

**Doktori (PhD) értekezés tézisek**

**A CITOKRÓM P450 ENZIMRENDSZER FARMAKOGENETIKAILAG  
JELENTŐS POLIMORFIZMUSAINAK VIZSGÁLATA  
MAGYAR ÉS ROMA POPULÁCIÓBAN**

*Szalai Renáta*

**Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Sümegei Balázs**

**Témavezető: Prof. Dr. Melegh Béla**

**Pécsi Tudományegyetem,  
Általános Orvostudományi Kar**



**Pécs, 2015**

# 1. Bevezetés

## Citokróm P450 enzimrendszer

A citokróm P450 (CYP) rendszer az emberi és más alacsonyabb rendű szervezetekben univerzálisan előforduló enzim szupercsalád. A citokróm P450 enzimek legfontosabb feladata a különböző endogén és exogén vegyületek biotranszformációja. Fontosabb fiziológiai szubsztrátjai közé tartoznak a szteroidok, zsírsavak, prosztaglandinok, leukotriének és biogén aminok. Ezen felül számos xenobiotikum, úgy, mint gyógyszerek, növényi toxinok és a környezetből származó mérgező vegyületek átalakítását végzi. A CYP enzimek a fázis I típusú reakciókban túlnyomórészt oxidatív reakciókat katalizáló monooxigenázok, oxidázok és peroxidázok. Fontos szerepet játszanak inaktív „prodrug”-ok aktív metabolitá alakításában, mint például a CYP2D6-mediálta kodein-morfin átalakulás. Általában a CYP enzimek nem specifikusak, egy enzim több különböző gyógyszert is képes átalakítani és egy gyógyszer gyakran több enzim révén is metabolizálódhat. A CYP1, CYP2 és CYP3 enzimcsalád felelős a klinikumban alkalmazott gyógyszerek 70-80%-ának fázis I-függő metabolizmusáért. A legtöbb CYP enzim jelentős interindividuuális variabilitást mutat, mely részben a genetikai polimorfizmusoknak, részben pedig a különböző mértékű génexpresszióknak tulajdonítható. A humán citokróm P450 enzimrendszert 57 funkcionálisan aktív gén és 58 pszeudogén alkotja. A Humán Genom Projekt a szekvencia szimilaritás alapján 18 családot és 44 alcsaládot különböztet meg.

A citokróm P450 1A2 (CYP1A2) fázis I típusú mikroszómális enzim, mely szerepet játszik számos klinikailag fontos gyógyszer (clozapin, paracetamol, verapamil, theophyllin, koffein) metabolizmus mellett olyan endogén szubsztrátok biotranszformációjában, mint a melatonin, bilirubin, ösztadiol. A *CYP1A2* gén által kódolt enzim felelős bizonyos prokarcinogén vegyületek (aromás- és heterociklusos aminok, policiklusos aromás szénhidrogének) metabolikus aktivációjáért is. Az enzim aktivitását egyes környezeti tényezők - vegyszerek, gyógyszerek (protonpumpa-gátlók, orális kontraceptívumok), táplálkozási faktorok, dohányzás – befolyásolhatják. A génexpresszióban bekövetkező változások daganatos megbetegedések, infarktus, krónikus obstruktív tüdőbetegség és más kórkép kialakulásához vezethetnek. Az egy nukleotidot érintő polimorfizmusok (SNP-k) egy része funkcionális jelentőséggel bír, gyakoriságuk figyelemre méltó egyének közötti és interetnikai különbséget mutat. A legalaposabban tanulmányozott *CYP1A2* nem-kódoló

régióban elhelyezkedő polimorfizmusok a -3860G>A, -2467delT, -729C>T és -163C>A variánsok.

A széles körben alkalmazott paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>) és docetaxel (Taxotere<sup>®</sup>) a mikrotubulus stabilizáló vagy mikrotubulus inhibitor természetű taxán vegyületek csoportjába tartozó, különösen aktív kemoterápiás ágensek. A paclitaxel és a docetaxel egyaránt a máj citokróm P450 enzimrendszerén keresztül metabolizálódik. Mindkét vegyület elsődleges metabolizálója a CYP3A4 enzim, a paclitaxel a CYP2C8, a docetaxel pedig a CYP3A5 enzim további hozzájárulásával biotranszformálódik. A fázis I metabolizmusban szerepet játszó citokróm P450 2C8 (CYP2C8) polipeptid sokféle különböző xenobiotikum és endogén vegyület átalakításáért felelős. A máj összes CYP enzimeinek körülbelül 7%-át adja, továbbá kisebb mértékben expresszálódik a vesében, mellékvesében, agyban, petefészekben, uterusban és a duodenumban. A CYP1B1 az egyik legfontosabb enzim a prekarcinogén vegyületek metabolikus aktiválásában, valamint a taxán és ösztrogén metabolikus útvonalak fontos szereplője. Egyes elképzelések szerint a *CYP1B1* genotípus modulálhatja a docetaxel kezelésre adott választ a fokozott ösztrogén metabolizmusnak köszönhetően.

Az antikoaguláns gyógyszerválasz fő genetikai determinánsa a *CYP2C9* és *VKORC1* gének mellett a *CYP4F2*, de számos további gén is részt vesz a warfarin biotranszformációjában és hatásmechanizmusának kialakításában. A *VKORC1*, *CYP2C9* és *CYP4F2* genotípusok a társuló klinikai faktorokkal együttesen 60%-ban magyarázzák az antikoaguláns gyógyszerválasz változékonyságát. A *CYP4F2* gén által kódolt enzim a K vitamin biotranszformációban szerepet játszó NADPH-függő oxidáz, melynek variánsai csökkentik az enzim K vitamin metabolizáló kapacitását. Részt vesz továbbá hosszú szénláncú zsírsavak, E vitamin, arachidon sav és leukotrién B<sub>4</sub> oxidációjában. Újabb kutatási eredmények számolnak be arról, hogy a magas warfarin dózist meghatározó *CYP4F2* V433M SNP frekvenciája szignifikáns különbségeket mutat különböző populációkban, valamint az egyének közötti eltérő antikoaguláns dózis szükségletet magyarázhatja.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásunk célja a citokróm P450 enzimrendszer farmakogenetikai szempontból releváns génjeiben leírt polimorfizmusok genetikai vizsgálata volt, mely magába foglalja ezen variánsok gyakoriságának és eloszlásának meghatározását roma és magyar populációban.

Kitűzött céljaink pontokban:

1. A *CYP1A2* gén szabályozó régiójában elhelyezkedő rs2069514 és rs35694136, valamint az intronikus rs762551 és rs12720461 polimorfizmusok gyakoriságának meghatározása roma és magyar populációban.
2. A vizsgált *CYP1A2* variánsok együttállásaiból a különböző haplocsoportok frekvenciájának meghatározása a két vizsgált populációban.
3. A taxán kezelés kimenetelét befolyásoló *CYP1B1*, *CYP2C8* és *CYP3A5* rs1056836, rs1058930 és rs776746 variánsok allélfrekvenciáinak vizsgálata.
4. Az antikoaguláns terápiát érintő *CYP4F2* rs2108622 polimorfizmust vizsgálva információt kapni arról, hogy az általunk tanulmányozott két népcsoport között az említett SNP tekintetében mutatkozik-e olyan jelentős genetikai különbség, mely eltérő módon befolyásolhatja a két populáció véralvadásgátló gyógyszerekkel szembeni érzékenységét.
5. A *CYP1A2*, *CYP1B1*, *CYP2C8*, *CYP3A5* és *CYP4F2* polimorfizmusok allélfrekvencia értékeinek összehasonlítása más kutatók szakirodalomban leírt populációs adataival, különös tekintettel a kaukázusi és indiai populációkra.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### Vizsgált populációk

Vizsgálataink során magyar és roma populációból származó DNS mintákkal dolgoztunk. A DNS mintákat egészséges, magyarországi roma és magyar személyektől gyűjtöttük. A vizsgálatainkban résztvevő személyek valamennyien előzetes tájékoztatást követően beleegyezésüket adták a vizsgálatok elvégzéséhez és nyilatkoztak etnikai hovatartozásukról. A roma és magyar DNS minták a Pécsi Tudományegyetem központi biobankjából származtak, mely része a Páneurópai Nemzetközi Biobankhálózatnak (BBMRI). A minták gyűjtésében és tárolásában az 1975-ben az Orvos-világszövetség által megalkotott Helsinki deklarációban megfogalmazott etikai alapelvek voltak irányadók, a biobank vezetésében és fenntartásában az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (ETT-TUKEB) által jóváhagyott elveket követtük. Kutatásaink összesen 5 citokróm P450 gén 8 funkcionálisan jelentős polimorfizmusának vizsgálatára terjedtek ki. A *CYP1A2* gén nem-kódoló régióiban elhelyezkedő négy polimorfizmus (-163C>A, -729C>T, -2467T>delT és -3860G>A) vizsgálatához 404 roma (148 férfi, 256 nő; átlag életkor 35±11 év) és 396 magyar (236 férfi, 163 nő; átlag életkor 42±14 év) mintát analizáltunk. A taxán terápiát befolyásoló három citokróm P450 gén (*CYP1B1*, *CYP2C8* és *CYP3A5*) polimorfizmusainak (rs1056836, rs1058930, rs776746) vizsgálata során 397 roma (172 férfi, 225 nő; átlag életkor 36±14 év) és 412 magyar (204 férfi, 208 nő; átlag életkor 41±22 év) minta került genotipizására. A *CYP4F2\*3* (rs2108622) allél gyakoriságának meghatározásához 484 roma (230 férfi, 254 nő; átlag életkor 41±20 év) és 493 magyar (278 férfi, 215 nő; átlag életkor 37±13 év) DNS mintáját vizsgáltuk.

#### Molekuláris biológiai módszerek

A DNS-izolálást EDTA-val alvadásgátolt perifériás vérminták leukocitáiból végeztük rutin kisózásos technika segítségével. DNS vizsgálatához munkánk során az első lépés minden esetben egy polimeráz láncreakció (PCR) útján történő amplifikáció volt. A PCR-t minden esetben saját tervezésű, szekvencia-specifikus oligonukleotidokkal- forward és reverse primerrel- végeztük (1. táblázat). Valamennyi általunk tervezett PCR-RFLP módszer specificitását és eredményeink konfirmálását Sanger-féle bidirekcionális szekvenálással végeztünk random módon.

Az RFLP módszerekhez kapcsolódó PCR reakciók kondíciói a következők voltak a *CYP1A2* polimorfizmusok vizsgálatánál: elődenaturáció 2 min 95°C-on, ezt követte 35 cikluson keresztül: denaturáció 30 s 95°C-on, az annealing hőmérséklete a -163C>A és a -3860G>A SNP-k esetén 59°C volt 30 s-ig, -729C>T SNP-nél 60°C volt 30 s-ig, ez után a primer extenzió 30 s 72°C-on és a végső lánchosszabbítás 72°C-on 5 percig tartott.

A *CYP1B1*, *CYP2C8*, *CYP4F2* és *CYP3A5* SNP-k PCR amplifikációja a következő feltételek mellett zajlott: elődenaturáció 2 min 95°C-on, ezt követte 35 cikluson keresztül 30 s denaturálás 95°C-on, primerkötődés 30 s 57°C-on (*CYP1B1*; rs1056836), 55°C-on (*CYP2C8*; rs1058930), 60°C-on (*CYP4F2*; rs2108622), 62°C-on (*CYP3A5*; rs776746). Ez után a primer extenzió 45 s 72°C-on, melyet 5 perc végső extenzió követett 72°C-on. A keletkezett PCR termékek detektálása gélelektroforézissel (2%-os agaróz gélben), etídium-bromidos festéssel és UV megvilágítással történt.

A *CYP1A2* gén kapcsán restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (RFLP) módszert használtunk az rs2069514, rs762551 és rs12720461 polimorfizmusokhoz kapcsolódó genotípusok elkülönítésére. A *CYP1B1*, *CYP2C8*, *CYP4F2* és *CYP3A5* SNP-k genotipizálása minden esetben szintén ezzel a módszerrel valósult meg. A restrikciós enzimmel történő hasítás után az emésztett PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel választottuk szét. A genotípusok elkülönítése a 3%-os agaróz gélben etídium-bromid festéssel, UV megvilágítással történt standard DNS létra mellett. A *CYP1A2* -2467T>delT polimorfizmus vizsgálatához real-time PCR módszert használtuk (TaqMan Drug Metabolism Genotyping Real-Time PCR Assay). A PCR amplifikációt a következő kondíciókkal végeztük: kezdő inkubáció 2 min 95°C-on, denaturáció 20 s 95°C-on, annealing és primer extenzió 40 s 60°C-on, 40 cikluson keresztül.

## **Statisztikai módszerek**

A vizsgált genetikai variánsok allélfrekvenciái között fennálló összefüggések feltárására  $\chi^2$ -tesztet alkalmaztunk SPSS 20.0 programcsalád felhasználásával, a szignifikancia szintet  $p < 0,05$ -nél húztuk meg. A haplotípus analízis vizsgálatához Phase 2.1. programot használtunk.

## 4. EREDMÉNYEK

### CYP1A2 gén

A *CYP1A2* gén nem-kódoló régióiban elhelyezkedő polimorfizmusok közül roma és magyar populációban a -163A SNP volt a leggyakoribb (56,9% vs. 68,6%), ezt követően a -2467delT variáns volt jelen 6,81% és 5,81%-os gyakorisággal. A -3860A és -729T variánsok jelentősen ritkábban fordultak elő vagy nem voltak kimutathatók a két csoportban (2. táblázat). A *CYP1A2\*1C* allél (-3860G>A) vizsgálata során a -3860A variáns allél gyakoriságában különbséget észleltünk magyar és roma populációban (2,02% vs. 0%). A *CYP1A2* -3860AA homozigóta genotípus nem volt kimutatható sem a roma, sem a magyar mintákban. A *CYP1A2\*1F* allélt (-163C>A) illetően jelentős különbséget észleltünk a -163AA genotípus frekvenciájában. Ez az érték a roma populációban 31,9%, magyar populációban 49,5% volt ( $p < 0,001$ ). További szignifikáns eltérést mutattunk ki a variáns -163A allél frekvenciájában a roma és magyar populáció között (56,9% vs. 68,6%,  $p = 0,025$ ). Míg a magyar populációban a -163AA homozigóta genotípus fordult elő leggyakrabban (49,5%), addig a roma minták fele -163CA heterozigóta genotípusúnak mutatkozott (50,0%). A *CYP1A2* gén -2467delT polimorfizmusát (*CYP1A2\*1D* allél) vizsgálva a variáns delT allélfrekvencia értékekben nem találtunk szignifikáns különbséget a roma csoportban a magyarokhoz viszonyítva (6,81% vs. 5,81%). Magyar mintákban a homozigóta -2467delT/delT genotípus nem volt kimutatható, roma populációban ez az érték 0,74% volt. A *CYP1A2* -729T variáns gyakorisága 0,25% volt magyar populációban, a roma minták erre a polimorfizmusra nézve 100%-ban vad típusúnak bizonyultak.

Az általunk vizsgált -3860G>A, -2467T>delT, -163C>A és -729C>T polimorfizmusok a 3. táblázatban bemutatott öt különböző haplotípust (ht) határozták meg. A különböző haplotípusok (ht1-ht5) frekvenciái sorban a következők voltak magyar minták vizsálatát követően: 31,4%, 2,02%, 62,8%, 0,25% és 3,54%. Roma populációs mintákban a ht2 és a ht4 haplotípus nem volt kimutatható, a ht1, ht3 és ht5 haplotípusok gyakorisági értékei a következők voltak roma mintákban: 43,1%, 50,1% és 6,81% (3. táblázat).

## **CYP1B1, CYP2C8 és CYP3A5 gének**

A *CYP1B1* gén c.4326C>G polimorfizmusát tekintve a *CYP1B1* 4326GG homozigóta variáns genotípus előfordulása szignifikánsan magasabb volt roma populációban, mint magyarban (50,12% vs. 39,32%,  $p=0,002$ ). A *CYP1B1* 4326G allél frekvenciája ezzel szemben csak kis mértékben bizonyult emelkedettnek a roma mintákban, összehasonlítva a magyar populációs mintákkal (69,4% vs. 64,2%). A különbség nem bizonyult szignifikánsnak ( $p=0,852$ ). A *CYP2C8* c.792C>G polimorfizmus vizsgálata során a *CYP2C8* 792GG (\*4/\*4) homozigóta genotípus a roma csoportban nem volt kimutatható, a magyar populációban is csak 1,46%-os gyakorisággal fordult elő. A *CYP2C8* 792G allél frekvenciájában szignifikáns különbséget tapasztaltunk a két populáció között. A magyar mintákban a 792G variáns allél jelenléte jelentősen gyakoribb volt összehasonlítva a roma csoportban kapott értékekkel (5,83% vs. 2,14%,  $p=0,001$ ). A *CYP3A5* c.6986A>G polimorfizmus vizsgálatát követően a *CYP3A5* 6986G variáns allél gyakorisága a magyar populációban emelkedettnek mutatkozott a roma populációval történő összehasonlítás során, de a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns (92,0% vs. 75,7%,  $p=0,091$ ). Ezzel szemben a *CYP3A5* 6986GG homozigóta variáns genotípus frekvenciája szignifikánsan magasabb volt magyarokban, szemben a roma mintákkal (84,95% vs. 53,90%,  $p<0,001$ ). A vad típusú *CYP3A5* 6986AA genotípus alacsony gyakorisággal volt kimutatható mint két vizsgált populációban. Romákban ez a genotípus több mint kétszer gyakrabban fordult elő, mint magyarokban (2,52% vs. 0,97%) (4. táblázat).

## **CYP4F2 gén**

A *CYP4F2* c.1297G>A variáns genotipizálását követően eredményeink azt mutatják, hogy a vizsgált *CYP4F2* polimorfizmushoz kapcsolódó GG, GA, AA genotípusok és az 1297A variáns allél gyakorisága roma populációban 46,5%, 42,6%, 10,9% és 32,2% volt, magyar populációban pedig egyenként 50,1%, 42,2%, 7,7% és 22,8% (5. táblázat). A *CYP4F2* 1297AA homozigóta genotípus előfordulási gyakoriságában jelentős, de statisztikailag nem szignifikáns ( $p<0,08$ ) különbséget észleltünk a két populáció között. A roma populációs minták több mint fele *CYP4F2* 1297A variáns allélt hordozó (GA+AA: 53,5%), ez az érték a magyar populációban szintén magasnak bizonyult (GA+AA: 49,9%).



## 5. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A csökkent CYP1A2 enzimaktivitással jellemezhető *CYP1A2* -3860G>A polimorfizmus roma mintákban nem volt kimutatható, a magyar mintákban mért allélfrekvencia hasonló értéket mutat más kutatók korábbi vizsgálataiból származó európai populációk adataival. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a CYP1A2 lassan metabolizáló fenotípus ritkán fordul elő az általunk vizsgált roma és magyar populációban. A *CYP1A2* gén -2467delT variánsa, ami a *CYP1A2* gén indukciójában játszik fontos szerepet, roma populációban emelkedett gyakorisággal volt jelen, összehasonlítva a magyar mintákkal. Ezek alapján elmondhatjuk, hogy roma személyekben, különösen dohányzókban, a CYP1A2 enzim fokozott indukciójával és aktivitásával kell számolnunk, valamint emelkedett rizikóval a különféle daganatos betegségek kialakulására nézve. A magyar csoportban mért deletált timin frekvenciája a *CYP1A2* gén -2467-es pozíciójában, megközelítette más kaukázusi populációk frekvenciaértékeit. A *CYP1A2*\*1F variáns allél frekvenciáját és a homozigóta variáns genotípus gyakoriságát is statisztikailag szignifikánsan magasabbnak találtuk magyar populációban, mint romában. Ez az emelkedett érték a magyar populáció tagjait fokozottabban hajlamosíthatja daganatos megbetegedések kialakulására, mint a romákat a fokozott CYP1A2 enzim indukciója révén. A magyar minták vizsgálata során kapott \*1F allélfrekvencia érték összhangban van a korábban, mások által vizsgált átlag európai populációk értékeivel. A *CYP1A2* -729T allél roma populációban nem volt kimutatható, hasonlóan, ahogy a HapMap projekt adatai mutatják európai, japán és nigériai minták kapcsán. Ezzel szemben magyar populációban alacsony gyakorisággal ugyan, de detektálni tudtuk. Az általunk vizsgált polimorfizmusok együttállásait vizsgálva a haplotípus analízis során a leggyakoribb allélikus konstelláció a -3860G/-2467T/-729C/-163A (\*1F) volt mind roma, mind pedig magyar populációban, ezt követte második leggyakoribb előfordulással a -3860G/-2467T/-729C/-163C (\*1A) haplotípus. A -3860G/-2467delT/-729C/-163A kialakítva a ht5 haplotípust, jelentősen gyakrabban fordult elő roma mintában, mint magyar mintákban. Az allélek -3860A/-2467delT/-729C/-163A és -3860G/-2467delT/-729T/-163A együttállása magyar populációból származó mintákban is ritkán fordult elő, roma mintákban egyáltalán nem volt megfigyelhető.

A taxán vegyületek metabolizmusát és hatását befolyásoló citokróm P450 gének polimorfizmusainak vizsgálata során roma és magyar populációban lényeges különbségeket észleltünk, melyek befolyásolhatják a taxán terápia kimenetelét. A *CYP1B1*\*3 variáns allél vizsgálatával kapott eredményeink alapján elmondható, hogy a *CYP1B1* \*3 allél enyhén, a

\*3/\*3 homozigóta variáns genotípus szignifikánsan emelkedettnek számít roma populációban összevetve a magyarokkal. Magyar populációban az általunk kapott *CYP1B1*\*3 allél frekvenciája 1,5-szerese a korábban, más kutatók kaukázusi populációkban mért adatainak. A \*3 variáns gyakorisága roma populációban is magasabbnak bizonyult, mint más észak-indiai populációs eredmények. E polimorfizmus tekintetében összességében elmondhatjuk, hogy roma populációban gyakrabban kell számolnunk fokozott *CYP1B1* mRNS expresszióval, erősebb enzimaktivitással, továbbá, hogy a roma népesség tagjai fokozott hajlamot mutathatnak idiopátiás férfi infertilitásra, glaukoma, valamint tüdő- és endometrium daganat kialakulására a magyarokhoz képest. Taxán terápia kapcsán a roma betegek körében a teljes túlélési ráta alacsonyabb lehet, mint magyarok esetén, illetve paclitaxel és docetaxel terápiát követően a romák nagyobb eséllyel mutathatnak elégtelen gyógyszerválaszt a *CYP1B1*\*3 variáns hordozása kapcsán. A *CYP2C8*\*4 SNP-nek, mely csökkent enzimaktivitással jellemezhető, a magyar populációban való gyakoribb előfordulása azt sejteti, hogy a magyarok gyakrabban tekinthetők lassú metabolizálónak a *CYP2C8* szubsztrátjait illetően, szemben a romákkal. Így a paclitaxel-indukálta toxicitás esélye is magasabb lehet a magyar népcsoportban, mint romák körében. A magyar populációban észlelt szignifikánsan magasabb előfordulási gyakorisága a *CYP3A5*\*3/\*3 nem-expresszáló genotípusnak magyarázhatja a *CYP3A5* szubsztrát gyógyszerekkel szembeni gyakoribb, lassabb metabolizmust magyar populációban. A csökkent metabolizmus megnövekedett docetaxel toxicitáshoz vezethet a gyógyszer normál dózisban való alkalmazása során. Mivel az expresszáló *CYP3A5* genotípusok (\*1/\*3 és \*1/\*1) megnövekedett kockázatot jelenthetnek akut limfoblasztos leukémia és emlődaganat kialakulására, a magyar populációban ezen genotípusok ritkább előfordulása a magyarokat kevésbé hajlamosítja az említett betegségek kialakulására, mint a roma populáció tagjait. Roma populációs minták vizsgálata során kapott variáns allélfrekvencia magasabb volt, mint a korábbi vizsgálatok indiai és észak-indiai populációkban mért értékei. Ezzel szemben magyar mintáink *CYP3A5*\*3 alléljának gyakorisági értéke jól közelít más kaukázusi populációk értékeihez.

A *CYP4F2* gén rs2108622 variáns genotipizálását követően arra a következtetésre jutottunk, hogy a minor allél frekvenciája magyarokban alacsonyabbnak bizonyult, mint roma populációban. Roma populációs mintákban a tanulmányozott SNP variáns allélfrekvenciájának értékét összevetve más indiai populációs adatokkal, sokkal alacsonyabb értéket kaptunk, mely inkább a kaukázusi értékekhez közelít. Hasonló a helyzet a magyar minták esetében is, ugyanis a *CYP4F2* 1297A variáns allél értékei közelebb állnak korábbi vizsgálatokból származó ázsiai értékekhez, mint a kaukázusiakhoz.

## 6. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Szignifikánsan emelkedett variáns allélfrekvencia értéket észleltünk a vizsgált magyar populációban a *CYP1A2\*1F* és *CYP2C8\*4* allélokra nézve a roma populációs mintákhoz viszonyítva.
2. A homozigóta variáns genotípus gyakorisága magyarokban a *CYP3A5\*3* és a *CYP1A2\*1F*, romákban pedig a *CYP1B1\*3* SNP-k esetén volt szignifikánsan magasabb.
3. Mindkét populációban a *CYP1A2\*1C* variáns alacsony frekvenciájának köszönhetően a lassan metabolizáló fenotípus, így a CYP1A2 szubsztrát-gyógyszer toxicitás esélye is valószínűsíthetően ritka.
4. A *CYP1A2* gén genetikai profiljának vizsgálatát követően megállapíthatjuk, hogy roma populációban a *CYP1A2\*1D* allél gyakori előfordulása növelheti a daganatos megbetegedések kialakulásának rizikóját.
5. A magyar populációban a *CYP1A2\*1F* funkcionális allél szignifikánsan emelkedett gyakorisága fokozott kockázatot jelenthet emlő-, tüdő-, és petefészek daganat kialakulására, különösen hajlamosító környezeti tényezőknek való kitettség esetén.
6. A *CYP1A2* gén -3860G>A, -2467T>delT, -729C>T és -163C>A nem-kódoló polimorfizmusai 5 fő haplotípust határoztak meg magyar populációban, míg roma mintákban a ht2 és ht4 együttállás nem volt detektálható.
7. Roma populációs mintákban a *CYP1B1\*3* homozigóta genotípus gyakori előfordulása állhat a romák taxán kezelésre adott esetleges csökkent gyógyszerválasza és a daganatos megbetegedésekben szenvedők alacsonyabb teljes túlélési rátája hátterében.
8. A *CYP2C8* és *CYP3A5* gének tekintetében a *CYP2C8\*4* és *CYP3A5\*3* csökkent aktivitású variánsok gyakorisága magyarokban nagyobb volt, mint romákban. Így mind docetaxel, mind paclitaxel alkalmazásakor a magyarok nagyobb valószínűséggel tekinthetők taxán gyógyszerek lassú metabolizálóinak, ezáltal feltételezhetően nagyobb az esélyük taxán-indukált toxicitás kialakulására.
9. Roma populációban a *CYP4F2\*3* allél gyakoribb hordozása nagyobb dózisu kumarin származékokkal történő kezelést tehet indokoltá a megfelelő antikoaguláns válasz elérése érdekében.

## 7. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

### *ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK:*

1. Szalai R, Magyar L, Matyas P, Duga B, Banfai Z, Szabo A, Kovesdi E, Melegh B.  
**Genetic polymorphisms in promoter and intronic regions of CYP1A2 gene in Roma and Hungarian population samples.** Environ Toxicol Pharmacol. 2014;38(3):814-20.

*IF: 2,084*

2. Szalai R, Ganczer A, Magyar L, Matyas P, Bene J, Melegh B.  
**Interethnic differences of cytochrome P450 gene polymorphisms may influence outcome of taxane therapy in Roma and Hungarian populations.** Drug Metab Pharmacokinet. 2015.

*IF: 2,568 (2014)*

3. Sipeky C, Weber A, Melegh BI, Matyas P, Janicsek I, Szalai R, Szabo I, Varnai R, Tarlos G, Ganczer A, Melegh B.

**Interethnic variability of CYP4F2 (V433M) in admixed population of Roma and Hungarians.** Environ Toxicol Pharmacol. 2015;40(1):280-3.

*IF: 2,084 (2014)*

### *EGYÉB KÖZLEMÉNYEK:*

1. Szalai R, Matyas P, Varszegi D, Melegh M, Magyar L, Jaromi L, Sumegi K, Duga B, Kovesdi E, Hadzsiev K, Melegh B.

**Admixture of beneficial and unfavourable variants of GLCCI1 and FCER2 in Roma samples can implicate different clinical response to corticosteroids.** Mol Biol Rep. 2014 Nov;41(11):7665-9.

*IF: 2,024*

2. Weber A, Szalai R, Sipeky C, Magyar L, Melegh M, Jaromi L, Matyas P, Duga B, Kovesdi E, Hadzsiev K, Melegh B.

**Increased prevalence of functional minor allele variants of drug metabolizing CYP2B6 and CYP2D6 genes in Roma population samples.** Pharmacol Rep. 2015 Jun;67(3):460-4.

*IF: 1,928*

3. Sipeky C, Matyas P, Melegh M, Janicsek I, **Szalai R**, Szabo I, Varnai R, Tarlos G, Ganczer A, Melegh B.

**Lower carrier rate of GJB2 W24X ancestral Indian mutation in Roma samples from Hungary: implication for public health intervention.** Mol Biol Rep. 2014 Sep;41(9):6105-10.

**IF: 2,024**

4. Magyari L, Varszegi D, Sarlos P, Jaromi L, Melegh BI, Duga B, Kiszfali P, Kovesdi E, Matyas P, Szabo A, **Szalai R**, Melegh B.

**Marked differences of haplotype tagging SNP distribution, linkage, and haplotype profile of IL23 receptor gene in Roma and Hungarian population samples.** Cytokine. 2014 Feb;65(2):148-52.

**IF: 2,664**

5. Nagy A, **Szalai R**, Magyari L, Bene J, Toth K, Melegh B.

**Extreme differences in SLCO1B3 functional polymorphisms in Roma and Hungarian populations.** Environ Toxicol Pharmacol. 2015 May;39(3):1246-51.

**IF: 2,084**

6. Sumegi K, Jaromi L, Magyari L, Kovesdi E, Duga B, **Szalai R**, Maasz A, Matyas P, Janicsek I, Melegh B.

**Functional Variants of Lipid Level Modifier MLXIPL, GCKR, GALNT2, CILP2, ANGPTL3 and TRIB1 Genes in Healthy Roma and Hungarian Populations.** Pathol Oncol Res. 2015 Jan 9.

**IF: 1,855**

7. Nagy A, Sipeky C, **Szalai R**, Melegh B I, Matyas P, Ganczer A, Toth K, Melegh B

**Marked differences in frequencies of statin therapy relevant SLCO1B1 variants and haplotypes between Roma and Hungarian populations.** BMC Genetics.

**IF: 2,40**

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: **6,736**

Egyéb közlemények összesített impakt faktora: **14,979**

Összesített impakt faktor: **21,715**

## 8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Melegh Béla** Professzor Úrnak, aki lehetővé tette, hogy doktori disszertációm alapjául szolgáló kutatómunkámat a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Orvosi Genetikai Intézetében a Multidiszciplináris Orvostudományok keretén belül zajló „Humán molekuláris genetika” témában végezhessem, szakmai tevékenységemet mindvégig figyelemmel kísérte, munkámat hasznos meglátásaival, útmutatásával irányította és segítette.

Köszönetemet fejezem ki **Dr. Berenténé Dr. Bene Juditnak** a szakmai, tudományos és emberi segítségért, amit tőle mindvégig kaptam.

Köszönettel tartozom az Orvosi Genetikai Intézet minden **asszisztensnőjének**, akik kezdettől fogva szakmai tapasztalatukkal és lelkiismeretes munkájukkal segítettek tanulmányaimat.

Köszönettel tartozom továbbá azoknak a **kollégáknak, doktornőknek**, akik közreműködtek a minták gyűjtésével.

Hálával tartozom és köszönöm családom megértő türelmét, szeretetét és bátorítását.

**1. táblázat** A vizsgált polimorfizmusok genotipizálásához használt primerek, restrikciós endonukleázok és hasítási mintázatok

| Gén           | Variáns    | Primerek (5'-3') |                          | PCR annealing hőmérséklet (C) | PCR termék (bp) | Endonukleáz      | Fragmentek (bp)    | Genotípus |
|---------------|------------|------------------|--------------------------|-------------------------------|-----------------|------------------|--------------------|-----------|
| <b>CYP1A2</b> | rs2069514  | Forward          | TCATCAAGCTACACATGATCGAG  | 59                            | 611             | BseLI (BslI)     | 123, 139, 349      | GG        |
|               |            | Reverse          | TGCGTGTCAGGTCTCTTCAC     |                               |                 |                  | 123, 139, 349, 488 | GA        |
|               | rs762551   | Forward          | GGTATCAGCAGAAAGCCAGC     | 59                            | 298             | Bme1390I (ScrFI) | 123, 488           | AA        |
|               |            | Reverse          | CCCAGCTGGATACCAGAAAG     |                               |                 |                  | 46, 66, 186        | CC        |
|               | rs12720461 | Forward          | ACTCACCTAGAGCCAGAAGCTC   | 60                            | 250             | Bme1390I (ScrFI) | 46, 66, 186, 232   | CA        |
|               |            | Reverse          | AATGGCTTAGTCCAAACTGCC    |                               |                 |                  | 66, 232            | AA        |
| <b>CYP1B1</b> | rs1056836  | Forward          | TCATCACTCTGCTGGTCAGG     | 57                            | 311             | BseNI (BsrI)     | 28, 33, 67, 122    | CC        |
|               |            | Reverse          | AGAATTGGATCAGGTCGTGG     |                               |                 |                  | 28, 33, 67, 95 122 | CT        |
|               |            |                  |                          |                               |                 |                  | 33, 95, 122        | TT        |
| <b>CYP2C8</b> | rs1058930  | Forward          | GGTCTGCAATAATTTCCCTC     | 55                            | 500             | TaqI             | 22, 95, 194        | CC        |
|               |            | Reverse          | TGATATTCATCTTCAGTTTGTGG  |                               |                 |                  | 22, 95, 117, 194   | CG        |
|               |            |                  |                          |                               |                 | 117, 194         | GG                 |           |
| <b>CYP3A5</b> | rs776746   | Forward          | GTGGTCCAAACAGGGAAGAGGT   | 62                            | 309             | RsaI             | 83, 150, 267       | CC        |
|               |            | Reverse          | GCCCATACAGGCAACATGACTTAG |                               |                 |                  | 83, 150, 233, 267  | CG        |
|               |            |                  |                          |                               |                 |                  | 233, 267           | GG        |
| <b>CYP4F2</b> | rs2108622  | Forward          | ATCAACCCGTTCCACCT        | 60                            | 492             | PvuII            | 96, 213            | AA        |
|               |            | Reverse          | ACATTGTGCTCCCAGACG       |                               |                 |                  | 22, 74, 96, 213    | AG        |
|               |            |                  |                          |                               |                 |                  | 22, 74, 213        | GG        |
|               |            |                  |                          |                               |                 | 176, 316         | GG                 |           |
|               |            |                  |                          |                               |                 | 176, 316, 492    | GA                 |           |
|               |            |                  |                          |                               |                 | 492              | AA                 |           |

**2. táblázat** Genotípus- és allélfrekvencia értékek eloszlása roma és magyar populációban a *CYP1A2* gén polimorfizmusai esetén

| Polimorfizmus      | Genotípus | Genotípus frekvencia |                         | Allél | Allélfrekvencia |               |
|--------------------|-----------|----------------------|-------------------------|-------|-----------------|---------------|
|                    |           | Roma<br>n=404 (%)    | Magyar<br>n=396 (%)     |       | Roma<br>(%)     | Magyar<br>(%) |
| <b>-163C&gt;A</b>  | C/C       | 73 (18,1)            | 49 (12,4)               | C     | 43,1            | 31,4          |
|                    | C/A       | 202 (50,0)           | 151 (38,1)              | A     | 56,9            | 68,6*         |
|                    | A/A       | 129 (31,9)           | 196 (49,5) <sup>#</sup> |       |                 |               |
| <b>-3860G&gt;A</b> | G/G       | 404 (100,0)          | 380 (95,9)              | G     | 100,0           | 98,0          |
|                    | G/A       | 0 (0,0)              | 16 (4,04)               | A     | 0,0             | 2,0           |
|                    | A/A       | 0 (0,0)              | 0 (0,0)                 |       |                 |               |
| <b>-2467delT</b>   | T/T       | 352 (87,1)           | 350 (88,4)              | T     | 93,2            | 94,2          |
|                    | T/delT    | 49 (12,1)            | 46 (11,6)               | delT  | 6,8             | 5,8           |
|                    | delT/delT | 3 (0,74)             | 0 (0,0)                 |       |                 |               |
| <b>-729C&gt;T</b>  | C/C       | 404 (100,0)          | 394 (99,5)              | C     | 100,0           | 99,7          |
|                    | C/T       | 0 (0,0)              | 2 (0,5)                 | T     | 0,0             | 0,3           |
|                    | T/T       | 0 (0,0)              | 0 (0,0)                 |       |                 |               |

\*p=0,025

#p<0,001

**3. táblázat** A vizsgált *CYP1A2* polimorfizmusok együttállása által meghatározott 5 fő haplotípus és azok gyakorisága roma és magyar populációban

| Haplotípus | Allélkonstelláció  |                       |                   |                   | Frekvencia    |                 |
|------------|--------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|---------------|-----------------|
|            | <b>-3860G&gt;A</b> | <b>-2467T&gt;delT</b> | <b>-729C&gt;T</b> | <b>-163C&gt;A</b> | Roma<br>n (%) | Magyar<br>n (%) |
| ht1        | G                  | T                     | C                 | C                 | 348 (43,1)    | 249 (31,4)      |
| ht2        | A                  | delT                  | C                 | A                 | -             | 16 (2,02)       |
| ht3        | G                  | T                     | C                 | A                 | 405 (50,1)    | 497 (62,8)      |
| ht4        | G                  | delT                  | T                 | A                 | -             | 2 (0,25)        |
| ht5        | G                  | delT                  | C                 | A                 | 55 (6,81)     | 28 (3,54)       |



**4. táblázat** A *CYP1B1* c.4326C>G, *CYP2C8* c.792C>G és a *CYP3A5* c.6986A>G polimorfizmusok genotípusainak és variáns allélek frekvenciájának eloszlása magyar és roma populációkban

| Gén           | Polimorfizmus | Genotípus         | Magyar<br>n=412 (%) | Roma<br>n=397 (%)         |
|---------------|---------------|-------------------|---------------------|---------------------------|
| <i>CYP1B1</i> | c.4326C>G     | CC                | 45 (10,92)          | 45 (11,34)                |
|               |               | CG                | 205 (49,76)         | 153 (38,54)               |
|               |               | GG                | 162 (39,32)         | 199 (50,12)*              |
|               |               | G allélfrekvencia | 0,642 (64,2)        | 0,694 (69,4)              |
| <i>CYP2C8</i> | c.792C>G      | CC                | 370 (89,80)         | 380 (95,72)               |
|               |               | CG                | 36 (8,74)           | 17 (4,28)                 |
|               |               | GG                | 6 (1,46)            | 0 (0,00)                  |
|               |               | G allélfrekvencia | 0,058 (5,83)        | 0,021 (2,14) <sup>#</sup> |
| <i>CYP3A5</i> | c.6986A>G     | AA                | 4 (0,97)            | 10 (2,52)                 |
|               |               | AG                | 58 (14,08)          | 173 (43,58)               |
|               |               | GG                | 350 (84,95)         | 214 (53,90) <sup>‡</sup>  |
|               |               | G allélfrekvencia | 0,920 (92,0)        | 0,757 (75,7)              |

\*p=0,002 <sup>#</sup>p=0,001 <sup>‡</sup>p<0,001

**5. táblázat** A *CYP4F2* c.1297G>A polimorfizmus allél- és genotípus frekvenciáinak gyakorisága magyar és roma populációban

| Gén           | Polimorfizmus | Genotípus         | Magyar<br>n=493 (%) | Roma<br>n=484 (%) |
|---------------|---------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| <i>CYP4F2</i> | c.1297G>A     | GG                | 247 (50,1)          | 225 (46,5)        |
|               |               | GA                | 208 (42,2)          | 206 (42,6)        |
|               |               | AA                | 38 (7,7)            | 53 (10,9)         |
|               |               | A allélfrekvencia | 0,228 (22,8)        | 0,322 (32,2)      |