

POLIMORFIZAM 4G/5G U PROMOTORSKOJ REGIJI GENA ZA INHIBITOR AKTIVATORA PLAZMINOGENA-1 KAO RIZIČNI ČIMBENIK U MULTIPLOJ SKLEROZI

4G/5G POLYMORPHISM IN PROMOTER REGION OF PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR-1 GENE AS RISK FACTOR IN MULTIPLE SCLEROSIS

Smiljana Ristić¹, Nada Starčević-Čizmarević¹, Juraj Sepčić², Josip Rudež³, Marija Crnić-Martinović⁴, Vesna Barac-Latas⁵, Miljenko Kapović¹

SAŽETAK

Da bi se ispitalo moguće značenje proteolitičkih mehanizama na razvoj upalnih lezija u MS-u, u radu je analiziran utjecaj polimorfizma 4G/5G u promotorskoj regiji gena za inhibitor aktivatora plazminogena-1 (PAI-1) na podložnost za MS i kliničku ekspresiju bolesti. Ispitanici su bili bolesnici iz Gorskog kotara s klinički sigurnim i laboratorijski potvrđenim sigurnim MS-om (N=46), a u kontrolnoj su skupini bili dobrovoljni davatelji krvi, autohtoni stanovnici iz istog područja (N=101). Rezultati su pokazali da se distribucija PAI-1 genotipova i alela u MS-bolesnika nije statistički razlikovala od učestalosti u zdravih ispitanika, a razlike nije bilo niti kada su uspoređeni pojedini subtipovi bolesti (PP, SP i RR) međusobno kao i sa zdravim ispitanicima. Nije bilo ni statistički značajne razlike u dobi nastupa i progresiji bolesti između pojedinih PAI-1 genotipova. Stoga možemo zaključiti da polimorfizam 4G/5G PAI-1 gena nema utjecaja na podložnost kao ni na ekspresiju bolesti u MS-bolesnika iz Gorskog kotara.

KLJUČNE RIJEČI: multipla skleroza, inhibitor aktivatora plazminogena-1, rizični čimbenik

ABSTRACT

In view of the potential importance of the proteolytic mechanisms in the development of MS lesions, the authors studied whether the 4G/5G promoter polymorphism of the plasminogen activator inhibitor 1 (PAI 1) gene may play a role in the clinical characteristics of Gorski kotar MS patients and their potential genetic susceptibility to MS. A total of 46 patients with clinically definite and laboratory supported MS were recruited from Gorski kotar region, while the control group consisted of 101 unrelated ethnically matched healthy blood donors. The distribution of PAI-1 genotypes and alleles in MS patients was similar to the distribution pattern in healthy donors. Furthermore, no association was observed between the PAI-1 promoter polymorphism and clinical characteristics, such as clinical course, age of disease onset and disease progression. Therefore, we can conclude that the 4G/5G promoter polymorphism of the PAI-1 gene does not influence the susceptibility to MS or the clinical characteristics of MS in Gorski kotar patients.

KEY WORDS: multiple sclerosis, plasminogen activator inhibitor 1, risk factor

UVOD

Multipla skleroza (MS) složena je bolest multifaktorijalne uzročnosti, za čiju su patogenezu potrebni genetički i okolišni čimbenici. Ulogu genetičkih čimbenika u MS-u

podupiru saznanja o povećanom relativnom riziku braće i sestara oboljelih (20–40 puta) u usporedbi s općom populacijom, kao i povećana konkordantna stopa u monozigotnih (25%–30%) u usporedbi s dizigotnim blizancima (5%).¹ Genetičke studije velikog broja obitelji s obiteljskom i/ili blizanačkom MS-om, sugeriraju da je MS poligenska bolest u kojoj je podložnost za bolest određena većim brojem gena koji djeluju neovisno ili epistatski.² Identifikacija gena s pomoću pozicijskog kloniranja, uključenih u patogenezu MS-a, slijedi uglavnom dva pravca. Prvi je pravac istraživanja polimorfnih gena čiji su produkti uključeni u imunološki odgovor – glavni kompleks histokompatibilnosti

Ustanova: ¹Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, ²Poslijediplomski studij, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, ³Klinika za neurologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, ⁴Zavod za transfuziologiju, KBC Rijeka, ⁵Zavod za fiziologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Prispjelo: 12. 4. 2004.

Prihvaćeno: 29. 4. 2004.

Adresa za dopisivanje: Prof. dr. sc. Smiljana Ristić, Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Rijeka, Braće Branchetta 20, 51000 Rijeka. Tel. 051/651181. e-mail: smiljana.ristic@mamed.medri.hr

(MHC), T-stanični receptorni geni, geni za tumorski faktor nekroze (TNF) i imunoglobulinski geni, koji redom pokazuju određeni genetički utjecaj na podložnost za MS. Drugi pravac su istraživanja genomske probira, koja identificiraju više od 19 lokusa podložnosti za MS, uključujući 5p14, 5q13, 6p21, 7q21, 17q22 i 19q13.² U nedavnim studijama pokazan je i utjecaj specifičnih genskih polimorfizama na podložnost i/ili ekspresiju MS-a.³⁻⁷ Rezultati tih istraživanja, s iznimkom MHC-gena, pokazali su se teško ponovljivim u ostalim populacijama. Različiti rezultati u navedenim studijama, koji se odnose na utjecaj različitih gena i lokusa, mogu se objasniti genetičkom i etiološkom heterogenosti u MS-u. Ta činjenica upućuje na to da određene populacije, poglavito one koje se odlikuju visokom incidencijom i prevalencijom za MS, predstavljaju izazovne modele za istraživanje te bolesti. U svijetu su takve istražene populacije rijetke: Orkney otoci u sjevernoj Škotskoj ($250/10^5$), Shetland otoci u sjeveroistočnoj Škotskoj ($100/10^5$) te Sardinija ($102/10^5$).⁸ Razlike u genetičkoj strukturi tih populacija, utvrđenih HLA-studijama, govore o značenju genetičke podloge za MS-podložnost te o potrebi nastavka takvih studija za procjenu genetičkih čimbenika u MS-u.

Cilj je ovog rada istraživanje specifičnog polimorfizma gena za inhibitor aktivatora plazminogena -1 (PAI-1) u MS-bolesnika Gorskog kotara (Hrvatska), još jednoj zoni visokog rizika za MS u Europi (prevalencija $143,5/10^5$)⁹ i njegova utjecaja na podložnost za MS i ekspresiju bolesti.

ISPITANICI I METODE

Ispitanici

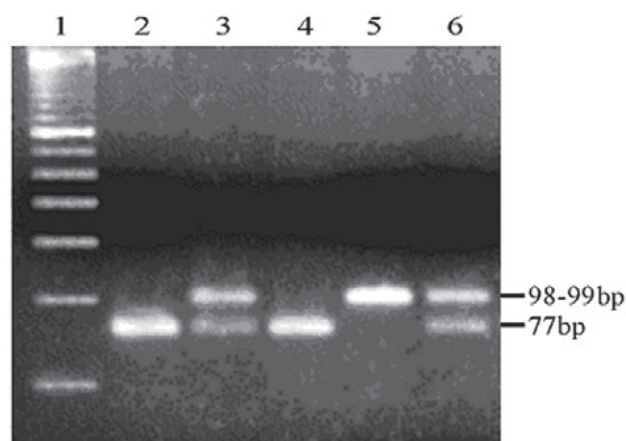
Analizirali smo 46 bolesnika – 24 žene i 22 muškarca (spolni indeks: 1,09) iz Gorskog kotara, slučajevi klinički sigurne i laboratorijski potkrijepljene sigurne multiple skleroze (kriteriji prema Ch. M. Poseru).¹⁰ Bolesnici su bili obrađeni prema protokolu *European Database for Multiple Sclerosis* (EDMUS).¹¹

U kontrolnoj skupini bili su zdravi dobrovoljni davatelji krvi (N=101), autohtoni stanovnici toga područja, nesrodni međusobno i s MS-bolesnicima.

Svi su ispitanici bili anketirani i nakon njihova pristanka uzeta im je periferna krv iz v. cubitalis.

Genotipizacija

DNA iz periferne krvi ispitanika bila je izolirana prema standardnom protokolu. Polimorfizam 4G/5G u promotorskoj regiji PAI-1 gena ustanovljen je s pomoću metode lančane reakcije polimeraze (PCR) prema uputama M. Luomala i suradnika.¹⁴ Slijedila je restrikcija PCR-produkata s Bsl-restrikcijskom endonukleazom.



Slika 1. Analiza PAI-1 genotipova. Linija 1: 50 bp DNA marker; linije 2,4: 5G5G genotip (77bp i 22 bp); linije 3,6: 4G5G genotip (98bp, 77bp i 22bp); linija 5: 4G4G genotip (98bp). Restrikcijski fragment od 22 bp ne vidi se na prikazanome gelu.

Figure 1 *PAI-1* genotype analysis. Line 1: 50 bp DNA marker; lines 2,4: 5G5G genotype (77bp and 22 bp); lines 3,6: 4G5G genotype (98bp, 77bp and 22bp); line 5: 4G4G genotype (98 bp). Restrictive fragment of 22 bp cannot be seen on the presented gel.

Restrikcijska smjesa inkubirana je tijekom 2,5 sata u vodenoj kupelji pri temperaturi od 55°C. Restrikcijski fragmenti provjeravani su elektroforezom na 4% agaroznom gelu, pri čemu su se jasno razlikovali 4G4G, 4G5G i 5G5G genotipovi (slika 1.).

Statistička obrada

Uporabom računalnih programa Statistica 6,0 i Epi 6, uspoređena je učestalost alela i genotipova između skupina MS-bolesnika i kontrole χ^2 i Fisherovim egzaktним testom. Početno doba i trajanje bolesti te stupnjevi invalidnosti u proširenoj ljestvici prema J. F. Kurtzkeu (EDSS)¹² i indeks progresije MS-a u bolesnika s različitim PAI-1 genotipovima, ispitani su ANOVA-one way testom. Statistička značajnost razlika izražena je na razini 0,05.

REZULTATI

Osnovne kliničke karakteristike MS-bolesnika prikazane su u tablici 1.

Trajanje bolesti određeno je razdobljem od početnog doba bolesti do zadnjega kliničkog pregleda, a indeks progresije kao odnos EDSS-a i trajanja bolesti.

Spol i dob između skupina MS-bolesnika i kontrole nisu bili statistički značajno različiti.

Tablica 1. Kliničke karakteristike MS-bolesnika iz Gorskog kotara, Hrvatska (N=46)

Table 1 *Clinical characteristics of MS patients from Gorski kotar region, Croatia (N=46)*

Spolni indeks	1,09
Dob nastupa bolesti ^a (godine)	27,6 (9,0)
Trajanje bolesti ^a (godine)	21,6 (11,1)
Primarno progresivni MS (PP) n (%)	5 (10,9)
Sekundarni MS (SP) n (%)	21 (45,6)
Relapsno-remitirajući MS (RR) n (%)	20 (43,5)
Stupnjevi invalidnosti (EDSS) ^b	6.0 (3,2)
Indeks progresije (PD) ^c	0.36 (0,25)

a, b, c. vrijednosti izražene su kao prosjek (standardna devijacija, SD)

Distribucija PAI-1 genotipova i alela u MS-bolesnika u kontrolnih ispitanika prikazana je u tablici 2. Distribucija genotipova i alela nije se statistički razlikovala između skupina MS-bolesnika i kontrolnih ispitanika, a razlika nije bilo ni u usporedbi pojedinih evolucijskih oblika bolesti međusobno kao niti s kontrolom.

Ovisnost kliničke ekspresije bolesti od različitih PAI-1 genotipova prikazana je u tablici 3. Nije bilo statistički značajne razlike u dobi nastupa, trajanju, stupnju invalidnosti i indeksu progresije između pojedinih genotipova.

RASPRAVA

Patologija MS-a izražava se razasutim upalnim i degenerativnim oštećenjima mijelina živčane osi. Razvoj tih oštećenja dijelom je posljedica proteolitičkih učinaka aktivatora plazminogena (PA) i metaloproteaza matrice različita djelovanja: pospješuju migraciju imunskih

Tablica 2. Distribucija PAI-1 genotipova i alela u MS-bolesnika iz Gorskog kotara, Hrvatska, i kontrolnih ispitanika

Table 2 *Distribution of PAI-1 genotypes and alleles in MS patients from Gorski kotar region, Croatia, and in control group*

Genotipovi	MS bolesnici (N=46)				Kontrola (N=101)	P
	PP (N=5) n (%)	SP (N=21) n (%)	RR (N=20) n (%)	ukupno n (%)		
4G4G	1 (20,0)	5 (23,8)	2 (10,0)	8 (17,4)	31 (30,7)	ns
4G5G	4 (80,0)	10 (47,6)	16 (80,8)	30 (65,2)	50 (49,5)	ns
5G5G	0	6 (28,6)	2 (10,0)	8 (17,4)	20 (19,8)	ns
<i>Aleli</i>	%	%	%	%	%	
4G	60,0	47,6	50,0	50,0	55,4	ns
5G	40,0	52,4	50,0	50,0	44,6	ns

Tablica 3. Odnos PAI-1 genotipova i kliničkih karakteristika u MS-bolesnika iz Gorskog kotara, Hrvatska

Table 3 *Relation between PAI-1 genotypes and clinical characteristics in MS patients from Gorski kotar region, Croatia*

Karakteristike	PAI-1 genotipovi			P
	4G4G	4G5G	5G5G	
Dob nastupa bolesti (godine)	28,4 (9,5)	27,4 (9,6)	27,6 (7,2)	ns
Trajanje bolesti (godine)	15,5 (8,4)	22,2 (11,4)	25,4 (10,9)	ns
Stupnjevi invalidnosti (EDSS)	6,6 (2,9)	5,4 (3,2)	7,6 (3,2)	ns
Indeks progresije	0,52 (0,30)	0,32 (0,22)	0,34 (0,24)	ns

a, b, c. vrijednosti izražene su kao prosjek (standardna devijacija, SD)

stanica kroz krvno-moždanu membranu nakon što su je oštetili, te degradiraju mijelin.^{13,14,16}

Aktivatori plazminogena glavni su pokretači kaskadne aktivnosti nekoliko metaloproteaza. Aktivnost samoga PA može biti zakočena posredstvom PAI-1. U žarištima (plakovima) MS-a prisutni su i PA i PAI-1.¹⁶ U animalnom modelu, PAI-1 obustavlja razvoj alergijskog encefalomijelitisa vjerojatnom inhibicijom proteolitičkih mehanizama prisutnih u procesu demijelinizacije.¹⁴ Sinteza, proizvodnja i aktivnost PAI-1 regulirane su snažnim genetskim mehanizmima. Polimorfizam 4G/5G u promotorskoj regiji PAI-1 gena daje kao rezultat tri moguća genotipa: 4G4G, 4G5G, i 5G5G. Genotip 5G5G, *in vivo* i *in vitro*, uvjetuje nižu koncentraciju PAI-1 te je sasvim moguće da taj genotip utječe na patogenezu MS-a.¹⁷

Naše je istraživanje usmjereno na utjecaj PAI-1 gena na podložnost i kliničku ekspresiju MS-a, bolesti još danas neidentificirane (etio)patogeneze. Opće je prihvaćeno da je MS poligenska bolest u kojoj svaki pojedinačni lokus umjereno pridonosi njezinoj predispoziciji.² Ne iznenađuje, dakle, današnji procvat istraživanja o združenosti specifičnih genskih polimorfizama i MS.³⁻⁷ Različitos rezultata tih istraživanja nameće potrebu usmjerenja novih genetičkih studija MS-a u stanovništvu donedavnih zemljopisnih izolata, primjenom sve preciznijih dijagnostičkih algoritama i kriterija. Stoga je u našem radu ispitan polimorfizam 4G/5G u promotorskoj regiji PAI-1 gena u MS-bolesnika iz Gorskoga kotara, područja visokog rizika za tu bolest. Dijagnoza je postavljena na osnovi Poserovih kriterija koji su se pokazali najprikladnijim u epidemiološkim i kliničkim istraživanjima MS-a.

Nedavno utvrđena združenost 5G5G genotipa u MS-bolesnica u Finskoj (OR=2,3, 95% CI: 1,04-5,23) koja pretpostavlja da smanjena proizvodnja proteaznih inhibitora utječe na patogenezu MS-a u žena, te dokaz lokacije PAI-1 gena na 7q21.3-22, koja se poklapa s lokusom podložnosti za MS – izazovi su za poduzeto i provedeno istraživanje.^{17,18}

Temeljni su rezultati tog istraživanja sljedeći: distribucija PAI-1 genotipova i alela u MS-bolesnika iz Gorskoga kotara statistički se ne razlikuje od one u zdravom autohtonom stanovništvu; među različitim evolucijskim oblicima bolesti uspoređujući ih međusobno i s kontrolom te, konačno, između spolova (S. Ristić, neobjavljeno priopćenje 2004.). Ispitivani polimorfizam 4G/5G u promotorskoj regiji PAI-1 gena, dakle, nema utjecaja ni na podložnost ni na tijek bolesti u MS-bolesnika iz Gorskoga kotara.

Niska genetska heterogenost autohtonog stanovništva Gorskoga kotara eliminirala je čest problem koji opterećuje slične populacijsko-asocijacijske studije u kojima je ispitivanje mogućih genetičkih čimbenika na predispoziciju za bolest problematično zbog genetičkih

razlika između ispitanika različitog etničkog podrijetla. S druge strane, mogućnost detekcije malog utjecaja ispitivanog čimbenika ograničena je malim uzorkom bolesnika te činjenicom da "odgovorni genotip" također može biti učestao u stanovništvu.

Zato je u novije vrijeme veliko zanimanje pokazano za studije koje se bave identificiranjem gena koji mijenjaju "ponašanje" same bolesti jer bi to dovelo i do razvoja novih terapijskih postupaka i pristupa MS-u. Ta su istraživanja pokazala da problem etničkih razlika u određenom stanovništvu nije odlučujući za procjenu utjecaja specifičnoga genetskog čimbenika na kliničku ekspresiju bolesti. U našem ispitivanju početno doba, trajanje, stupnjevi invalidnosti i indeks progresije bolesti nisu bili statistički značajno različiti između osoba koje su imale 4G4G, 4G5G ili 5G5G genotipove.

Zaključujemo, dakle, da polimorfizam 4G/5G PAI-1 gena nema utjecaja na podložnost kao ni na ekspresiju MS-a u autohtonom stanovništvu Gorskoga kotara.

LITERATURA

1. Ebers GC, Koopman WJ, Hader W, Sadovnick AD, Kremenchutzky M, Mandalfino P, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study: 8: familial multiple sclerosis. *Brain*. 2000; 123 (3):641-649.
2. Compston A. Genetic susceptibility to multiple sclerosis. In: Compston A, Ebers GC, Lassmann H, McDonald I, Matthews B and Wekerle H, eds. *McAlpine's Multiple Sclerosis*. 3rd ed, London Livingstone, 2000, pp.101-142.
3. Tienari PJ, Wikström J, Sajantila A, Palo J, Peltonen L. Genetic susceptibility to multiple sclerosis linked to myelin basic protein gene. *Lancet* 1992; 340: 987-991
4. Nejentsev S, Laaksonen M, Tienari PJ, Fernandez O, Cordell H, Ruutiainen J, et al. Intercellular adhesion molecule-1 K469E polymorphism: study of association with multiple sclerosis. *Hum Immunol* 2003; 64(3): 345-9.
5. Niino M, Fukazawa T, Yabe I, Kikuchi S, Sasaki H, Tashiro K. Vitamin D receptor gene polymorphism in multiple sclerosis and association with HLA class II alleles. *J Neurol Sci* 2000; 177: 65-71.
6. Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. Estrogen receptor polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2000; 179: 70-5.
7. Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. Genetic polymorphisms of osteopontin in association with multiple sclerosis in Japanese patients. *J Neuroimmunol* 2003; 136/1-2: 125-9.
8. Kurtzke JF. Multiple sclerosis in time and space - geographic clues to cause. *J Neurovirol* 2000; 6(Suppl 2): S134-S140.
9. Sepčić J, Antonelli L, Materljan E, Šepić-Grahovac D. Multiple sclerosis cluster in Gorski kotar, Croatia. In: Battaglia MA, ed. *Multiple Sclerosis Research*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B V, 1989, pp.165-169.

10. Confavreux C, Compston DAS, Hommes OR, McDonald WI, Thompson AJ. EDMUS, a European database for multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 1992; 55:671-676.
11. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983; 13:227-231.
12. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33:1444-1452.
13. Leppert D, Waubant E, Burk M, Oksenberg J, Hauser S. Interferon beta-1b inhibits gelatinase secretion and in vitro migration of human T cells: a possible mechanism for treatment efficacy in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996; 40:846-852.
14. Gijbels K, Galardy R, Steinman L. Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis with a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteases. *J Clin Invest* 1994; 94:2177-2182.
15. Proost P, Van Damme J, Opdenakker G. Leukocyte gelatinase B cleavage releases encephalitogens from human myelin basic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192:1175-1181.
16. Cuzner M, Gveric D, Strand C, et al. The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution. *J Neuropathol ExpNeurol* 1996; 55:1194-1204.
17. Luomala M, Elovaara I, Ukkonen M, Koivula T, Lehtimäki T. Plasminogen activator inhibitor 1 gene and risk of MS in women. *Neurology* 2000; 54/9:1864-4.
18. Haines JL, Ter-Minassian M, Bazyk A, et al. A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex. *Nat Genet* 1996; 13:469-471.

ZAHVALA

Rad je izrađen u okviru projekta broj 0062016, koji je odobrilo Ministarstvo za obrazovanje, znanost i šport Republike Hrvatske. Zahvaljujemo svim ispitanicima koji su dobrovoljno sudjelovali u istraživanju. Posebnu zahvalnost dugujemo prof. dr. sc. Borutu Peterlinu, predstojniku Zavoda za medicinsku genetiku Univerziteta u Ljubljani, s kojim surađujemo u istraživanjima genetičkih čimbenika u multiploj sklerozi.