

**A Toll-like receptor 4 polimorfizmus vizsgálata
szubklinikus és krónikus gyulladással járó
betegségekben
(diabetes mellitus, stroke, periodontitis)
Doktori értekezés**

Dr. Reismann Péter

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
Doktori Iskola vezető: Dr. Tulassay Zsolt
egyetemi tanár, akadémikus



Témavezető: Dr. Rác Károly
egyetemi tanár, az orvostudományok doktora
Opponensek: Dr. Cseh Károly
egyetemi tanár, az orvostudományok doktora
Dr. Bencsik Zsuzsanna
főorvos, PhD

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Madácsy László, az orvostudományok doktora
Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Alföldi Sándor, egyetemi docens
Dr. Hosszúfalusi Nóra, egyetemi docens

Budapest, 2009

I. Bevezetés

A természetes immunválasz számos szolúbilis, sejtfelszíni és intracelluláris érzékelő mechanizmust alkalmaz a lehetséges kórokozók, káros anyagok mihamarabbi felismeréséhez és eliminálásához. A szöveti homeosztázist felborító behatások a természetes immunválasz aktiválásán keresztül akut fázis reakciót indítanak el. A természetes immunválaszban résztvevő sejtek felszínén, illetve intracellulárisan olyan receptorok találhatóak, amelyek egy konzervált struktúrát vagy molekuláris jellemzőt, például egy PAMP-ot (pathogen associated molecular pattern: kórokozó-asszociált molekuláris mintázat) ismernek fel. Ezek a PRR, mintázatot felismerő receptorok (pattern recognition receptor). Ilyen PRR a Toll-like receptor, amely a természetes immunválasz egyik központi eleme. A TLR családnak jelenleg 10 receptora ismert. Ezek közül a mai napig a legjobban megismert receptor a TLR4. A TLR4 főbb ligandjai a Gram-negatív baktériumok lipopoliszacharidja, a hősokk fehérje 60, 70, a taxol, az oxidált alacsony denzitású lipoprotein, a fibronektin. A

TLR4 aktiváció az Nf- κ B-n keresztül proinflammatorikus citokin expressziót indít el.

A humán TLR4 génnek ismert két co-szegregációs polimorfizmusa. A cDNS-en a start kodontól 3' irányba, a 896. pozícióban az adenin (A) helyett guanin (G) épül be (dbSNP adatbázisban: rs4986790). Ez a *missense mutáció* a TLR4 harmadik exonján a fehérjeszintézis során, a 299-es pozícióban egy konzervatív Aszparaginsav (Asp) helyett egy Glicin (Gly) aminosav beépülését okozza. Az Asp299Gly polimorfizmussal gyakran együtt jelentkezik a 399-es pozícióban egy nem-konzervatív Threonin (Thr) és Izoleucin (Ile) aminosav csere. A Thr399Ile aminosav csere alapja, hogy a start kodontól 3' irányba, az 1196. pozícióban citozin (C) helyett timin (T) található (db SNP adatbázisban: rs4986791). Mindkét aminosav csere a TLR4 receptor extracelluláris régióját érinti. A polimorfizmusok előfordulási gyakorisága kaukázusi populációban 10% körüli.

Klinikai vizsgálatok alapján a TLR4 polimorfizmust hordozó személyekben csökkent az LPS inhalációra adott immunválasz, nagyobb a Gram-negatív baktérium okozta

fertőzés kockázata. Eset-kontroll vizsgálatok eredményei kimutatták, hogy a TLR4 funkcionális polimorfizmusa a gyulladós bélbetegségekkel asszociált.

A prospektív, populációs mintán alapuló Bruneck tanulmány kimutatta, hogy a TLR4 polimorfizmus növelte a súlyos bakteriális fertőzés kockázatát, azonban csökkentette az artéria carotis atheroszklerózisának kockázatát. Továbbá, az Asp299Gly TLR4 polimorfizmust hordozókon a carotis artérián kisebb intima-média vastagságot mutattak ki a vad típust hordozókkal összehasonlítva. A REGRESS vizsgálat alapján az Asp299Gly SNP-t hordozóknál a pravastatin terápia szignifikánsan hatékonyabbnak bizonyult a kardiovaszkuláris események számának csökkentésében a vad típust hordozókkal összehasonlítva.

A fenti vizsgálati eredmények alapján felmerült, hogy a TLR4 és a természetes immunválasz nemcsak a fertőzések eredetű betegségekben játszhat kulcsszerepet, hanem behatással lehet olyan, nem fertőzések eredetű, de krónikus gyulladással járó folyamatokban is, mint az atheroszklerózis és súlyos szövődménye, az ischaemias stroke, vagy a diabetes mellitus és kísérő szövődményei.

II. Célkitűzés.

Három, a modern társadalomban gyakori betegség és a TLR4 gén koszegregációs, funkcionális polimorfizmusa (Asp299Gly és Thr399Ile) közötti összefüggés vizsgálatát tűztük ki célul. Ennek megfelelően három különálló kutatási tervet állítottunk fel.

II. 1. Az I. számú vizsgálat alapja és célkitűzése:

A természetes immunválasz szerepet játszhat mind az 1-es, mind a 2-es típusú diabetes mellitus és a diabeteses késői szövődmények kialakulásában. A természetes immunitás TLR4-függő útvonalainak jelentősége a diabeteses szövődmények kórélettanában azonban még nem ismert. Az I. számú vizsgálat célkitűzése a TLR4 gén Asp299Gly/Thr399Ile funkcionális polimorfizmusa valamint a diabeteses nephropathia és a perifériás neuropathia közötti lehetséges összefüggés vizsgálata volt 1-es és 2-es típusú cukorbetegségben.

II. 2. A II. számú vizsgálat alapja és célkitűzése:

A TLR4 Asp299Gly polimorfizmusa csökkent gyulladásoos citokinprofíllal, csökkent carotis artéria atheroszklerozis kockázattal és kisebb carotis artéria

intima-media falvastagsággal társul. A carotis artéria atheroszklerozisa klasszikus kockázati tényezőként szerepel az ischaemias stroke kialakulásában. Nem ismert, vajon a TLR4 gén polimorfizmusa befolyásolhatja-e az ischaemias stroke kialakulásának kockázatát. A II. számú vizsgálat célkitűzése az ischaemias agyi történések és a TLR4 gén Asp299Gly/Thr399Ile polimorfizmusa közötti lehetséges kapcsolat vizsgálata volt.

II. 3. A III. számú vizsgálat alapja és célkitűzése:

A periodontitis kialakulásában döntő szerepe van a Gram-negatív baktériumok kiváltotta gyulladásnak. A TLR4 gén funkcionális polimorfizmusa csökkentheti a Gram-negatív baktériumok elleni védekező reakciót. Nem tisztázott, vajon a TLR4 polimorfizmus befolyásolja-e a periodontitis kialakulását. A III. számú vizsgálatban célul tűztük ki a krónikus periodontitis és a TLR4 gén Asp299Gly/Thr399Ile polimorfizmus közötti lehetséges kapcsolat vizsgálatát.

III. Módszerek.

A DNS mintát perifériás vérből izolált mononukleáris sejtekből nyertük. A koszegregációs polimorfizmust polimeráz láncreakcióval és azt követő restrikciós endonukleáz hasítással detektáltuk.

A betegeket a heidelbergi Egyetemi Klinika járóbeteg rendelésen illetve stroke fekvőbeteg osztályon választottuk ki.

IV. Eredmények.

I. vizsgálat eredménye: Az 1-es típusú diabetes mellitus (1TDM) csoport 246 betege közül 27-en voltak heterozigóta hordozók a TLR4 polimorfizmusra. A 2-es típusú diabetes mellitus csoportban 530 személy közül 65 volt heterozigóta hordozó mindkét polimorfizmusra. Mindössze 1 beteg volt homozigóta mindkét polimorfizmus allélra. Az 1TDM csoportban a genotípus eloszlás nem különbözött sem a veseérintettség, sem a perifériás idegzavar tekintetében. A 2TDM csoportban a nephropathias szövődményt vizsgálva szintén nem mutatott különbséget a genotípus eloszlás. Azonban a perifériás neuropathia elemzésekor a 2-es típusú

cukorbeteg csoportban erős asszociációt mutatott az TLR4 Asp299Gly és a Thr399Ile genotípus a perifériás neuropathia előfordulásával ($p = 0.0002$; $OR = 0.35$ [95% CI: 0.19-0,61]).

II. vizsgálat eredménye:

Három különböző vizsgálati csoportot elemeztünk. Egy magas kockázatú csoportot: cukorbeteg populációt ($n_d=776$), és két eset-kontroll csoportot ($n_1=267$ illetve $n_2=375$). Egyik csoportban sem mutatkozott összefüggés a polimorfizmus hordozása és az ischaemiás agyi történet előfordulása között ($p_d = 0.812$ $OR_d = 1.13$, 95%CI_d:0.45-2.78; $p_1 = 0.572$; $OR_1 = 1.26$; 95%CI₁:0.57-2.8; $p_2 = 0.106$; $OR_2 = 1.83$; 95%CI₂: 0.88-3.8).

III. vizsgálat eredménye:

129 személyt, 85 periodontitisben szenvedő és 54 kontroll személyt elemeztünk. 12 személynél találtuk a TLR4 gén heterozigóta polimorfizmusát. Az egyváltozós statisztikai számításban a periodontitis és a TLR4 genotípus közti összefüggés a szignifikancia határához közeli értéket adott, de azt el nem érte. A periodontális paramétereket vizsgálva az Asp299Gly és Thr399Ile TLR4 genotípust hordozóknál azonban szignifikánsan

nagyobb csontvesztés és ínytapadási veszteség volt kimutatható.

V. Következtetések.

- A Toll-like receptor 4 gén Asp299Gly és Thr399Ile polimorfizmus gyakorisága nem különbözik 1-es és 2-es típusú cukorbetegségben és nem különbözik a populációs átlagtól.

- A TLR4 gén Asp299Gly és Thr399Ile polimorfizmust hordozó 2-es típusú cukorbetegekben a perifériás neuropathia előfordulása szignifikánsabb alacsonyabb a vad típust hordozókhöz képest.

- A TLR4 gén Asp299Gly és Thr399Ile polimorfizmus nem befolyásolja az agyi ischaemias történés kockázatát.

- A TLR4 gén Asp299Gly és Thr399Ile polimorfizmus nem elégséges genetikai marker a krónikus periodontitis kockázatának felméréséhez.

VI. Saját publikációk:

VI. 1. Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

- Rudofsky G jr ^{*}, **Reismann P^{*}**, Witte S, Humpert PM, Isemann B, Chavakis T, Tafel J, Nosikov VV, Hamann A, Nawroth P, Bierhaus A (2004) *Asp299Gly and Thr399Ile genotypes of the TLR4 gene are associated with a reduced prevalence of diabetic neuropathy in patients with type 2 diabetes.* Diabetes Care 27(1): 179-83.
- **Reismann P^{*}**, Lichy C ^{*}, Rudofsky G, Humpert PM, Genius J, Si TD, Dörfer C, Grau AJ, Hamann A, Hacke W, Nawroth P, Bierhaus A (2004) *Lack of association between polymorphisms of the toll-like receptor 4 gene and cerebral ischemia.* J Neurol. 251(7):853-8.
- **Reismann P**, Lichy C, Rudofsky G, Meiser H, Nawroth P, Staehle HJ, Bierhaus A, Dörfer C. (2007) TLR4-polymorphism and the risk of chronic periodontitis. Perio 4(1):41-45.
- **Reismann P**, Racz K, Tulassay Zs. (2008) *A Toll-like receptor 4 génpolimorfizmusok valamint lehetséges klinikai szerepük fertőzésekben és krónikus gyulladós betegségekben.* Orv. Hetil 149 (38): 1791-9.

VI. 2. Disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

- Rudofsky Jr G, **Reismann P**, Schiekofer S, Petrov D, Eynatten M, Humpert PM, Isermann B, Muller-Hoff C, Thai TP, Lichtenstein S, Bartsch U, Hamann A, Nawroth P, Bierhaus A. (2004) *Reduction of postprandial hyperglycemia in patients with type 2 diabetes reduces NF-kappaB activation in PBMCs*. Horm Metab Res. 36(9):630-8.
- Rudofsky Jr G, Schlimme M, Schlotterer A, von Eynatten M, **Reismann P**, Tafel J, Grafe I, Morcos M, Nawroth P, Bierhaus A, Hamann A. (2005) *No association of the 94T/G polymorphism in the adiponectin gene with diabetic complications*. Diabetes Obes Metab. 7(4):455-9.
- Humpert PM, Battista MJ, Lammert A, **Reismann P**, Djuric Z, Rudofsky G Jr, Zorn M, Morcos M, Hammes HP, Nawroth P, Bierhaus A. (2006) *Association of stroma cell-derived factor 1 genotype with diabetic foot syndrome and macrovascular disease in patients with type 2 diabetes*. Clin Chem. 52(6):1206-8.
- Lichy C, Kloss M, **Reismann P**, Genius J, Grau A, Reuner K. (2007) *No evidence for plasminogen activator inhibitor 1 4G/4G genotype as risk factor for cerebral venous thrombosis*. J Neurol. 254(8):1124-5.

- Rudofsky G Jr, **Reismann P**, Grafe IA, Konrade I, Djuric Z, Tafel J, Buchbinder S, Zorn M, Humpert PM, Hamann A, Morcos M, Nawroth PP, Bierhaus A. (2007) *Improved vascular function upon pioglitazone treatment in type 2 diabetes is not associated with changes in mononuclear Nf-kappaB binding activity.* Horm Metab Res 39(9):665-71.
- **Reismann P**, Varga I, Patócs A, Gergics P, Tóth M, Szücs N, Gláz E, Rác K, Tulassay Zs. (2007) *A hormonvizsgálatok fejlődésének 50 éve, nemzetközi visszatekintés és hazai tapasztalatok.* Magy Belorv Arch 60:129-134.
- **Reismann P**, Rác K. (2008) *A polycystas ovarium szindóma patogenetika háttere.* Diab Hung. Suppl. 2. 6-13.
- **Reismann P**, Tulassay Zs. (2008) *Lizoszóma tárolási rendellenességek kezelési lehetőségei.* Orv. Hetil 149(25):1171-9.