

A PPARG2 – P12A és PC1 – K121Q génpolimorfizmusok kölcsönhatása a metabolikus szindróma kialakításában

Csép Katalin, Dudutz Gyöngyi, Pașcanu Ionela, Bănescu Claudia
Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem

Interacțiunea polimorfismelor genice PPARG2 – P12A și PC1 – K121Q în dezvoltarea sindromului metabolic

Gena PPARG2 influențează prin mai multe căi metabolismul lipidic și glucidic, iar polimorfismul P12A a fost frecvent asociat cu tulburări metabolice. PC1 interacționează direct cu receptorul insulinic, iar polimorfismul K121Q al genei poate induce rezistență la insulină. Am investigat interacțiunea a celor două snip-uri la populația autohtonă conform ipotezei elaborate de Baratta și colab. la italieni. Am observat o diferență semnificativă în cazul combinațiilor genotipice PP+KQ/QQ vs. de PP+KK în cazul glicemiei, rezistenței la insulină, greutateii corporale și circumferinței taliei, valorilor lipidice din ser și al tensiunii arteriale ($p < 0,05$), dar nu și în cazul grupurilor PA/AA+KQ/QQ vs. PA/AA+KK. Riscul pentru dezvoltarea sindromului metabolic în cazul combinației PP+KQ/QQ comparativ cu restul combinațiilor genotipice, a fost semnificativ crescut (OR: 9,25, $p < 0,001$). Aceste rezultate confirmă efectul epistatic între cele două polimorfisme și sugerează interacțiuni genice complexe implicate în dezvoltarea sindromului metabolic.

Cuvinte cheie: sindrom metabolic, PPARG2, PC1, epistază

Interaction of the PPARG2 – P12A and PC1 – K121Q gene polymorphisms in the development of the metabolic syndrome

The PPARG2 gene influences the lipid and carbohydrate metabolism via multiple pathways and the P12A polymorphism was frequently reported to be associated with metabolic anomalies. The PC1 interacts directly with the insulin receptor, and the K121Q polymorphism of the gene may induce insulin resistance. We investigated the interaction between the two snips in the local population as suggested by Baratta et al. in Italians. We found significant difference in the case of the PP+KQ/QQ vs. PP+KK genotype combination in the case of fasting glucose, insulin resistance, body weight and waist circumference, blood lipids and blood pressure ($p < 0,05$), but not in the case of the PA/AA+KQ/QQ vs. PA/AA+KK groups. The risk for developing the metabolic syndrome in the case of the PP+KQ/QQ as compared to the rest of genotype combinations was significantly increased (OR: 9,25, $p < 0,001$). These results confirm the epistatic effect between the two snips and suggest complex gene interactions involved in the development of the metabolic syndrome.

Key words: metabolic syndrome, PPARG2, PC1, epistasis

Orvostudományi Értesítő, 2008, 81 (3): 195-198

www.orvtudert.ro

Az elhízás, 2. típusú cukorbetegség, magas vérnyomás és egyéb – a metabolikus szindrómával rokon – anyagcsere-zavarok heterogén etiopatogenezissel rendelkeznek, ám a leggyakoribb formák multifaktoriális eredetűek, azaz genetikai és környezeti tényezők okozzák kialakulásukat. A genetikai komponenst rendszerint egy poligénes rendszer képezi, amely a betegséggel kapcsolatos veleszületett fogékonyságért felelős. A poligénes rendszeren belül a gének kölcsönhatásban állnak egymással. A legegyszerűbb és elterjedt génkölcsönhatás additív, azaz az egyes minor gének hatása összeadódik. Valószínűsíthető, hogy az egyes gének kumulatív hatása nem egyenlő, gyakran egyenlőtlen. A minor gének major génekkel is kölcsönhatásban lehetnek, oligogénes rendszerek keretén belül. Megjegyzendő, hogy a gének változatos kombinációi a környezeti tényezőkkel bonyolult, rendszerint ismeretlen kölcsönhatásban eredményezik végül a kóros fenotípus megjelenését.

Feltételezhető, hogy a poligénes rendszeren belül az additív kölcsönhatáson kívül egyéb jelenségek is érvényesülnek, ám ezekre csak most kezd fény derülni. Így például, Barrett és mtsai. az inzulinrezisztencia kialakításában két génpolimorfizmus – a PPARG2 - P12A és a PC1 - K121Q között – episztázist mutattak ki a szicíliai lakosoknál [5]. Előző tanulmányainkban, a helyi lakosságnál, az IDF (IDF – International Diabetes Federation) kritériumai alapján diagnosztizált metabolikus szindróma esetében a PPARG2 - P12A génpolimorfizmus jelenlétében a kockázat enyhe, de statisztikailag szignifikáns emelkedését tapasztaltuk, ám a PC1 - K121Q polimorfizmus esetében hasonló hatást nem sikerült kimutatni [7, 8]. Így jelen tanulmányunkban a két SNP (single nucleotide polymorphism, snip) együttes hatásának vizsgálatát tűztük ki célul.

Anyag és módszer

178 középkorú marosvásárhelyi személynél antropometriai méréseket, biokémiai vizsgálatokat és genetikai analíziseket végeztünk. A biokémiai vizsgálatokat a Megyei Kórház Központi Laboratóriumában, Hitachi® 717 Roche segítségével határozták meg. Az éhomi inzulinszintet ELISA módszerrel mértük (DakoCytomation Insulin kit). Az inzulin-érzékenységet a HOMA-IR index számításával ítéltük meg [9]. A metabolikus szindróma diagnózisát az IDF 2005-ös ajánlásainak megfelelően állítottuk fel [11].

A DNS polimorfizmusokat PCR - RFLP módszerrel mutattuk ki. Az amplifikációt, 2 U AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) felhasználásával, 1,5 mM MgCl₂ jelenlétében, a PPARG-A: 5'-GCCAATTCAAGCCAGTC-3' és

PPARG-B: 5'-GATATGTTGCAGACAGTGTATCAGTGAAGGAATCGCTTTCCG-3' illetve PC1-A: 5'-CTGTGTTCACTTTGGACATGTTG-3'

PC1-B: 5'-GACGTTGGAAGATAACCAGGTTG-3' primerek (Integrated DNA Technologies, Inc.) segítségével végeztük. A PPARG2 - P12A polimorfizmus kimutatására BstU I, míg a PC - K121Q esetében Ava II (NewEngland Biolabs Inc.) restriktív enzimet használtunk, és az enzimátikus hasítás után az elektroforézis 2,5 % - os agaróz gélben végeztük.

A statisztikai számításokat GraphPad InStat 3 (GraphPad InStat version 3.00 for Windows 95) számítógépes programmal végeztük. Statisztikailag szignifikánsnak tekintettük a $p < 0,05$ összefüggéseket.



Dr. Csép Katalin

UMF – Disciplina de Genetică, 540139 Marosvásárhely – Tg. Mureș, str. Gh. Marinescu 38
e-mail: genetica@umftgm.ro

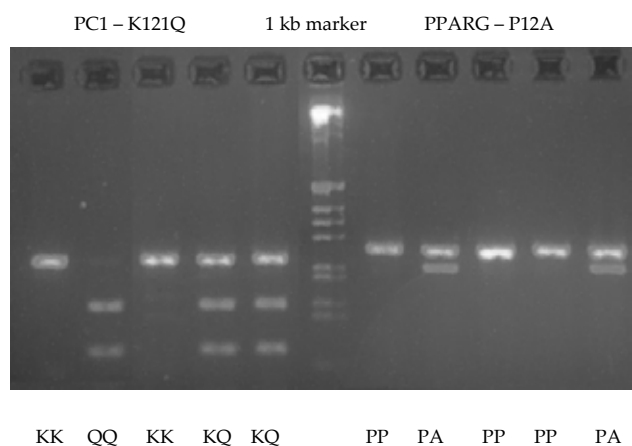
Eredmények

A vizsgált 178 személy átlagéletkora $59,8 \pm 12,19$ év (61) volt, míg a nemek megoszlása a csoporton belül 45,5 % nő és 54,5 % férfi. A csoport metabolikus jellemzését az **1. táblázatban** tüntettük fel.

1. táblázat. A vizsgálati csoport metabolikus jellemzése

	Átlag	SD	Medián	Min	Max
Éhomi vércukor szint (mg/dl)	111,49	25,79	99,95	67	222,6
Éhomi inzulinémia (μ U/ml)	11,54	5,08	9,55	2,6	36,25
HOMA-IR	3,03	1,19	2,97	0,7	17,07
Testsúly (kg)	81,41	19,33	78,5	43	143
Testtömeg index	29,30	6,81	28,51	18,21	60,59
Derékbőség (cm)	103,5	15,47	104	74	144
Derék-csípő hányados	0,95	0,07	0,96	0,68	1,17
Triglicerid (mg/dl)	180,50	40,47	149,5	38	810
HDL-koleszterin (mg/dl)	51,11	15,95	49	18	89
Teljes koleszterin (mg/dl)	211,92	45,64	210	70	359
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	146,24	23,46	145	90	205
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	85,41	12,10	85	55	125

A genotípus megállapítása a restrikciós fragmentumok elektroforetikus képe alapján, az **1. ábrán** bemutatott példa



1. ábra. A genotípus megállapítása a restrikciós fragmentumok elektroforézisé alapján

szerint történt.

Az egyes metabolikus paraméterek változása (átlagérték \pm SD, zárójelben a medián) a genotípus kombináció szerint a **2. és 3. táblázatban** van feltüntetve.

A 178 vizsgált személy közül a metabolikus szindróma jelenléte az IDF ajánlások alapján 106-nál volt felállítható. A metabolikus szindróma kockázata a PP + KQ/QQ genotípus esetében a PP + KK kombinációhoz viszonyítva OR = 7,97, CI95%: 2,6-24,38, $p < 0,0001$, míg a PP + KK valamint PA/AA + KK/KQ/QQ genotípus kombinációkhoz viszonyítva OR = 8,38, CI95%: 2,82-24,84, $p < 0,0001$ („Fisher’s exact test”, „two-sided p”).

Megbeszélés

A zsírsavak által aktivált PPARG2 gén (PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR-GAMMA; *601487, 3p25) transzkripció faktort kódol, amely az adipociták differenciációjában valamint az inzulin intracelleuláris jelátvitelében játszik szerepet. A CCG (Pro)

2. táblázat. Anyagcsere jellemzők a PC1 gén K121Q polimorfizmusa szerint a PPARG2 génre PP homozigóta genotípus esetében

	PP (n = 125)		p*
	KK (n = 86)	KQ/QQ (n = 39)	
Éhomi vércukor szint (mg/dl)	104,75 \pm 3,35 (98,2)	128,73 \pm 7,4 (114,2)	0,002
Éhomi inzulinémia (μ U/ml)	11,37 \pm 7,94 (9,68)	12,86 \pm 9,56 (10,44)	0,4
HOMA-IR	2,72 \pm 2,86 (1,95)	4,07 \pm 3,75 (2,88)	0,02
Testsúly (kg)	77,37 \pm 18,86 (75)	84,67 \pm 15,28 (84)	0,01
Testtömeg index	28,07 \pm 6,48 (27,75)	30,82 \pm 5,75 (30,05)	0,009
Derékbőség (cm)	100,81 \pm 16,68 (99,5)	106,99 \pm 11,69 (107)	0,01
Derék-csípő hányados	0,95 \pm 0,07 (0,95)	0,97 \pm 0,07 (0,97)	0,01
Triglicerid (mg/dl)	157,2 \pm 130,19 (125,5)	199 \pm 135,65 (180)	0,004
HDL-koleszterin (mg/dl)	53,35 \pm 20,11 (53,5)	50,09 \pm 15,14 (44,3)	0,02
Teljes koleszterin (mg/dl)	206,47 \pm 65,07 (201)	214,42 \pm 39,87 (215)	0,03
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	117,35 \pm 43,34 (125)	159 \pm 21,68 (155)	0,0001
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	97,15 \pm 10,64 (102)	91,62 \pm 9,97 (90)	0,0008

*Mann-Whitney-teszt

3. táblázat. Anyagcsere jellemzők a PC1 gén K121Q polimorfizmusa szerint a PPARG2 génre PA heterozigóta illetve AA homozigóta genotípus esetében

	PA + AA (n = 53)		p*
	KK (n = 37)	KQ/QQ (n = 16)	
Éhomi vércukor szint (mg/dl)	107,12 ± 19,01 (112,65)	100 ± 9,74 (96,5)	
Éhomi inzulinémia (µU/ml)	11,08 ± 7,81 (8,7)	10,24 ± 5,53 (7,47)	
HOMA-IR	2,9 ± 2,53 (2,15)	2,49 ± 1,82 (1,77)	
Testsúly (kg)	85,89 ± 23,49 (81)	84,83 ± 17,96 (85)	
Testtömeg index	30,36 ± 8,67 (28,44)	29,94 ± 5,91 (28,3)	
Derékbőség (cm)	105,75 ± 13,86 (107)	103,82 ± 19,31 (104,25)	>0,05
Derék-csipő hányados	0,95 ± 0,07 (0,98)	0,96 ± 0,09 (0,98)	
Triglicerid (mg/dl)	161,65 ± 99,85 (137)	201,81 ± 251,83 (132,5)	
HDL-koleszterin (mg/dl)	45,71 ± 9,77 (48,27)	49,95 ± 24,39 (48)	
Teljes koleszterin (mg/dl)	208,95 ± 52,04 (200)	215,19 ± 29,96 (218,5)	
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	141,21 ± 23,05 (141)	142,13 ± 16,35 (145)	
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	83,55 ± 11,92 (80)	84,96 ± 8,38 (85)	

*Mann-Whitney-teszt

→GCG (Ala) mutáció a 12. kodonban a kódolt fehérje szerkezetét jelentősen módosítja, és a PPARG2 által szabályozott gének aktiválódását lecsökkenti, így jobb inzulinérzékenységet eredményez [13]. Bár számos tanulmány igazolta ezt a hatást, az eredmények olykor ellentmondásosak. Így egyes tanulmányok az inzulinérzékenység csökkenésére utalnak a PP genotípus jelenlétében illetve fokozott kockázatot jelentenek a 2. típusú cukorbetegség kialakulására, ám más szerzőknek ezt az összefüggést nem sikerült igazolni, vagy éppen az elhízással szemben védő hatást mutattak ki [3, 4, 12]. Előző vizsgálatunkban a P12 allél jelenlétében, homozigóta genotípus mellett, a hazai populációban az IDF kritériumai alapján diagnosztizált metabolikus szindróma kockázatának enyhe, de statisztikailag szignifikáns emelkedését tapasztaltuk (PP vs. PA + AA: OR = 1,98, p < 0,05). Érvényesült tehát az A12 allél védő hatása az anyagcsere-zavarok kialakulásával szemben, a viszonylag magasabb testsúly ellenére. A P12 allélfrekvencia a beteg, illetve egészséges csoportban 76, illetve 65,7 % volt [7].

A PC1 gén (PLASMA CELL MEMBRANE GLYCOPROTEIN vagy ENPP1 - ECTONUCLEOTIDE

PYROPHOSPHATASE/ PHOSPHODIESTERASE 1, *173335, 6q22-q23) egy membrán glikoproteint kódol, amely az inzulinérzékenységet az inzulin receptor működése révén befolyásolja. Az α alegységgel kölcsönhatásába lépve erősen gátolja a receptor tirozin-kináz aktivitását, megzavarja a jelátvitelt, és így az inzulinérzékenységet csökkenti. A 4. exonban, az 533. pozícióban bekövetkező A→C mutáció okozta Lys121Gln szubsztitúció egyes tanulmányok szerint inzulinrezisztenciát okoz, bár ezt a hatást sok populációban nem sikerült igazolni [1, 2, 6, 10, 13, 14, 15]. Kutatásunk során, bár a Q allél nagyobb gyakoriságát tapasztaltuk a betegeknek, mint az egészséges kontrollcsoportban (22,47, illetve 18,19%), a polimorfizmus jelenlétében a metabolikus szindróma kockázatának statisztikailag jelentős növekedését nem sikerült kimutatni (OR = 1,38, p > 0,05), és az egyes anyagcsere paraméterek sem mutattak jelentős eltéréseket a genotípus szerint [8]. Természetesen mindezen eredmények nem zárják ki a polimorfizmus részvételét a vizsgált patológia kialakításában, tekintettel a kórkép heterogenitására, a gén-gén valamint gén-környezeti tényező jellegű kölcsönhatásokra.

A betegségek etiológiája leggyakrabban multifaktoriális, így genetikai és környezeti tényezők együttesen határozzák meg a kórkép kialakulását, gyakran a kóroki tényezők egyénre jellemző kombinációjában. A genetikai komponens legtöbbször poli- vagy oligogénesen meghatározott. A cukorbetegség, elhízás, magas vérnyomás, illetve a nehezen defineálható és vitatott metabolikus szindróma elterjedt formáiban nyilvánvaló mind a veleszületett hajlam, mind az életmód hatása. A veleszületett fogékonyág, azaz a genetikai komponens megismerése elősegítheti a fokozott kockázattal rendelkező személyek azonosítását, a betegség megjelenésének kivédését, ám a gyakran minor génhatások, a változatos, egyénre jellemző rizikó-gén kombinációk valamint az egyelőre többnyire tisztázatlan gén – gén és gén – környezet kölcsönhatások az áttörést hozó eredményeket késleltetik, bár a nagy hozamú módszerek megjelenése reményt kelt.

Az inzulinrezisztencia ritka és gyakori formáinak kialakításában egyaránt sikerült néhány gén kölcsönhatást kimutatni [16, 17]. Mindezek valószínűsítik a veleszületett hajlam poligénes eredetét. Ám a minor gének egyszerű additív hatásán kívül egyéb kölcsönhatások, így az episztázis is érvényesülhet. Baratta és mtsai 2003-ban szicíliaiainál mutatták ki, hogy a PC-1 gén Q121 alléljának az inzulinérzékenységre gyakorolt szignifikáns negatív hatása csak a PPARG2 gén PP genotípusa mellett érvényesül [5]. Bár az episztázis jellegű génkölcsönhatás az inzulinrezisztencia kialakításában állat modelleken már előzőleg ismert volt, és major gének esetében a súlyos humán inzulinrezisztencia egyes formáiban is leírták, ez a tanulmány igazolta először a kölcsönhatást a minor hatású kandidáns gének polimorfizmusa esetében is [13, 16].

Baratta és mtsai. 40 év alatti egészséges populáción az éhomi vércukorszint, inzulinémia és az inzulinrezisztencia különböző, többek között HOMA módszerrel megítélt értéke, esetében tapasztaltak jelentős eltérést a PP + KQ/QQ genotípus mellett a PP + KK genotípushoz viszonyítva.

Tanulmányuk elsődleges célja a génkölcönhatásnak az inzulinérzékenység szempontjából való követése volt. Ám megfigyelték, hogy az összefüggés érvényes úgy a normális testsúlyú, mint az elhízott egyének esetében.

Mindezek alapján a génkölcönhatás vizsgálatát tűztük ki célul a hazai populációban, ám az olasz vizsgálattól eltérően, egy hatvan év körüli, a kornak megfelelően anyagcsere elváltozásokkal gyakran rendelkező vizsgálati csoporton. A kóros anyagcsere elváltozások jelenléte, így az elhízás és 2. típusú cukorbetegség, vagy a magas vérnyomás nem jelentette a vizsgálatból való kizárást. A PP + KQ/QQ kombináció jelenlétében a PP + KK genotípushoz viszonyítva számos metabolikus paraméter – vércukorszint, testsúly, vérzsírok, vérnyomás – esetében is szignifikáns eltérést tapasztaltunk.

Ez az episztatikus génkölcönhatás egyben magyarázatot jelenthet a szakirodalomban gyakran felbukkanó ellentmondásokra, legalábbis a PPARG2 - P12A és PC1 - K121Q polimorfizmusokkal kapcsolatban, amelyet magunk is tapasztaltunk. Ugyanakkor a populációs különbségek, a kórkép heterogenitása is magyarázhatja az eltéréseket. Bár az inzulinrezisztencia megítélésében segítő HOMA-IR index szintén szignifikánsan magasabb a PP + KQ/QQ genotípus kombináció mellett, a metabolikus szindróma által körülírt anyagcserezavarok hátterében vélhetően nem egyetlen patogenetikai tényezőként szerepel.

A vizsgált személyek korlátozott száma, a viszonylag magas beteg arány (106 metabolikus szindrómásnak tekinthető, illetve 72 metabolikus szindrómával nem rendelkező személy), valamint a PP + KQ/QQ genotípus kombinációval rendelkező egészséges személyek alacsony száma befolyásolhatják a kapott értékeket, ám az összefüggés – az olasz tanulmányhoz hasonlóan – nem valószínű, hogy a véletlennek tulajdonítható, hiszen a PP + KQ/QQ gén kombináció negatív hatása több anyagcsere paraméter estében is megnyilvánul, és a szignifikancia értéke jelentős.

Mindezek alapján, úgy tűnik, hogy a PPARG2 – PP és a PC1 – KQ/QQ allélkombináció a metabolikus szindrómában foglalt anyagcserezavarokra hajlamosít a tanulmányozott helyi populációban.

Irodalom

- Abate N., Carulli L., Cabo-Chan A. et al. – *Genetic polymorphism PC-1 K121Q and ethnic susceptibility to insulin resistance*, J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88:5927-5934.
- Abate N., Chandalia M., Satija P. et al. – *ENPP1/PC-1 K121Q Polymorphism and Genetic Susceptibility to Type 2 Diabetes*, Diabetes, 2005, 54(4):1207-1213.
- Altshuler D., Hirschhorn J.N., Klannemark M. – *The common PPAR-gamma pro12ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes*, Nature Genet, 2000, 26:76-80.
- Ardlie K.G., Lunetta K.L., Seielstad M. – *Testing for population subdivision and association in four case-control studies*, Am J Hum Genet, 2002, 71: 304-311.
- Baratta R., Paola D., Spampinato D. et al. – *Evidence for genetic epistasis in human insulin resistance: the combined effect of PC-1 (K121Q) and PPARγ2 (P12A) polymorphisms*, J Mol Med, 2003, 81:718-723.
- Costanzo B.V., Trischitta V., Di Paola R. et al. – *The Q allele variant (GLN121) of membrane glycoprotein PC-1 interacts with the insulin receptor and inhibits insulin signaling more effectively than the common K allele variant (LYS121)*, Diabetes, 2001, 50(4):831-836.
- Csép K., Dudutz Gy., Vitay M. et al. – *The relationship between the Pro12Ala polymorphism of the PPARγ2 gene and the metabolic syndrome diagnosed according to the IDF criteria*, Acta Endocrinologica (Buc), 2008, 4(3).
- Csép K., Dudutz Gy., Vitay M. et al. – *Relația polimorfismului K121Q al genei PC1 cu sindromul metabolic diagnosticat conform criteriilor recomandate de IDF*, Revista de Medicină și Farmacie, Orvosi és Gyógyszerészeti Szemle, 2007, 3:200-203.
- Fukushima M., Taniguchi A., Sakai M. et al. – *Assessment of insulin sensitivity from a single sample*, Diabetes Care, 2000, 23:1434-1435.
- Gu H.F. – *Association between the human glycoprotein PC-1 gene and elevated glucose and insulin levels in a paired-sibling analysis*, 2000, Diabetes, 49:1601-1603.
- International Diabetes Federation – *The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome*. IDF, Brussels, 2005 (Accessed May 15, 2005, at site <http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Metasyndrome_definition.pdf>).
- Masud S., Ye S. – *Effect of the peroxisome proliferator activated receptor-gamma gene pro12ala variant on body mass index: a meta-analysis*, J Med Genet, 2003, 40:773-780.
- OMIM. – *Mendelian Inheritance in Man* (Accessed July 29, 2008, at site <<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM/>>).
- Pizzuti A., Frittita L., Argiolas A. et al. – *A polymorphism (K121Q) of the human glycoprotein PC-1 gene coding region is strongly associated with insulin resistance*, Diabetes, 1999, 48:1881-1884.
- Rasmussen S.K., Urhammer S.A., Pizzuti A. et al. – *The K121Q variant of the human PC-1 gene is not associated with insulin resistance or type 2 diabetes among Danish Caucasians*, Diabetes, 2000, 49(9):1608-1611.
- Savage D.B. – *Digenic inheritance of severe insulin resistance in a human pedigree*, Nat Genet, 2002, 31:379-384.
- Stumvoll M. – *Interaction effect between common polymorphisms in PPARγ (2) (Pro12Ala) and insulin receptor substrate 1 (Gly972Arg) on insulin sensitivity*, J Mol Med, 2002, 80:33-38.