus
DM2	2-es típusú diabetes mellitus, nem inzulin-függő diabetes mellitus
DNS	dezoxiribonukleinsav
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ELISA	"enzyme-linked immunosorbent assay"
<i>GAPDH</i>	gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz gén
HBD1	humán β 1-defenzin fehérje
HLA	humán leukocita antigén
HNP	humán neutrofil peptid
Hu1	humán kationos tripszinogén fehérje
<i>IFIH1</i>	"interferon-induced helicase C domain-containing protein 1" gén
<i>INS</i>	inzulin gén
LDL	alacsony denzitású lipoprotein
MODY	"maturity onset diabetes of the young", monogénes diabetes
<i>MPO</i>	mieloperoxidáz gén
mRNA	hírvivő ribonukleinsav
NF- κ B	"nuclear factor- κ B"
PAGE	poliakrilamid-gélelektroforézis
PCR	polimeráz láncreakció
<i>PRSS1</i>	humán kationos tripszinogén gén
<i>PTPN22</i>	"protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22" gén
qPCR	kvantitatív (valós idejű) polimeráz láncreakció
RNS	ribonukleinsav
RT PCR	reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SNP	egynukleotidos polimorfizmus
<i>SPINK1</i>	Kazal-típusú szerin proteáz inhibitor gén
<i>SUMO4</i>	"small ubiquitin-like modifier 4" gén
TIA	átmeneti agyi vérellátási zavar ("transient ischemic attack")

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	5 -
1.1 A diabetes mellitus genetikája	5 -
1.1.1 1-es típusú cukorbetegség (DM1) genetikája	5 -
1.1.2 A 2-es típusú cukorbetegség (DM2) genetikája.....	6 -
1.1.3 Defenzinek szerepe a cukorbetegség kialakulásában.....	6 -
1.1.3.1 α -defenzinek.....	6 -
1.1.3.2 β -defenzinek.....	7 -
1.1.3.3 Defenzinek szerepe diabetes mellitus-ban.....	7 -
1.1.4 Az endokrin és exokrin hasnyálmirigy megbetegedéseinek genetikai szintű kapcsolata	7 -
1.2 A krónikus hasnyálmirigy-gyulladás genetikája.....	8 -
1.3 Egér tripszinogének	9 -
2. CÉLKITŰZÉSEK	10 -
3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK	11 -
3.1 Cukorbeteg- és kontroll populáció a humán genetikai vizsgálatokban.....	11 -
3.2 Humán genetikai vizsgálatokban alkalmazott módszerek	11 -
3.3 Egér tripszinogének vizsgálatához alkalmazott módszerek.....	12 -
4. EREDMÉNYEK	13 -
4.1 Humán genetikai vizsgálatok eredményei	13 -
4.1.1 α -defenzinek (HNP 1-3).....	13 -
4.1.2 β 1-defenzin.....	13 -
4.2 Egér tripszinogének biokémiai vizsgálatának eredményei.....	13 -
5. MEGBESZÉLÉS	15 -
5.1 Az α - és β -defenzinek jelentősége diabetes mellitus-ban.....	15 -
5.2 Az egér kimotripszin C az autolízis hurok hasításával szabályozza az egér tripszinogének autoaktivációját.....	15 -
6. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS ÚJ EREDMÉNYEK	17 -
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	18 -

1. BEVEZETÉS

A cukorbetegség és a hasnyálmirigy-gyulladás az endokrin, illetve az exokrin pankreász leggyakoribb betegségei, melyek kialakulásában fontos szerepet játszanak különféle genetikai tényezők. Az elmúlt 2-3 évtizedben jelentős felfedezéseknek lehettünk tanúi, amelyek megvilágították ezen betegségek genetikai hátterét.

1.1 A diabetes mellitus genetikája

A magas vércukorszinttel járó diabetes mellitus a metabolikus betegségek egy csoportja, amely kialakulhat az inzulintermelés, az inzulin hatás vagy mindkettő zavara miatt. Az 1-es típusú cukorbetegséget a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteiben lévő β -sejtek károsodása okozza, amely a szervezet abszolút inzulin hiányához vezet. A 2-es típusú cukorbetegség kialakulását elsősorban a relatív inzulin hiányért felelős inzulin rezisztencia okozza, mely társulhat az inzulintermelés zavarával is. A kórlefolyásban genetikai és immunológiai tényezőknek is szerepük van. A betegség hosszú távon kialakuló szövődményei szinte az egész szervezetet érintik, főként szem-, vese-, ideg, és érkárosodással járnak.

1.1.1 1-es típusú cukorbetegség (DM1) genetikája

Az 1-es típusú cukorbetegség a glükóz homeosztázis genetikailag heterogén autoimmun betegsége, amely a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteiben található β -sejtek immunológiai eredetű pusztulása miatt alakul ki. A szigetsejteket károsító antitestek termelődhetnek az inzulin, valamint a glutaminsav-dekarboxiláz és a tirozin-foszfataz enzimek ellen.

A 6-os kromoszóma rövid karján elhelyezkedő humán leukocita antigén (HLA) II. osztály DR3 és DR4 haplotípusai nagy mértékben elősegíthetik a betegség kialakulását, míg a DR2 haplotípus jelenlétének védő szerepe van. Más gének, úgy mint az inzulin gén (*INS*, 11q15), a *PTPN22* (1p13), *CTLA4* (2q33), *CD25 / IL2RA* (10p15), *IFIH1* (2q24), *SUMO4* (6q25) egyes génváltozatai is fokozzák a betegségre való hajlamot, azonban hatásuk a fent említett HLA haplotípusokhoz képest kevésbé jelentős.

Mivel az 1-es típusú diabetes elsősorban autoimmun betegségnek tekinthető, az immunrendszer működését szabályozó géneknek szintén hatásuk lehet a cukorbetegség kialakulására. A későbbi fejezetben tárgyalt defenzinek a természetes immunrendszer működésében jelentős szerepet játszó peptidek. Egyes génváltozataikat több autoimmun eredetű betegséggel is kapcsolatba hozták.

1.1.2 A 2-es típusú cukorbetegség (DM2) genetikája

A 2-es típusú cukorbetegség a szervezetben előzetesen kialakuló inzulin rezisztencia talaján fejlődik a glükóz anyagcsere krónikus betegségévé. A betegek relatív inzulin hiányban szenvednek, miközben a hasnyálmirigy inzulin termelő képessége kezdetben megtartott. A DM2 multifaktoriális betegség, mely kialakulásában jelentős szerepe van környezeti és genetikai hatásoknak is, kórlefolyásában nem jellemző a β -sejtek autoimmun eredetű pusztulása.

A természetes immunrendszer sejtjei és mediátorai elsősorban a bakteriális, gombás és virális eredetű fertőzések elleni védekezés frontvonalát alkotják szervezetünkben. Az interleukin-1 β , interleukin-6, interleukin-10, tumor nekrozis faktor- α egyes génváltozatai befolyásolják a szervezetünk inzulin-, triglicerid- és koleszterinszintjét és hozzájárulnak az inzulin rezisztencia kialakulásához a zsír-, izom- és májsejtekben. Ez a folyamat a 2-es típusú cukorbetegségre jellemző csökkent glükóz toleranciához vezet.

1.1.3 Defenzinek szerepe a cukorbetegség kialakulásában

A defenzinek a természetes immunrendszer kis méretű antimikrobiális peptidjei. Gerincesekben 3 fő típusuk van: az α , β és θ , melyek közül emberben csak az α - és β -defenzinek expresszálódnak. Az antimikrobiális hatásuk mellett részt vesznek a gyulladási folyamatok szabályozásában és az érlemezés kialakulásában is, így a cukorbetegséghez társuló makro- és mikroangiopátia kialakulásában is feltételezhető szerepük.

1.1.3.1 α -defenzinek

Emberben a 8-as kromoszóma rövid karján található 23.1 lókuszon 6 α -defenzin gént (*DEFA1*, *DEFA3*, *DEFA1B*, *DEFA4*, *DEFA5*, *DEFA6*), és 5 pszeudogént különböztetünk meg. A humán neutrofil peptideket (HNP 1-3) kódoló *DEFA1* és *DEFA3* gének együttes kópiaszáma nagy változatosságot mutat az emberi populációban. A közölt tanulmányok alapján a *DEFA1 / DEFA 3* kópiaszám átlagosan 4 és 11 közé tehető a diploid genomban.

Az α -defenzinokat az alarminok (veszélyt jelző molekulák) közé soroljuk, melyek fontos szerepet játszanak a gyulladási folyamatokban, továbbá nagy jelentőségük van az immunrendszer működésében. Az antimikrobiális hatáson kívül szerepük van a kemotaxisban valamint a gyulladási citokinek termelésében. Az α -defenzinek közül a HNP1-3 peptidiek elsődlegesen a neutrofil granulocitákban termelődnek és granulumaikban tárolódnak. Gyulladási folyamatokban a granulociták aktivációja során kerülnek ki a véráramba. Fokozzák az LDL koleszterin kötődését az erek endoteljéhez, ezáltal az érlemezés

kialakulását is elősegítik, ezért a cukorbetegség hosszú távú szövődményeinek kifejlődésében is feltételezhető a szerepük.

1.1.3.2 β -defenzinek

A humán β -defenzinek szintén kis méretű antimikrobiális peptidek. Jelenleg 38 β -defenzin gént különböztetünk meg, melyek az 1-es, 6-os, 8-as, 11-es és 20-as kromoszómákon helyezkednek el. Ezen kívül 9 β -defenzin pszeudogén is található az emberi genomban. Közel az α -defenzin génekhez, 8-as kromoszómán található a humán β 1-defenzin gén (*DEFB1*), mely állandóan expresszálódik szervezetünk epitélsejtjeiben.

A β -defenzinek közvetlen antibakteriális, antifungális és antivirális hatása jól ismert, melyeken kívül kemotaktikus funkciójuknak is jelentős szerepe van szervezetünk védelmében.

A *DEFB1* gén promóter régiójában 3 egynukleotidos polimorfizmus (SNP) található, melyeknek a *DEFB1* génexpresszió szabályozásában van szerepük (c.-20G>A, c.-44C>G és c.-52G>A).

1.1.3.3 Defenzinek szerepe diabetes mellitus-ban

Ismert, hogy egyes citokin gének változatai szerepet játszanak az 1-es vagy 2-es típusú cukorbetegség kialakulásában, azonban keveset tudunk a-defenzinek szerepéről. Cukorbetegben gyakran alakulnak ki fertőzések, mivel a betegek immunrendszere sok esetben gyengült. Kimutatták, hogy cukorbetegség esetén a β 1-defenzin mRNS szint csökkent a vesékben, mely magyarázattal szolgálhat a gyakran megfigyelhető húgyúti infekciókra. Nemrégiben az is kiderült, hogy a szőlőcukornak és az inzulinak közvetlen hatása van a β -defenzinek expressziójára.

A HNP 1-3 plazmaszintje megemelkedett vesekárosodásban és szív-érrendszeri betegségben szenvedőknél. A vesekárosodás és szív-érrendszeri megbetegedések a cukorbetegség hosszú távú következményei lehetnek, amelynek kapcsán felmerül a kérdés, hogy a *DEFA1 / DEFA3* gének kópiaszám polimorfizmusai, valamint a neutrofil granulociták mRNS expressziója hatással vannak-e a HNP 1-3 plazmaszintekre 1-es és 2-es típusú cukorbetegben.

1.1.4 Az endokrin és exokrin hasnyálmirigy megbetegedéseinek genetikai szintű kapcsolata

A cukorbetegség kialakulásának számos rizikófaktora van, melyek között szerepelnek mind a környezeti, mind genetikai tényezők. A monogénes diabetes (MODY) egyetlen gén

rendellenessége miatt kialakuló cukorbetegség, mely általában a 25. életév előtt kezdődik és nem jár ketoacidózissal. A MODY 11 típusa genetikailag autoszomális domináns öröklésmentet követ. Jellemző, hogy a genetikai károsodás minden esetben közvetlenül a β -sejtek funkcióvesztéséhez vezet. A pankreász működés romlását MODY8-ban (karboxilészter lipáz MODY vagy CEL MODY) mind az endokrin, mind az exokrin szövet károsodása okozza.

A prokolipáz gén (*CLPS*) terméke a kolipáz és az enterosztatin prekuzora, mely főleg az exokrin hasnyálmirigyben termelődik. A kolipáz fehérje nélkülözhetetlen kofaktora a lipáznak, mely az epesavak által emulzifikált trigliceridek emésztését végzi. Az enterosztatin peptid hormonnaként viselkedik, mely állatmodellekben negatívan szabályozza a zsírfogyasztást és az inzulin szekréciót. A *CLPS* gén SNP-it több tanulmányban összefüggésbe hozták a rendellenes inzulin szekrécióval, a 2-es típusú diabetes kialakulásával és zsírsavak emésztési zavarával.

A cukorbetegség és az exokrin pankreász elégtelenség együttes előfordulása meglepően gyakori jelenség. A legtöbb esetben nem egyetlen gén hatása miatt alakulnak ki, mint a CEL MODY esetében, vagy a *CLPS* gén károsodásakor. Olyan, elsődlegesen az exokrin pankreászt érintő folyamatok, melyek kiterjedt hasnyálmirigy károsodással járnak (hasnyálmirigy-gyulladás, tumor, cisztás fibrózis, hemokromatózis), illetve a különböző hasnyálmirigy rezekciós műtétek könnyen vezethetnek cukorbetegség kialakulásához, melyet 3c típusú diabetes-ként tartunk számon.

Azon mechanizmusok kutatása, melyek krónikus hasnyálmirigy-gyulladásához vezethetnek, nem csak az exokrin pankreász működésének részletesebb megértését szolgálják, hanem egyes speciális cukorbetegség típusok kialakulásának részletesebb megismeréséhez is hozzájárulhatnak.

1.2 A krónikus hasnyálmirigy-gyulladás genetikája

A krónikus pankreatitisz a hasnyálmirigy visszatérő vagy állandó gyulladással járó megbetegedése, amelyet a hasnyálmirigy állandósult morfológiai elváltozásai, hasi fájdalom valamint az endokrin, az exokrin vagy mindkét funkció károsodása jellemeznek. Kialakulásában a genetikai tényezők mellett gyakran a túlzott alkoholfogyasztás és a dohányzás játszik szerepet. A krónikus pankreatitisz növeli a hasnyálmirigy-rák kialakulásának veszélyét is.

A betegség kialakulására több olyan gén mutációi is hajlamosítanak, amelyek a tripszinogén aktivációját szabályozzák. Ezek közül a legfontosabb a kationos tripszinogén

(*PRSSI* gén) p.R122H mutációja, mely az érintett családokban autoszomális domináns módon öröklődik és örökletes pankreatitist okoz. A p.R122H mutáció hatására fokozódik a kationos tripszinogén autoaktivációja, mert a mutáns tripszinogént a kimotripszin C nem képes lebontani. Ez feltehetőleg a tripszinogén hasnyálmirigyen belüli aktiválódásához, így a hasnyálmirigy önemésztődéséhez és krónikus gyulladás kialakulásához vezet. A hasnyálmirigyen belüli tripszinogén aktiváció a pankreatitisz nem örökletes formáiban is kulcsfontosságú tényező a betegség patogenezisében. Ezen esetekben a mutációk a tripszin inhibítort kódoló Kazal-típusú szerin proteáz inhibitor (*SPINK1*) génben, a tripszinogén lebontását katalizáló kimotripszin C (*CTRC*) génjében vagy a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (*CFTR*) génben található. A legújabb eredmények a karboxipeptidáz A1 gén (*CPA1*) szerepére is rávilágítanak. A <http://www.pancreasgenetics.org/> honlapon találhatóak meg a betegség kialakulásával összefüggésbe hozható mutációk.

1.3 Egér tripszinogének

Jelenleg nem áll rendelkezésünkre olyan állatmodell, amelyen kísérletesen jól vizsgálhatóak lennének a pankreatitiszhez vezető genetikai elváltozások. Ahhoz, hogy egy olyan egérmodellt hozzunk létre, amelyben egy tripszinogén mutáció hatására az emberi megbetegedésre jellemző módon és mechanizmussal alakul ki pankreatitisz, ismernünk kell az egér tripszinogének biokémiai tulajdonságait, illetve a humán mutációk egér tripszinogénekre gyakorolt hatását.

Az egér genom 20 tripszinogén gént tartalmaz, amelyből 11 látszólag funkcionális, azaz kifejeződhet mRNS és fehérje szinten is (T4, T5, T7, T8, T9, T10, T11, T12, T15, T16, T20). A maradék 9 tripszinogén gén vagy nem kifejeződő pszeudogén (T1, T2, T3, T14) vagy maradványgén (T6, T13, T17, T18, T19), melynek egy vagy több exonja hiányzik, így funkcióképes fehérje kódolására alkalmatlan.

Irodalmi adatokból tudjuk, hogy az egér hasnyálmirigyben a T7 izoforma alkotja a tripszinogén mennyiség 60%-át. Nem ismert azonban, hogy milyen más egér tripszinogén izoformák fejeződnek ki, azok hogyan autoaktiválódnak és az autoaktivációt hogyan szabályozza az egér kimotripszin C.

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. A természetes immunrendszer mediátorainak, így a defenzineknek is szerepük lehet az 1-es és 2-es típusú cukorbetegség és az ehhez kapcsolódó makro és mikrovaszkuláris szövődmények kialakulásában. A defenzinek diabetes mellitus kialakulásában játszott szerepének részletesebb megértése érdekében célunk volt:

- a humán neutrofil peptid (HNP 1-3) plazmakoncentrációjának mérése és a mért koncentrációk lehetséges szerepének vizsgálata a cukorbetegség és szövődményeinek kialakulásában,
- a *DEFA1* / *DEFA3* gének kópiaszámának és mRNS expressziójának meghatározása cukrobetegekben,
- a β 1-defenzin gén (*DEFB1*) promóter régiójában lévő c.-20G>A, c.-44C>G és c.-52G>A egynukleotidos polimorfizmusok (SNP) szerepének vizsgálata 1-es és 2-es típusú cukorbetegség kórfolyamatában.

2. Az örökletes hasnyálmirigy-gyulladás kórlefolyásának tanulmányozásához hiányoznak olyan állatmodellek, melyekben az emberi megbetegedéshez hasonlóan egy mutáció hatására spontán gyulladás alakul ki a hasnyálmirigyben. Mielőtt egy ilyen egérmodellt létrehoznánk, szükséges az egér tripszinogének biokémiai jellemzése. Ennek érdekében célul tűztük ki, hogy

- azonosítsuk az egér hasnyálmirigyében termelődő fő tripszinogén izoformákat,
- jellemezzük az egér tripszinogének autoaktivációját és megvizsgáljuk a kimotripszinek szabályozó szerepét az autoaktivációban,
- megvizsgáljuk a leggyakoribb, betegséget okozó humán kationos tripszinogén mutáció, a p.R122H hatását a T7 és T8 egér tripszinogénekben.

3. BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Cukorbeteg- és kontroll populáció a humán-genetikai vizsgálatokban

A cukorbeteg és kontroll populáció minden tagja Magyarországon élő magyar, akik a tanulmányban történő részvételükhöz írásos beleegyezésüket adták, melyet a Szegedi Tudományegyetemen működő helyi Etikai Bizottság előzetesen jóváhagyott.

Tanulmányunkban 221 fő egészséges véradó alkotta a kontroll populációt. A betegcsoportban összesen 257 cukorbeteg egyént vizsgáltunk, közülük 117-en 1-es típusú, míg 140-en 2-es típusú diabetes-ben szenvedett.

71 betegnek volt igazolható nephropátiája (32 fő DM1, 39 fő DM2), 115 betegnél retinopátia volt megfigyelhető (47 fő DM1, 68 fő DM2), neuropátiája 95 betegnek volt (35 fő DM1, 60 fő DM2), 54 betegnél korábban makrovaszkuláris betegséget – koronáriabetegség, stroke, TIA, perifériás érbetegség, amputáció - írtak le (14 fő DM1, 40 fő DM2), míg 182 beteg szenvedett magas vérnyomás betegségben (50 fő DM1, 132 fő DM2).

3.2 Humán-genetikai vizsgálatokban alkalmazott módszerek

Alavadásgátolt (EDTA) vénás vért használtunk genomi DNS és leukocitából származó mRNS izolálásra, valamint a vérplazmában lévő α -defenzin (HNP 1-3) koncentrációjának meghatározására.

A *DEFA1 / DEFA3* génkópiaszám meghatározás Linzmeier és mtsai. által korábban közölt módszerrel, kvantitatív real time PCR-rel történt BIO-RAD CFX 96 qPCR gép használatával. A reakcióelegy Fermentas Probe/Rox qPCR MasterMix-et és EVAGreen (Biotium Inc., USA) festéket tartalmazott. Referenciagénként az mieloperoxidáz (*MPO*) háztartási gént ("housekeeping gene") választottuk.

Húszt betegben történt *DEFA1 / DEFA3* mRNS expresszió mérése, amelynek kivitelezésére kvantitatív reverz transzkriptáz (RT) PCR módszert alkalmaztunk, amely módszerhez LightCycler (Roche) készüléket használtunk. Minden egyes reakcióelegy elkészítése Light Cycler Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green I master mix-szel történt. Referenciagénként a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenázt (*GAPDH*) választottuk, az expressziós különbségeket $\Delta\Delta C_t$ módszerrel határoztuk meg.

A *DEFB1* gén promóter polimorfizmusait TaqMAN próbával, valós idejű PCR módszerrel határoztuk meg (*DEFB1* c.-20G>A, c.-44C>G, c.-52G>A). A genotípus-megoszlások szignifikanciáját χ^2 próbával és Fisher-teszttel ellenőriztük ($p < 0,05$).

A vérplazma HNP 1-3 koncentrációját ELISA-val mértük (Hycult-Biotech HK324, Uden, The Netherlands), majd Mann-Whitney teszttel és kétmintás t-próbával hasonlítottuk össze az eredményeket.

3.3 Egér tripszinogének vizsgálatához alkalmazott módszerek

Az egér tripszinogéneket hasnyálmirigy homogenátumból ecotin affinitás kromatográfia segítségével izoláltuk, majd az egyes izoformákat ioncserélő kromatográfiával választottuk el. Az izoformák azonosítása N-terminális szekvenálás és tömegspektrografia segítségével történt.

A biokémiai kísérletekben használt tripszinogéneket rekombináns módon állítottuk elő *Escherichia coli* baktériumban. A tripszinogén mutánsokat kétlépéses helyspecifikus PCR mutagenézissel készítettük. A baktériumban termelt tripszinogéneket a zárványtest frakcióból nyertük ki, a denaturált fehérjét in vitro renaturáltuk, majd ecotin affinitás kromatográfiával megtisztítottuk. A kimotripszinogéneket (humán CTRB2, egér Ctrc és Ctrb) transzfektált HEK 293T sejtekben termeltük, majd a poli-hisztidinnel ("His tag") jelölt fehérjéket nikkell oszlopon végzett folyadék-kromatográfia segítségével tisztítottuk.

A tripszinogének autoaktivációját 8-as pH-n, 1 mM és 10 mM kalcium jelenlétében mértük. 2 μ M tripszinogént inkubáltunk 10 nM tripszinnel és 25 nM kimotripszinnel. A tripszin aktivitást 200 μ M koncentrációjú N-CBZ-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilid kromogén tripszin szubsztrát segítségével mértük.

A tripszinogénekben az autoaktiváció során végbement peptidkötés hasadásokat SDS-poliakrilamid gélelektroforézis és N-terminális szekvenálás segítségével határoztuk meg.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Humán genetikai vizsgálatok eredményei

4.1.1 α -defenzinek (HNP 1-3)

Kísérleteink igazolták, hogy az 1-es és 2-es típusú diabetes-es betegek plazmájában szignifikánsan magasabb a HNP 1-3 (α -defenzin) koncentrációja, mint az egészséges kontrollokéban. Az átlag koncentráció \pm szórás 28.78 ± 4.2 ng/mL volt az 1-es típusú, míg 29.82 ± 5.36 ng/mL volt 2-es típusú cukorbetegekben, szemben a kontroll populációban mért 11.94 ± 2.96 ng/mL értékkel ($p < 0.01$). A α -defenzin plazmakoncentrációja azokban a cukorbetegekben volt a legmagasabb, akikben szövődményként korábban nephropátiát vagy neuropátiát vagy szív-érrendszeri megbetegedést írtak le.

Az α -defenzin gének kópiaszám medián értéke 10 volt és ennek vonatkozásában a betegek nem mutattak különbséget a kontrolloktól. A *DEFA1 / DEFA3* gének kópiaszám egyénekenként vizsgálva nem mutatott összefüggést az mRNA expressziós szinttel és a plazmában mért HNP 1-3 koncentrációkkal sem.

4.1.2 β 1-defenzin

A *DEFB1* gén c.-20G>A és c.-52G>A polimorfizmusainak vizsgálatából kiderült, hogy e két SNP vonatkozásában a genotípus-megoszlás összességében nem különbözött a diabetes-es és egészséges egyének között. A c.-44C>G SNP vizsgálatánál azonban azt tapasztaltuk, hogy a GG homozigóta genotípus szignifikánsan alacsonyabb volt cukorbetegekben a kontrollokhöz képest (2,5% vs 9,5%, $p < 0,01$). Neuropátiás vagy nephropátiás szövődményekkel rendelkező cukorbetegekben ez a különbség még szembetűnőbb volt (1,2% vs 9,5%, $p < 0,01$ és 1,5% vs 9,5%, $p < 0,01$). Az alacsonyabb β 1-defenzin termelést determináló CC genotípus gyakoribb volt cukorbetegekben, mint a kontroll populációban (65% vs 50%, $p < 0,05$).

4.2 Egér tripszinogének biokémiai vizsgálatának eredményei

Az egér hasnyálmirigyében 4 tripszinogén izoforma fejeződik ki nagy mennyiségben: T7, T8, T9 és T20. Funkcionális vizsgálataink azt mutatták, hogy leggyorsabban a T7 izoforma autoaktiválódik és éri el a legmagasabb tripszin aktivitást autoaktiváció során. Fiziológiás kalcium koncentráció (1 mM) mellett a T20 izoforma nem képes autoaktivációra.

Az egér kimotripszin C (Ctrc) a T7 izoformát gyengén hasítja az autolízis hurokban a Leu149-Ser150 peptidkötésnél, melynek kismértékű gátló hatása van az autoaktivációra. A

T8 és T9 izoformát ugyancsak az autolízis hurokban, de sokkal gyorsabban hasítja a Ctrc a Phe150-Gly151 peptidkötésnél, amelynek eredményeként a T8 és T9 izoformánál az autoaktiváció teljes gátlása következik be. Eredményeink alapján az egér kimotripszin B (Ctrb) is képes hasítani a Phe150-Gly151 peptidkötést, azonban 7-szer lassabban, mint a Ctrc.

A humán kationos tripszinogén a 150. aminosav pozícióban szerint (Ser) tartalmaz, amely mellett a kimotripszinek nem képesek hasítani. Azonban, ha a humán kationos tripszinogén p.S150F mutánsával végezzük el az autoaktivációs kísérletet humán kimotripszin B2 (CTRB2) jelenlétében, a CTRB2 hasítja a Phe150-Gly151 peptidkötést, és az autoaktiváció jelentős mértékben lassul.

Ellentétben a humán kationos tripszinogénnel, a T7 izoforma Leu82-Glu83, valamint a T8 és T9 izoforma Leu81-Glu82 peptidkötéseit az egér Ctrc jelentős mértékben nem hasítja. A T7 izoforma N-terminusát az egér Ctrc a Leu17-Asp18 peptidkötésnél hasítja, így az aktivációs peptidet rövidíti, azonban ez a hasítás az autoaktivációra nem gyakorol jelentős hatást.

Az örökletes hasnyálmirigy-gyulladásban leggyakrabban kimutatható genetikai elváltozás a humán kationos tripszinogén p.R122H mutációja. Ez a mutáció fokozza a tripszinogén autoaktivációját, mert a humán CTRC nem képes lebontani a mutáns fehérjét. Valószínű tehát, hogy e mutáció közvetlen hatása a tripszinogén korai, hasnyálmirigyen belüli aktivációja, mely a pankreász önmérsztődéséhez és gyulladás kialakulásához vezet. Mivel kísérleteink végső célja, hogy olyan egérmodellt készítsünk, amelyben a humán mutációk hasnyálmirigy-gyulladást idéznek elő, ezért megvizsgáltuk a T7 izoforma p.R123H és a T8 izoforma p.R122H mutánsainak biokémiai tulajdonságait.

Kiderült, hogy ezen mutánsok aktivációja jelentős mértékben nem különbözik a vad típusú tripszinogénétől, ami arra utal, hogy a p.R122H mutáció hatása eltér az egér és humán tripszinogénekből, ezért az egér tripszinogének ilyen mutánsai nem megfelelő jelöltek egy egérmodell létrehozására.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1 Az α - és β -defenzinek jelentősége diabetes mellitus-ban

Kísérletes munkánkban cukorbeteg és egészséges kontroll populáció tagjainál meghatároztuk a vérplazma HNP 1-3 koncentrációját, a perifériás leukocitákból a *DEFA1 / DEFA3* mRNS expresszió szintjét és genomi szinten a *DEFA1 / DEFA3* gének kópiaszámát. A legmagasabb α -defenzin (HNP 1-3) plazmaszinteket olyan cukorbetegben mértük, akiknél mikro- vagy makrovaszkuláris elváltozások voltak igazolhatóak. Nem találtunk összefüggést a génkópiaszám és az mRNS expresszió, valamint a génkópiaszám és a plazma α -defenzin szint között. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a magas α -defenzin (HNP 1-3) szint diabetes-ben nem genetikailag meghatározott. Feltételezhető, hogy a neutrofil granulociták kóros állapotban (cukorbetegségben) történő degranulációja okozza a magas α -defenzin szintet a vérplazmában. A szakirodalomban fellelhető, egymásnak ellentmondó tanulmányok a *DEFA1 / DEFA3* génkópiaszám és HNP 1-3 plazmakoncentráció összefüggésében arra ösztönöz, hogy az általunk megfigyelt jelenség további vizsgálatát mindenképpen folytassuk.

A *DEFB1* gén c.1-44C>G SNP G alléljának jelenléte egy feltételezett NF- κ B kötőhelyet hoz létre a *DEFB1* gén promóter régiójában, mely megnövekedett *DEFB1* génexpressziót okoz. A G allél gyakrabban jelenik meg az egészséges populációban, ezért feltételezik protektív hatását. A diabetes szövődményeinek vizsgálatával arra a következtetésre jutottunk, hogy a G allél jelenléte különösen nephropátia és neuropátia esetében rendkívül ritka. A HBD1 diabetesben játszott szerepét megerősítik azok a korábbi megfigyelések, melyekből kiderül, hogy a magas vércukorszint oka lehet a csökkent *DEFB1* expresszió, valamint hogy az inzulin is képes a *DEFB1* expressziót szabályozni.

5.2 Az egér kimotripszin C az autolízis hurok hasításával szabályozza az egér tripszinogének autoaktivációját

Több kísérlet és próbálkozás ellenére a mai napig nem sikerült olyan egérmodellt létrehozni, mely mind fenotípusában, mind mechanisztikusan megfelel az emberben előforduló örökletes hasnyálmirigy-gyulladásnak, amely a tripszinogén pankreáson belüli aktiválódása miatt jön létre. Ahhoz, hogy ilyen modellt készítsünk, meg kell ismernünk az egér tripszinogének biokémiai tulajdonságait, valamint az egyes humán mutációk hatását az egér tripszinogének autoaktivációjára.

Az egér genomban jelen lévő 20 tripszinogén gén közül az egér hasnyálmirigyében 4 tripszinogén izoforma fejeződik ki nagy mennyiségben (T7, T8, T9 és T20). Közülük a T7, T8 és T9 autoaktiválódik fiziológias kalcium koncentráció mellett. A T7 izoforma termelődik a legnagyobb mennyiségben, autoaktivációja a leggyorsabb és az autoaktiváció során a legmagasabb tripszin koncentrációt éri el. Az egér Ctrc az autolízis hurokban található Phe150-Gly151 peptidkötés hasításával szabályozza az egér tripszinogének autoaktivációját, mely hasadás eredményeként a T8 és T9 izoformák autoaktivációja majdnem teljesen gátlódik.

A T8 és T9 izoformák autoaktivációjának Ctrc-függő gátlása kialakulhatott annak érdekében, hogy megvédje a hasnyálmirigyet az aktiválódó tripszinogéntől. Amennyiben ez a feltételezés igaz, abban az esetben a peptidkötés kimotripszin-függő hasadása funkcionálisan hasonló szerepet tölt be, mint a CTRC szabályozó szerepe a humán kationos tripszinogén autoaktiválódásában. A mechanizmus az egér tripszinogének esetében azonban az emberi tripszinogéneknél megismert jelenséghez képest eltérő, eddig nem ismert szabályozó mechanizmussal történik.

A tripszinogének fiziológias aktivátora az enterokináz, amely aktiváló hatását a patkóbélben fejt ki. Kísérleteinkben megfigyeltük, hogy a Phe150-Gly151 peptidkötés hasadása nem csak az autoaktivációt, de az enterokináz általi aktivációt is gátolja. Az emésztés fiziológias helyén a tripszinogén aktiváció hatékonyságának Ctrc-függő csökkenése nem tűnik logikusnak, azonban elképzelhető, hogy a tripszinogén aktiváció kinetikájának időbeni megnyúlása előnyös az emésztés hatékonysága szempontjából.

A kationos tripszinogén p.R122H mutációja az emberekben előforduló örökletes hasnyálmirigy-gyulladás leggyakoribb oka. Kísérletes tapasztalataink alapján kijelenthetjük, hogy a humán kationos tripszinogén p.R122H mutánsának analógiájára létrehozott egér tripszinogén mutánsok nem mutatták a humán patogén fenotípusra jellemző biokémiai tulajdonságokat. Örökletes pankreatitisz modellezésére egérben a p.R122H egér tripszinogén mutánsok nem alkalmasak.

6. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS ÚJ EREDMÉNYEK

1. Megerősítettük azokat a korábbi megfigyeléseket, amelyek igazolták, hogy a α -defenzin koncentrációja a vérplazmában jelentős mértékben emelkedett cukorbetegekben az egészséges populációhoz képest. Saját vizsgálataink során azt találtuk, hogy mind a kontrollpopulációhoz képest, mind pedig a szövődménymentes cukorbeteghez képest szignifikánsan magasabb a HNP 1-3 szint azon cukorbetegek vérében, akiknél szövődményként nephropátia, neuropátia vagy szív-érrendszeri megbetegedés áll fenn mind 1-es, és 2-es típusú diabetes-ben.

2. Eredményeink azt mutatták, hogy mind a kontrollpopulációban, mind a cukorbetegekben a *DEFA1 / DEFA3* gének összesített, diploid genomra értendő medián kópiaszáma 10. Nem találtunk összefüggést a *DEFA1 / DEFA3* génkópiaszám és mRNS expresszió szintje, valamint a *DEFA1 / DEFA3* génkópiaszám és a α -defenzin fehérje (HNP 1-3) vérplazmában mérhető koncentrációja között. Ezen eredmények azt bizonyítják, hogy a magas α -defenzin szint diabetes-ben nem genetikailag meghatározott.

3. A *DEFBI* gén c.-44C>G egynukleotidos polimorfizmusának vizsgálatából kiderült, hogy a C allél szignifikánsan gyakrabban fordul elő cukorbetegekben, mint az egészséges kontrollpopulációban, amely arra utal, hogy a csökkent β 1-defenzin termelésnek szerepe lehet a diabetes mellitus és szövődményeinek (nephropátia, neuropátia) kialakulásában.

4. Az egér hasnyálmirigyben fiziológiás körülmények között 4 különböző tripszinogén izoforma fejeződik ki nagy mennyiségben: T7, T8, T9 és T20. A T7, T8 és T9 izoformák 1 mM kalciumban, pH=8,0-on autoaktiválódnak, míg a T20 az említett körülmények között nem képes autoaktivációra.

5. Az autolízis hurok a T8 és T9 izoformákban jelentős mértékben hasad Ctrc és Ctrb hatására, mely hasadás szinte teljes mértékben meggátolja a T8 és T9 izoformák autoaktivációját. Ezzel ellentétben a Ctrc-nek és Ctrb-nek nincs jelentős hatása a T7 izoforma autoaktivációjára.

6. A p.R122H mutáció nem változtatja meg lényegesen a T7 és T8 egér tripszinogének autoaktivációját. Ezért ezen mutánsok biokémiai tulajdonságai nem hasonlítanak a humán kationos tripszinogén patogén p.R122H mutánsához.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Őszinte köszönetem fejezem ki témavezetőimnek, Prof. Dr. Mándi Yvette-nek és Prof. Dr. Sahin-Tóth Miklósnak, hogy megismertették velem az immunbiológia és biokémia csodálatos világát. Mindig csodáltam tudományos gondolkodásukat, szerteágazó tudásukat és újszerű ötleteiket. Hálás vagyok a doktori tanulmányaim során mutatott türelmes és törődő útmutatásukért és a tudományos pálya választása iránti lelkesítésükért.

Külön köszönetem fejezem ki Dr. Somogyvári Ferencnek, aki felkeltette a PCR technika széleskörű alkalmazása iránti érdeklődésemet.

Köszönetem fejezem ki a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet munkatársainak, különösképpen Dr. Burián Katalin, Dr. Megyeri Klára, Dr. Tizslavicz Zoltán László, Horváth Ádám és Dr. Szekeres Márta által nyújtott segítségért és tanácsokért. Müllerné Deák Györgyinek és Ábrahám Mariannak köszönöm a kitűnő labortechnikai és gyakorlati segítséget, Rosztóczy Zsuzsannának és Bognár Renátának a szakszerű adminisztrációs munkát.

Szeretném továbbá megköszönni a Boston University-n működő Henry M. Goldman School of Dental Medicine, Department of Medical and Cell Biology munkatársainak, hogy tanulmányaimat segítették. Különösképpen Dr. Szabó András, Dr. Schnúr Andrea, Dr. Geisz Andrea, Dr. Balázs Anita, Maren Ludwig, Dr. Sebastian Beer, Dr. Jiayi Zhou, Dr. Bence Melinda és Sahin-Tóth Vera segítségét emelem ki.

Nagy örömmre szolgál, hogy doktori tanulmányaim során segítségemre voltak kutatótársaink, Dr. Walter Halangk és Dr. Thomas Wartman (Department of Surgery, Otto-von-Guericke University of Magdeburg), továbbá klinikai partnereink: Dr. Várkonyi Tamás, Dr. Lengyel Csaba, Dr. Fehértemplomi Katalin, Dr. Nyiraty Szabolcs, Dr. Laurentzi Rita a Szegedi Tudományegyetem I. sz. Belgyógyászati Klinikájáról, Prof. Dr. Kempler Péter a Semmelweis Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinikájáról, Dr. Szolnoki Zoltán a Békés Megyei Pándy Kálmán Megyei Kórházból, Dr. Sztriha László és Prof. Dr. Vécsei László a Szegedi Tudományegyetem MTA Neurológiai és Idegtudományi Kutatócsoportjából.

Nagyra értékelem Borbás János segítségét a <http://www.pancreasgenetics.org/> honlap elkészítéséért és karbantartásáért. Továbbá köszönetem fejezem ki Dr. Amanda Watkinsnak és Martin Minns-nek, az angol nyelvű tézisem nyelvi lektorálásáért.

Szegedi munkánkat a Kutatóegyetemi Kiválósági Központ létrehozását támogató TÁMOP-4.2.2.A-11-1-KONV-2012-0035, és a TÁMOP-4.2.2.B-10/1-KONV-2010-0012 pályázatok segítették. Bostonban végzett munkánkat a National Institutes of Health (NIH)

ösztöndíjak segítették (R01DK058088, R01DK082412, R01DK082412-S2 és R01DK095753 (to M. S.-T.)), valamint a Deutsche Forschungsgemeinschaft is támogatta (DFG HA2080/7-1).

Tézisemet ajánlom szeretett szüleimnek, Varga Máriának és Németh Miklósnak, akiknek mélységes tisztelettel köszönöm a tanulmányaim során nyújtott állandó szeretetét, támogatását és bátorítását.