

Az apolipoprotein A5 gén természetes polimorfizmusainak szerepe a metabolikus szindróma kialakulásában

Ph.D. értekezés tézisei

Kisfali Péter

Témavezető: Prof. Dr. Melegh Béla

Pécsi Tudományegyetem

Klinikai Központ

Orvosi Genetikai Intézet



1. RÖVIDÍTÉSEK

APOA5	apolipoprotein A5 (gén)
APOAV	apolipoprotein AV (fehérje)
BMI	body mass index - testtömeg index
bp	bázispár
CVD	kardiovaszkuláris megbetegedés
dNTP	dezoxinukleotidtrifoszfát
EDTA	etilén-diamin-tetra-acetát
HDL	high density lipoprotein
LDL	low density lipoprotein
LPL-HSPG	lipoprotein-lipáz - heparin-szulfát-proteoglikán
MS	metabolikus szindróma
OR	odds ratio - esélyhányados
PCR	polimerase chain reaction - polimeráz lánreakció
RFLP	restriction fragment length polymorphism
SEM	standard error of mean - standard hiba
SNP	single nucleotide polymorphism - egy nukleotidot érintő eltérés
UTR	untranslated region - nem transzlálódó régió
VLDL	very low density lipoprotein
WHO	World Health Organization

2. BEVEZETÉS

A metabolikus szindróma (MS) koncepciója az 1988-ban Reaven által leírt X-szindróma. Szénhidrátanyagcsere-zavar, emelkedett vérnyomás, szérum triglicerid- és alacsony HDL (High Density Lipoprotein)-koleszterin-szint mellett centrális obezitás jellemzi. Ezen alkotóelemek akár külön-külön is kardio- és cerebrovaszkuláris betegségek kockázati tényezői, de együttes előfordulásuk fokozott rizikót képvisel. A MS a fejlett ipari országokra jellemző, akár a populáció egyharmadát is érintheti. Emiatt különös hangsúlyt kapott a 2-es típusú diabétesz mellett a MS genetikai hátterének vizsgálata.

2000-ben tették közzé a humán genom első teljes szekvenciáját a Human Genom Project keretében. Ez a lépés nagymértékben meggyorsította az új gének azonosítását, illetve a genetikai variánsok és mutációk szerepének és hatásainak vizsgálatát. Emellett a technika fejlődésével nagy populációkat érintő, széleskörű genetikai vizsgálatok is elérhetővé váltak, így egyszerre többszáz ezer polimorfizmus vizsgálható különböző csoportokban. Ezek tették lehetővé az elmúlt évtizedben a jelentős progressziót különböző, nagy populációt érintő betegségek hátterében álló genetikai variánsok azonosításában.

Az egyik, a kutatások középpontjába került téma a lipidparamétereket befolyásoló genetikai eltérések. A magasabb szérum trigliceridszint és az LDL (Low Density Lipoprotein)-koleszterin-szint emelkedése kardio- és cerebrovaszkuláris betegség fő rizikótényezői. Tanulmányomban az egyik ilyen triglicerid szintet befolyásoló gén, az apolipoprotein A5 (APOA5) variánsainak szerepével foglalkozom. A gén által kódolt fehérje az apolipoprotein család legutóbb felfedezett tagja. A gén egyes variánsainak erőteljes a lipidparaméterekre gyakorolt hatása

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A metabolikus szindróma

Ma már minden hatodik európai felnőttet fenyeget a MS-nek nevezett „életmódbetegség”, mely növeli a szív- és érrendszeri betegségek, így a stroke kockázatát. A MS már Görögországot és Franciaországot is fenyegeti, ahol a lakosság eddig viszonylag védettnek számított a kardiovaszkuláris megbetegedésekkel szemben, étrendjéből és életmódjából adódóan. A diagnózis öt alapeleme az abdominális obezitás, a magas vérnyomás, a kóros HDL-koleszterin és trigliceridszint, valamint a kóros éhgyomri vércukorszint.

A szindrómával terheltek között magasabb a kardiovaszkuláris morbiditás és mortalitás, beleértve a hirtelen halált is. A megemelkedett triglicerid- és LDL-koleszterin-szint fokozza az atherosclerotikus plakkok kialakulását egy idő után, mely atherosclerotikus szívérrendszeri betegségek formájában

(miokardiális infarktus, stroke) manifesztálódhat.. Az inzulinrezisztencia, következményesen magas inzulin szint és glükóz szint egyaránt fokozza az atherosclerotikus gyulladást, így az ezzel kapcsolatos oxidatív stresszt. A magas inzulinszint hozzájárul a vese fokozott nátrium visszatartásához, ami magas vérnyomáshoz vezethet.

A mai elképzelések szerint a szindróma alapját a viscerális obezitás talaján kialakuló kóros zsírszöveti aktivitás képezi, ami hozzájárul a többi abnormitás, így az inzulinrezisztencia és a következményes hiperinzulinémia megjelenéséhez. Alacsony HDL-koleszterin-, magas trigliceridszint és kis denzitású LDL-koleszterin-szint jellemzi a lipidabnormalitást. A fokozott szimpatikus aktivitás is jelentős elem a metabolikus szindróma patogenezisében és a szövődmények kialakulásában. Az aktivitásnövekedésben a leptin, az inzulin, a szabad zsírsavak, a citokinek, továbbá az alvási apnoe játsszák a legfőbb szerepet.

Az inzulinrezisztencia legfontosabb celluláris megnyilvánulásai: az inzulin által stimulált glükóz felvétel, illetve glikogénszintézis elégtelen volta a vázizomzatban, továbbá a máj glükoneogenezisének, illetve a zsírsejtek szabad zsírsav kibocsátásának nem megfelelő mértékű gátlása. Az inzulinrezisztencia a béta-sejtek „túlterheléséhez” vezetve, azok apoptózisán keresztül hozzájárulhat a 2-es típusú diabetes mellitus kialakulásához, amikor már relatív és későbbiekben valós hipoinzulinémia áll fenn.

3.2 A metabolikus szindróma WHO szerinti definíciója

A metabolikus szindróma diagnózisának felállításához az Egészségügyi Világszervezet kritériumai alapján 2-es típusú diabétesz, károsodott glükóz szabályozás, emelkedett éhgyomri vércukor érték vagy inzulin rezisztencia együttese, valamint a következő tünetek közül kettő jelenléte szükséges:

- 1: vérnyomás: $\geq 140/90$ Hgmm.
- 2: diszlipidémia: trigliceridek: $\geq 1,695$ mmol / L valamint (HDL-C) $\leq 0,9$ mmol / L (férfi), $\leq 1,0$ mmol / L (nő).
- 3: centrális elhízás: derék - csípő hányados > 0.90 (férfi), $> 0,85$ (nő), és / vagy testtömeg-index > 30 kg/m².
- 4: microalbuminuria: vizelet albuminürítés arány ≥ 20 mg / min, vagy albumin / kreatinin arány ≥ 30 mg / g.

3.3. Az apolipoprotein AV fehérje szerepe a lipid metabolizmusban

A APOAV fehérje a májban expresszálódik, molekulásúlya 39 kDa, struktúrája 76%-ban α -helikális (nagyobb fokú affinitást feltételez lipid felületekhez), a coiled-coil elemei két domént formálnak, míg N-terminális régiója nagyfokú homológiát mutat más apolipoprotein doménekkal. Koncentrációja a májban magas; HDL-hez és VLDL-hez kötötten exportálódik a plazmába, ahol a koncentrációja rendkívül

alacsony lesz: 0,1-0,4 $\mu\text{g/ml}$. Ez 2000-szer alacsonyabb, mint az APOAI és APOCIII plazmabeli koncentrációja. A feltételezések szerint ez az alacsony plazmakoncentráció az oka, hogy a fehérjecsalád többi tagjához képest az APOAV fehérjét csak a közelmúltban fedezték fel.

A vizsgált enzim a triglicerid metabolizmus szabályozója. A fehérjét VLDL és HDL partikulumokon találták meg, ezek között transzportálódik a metabolizmus során. Egyes vizsgálatok alapján az APOAV a kilomikronok és a VLDL katabolizmusát segíti elő, de a bél kilomikron és a máj VLDL termelését nem befolyásolja. A plazma trigliceridek hidrolízise révén hozzájárul a triglicerid-gazdag lipoproteinek eltávolításához. A pontos mechanizmus, amelyen keresztül az APOAV a lipid szintet csökkentheti, még nem ismert. Egyes *in vitro* vizsgálatok direkt, mások indirekt kapcsolatot feltételeznek az APOAV fehérje és az LPL között. Egyik feltételezés szerint az APOAV a proteoglikánokhoz kötött LPL aktiválásával mások szerint a lipoprotein-lipáz - heparin-szulfát-proteoglikán (LPL-HSPG) komplex stabilizálása révén fejti ki hatását. Nem kizárt, hogy az APOAV más apolipoproteinek (APOCIII) funkcióját módosítva csökkenti a trigliceridszintet.

3.4. Az APOA5 gén

A gént két egymástól független munkacsoport azonosította: van der Vliet és munkatársai a máj regenerálódásában szerepet játszó faktorok vizsgálata közben, Pennacchio és munkatársai pedig a lipid-metabolizmus lehetséges szabályozó génjeinek kutatásakor fedezték fel

Az APOA5 gén 3 exonja 366 aminosavat kódol, alternatív poliadeniláció eredményeként két transzkriptum keletkezik (1,3 és 1,9 kb hosszúságú), amelyeknek a funkcionális vonatkozásai még nem ismertek. Az *APOA5* gén polimorf természetű, felfedezése óta már 40 SNP-t azonosítottak a szekvenciájában.

Az *APOA5* gén felfedezésekor 4 gyakori polimorfizmust azonosítottak, amelyek mindegyike emelkedett trigliceridszinttel társult. Azóta ezek számtalan tanulmány vizsgálati tárgyát képezték: a T-1131C a promóter régióban; a T1259C a 3' nem transzlálódó régióban (UTR); a C56G a 1. exonban és az IVS3+G476A pedig a 3. intronban található. Elhelyezkedése miatt közvetlen funkcionális következménye csak a C56G variánsnak van. A 19-es kodonban szerin - triptofán aminosav cserét eredményez. Más apolipoproteinekhez hasonlóan az APOAV is rendelkezik egy N-terminális export szignálszekvenciával, amelynek segítségével a fehérje a képződés helyéről a keringésbe jut. Az APOAV esetében ez a szekvencia a 1-23 aminosavakat érinti. A 19-es pozícióban bekövetkező aminosav csere során egy nagyobb aminosav épül be, így az közvetlen hatással lehet az export folyamatra, az APOAV plazmabeli koncentrációja csökkenhet, magasabb plazma trigliceridszintet eredményezve.

4. CÉLKITŰZÉSEK

A MS betegeken végzett vizsgálatainkkal a következő céljaink voltak:

1. Megfigyelésünk tárgyává tettük a nemzetközi szakirodalomban más betegségek, mint például a hipertrigliceridémia, stroke és az ischémias szívbetegség kialakulásával összefüggésbe hozott, az *APOA5* gén gyakori természetes variánsainak (T-1131C, C56G, IVS3+G476A és T1259C) alléleloszlását.
2. Megvizsgáltuk az *APOA5* gén -1131C, 56G, IVS3+476A és 1259C alléljeinek a betegek és az egészséges kontrollok triglicerid- és koleszterinértékeire gyakorolt hatását.
3. Vizsgálatunk továbbá az *APOA5* génben található négy variáns minor alléljeinek a MS kialakulásában betöltött esetleges hajlamosító, kockázati szerepének felderítésére irányultak.
4. Ezenkívül megvizsgáltuk a variánsok által meghatározott haplotípusok triglicerid- és koleszterinértékeire gyakorolt hatását és a MS megjelenésre gyakorolt hatásukat.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. A vizsgálatban résztvevő személyek

A vizsgálatunkba bevont 353 MS beteg és 284 kontroll egyén intézetünk biobankjában található mintákból kerültek ki, amely az országos biobank részét képezi (www.biobanks.hu). A vérminták biobankba történő gyűjtése 2005 óta folyik a Pécsi Tudományegyetem II.sz. Belgyógyászati Klinika és Nephrológiai Centrum mellett a Zala Megyei Kórház II. Belgyógyászati Osztályán. Minden beteg részletes klinikai vizsgálaton esett át, amely magában foglalta a családi anamnézis felvételét, esetleges rizikófaktorok és szövődmények felmérését, teljes körű fizikális és laboratóriumi vizsgálatot.

A MS diagnózisának felállításához a WHO kritériumok alapján a 2-es típusú diabétesz, a károsodott glükóz szabályozás, emelkedett éhgyomri glükóz vagy inzulin rezisztencia együttese, valamint a következő tünetek közül kettő jelenléte szükséges (Marchesini et al., 2004):

1: vérnyomás: $\geq 140/90$ Hgmm;

2: dyslipidaemia: trigliceridek: $\geq 1,695$ mmol/L valamint (HDL-C) $\leq 0,9$ mmol/L (férfi), $\leq 1,0$ mmol/L (nő)

3: központi elhízás: testtömeg-index > 30 kg/m²

4: microalbuminuria: vizelet albuminürítés arány ≥ 20 mg/min, vagy albumin / kreatinin arány ≥ 30 mg/g.

A beteg egyénekhez korban és nemben illeszkedő, egészséges személyeket véletlenszerűen választottuk ki a tanulmányhoz kontrollnak.

5.2. Genetikai analízis

5.2.1. PCR reakció

Vizsgálataink során genomi DNS mintákkal dolgoztunk, amelyeket EDTA-val alvadásgátolt perifériás vér fehérvérsejtjeiből rutin kisózással módszerrel nyertünk ki. A mintákból származó, vizsgálni kívánt DNS-szakaszokat saját tervezésű primerekkel, polimeráz láncreakcióval amplifikáltuk.

Minden vizsgálat esetében a reakcióelegyet 50 µl végtérfogatra állítottuk össze, melynek összetétele a következő: 200 µM dNTP oldat, 1 U Taq polimeráz enzim (5 U/µl), 5 µl puffer oldat (500 mM KCl, 14 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl; pH 9,0), 0,2 mM megfelelő primerpár (Metabion International AG, Martinsried, Germany) valamint 100 ng DNS templát. A vizsgálatainkban alkalmazott primerek szekvenciáit és a PCR reakciók körülményeit a 1. táblázat foglalja össze.

5.2.2. RFLP módszer

A PCR reakciók termékeit restrikciós endonukleázokkal hasítottuk. A reakcióhoz minden esetben 15 µl PCR terméket és 1 U megfelelő restrikciós endonukleázt (Fermentas Inc., Burlington, ON, Canada), az enzim működéséhez szükséges 10x puffert és steril desztillált vizet használtunk. Ezután a reakcióelegyet a restrikciós enzimnek megfelelő hőmérsékleten inkubáltuk. A restrikciós enzimek kiválasztásánál mindig arra törekedtünk, hogy az enzimnek a felsokszorozott DNS szakaszban a genotípustól függetlenül legyen egy obligát hasítási helye, amelynek segítségével meggyőződhetünk az enzim megfelelő működéséről. Az általunk felhasznált restrikciós endonukleázokat illetve azok felismerési és hasítási helyeit a 1. táblázat mutatja. A hasítás során keletkezett fragmenteket 3 %-os etídium-bromiddal festett agaróz gélben analizáltuk a kapott adatokat UVIdoc géldokumentációs rendszer (Cleaver Scientific Ltd., Warwickshire, UK) segítségével tároltuk.

5.3. DNS szekvencia meghatározás és analízis

Eredményeinket DNS szekvenálással ellenőriztük, a minták közül random módon választottunk. A szekvencia meghatározást mindkét irányból, direkt szekvenálással végeztük, ABI Prism 3100 Avant típusú automata szekvenáló készülék segítségével (Life Technologies Ltd., Foster City, CA, USA). Az így kapott szekvenciákat összevetettük referencia-szekvenciával a Winstar genetikai program segítségével (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA).

1. táblázat A vizsgált polimorfizmusok PCR-RFLP körülményei.

Vizsgált variáns	Az alkalmazott primerek szekvenciája	Annealing hőmérséklet (°C)	PCR termék hossza (bp)	A restrikciós enzim	
				Neve	Felismerési és hasítási helye
APOA5					
T-1131C (rs662799)	f: 5'-CCCCAGGAACTGGAGCGACCTT-3' r: 5'-TTCAAGCAGAGGGAAGCCTGTA-3'	55	398	<i>TruI</i>	5'-T [^] TAA-3' 3'-AAT [^] T-5'
IVS3+G476A (rs2072560)	f: 5'-CTCAAGGCTGTCTTCAG-3' r: 5'-CCTTTGATTCTGGGGACTGG-3'	62	280	<i>MnlII</i>	5'-CCTC(N) ₇ [^] -3' 3'-GGAG(N) ₆ [^] -5'
T1259C (rs2266788)	f: 5'-TCAGTCCTTGAAAGTGGCCT-3' r: 5'-ATGTAGTGGCACAGGCTTCC-3'	62	287	<i>BseGI</i>	5'-GGATGNN [^] -3' 3'-CCTAC [^] NN-5'
C56G (rs3135506)	f: 5'-AGAGCTAGCACCGCTCCTTT-3' r: 5'-TAGTCCCTCTCCACAGCGTT-3'	62	256	<i>Cfr13I</i>	5'-G [^] GNCC-3' 3'-CCNG [^] G-5'

f: forward primer; r: reverse primer

5.4. Az adatok statisztikai feldolgozása

A klinikai adatokat minden esetben átlag \pm SEM értéként tüntettük fel, a változók eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk. A normál eloszlást követő mintákra úgynevezett paraméteres próbákat; nem normál eloszlást követő változók esetén nem paraméteres próbákat alkalmaztunk. Az egyes csoportok értékei közötti különbség meglétét vagy hiányát Kruskal-Wallis-teszttel állapítottuk meg. A csoportok klinikai és laboratóriumi paramétereit közötti különbségek páronkénti összehasonlítására normál eloszlású, diszkrét változókra χ^2 tesztet alkalmaztunk. Normál eloszlású, folytonos változók esetében a két csoport paramétereit Student-féle páros t-teszttel vizsgáltuk. Nem normál eloszlású változók elemzését pedig Mann-Whitney teszttel végeztük. A szignifikancia határértékét (p) minden esetben 0,05-nél állapítottuk meg.

A korreláció elemzéséhez és az esélyhányadosok megadásához logisztikus regressziós modellt használtunk. A konfidencia intervallum minden esetben 95%-os volt. A statisztikai analíziseket MS Excel valamint SPSS 11.5 programok segítségével végeztük (SPSS Inc, Chicago, IL; USA). A haplotípusok meghatározásához a HAPSTAT 3.0 (University of North Carolina, Chabell Hill, NC, USA) szoftvert használtuk.

6. EREDMÉNYEK

6.1. Az APOA5 gén variánsainak vizsgálata

2. táblázat *A vizsgált MS betegek és kontrollok főbb klinikai paramétereit*

	Kontrollok	MS betegek
	n=284	n=343
nem (férfi/nő)	124/160	158/185
Kor (év)	58,8 \pm 15,2	60,5 \pm 10,8
BMI (kg/m ²)	24,1 \pm 2,00	33,1 \pm 5,23*
Szérum triglicerid (mmol/l)	1,40 \pm 0,37	2,32 \pm 1,38*
Szérum összkoleszterin (mmol/l)	5,39 \pm 1,00	5,35 \pm 1,08

* p<0,001

A vizsgált MS betegek és a kontrollcsoport klinikai és laboratóriumi paramétereit a 2. táblázat mutatja be. A betegcsoport szérum triglicerid és BMI eredményei szignifikánsan magasabbak voltak, mint a kontrollcsoportban ($p < 0,001$).

A 3. táblázat mutatja a beteg- és kontrollcsoport triglicerid, koleszterin és BMI profilját a genotípusok megoszlásában. Mind a beteg-, mind a kontrollcsoportban a C56G variáns kivételével minden variáns esetében szignifikánsan emelkedett trigliceridszintet találtunk a minor allélt hordozó egyének alcsoportjában azokhoz képest, akik nem hordozták a variánsokat. A többi vizsgált klinikai paraméter (összkoleszterin, HDL-C, BMI) nem mutatott hasonló összefüggést. A vizsgálat során a logisztikus regressziós analízis segítségével kapott esélyhányadosokat (odds ratio, OR) a 4. táblázatban tüntettük fel. Az OR értékeket minden esetben a csoportok között fennálló - kor, nem, BMI, szérum összkoleszterin szint, magas vérnyomás, ischémiás szívbetegség, és stroke különbségekkel korrigáltuk. A táblázatból kitűnik, hogy az *APOA5* gén vizsgált variánsai közül a -1131C és az *IVS3+476A* allél hordozása hajlamosít a MS kialakulására.

6.2. Az APOA5 gén haplotípusainak vizsgálata

Az 5. táblázat tartalmazza az általunk vizsgált populációban talált haplotípusokat és az ezeket meghatározó genotípusokat.

3. táblázat A szérum triglicerid, összkoleszterin, HDL-C szint és BMI az egyes genotípusokban.

		<i>T-1131C</i>		<i>IVS3+G476A</i>		<i>T1259C</i>		<i>C56G</i>	
		TT	TC+CC	GG	GA+AA	TT	TC+CC	CC	CG+GG
		n=282	n=61	n=285	n=58	n=284	n=59	n=300	n=43
MS betegek	BMI (kg/m ²)	33,2±5,16	32,6±5,38	33,2±5,15	32,7±5,41	33,2±5,16	32,6±5,41	33,2±5,20	33,0±5,22
	Szérum triglicerid (mmol/l)	2,33±1,28	2,90±1,55*	2,39±1,28	2,90±1,55*	2,34±1,29	2,89±1,54*	2,42±1,38	2,48±1,48
	Szérum összkoleszterin (mmol/l)	5,30±1,06	5,51±1,11	5,38±1,06	5,46±1,10	5,31±1,08	5,47±1,06	5,34±1,05	5,31±1,16
	HDL-C (mmol/l)	1,24±0,03	1,22±0,04	1,24±0,05	1,23±0,03	1,25±0,02	1,23±0,03	1,23±0,06	1,24±0,02
Kontrollok		TT	TC+CC	GG	GA+AA	TT	TC+CC	CC	CG+GG
		n=256	n=28	n=262	n=22	n=251	n=33	n=257	n=27
	BMI (kg/m ²)	24,1±2,05	24,1±1,50	24,1±2,05	24,1±1,28	24,1±2,08	24,2±1,25	24,1±2,03	24,2±1,68
	Szérum triglicerid (mmol/l)	1,38±0,34	1,66±0,54*	1,38±0,34	1,70±0,53*	1,38±0,35	1,63±0,48*	1,41±0,38	1,32±0,33
	Szérum összkoleszterin (mmol/l)	5,42±1,00	5,18±1,06	5,42±0,99	5,10±1,07	5,41±0,98	5,30±1,17	5,39±1,02	5,40±0,81

*p < 0,05 a normál genotípushoz képest

4. táblázat Az egyes genotípusok logisztikus regressziós vizsgálata a MS kialakulásában.

SNP	MS betegek	Kontrollok	OR (95% CI)	Korrigált OR [#] (95% CI)	*p
T-1131C	17,8%	9,85%	1,856 (0,995-2,981) p=0,004*	3,622 (1,200-10,963) p=0,002*	
IVS3+G476A	16,9%	7,75%	2,780 (1,567-5,292) p=0,001*	2,461 (1,297-5,066) p=0,007*	
T1259C	17,2%	11,6 %	1,856 (0,598-2,941) p=0,823	1,971 (0,912-2,764) p=0,915	
C56G	12,5%	9,5%	1,122 (0,659-1,911) p=0,672	1,162 (0,645-2,092) p=0,617	

<0,05; [#]Korra, nemre, BMI-re, szérum összkoleszterinre, ischémiás szívbetegségre, stroke-ra fennálló különbségekre korrigálva

5. táblázat Az APOA5 gén haplotípusai.

Haplotípus	T-1131C	IVS3 G+476A	T1259C	C56G
APOA5*1	T	G	T	C
APOA5*2	C	A	C	C
APOA5*3	T	G	T	G
APOA5*4	C	G	T	C
APOA5*5	T	G	C	C

A 6. táblázat mutatja a beteg és kontrollcsoport triglicerid, koleszterin és BMI profilját a haplotípusok megoszlásában. Mind a beteg-, mind a kontrollcsoportban szignifikánsan emelkedett trigliceridszintet találtunk az APOA5*2 alcsoportjában az APOA5*1 haplotípust hordozókhoz képest. A többi vizsgált klinikai paraméter (összkoleszterin, HDL-C, BMI) nem mutatott hasonló összefüggést.

6. táblázat A szérum triglicerid, összkoleszterin, HDL-C szint és BMI haplotípusonként.

Haplotípus	<i>APOA5</i> *1/ 1	<i>APOA5</i> *1/2 -2/2	<i>APOA5</i> *1/3- 3/3	<i>APOA5</i> *1/4- 4/4	<i>APOA5</i> *1/5- 5/5	Egyéb	
	73,1%	13,1%	9,50%	1,40%	1,00%	1,90%	
MS betegek	BMI (kg/m ²)	33,2±5,25	33,4±5,85	33,5±4,40	31,6±5,37	30,5±2,33	27,2±2,07
	Szérum triglicerid (mmol/l)	2,29±1,29	2,95±1,63*	2,57±1,43	2,84±1,51	2,68±1,50	2,43±1,87
	Szérum összkoleszterin (mmol/l)	5,29±1,09	5,37±1,10	5,33±1,09	6,02±0,90	5,50±1,36	5,34±0,87
	HDL-C (mmol/l)	1,24±0,03	1,23±0,04	1,24±0,02	1,26±0,11	1,29±15	1,22±0,09
	76,5%	4,90%	8,40%	3,50%	5,30%	1,40%	
Kontroll	BMI (kg/m ²)	24,1±2,13	23,9±1,29	24,3±1,69	24,1±2,02	24,2±1,35	24,7±0,43
	Szérum triglicerid (mmol/l)	1,38±0,35	1,77±0,61*	1,32±0,33	1,46±0,49	1,39±0,25	1,45±0,21
	Szérum összkoleszterin (mmol/l)	5,41±1,00	5,16±1,07	5,42±0,85	5,34±1,17	5,51±1,19	4,85±0,90

*p <0,05 az *APOA5**1 haplotípussal összehasonlítva

A haplotípusok logisztikus regressziós analízisével kapott esélyhányadosokat a 7. táblázatban demonstráljuk. Az OR értékeket minden esetben a csoportok között fennálló - kor, nem, BMI, szérum összkoleszterin szint, magas vérnyomás, ischémiás szívbetegség, és stroke - különbségekkel korrigáltuk. A táblázatból kitűnik, hogy az *APOA5* gén vizsgált haplotípusai közül Az *APOA5**2 hordozása hajlamosító, viszont az *APOA5**5 haplotípusa védő hatású a MS kialakulására a normál *APOA5**1 haplotípussal összehasonlítva.

7. táblázat Az egyes haplotípusok logisztikus regressziós vizsgálata a MS kialakulásában.

Haplotípus	MS betegek	Kontrollok	OR (95% CI)	Korrigált OR [#] (95% CI)
APOA5*1/1	73,1%	76,5%	0,837 (0,590-1,187) p=0,318	0,878 (0,594-1,299) p=0,515
APOA5*1/2-2/2	13,1%	4,90%	2,880 (1,567-5,292) p=0,001*	2,561 (1,295-5,066) p=0,007*
APOA5*1/3-3/3	9,50%	8,40%	1,122 (0,659-1,911) p=0,672	1,162 (0,645-2,092) p=0,617
APOA5*1/4-4/4	1,40%	3,50%	0,401 (0,114-1,117) p=0,081	0,539 (0,183-1,591) p=0,263
APOA5*1/5-5/5	1,00%	5,30%	0,174 (0,057-0,531) p=0,002*	0,182 (0,058-0,565) p=0,003*
Egyéb	1,90%	1,40%	0,374 (0,410-4,606) p=0,607	1,388 (0,395-4,876) p=0,609

*p <0,05; [#]Korra, nemre, BMI-re, szérum összkoleszterinre, ischémiás szívbetegségre, stroke-ra fennálló különbségekre korrigálva.

7. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

7.1. Az APOA5 gén promóter régiójában található T-1131C variáns szerepe

Az APOA5 gén természetes variánsai közül a legtöbbet vizsgált eltérés a gén promóter régióját érintő T-1131C tranzíció. Ezt a variánst az egészséges európai populáció 6%-ában találták meg. Az ázsiai populációk közül a japán populációban 35%-os, a kínai populációban 29%-os, az indiai populációban

pedig 20%-os gyakoriságot mutatott. Tanulmányunkban a variáns vizsgálata során az eddig európai populációra leírtaknál enyhén magasabb 9,89%-os allélfrekvenciát találtunk a vizsgált magyar kontrollcsoportban. A plazma lipidszintek fontos determináló faktorai a kardio- és cerebrovaszkuláris betegségekre való hajlamosításnak. A trigliceridszint 1 mmol/l-es emelkedése férfiakban 14%-kal, nőkben 37%-kal emeli a kockázatot koronária-betegség kialakulására.

Az APOA5 T-1131C variánsát - felfedezése óta - különböző populációkban, számos betegcsoportban vizsgálták. Familiáris hiperlipidémiában és hipertrigliceridémiában szenvedő kínai, cseh, ír és magyar populációkból származó betegekben egyértelmű hajlamosító tényezőként azonosították az adott betegség kialakulására. Egy nemzetközi kooperáció (Framingham Heart Study) kritériumai szerint kardiovaszkuláris betegségben szenvedő egyéneken elvégzett genotipizálás és statisztikai vizsgálat a -1131C mutáns allél hordozását a betegség kockázati tényezőjeként definiálja, ugyanakkor koronária betegségben betöltött szerepe még vitatott. Magyar és kínai betegcsoportban a mutáns allél hordozása emelkedett rizikót jelentett miokardiális infarktus kialakulásában.

Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a mutáns C allél hordozása szignifikánsan emelkedett trigliceridszintet eredményez minden vizsgált csoportban. A -1131C allél trigliceridemelő hatását számos kutatócsoport vizsgálta mind felnőttekben, mind gyermekekben. Eredményeik a trigliceridszint tekintetében egységesek és eredményeinkkel megegyeznek: a mutáns allél a vizsgált populációktól függetlenül összefüggést mutat emelkedett trigliceridszinttel.

Vu-Dac és munkatársai bioinformatikai módszerekkel sok más szabályozó szekvencia között egy peroxiszóma proliferátor reszponzív elemet (PPRE) azonosítottak ebben a promóter régióban (-272, -260), amely az *APOA5* gén expressziójának szabályozásához szükséges. A -1131C allél a feltételezések értelmében megváltoztathatja az affinitást illetve a kötődést ehhez vagy más hasonló szabályozó régiókhoz, csökkentve ezzel az *APOA5* gén expresszióját, így emelve a trigliceridszintet.

Valószínűleg a T-1131C más génen belüli funkcionális variánsokkal erős kapcsoltságban van, így ezen a kapcsolaton keresztül fejtheti ki hatását a trigliceridszintre. Ilyen kapcsolatot az *APOA5* T-1131C és A-3G variánsok között találtak. Ez az eltérés a start kodontól 3 bp távolságra van 5' irányban. Ez a báziscsere az *APOA5* mRNS transláció csökkenését, így alacsonyabb plazma APOAV szintet, és ezáltal emelkedett trigliceridszintet von maga után.

A T-1131C nemcsak az *APOA5* gén variánsaival állhat erős kapcsoltságban, hanem az apolipoprotein génklaszter - *APOA5* génhez közel lokalizálódó - többi tagjának variánsaival is. Erős kapcsoltságot mutattak ki az általunk vizsgált variáns és az *APOC3* gén C-482T vagy C-455T variánsai között. Az *APOC3* gén promóter régiójában egy inzulin reszponzív elemet azonosítottak, amely az

APOC3 inzulin által történő szabályozásának kulcseleme. A gén promóter régiójában bekövetkezett mutációk ezt a fontos szabályozó régiót megváltoztatják, ennek következtében megszűnik az inzulin *APOC3*-ra kifejtett repressziója, így emelkedik az APOCIII szintje, ami a trigliceridszint szükségszerű emelkedésével.

7.2. Az APOA5 gén intronikus régiójában található IVS3+G476A variáns szerepe

Az *APOA5* gén intronikus régióját érintő variánsokról az előzőekben tárgyalt variánshoz viszonyítva csekély ismeretanyaggal rendelkezünk. Az általunk végzett vizsgálatokból és más európai populációkon végzett tanulmányokból is világosan látszik, hogy ez az SNP emeli a trigliceridszintet. Egy vizsgált costa ricai populációban azonban nem találtak triglicerid-emelkedést a minor allélt hordozó egyénekben. A mechanizmus, amelyen keresztül befolyásolják a trigliceridszintet, még ismeretlen; a feltételezések szerint más variánsokkal való szoros kapcsoltság játszhat ebben szerepet. Európai populációkban teljes kapcsoltságot állapítottak meg az *APOA5* variánsai között. A costa ricai populációban a kapcsoltság csak részleges volt, ami magyarázatot szolgáltat arra, miért nem találtak összefüggést a mutáns allélok és emelkedett trigliceridszint között.

7.3. Az APOA5 gén 3' UTR régiójában található T1259C variáns szerepe

T1259C variáns trigliceridszint-emelő hatása ellenére a mutáns C allél hordozását nem találtak hajlamosító tényezőnek a MS kialakulására. Ezzel ellentétben az IVS3+G476A eltéréssel 3-4-szeresére emelheti MS kialakulásának esélyét. A legfőbb hatását a vele kapcsolatosan előforduló variánsok által előidézett funkcióváltozásban fejezi ki. Ezt támasztja alá, hogy az *APOA5**5 haplotípus esetén, mikor a 1259C allél csak önmagában található, nem emeli a trigliceridszintet, sőt véd a MS kialakulása ellen.

7.4. Az APOA5 gén 1. exonjában található C56G variáns szerepe

A vizsgált SNP a gén harmadik exonjának 56-os nukleotid pozíciójában található C/G tranzíció. A báziscsere a 19-es aminosavat, a szerint érinti, helyette a mutáns allél egy triptofán aminosavat kódol. Az 56G allél populációnként eltérő előfordulást mutat. A kínai és japán populációkban rendkívül alacsony arányban fordul elő (<0,1%), az indiai populáció 3%-ában található meg, afro-amerikai és francia populációkban 4,8%, spanyol populációban ~15% az előfordulási aránya. Vizsgálatainkban több vizsgált európai populációnál (spanyol, francia, német, osztrák), 9,5%-os a mutáns allélt hordozók aránya a kontrollcsoportban.

Talmud és munkatársai a trigliceridszint 8-16%-os emelkedését tapasztalták egy kaukázusi populációban az 56G allél jelenlétekor (Talmud et al., 2005). Török populációban pedig 18-26%-os volt az emelkedés mértéke a mutáns allél hatására (Hodoglugil et al., 2006). A populációvizsgálatok eredményei alapján hordozása miokardiális infarktusz, koronária betegség, metabolikus szindróma

kialakulására jelent magasabb kockázatot. Talmud és munkatársai a mutáns allél jelenlétében gyorsabb atherogenezist mutattak ki. A mutáns allélt homo-, vagy heterozigóta formában hordozók körében sem találtunk emelkedett triglicerid átlagértékeket illetve a variáns hordozása nem növelte a MS kialakulásának esélyét.

A variáns lipidparaméterekre gyakorolt hatása és a mechanizmus, amelyen keresztül trigliceridszint-emelkedést képes kiváltani, számos tanulmány középpontjába került. A vizsgálatok alapján az *APOA5* variánsok közül a C56G az egyetlen „funkcionális” variáns, amely nem más SNP-kel való kapcsolatán keresztül fejt ki hatását, hanem direkt módon emeli a trigliceridszintet. A variáns hatására ugyanis a hidrophil szerin aminosav helyett hidrofób triptofán épül be az APOAV szignálfehérje hidrophil doménjében, amely drasztikusan befolyásolhatja a fehérje endoplazmatikus retikulumon át történő transzlokációját. Ennek következtében csökken a szekretált APOAV fehérje mennyisége, és így trigliceridszint-emelkedés detektálható.

Természetesen az sem zárható ki, hogy a C56G variáns esetleg más polimorfizmusokkal együtt, egymás hatását felerősítve játszik szerepet betegségek kialakulásában. Schaefer és munkatársai 170 hipertrigliceridémias beteg vizsgálata során a betegek *APOE* és *APOA5* C56G genotípusát határozták meg. Az *APOE* 2/2 genotípussal rendelkező betegek majdnem mindannyian hordozták az 56G allélt is. Normál lipidparaméterekkel rendelkező egyéneknél azonban ezek együttesen nem voltak kimutathatók. Hipotézisük szerint, a C56G kofaktorként működve vezet hipertrigliceridemia kialakulásához. Ezt a hatásmechanizmust valószínűsítik a vizsgálati eredményeink is

7.5. Az *APOA5* gén leggyakoribb haplotípusainak lehetséges szerepe

Pennacchio és munkatársai az *APOA5* gén természetes variánsainak tanulmányozása során erős kapcsoltságot igazoltak a leggyakoribb variánsok között, amelyek így három fő haplotípust determinálnak. A két haplotípus (*APOA5**2 és*3) a vad típusú (*APOA5**1) haplotípussal együtt a populáció ~98%-át lefedi. Vizsgálatainkban hasonló adatokat kaptunk, kivéve hogy a kontrollcsoportban magas arányban található az *APOA5**5 haplotípus.

Az *APOA5**2 haplotípus egyértelmű rizikótényező hipertrigliceridémia, különböző kardio-, cerebrovaszkuláris megbetegedések kialakulásában. Az *APOA5**2 haplotípus román, osztrák és német felnőtt populációk mellett magyar gyermekeknél is egyértelműen hajlamosít a MS kialakulására. Az *APOA5**3 haplotípus több tanulmányban kockázati faktora a MS-nek, de tanulmányunk illetve egy magyar gyermek populáción végzett kutatás sem igazolta ezt.

A haplotípusok analízise alapján feltételezhető, hogy a C56G variáns kivételével a vizsgált variánsok nem önmagukban, hanem az *APOC3* gén változataival kapcsolatban fejthetik ki hatásukat. Ha a -

1131C variáns önmagában fordul elő (APOA*4), nem emeli a szérum triglicerid szintjét, illetve nincs hatása a MS megjelenésére. Sőt a 1259C egyedüli előfordulása véd a betegség kialakulása ellen. Több tanulmány, ami az *APOA1/C3/A4* génklaszterrel foglalkozik, ahova az *APOA5* is tartozik, csak az *APOA5*2* haplotípus esetén mutatott ki nagyfokú kapcsoltságot az *APOC3* promóter régiójában található polimorfizmusokkal, amelyek egyértelműen befolyásolják a szérum triglicerid szintet és a glükóz metabolizmust (Li et al., 2004; Olivieri et al., 2003b).

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Tanulmányunkban a következő megfigyeléseket tettük:

1. Az *APOA5* variánsainak lipidparaméterekre gyakorolt hatásait vizsgálva elmondható, hogy a –1131C, IVS3+476A, 1259C mutáns allélok jelenléte a trigliceridek szignifikánsan emelkedett koncentrációját eredményezte a MS betegekben és a kontrollcsoportban is. A C56G variáns egyik csoportban sem mutatott összefüggést a szérum triglicerid szintekkel.
2. A koleszterin értékeket vizsgálva sem a betegek, sem a kontrollok körében a variánsok nem befolyásolták az összkoleszterin szintet.
3. Az allélok eloszlását vizsgálva a T–1131C, IVS3+G476A variánsok esetében a mutáns allél szignifikáns akkumulációját találtuk metabolikus szindrómás betegcsoportban a kontroll egyénekhez viszonyítva.
4. A T1259C variáns esetében azonban nem tudtunk kimutatni különbséget egyik allél előfordulásában sem a beteg-, sem a kontrollcsoportokban, annak ellenére, hogy a vizsgálataink során a 1259C allélvariáns hordozásának hatására szignifikáns trigliceridszint-emelkedést tapasztaltunk.
5. A vizsgált variánsok 5 gyakoribb haplotípust határoznak meg, az *APOA5*5* haplotípust más populációkban eddig még nem írták le.
6. A haplotípusok közül csak az *APOA5*2* eredményezte a trigliceridek statisztikailag szignifikánsan emelkedett koncentrációját a metabolikus szindrómás betegekben és a kontrollokban is.
7. A koleszterin értékeket vizsgálva sem a betegek, sem a kontrollok körében nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést egyik *APOA5* haplotípus hordozásának hatására sem.
8. A haplotípusok eloszlását vizsgálva az *APOA5*2* haplotípus akkumulációját találtuk metabolikus szindrómás betegcsoportban a kontroll egyénekhez viszonyítva. Az *APOA5*5* protektív hatásának bizonyult a MS kialakulásában.

9. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

A dolgozat alapjául szolgáló eredeti közlemények

1. Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome. Maász A, **Kisfali P**, Horvatovich K, Mohás M, Markó L, Csöngéi V, Faragó B, Járomi L, Magyarai L, Sáfrány E, Sipeky C, Wittmann I, Melegh B. *Pathol Oncol Res.* 2007;13(3):243-7.
2. Apolipoprotein A5 IVS3+476A allelic variant associates with increased triglyceride levels and confers risk for development of metabolic syndrome in Hungarians. **Kisfali P**, Mohás M, Maasz A, Hadarits F, Markó L, Horvatovich K, Oroszlán T, Bagosi Z, Bujtor Z, Gasztonyi B, Wittmann I, Melegh B. *Circ J.* 2008 Jan;72(1):40-3.
3. Haplotype analysis of the apolipoprotein A5 gene in patients with the metabolic syndrome. **Kisfali P**, Mohás M, Maász A, Polgár N, Hadarits F, Markó L, Brasnyó P, Horvatovich K, Oroszlán T, Bagosi Z, Bujtor Z, Gasztonyi B, Rinfel J, Wittmann I, Melegh B. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010 Sep;20(7):505-11.

Egyéb közlemények

Könyvfejezet:

Horizons in World Cardiovascular Research. Volume 2

Chapter 3. Shared Susceptibility Genes of Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease.

Peter Kisfali, Eniko Safrany, Judit Bene, Bela Melegh,

Nova Science Publishers 2010

Folyóirat cikkek:

1. Common functional variants of APOA5 and GCKR accumulate gradually in association with triglyceride increase in metabolic syndrome patients. Hadarits F, **Kisfali P**, Mohás M, Maász A, Duga B, Janicsek I, Wittmann I, Melegh B. *Mol Biol Rep.* 2011 Jun 4.
2. Detection of Dobrava-Belgrade hantavirus using recombinant-nucleocapsid-based enzyme-linked immunosorbent assay and SYBR Green-based real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Németh V, Madai M, Maráczai A, Bérczi B, Horváth G, Oldal M, **Kisfali P**, Bányai K, Jakab F. *Arch Virol.* 2011 May 14.
3. Functional glucokinase regulator gene variants have inverse effects on triglyceride and glucose levels, and decrease the risk of obesity in children. Horvatovich K, Bokor S, Polgar N, Kisfali P, Hadarits F, Jaromi L, Csöngéi V, Repasy J, Molnar D, Melegh B. *Diabetes Metab.* 2011 Apr 19.
4. Monitoring of group A rotaviruses in wild-living birds in Hungary. Ursu K, Papp H, **Kisfali P**, Rigó Avian Dis. 2011 Mar;55(1):123-7.
5. Cytotoxic T lymphocyte-Associated Antigen +49G Variant Confers Risk for Anti-CCP- and Rheumatoid Factor-Positive Type of Rheumatoid Arthritis Only in Combination with CT60G Allele. Farago B, **Kisfali P**, Magyarai L, Polgar N, Melegh B. *Autoimmune Dis.* 2010;2010:285974.
6. GCKR gene functional variants in type 2 diabetes and metabolic syndrome: do the rare variants associate with increased carotid intima-media thickness? Mohas M, **Kisfali P**, Jaromi L, Maasz A, Feher E, Csöngéi V, Polgar N, Safrany E, Cseh J, Sumegi K, Hetysesy K, Wittmann I, Melegh B. *Cardiovasc Diabetol.* 2010 Nov 29;9(1):79
7. Haplotype analysis of the apolipoprotein A5 gene in obese pediatric patients. Horvatovich K, Bokor S, Barath A, Maasz A, **Kisfali P**, Jaromi L, Polgar N, Toth D, Repassy J, Endreffy E, Molnar D, Melegh B. *Int J Pediatr Obes.* 2010 Sep 30
8. Triglyceride level affecting shared susceptibility genes in metabolic syndrome and coronary artery disease. **Kisfali P**, Polgár N, Sáfrány E, Sümegi K, Melegh B I, Bene J, Wéber A, Hetysesy K, Melegh B. *Curr Med Chem.* 2010;17(30):3533-41.
9. Mitochondrial DNA 11777C>A mutation associated Leigh syndrome: case report with a review of the previously described pedigrees. Hadzsiev K, Maasz A, **Kisfali P**, Kalman E, Gomori E, Pal E, Berenyi E, Komlosi K, Melegh B. *Neuromolecular Med.* 2010 Sep;12(3):277-84.
10. Stepwise Positive Association Between APOA5 Minor Allele Frequencies and Increasing Plasma Triglyceride Quartiles in Random Patients with Hypertriglyceridemia of Unclarified Origin.

- Hadarits F, **Kisfali P**, Mohás M, Maász A, Sümegi K, Szabó M, Hetyésy K, Valasek A, Janicsek I, Wittmann I, Melegh B. *Pathol Oncol Res.* 2010 May 19
11. Assessment of DNA methylation at the interferon regulatory factor 5 (IRF5) promoter region in inflammatory bowel diseases. Balasa A, Gathungu G, **Kisfali P**, Smith EO, Cho JH, Melegh B, Kellermayer R. *Int J Colorectal Dis.* 2010 May;25(5):553-6.
 12. Functional Variants of Glucokinase Regulatory Protein and Apolipoprotein A5 Genes in Ischemic Stroke. Járomi L, Csöngéi V, Polgár N, Szolnoki Z, Maász A, Horvatovich K, Faragó B, Sipeky C, Sáfrány E, Magyar L, **Kisfali P**, Mohás M, Janicsek I, Lakner L, Melegh B. *Mol Neurosci.* 2010 May;41(1):121-8.
 13. A Polymorphism within the Fructosamine-3-kinase Gene is Associated with HbA1c Levels and the Onset of Type 2 Diabetes Mellitus. Mohás M, **Kisfali P**, Baricza E, Mérei A, Maász A, Cseh J, Mikolás E, Szijártó IA, Melegh B, Wittmann I. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2010 Mar;118(3):209-12.
 14. Trends in the epidemiology of human G1P[8] rotaviruses: a Hungarian study. Bányai K, Gentsch JR, Martella V, Bogdán A, Havasi V, **Kisfali P**, Szabó A, Mihály I, Molnár P, Melegh B, Szücs G. *J Infect Dis.* 2009 Nov 1;200 Suppl 1:S222-7.
 15. Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. Ursu K, **Kisfali P**, Rigó D, Ivanics E, Erdélyi K, Dán A, Melegh B, Martella V, Bányai K. *Arch Virol.* 2009;154(8):1365-9.
 16. Searching for HAdV-52, the putative gastroenteritis-associated human adenovirus serotype in Southern Hungary. Bányai K, Martella V, Meleg E, **Kisfali P**, Péterfi Z, Benkő M, Melegh B, Szucs G. *New Microbiol.* 2009 Apr;32(2):185-8.)
 17. First detection of P[6],G9 rotaviruses in Hungary--an imported strain from India? László B, Nyúl Z, **Kisfali P**, Deák J, Kovács J, Kónya J, Mészner Z, Molnár P, Pátri L, Schneider F, Tóth A, Melegh B, Iturriza-Gomara M, Gray J, Martella V, Szucs G, Bányai K. *J Travel Med.* 2009 Mar-Apr;16(2):141-3.
 18. Adenovirus gastroenteritis in Hungary, 2003-2006. Bányai K, Kisfali P, Bogdán A, Martella V, Melegh B, Erdman D, Szücs G. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009 Aug;28(8):997-9.
 19. Genetic diversity and zoonotic potential of human rotavirus strains, 2003-2006, Hungary. Bányai K, Bogdán A, Domonkos G, **Kisfali P**, Molnár P, Tóth A, Melegh B, Martella V, Gentsch JR, Szucs G. *J Med Virol.* 2009 Feb;81(2):362-70.
 20. Apolipoprotein A5 gene IVS3+G476A allelic variant confers susceptibility for development of ischemic stroke. Maasz A, **Kisfali P**, Jaromi L, Horvatovich K, Szolnoki Z, Csongéi V, Safrany E, Sipeky C, Hadarits F, Melegh B. *Circ J.* 2008 Jul;72(7):1065-70.
 21. Detection and quantification of group C rotaviruses in communal sewage. Meleg E, Bányai K, Martella V, Jiang B, Kocsis B, **Kisfali P**, Melegh B, Szucs G. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Jun;74(11):3394-9.
 22. Apolipoprotein A5 gene C56G variant confers risk for the development of large-vessel associated ischemic stroke. Maász A, **Kisfali P**, Szolnoki Z, Hadarits F, Melegh B. *J Neurol.* 2008 May;255(5):649-54.
 23. Pseudo-Bartter syndrome in a case of cystic fibrosis caused by C1529G and G18.3978A compound heterozygosity Horvatovich K, Orkényi M, Bíró E, Pongrácz K, **Kisfali P**, Talián G, Csöngéi V, Járomi L, Sáfrány E, Harangi F, Sulyok E, Melegh B. *Orv Hetil.* 2008 Feb 17;149(7):325-8.
 24. Prevalence of functional haplotypes of the peptidylarginine deiminase citrullinating enzyme gene in patients with rheumatoid arthritis: no influence of the presence of anticitrullinated peptide antibodies. Faragó B, Talián GC, Maász A, Magyar L, Horvatovich K, Kovács B, Cserép V, **Kisfali P**, Kiss CG, Czirják L, Melegh B. *Clin Exp Rheumatol.* 2007 Jul-Aug;25(4):523-8.
 25. Emergence of serotype G12 rotaviruses, Hungary. Bányai K, Bogdán A, **Kisfali P**, Molnár P, Mihály I, Melegh B, Martella V, Gentsch JR, Szücs G. *Emerg Infect Dis.* 2007 Jun;13(6):916-9.

Összesített impakt faktor (idézhető absztraktok nélkül): 70,972