

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**AZ APOLIPOPROTEIN A5 GÉN TERMÉSZETES
POLIMORFIZMUSAI ÉS A VÉR TRIGLICERID SZINTJE
KÖZÖTTI KAPCSOLAT ÁTLAG MAGYAR
NÉPESSÉGBEN, METABOLIKUS SZINDRÓMÁS ÉS
STROKE-OS BETEGEKBEN**

Dr. Hadarits Ferenc

Témavezető: Prof. Dr. Melegh Béla

Készült:

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Genetikai Intézet



Pécs, 2011

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS	5
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
3.1. A lipid anyagcsere vázlatos jellemzése	7
3.2. A hypertrigliceridaemia kialakulásában szerepet játszó genetikai tényezők.....	13
3.3. Az apolipoprotein géncsalád	14
3.4. Az <i>apolipoprotein A5</i> fehérje szerepe a lipid metabolizmusban.....	17
4. CÉLKITŰZÉSEK	19
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	20
5.1. Betegek.....	20
5.1.1 Átlag magyar népesség.....	20
5.1.2. és 5.1.3. Metabolikus szindrómás és stroke-os betegek.....	20
5.2. Módszerek	21
5.2.1. Polimeráz láncreakció (PCR).....	21
5.2.2. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) módszer.....	21
5.3. DNS szekvencia meghatározás és analízis.....	23
5.4. Statisztikai kiértékelés.....	23
6. EREDMÉNYEK	24
6.1. <i>APOA5</i> allél variánsok és a szérum triglicerid szintje közötti kapcsolatvizsgálata metabolikus szindrómás pácienseknél.....	24
6.1.1. Metabolikus szindrómás betegek <i>APOA5</i> allél variánsai és szérum triglicerid szintek.....	24
6.1.2. A metabolikus szindrómás betegek haplotípusai.....	25
6.1.3. Négy, triglicerid szint szerinti kvartilisben a vizsgált <i>APOA5</i> allél variánsok gyakorisága	27
6.2. Stroke-os betegek <i>APOA5</i> allél variánsai és szérum triglicerid szintjeinek elemzése.....	29
6.2.1. A T-1131C <i>APOA5</i> variáns vizsgálata.....	29
6.2.2. A C56G <i>APOA5</i> variáns vizsgálata.....	30
6.2.3. A T1259C és IVS3+G476A <i>APOA5</i> variánsok vizsgálata.....	31

6.3. A vizsgálati csoportok kialakítása az átlag magyar népesség <i>APOA5</i> allél polimorfizmusai és triglicerid szintjei kapcsolatához.....	33
6.3.1. Alcsoportok kialakítása, genotipizálás.....	33
6.3.2. Az <i>APOA5</i> gén promóter régiójában található T-1131C variáns vizsgálata.....	36
6.3.3. Az <i>APOA5</i> gén intronikus IVS3+G476A variánsának vizsgálata...	37
6.3.4. Az <i>APOA5</i> gén T1259C variánsainak vizsgálata	38
6.3.5. Az <i>APOA5</i> gén harmadik exonjában található C56G variáns vizsgálata.....	39
6.3.6. Az <i>APOA5</i> haplotípusok.....	40
7. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	41
7.1. Az <i>APOA5</i> gén promóter régiója, a T-1131C variáns lehetséges szerepe	41
7.2. Az <i>APOA5</i> gén T1259C variánsának szerepe	44
7.3. Az <i>APOA5</i> gén intronikus IVS3+G476A variánsának szerepe	45
7.4. Az <i>APOA5</i> gén C56G variánsának lehetséges szerepe	46
7.5. Az <i>APOA5</i> gén leggyakoribb haplotípusainak lehetséges szerepe	47
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	49
9. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	50
10. IRODALOM	54
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	63

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

APOAI, II, ... V, stb.	apolipoprotein AI, II, ... V, stb.
bp	bázispár
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezinukleotidtrifoszfát
ddNTP	didezinukleotidtrifoszfát
EDTA	etilén-diamin-tetra-acetát
HDL	high density lipoprotein
HTG	hipertrigliceridemia
IDL	intermediate density lipoprotein
IRE	inzulin reszponzív elem
LDL	low density lipoprotein
LPL	lipoprotein lipáz enzim
LPL-HSPG	lipoprotein lipáz - heparin-szulfát-proteoglikán komplex
MRI	mágneses rezonancia spektroszkópia
MSZ	metabolikus szindróma
PCR	polimerase chain reaction - polimeráz láncreakció
q1-4	elsőtől negyedik kvartilis
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RNS	ribonukleinsav
SEM	standard error of mean - standard hiba
SNP	single nucleotide polymorphism
TG	triglicerid
UTR	untranslated region - nem transzlálódó régió
VLDL	very low density lipoprotein

2. BEVEZETÉS

A gazdaságilag fejlett országok halálozási statisztikáiban évtizedek óta vezető halálokok a különböző létfontosságú szervek ereit érintő (elsősorban az agyi, a szív- és egyéb érrendszeri) betegségek. Az e betegségekhez vezető, valamint az ezeket szövődményként okozó kórképek (pl. cukorbetegség, metabolikus szindróma) jól ismert rizikófaktorai közé tartoznak a vér különböző zsírnemű összetevőinek, a szérumban lévő lipideknek a változásai, összefoglalóan az úgynevezett dyslipidaemiák. Az ide tartozó elváltozások a következők: a szérumban lévő összes koleszterin, a triglicerid, az alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL = low density lipoprotein) szintjének emelkedése, valamint a magas sűrűségű lipoprotein (HDL = high density lipoprotein) szintjének csökkenése.

Az elmúlt években sok felfedezés történt a fent felsorolt súlyos és gyakori betegségek genetikai hátterének, genetikai meghatározottságának kutatásában. Olyan genetikai variánsokat ismertünk meg, amelyek összefüggésbe hozhatók az egyes elváltozások patogenezisével.

A fentiekből egyértelműen következik, hogy mivel a különböző szérumban lévő lipidek eltérései több vezető haláloki betegség (agyai érbetegségek, szív érbetegségek, általános atherosclerosis, diabetes mellitus, metabolikus szindróma, stb.) rizikófaktorai, a lipidek szérumban lévő szintjét befolyásoló gének és azok eltéréseinek kutatása az érdeklődés középpontjába került (Toole 1986, Adams 1993).

Feltérképezték az apolipoprotein géncsaládot (APO A-B-C-E). Az apolipoproteinek családjának ma ismert állapota – eddig utolsó lépésként – az *APOA5* gén által kódolt fehérje azonosításával vált teljessé (Pennacchio 2001). Azt is felfedezték, hogy az *APOA5* gén által kódolt ApoA-V fehérje a szérumban lévő triglicerid szintjének szabályozásában játszik központi szerepet, s az *APOA5* gén defektusai káros szérumban lévő triglicerid szintet vonhatnak maguk után (Pennacchio 2001, 2002, Eichenbaum-Voline 2004).

Dolgozatom alapjául szolgáló kutatásokban ezzel, az *apolipoprotein A5* gén variánsainak – az átlag magyar népeiséget, metabolikus szindrómás valamint stroke-os betegeket érintően – a szérumban lévő triglicerid szintjére gyakorolt hatásával foglalkozom.

Amennyiben sikerülne génszerkezeti technikákkal az ismert hibás géneket kijavítani, akkor ezzel sok, igen gyakori betegség volna megelőzhető, s népegészségügyi szempontból felbecsülhetetlen annak a jelentősége, hogy ez társadalmilag, világviszonylatban mekkora haszonnal járna.

Bár az emberi génállomány nagyobb részt minden emberben azonos, van egy bizonyos olyan változatosság, egy olyan polimorfizmus-profil, amely minden egyénre egyedileg jellemző. Az azonosságok és a polimorfizmusok vizsgálatával – reményeink szerint – egy idő után lehetőség nyílik a betegségek genetikai szinten történő diagnosztizálására, és ugyancsak a genetikai szinten történő javítására és/vagy gyógyítására, személyre szabott medicinára is.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A lipid anyagcsere vázlatos jellemzése

A lipidek – sok egyéb szerepük mellett – két területen alapvetően fontosak az emberi szervezetben: az egyik a sejtmembránok felépítése (koleszterin), a másik az energiaraktározás (triglicerid). A lipidek szállítását speciális fehérjék, ún. lipoproteinek végzik. A lipoproteinek foszfolipidekből és fehérjékből (apoproteinek) állnak. A különböző lipoproteinek eltérő lipid és fehérjetartalommal bírnak, így fajsúlyuk és sűrűségük különböző.

Csoportosításuk sűrűségük alapján történik:

1) kilomikron – ezeknek a legkisebb a fehérjetartalma és a sűrűsége, főként a trigliceridek szállítását végzik.

2) very low density lipoprotein – VLDL, a trigliceridek transzportjában vesznek részt;

3) intermediate density lipoprotein – IDL, a trigliceridek és a koleszterin-észterek transzportját végzik;

4) low density lipoprotein – LDL, a koleszterin-észterek transzportjáért felelősek;

5) high density lipoprotein – HDL, a legnagyobb a fehérjetartalma és a sűrűsége, a koleszterin-észterek és a foszfolipidek szállításában vesznek részt (Morrisett 1975, Smith 1978).

A koleszterin többek között a membránokon keresztül történő transzportot szabályozza, de alapeleme a szteroid hormonoknak és az epesavaknak is. A koleszterin 70%-ban koleszterin-észterek formájában van jelen a szervezetben, ahol vagy a táplálék útján kerül felvételre, vagy *de novo* szintetizálódik. Ez utóbbi elsősorban a májban történik, de kisebb részben a mellékvesekéreg és a bélhámsejtek is termelik. A koleszterin-homeosztázis fenntartásában fontos szerepet játszik az LDL és a HDL koleszterin is.

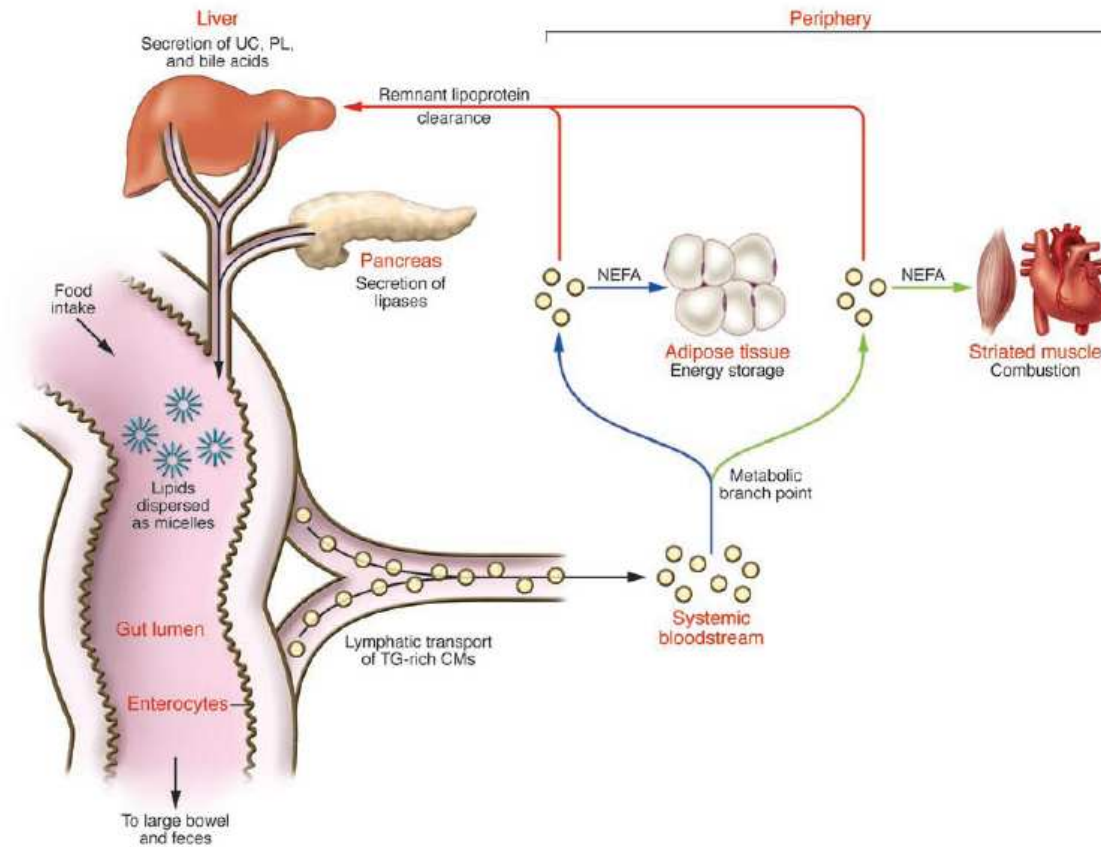
Az energia-háztartás részeként a zsírsavakat trigliceridek formájában a zsírsejtek raktározzák. A trigliceridek a májban és a zsírszövetben szintetizálódnak. A májban képződött triglicerid a VLDL-be épül be, amely a keringés révén eljuttatja azt a perifériás szervekhez, főként a zsírszövethez, ahol a kapillárisok endothel sejtjeinek felszínén lévő glikozaminoglikánokhoz kötött lipoprotein lipáz (LPL) a VLDL triglicerid tartalmát

hidrolizáljra (Tan 1978). Az így keletkezett zsírsavakat az adipociták vagy egyéb sejtek veszik fel. A VLDL-ből képződött IDL a keringéssel visszakerül a májba, ahol a májsejtek a felszínükön lévő apolipoprotein E receptorokkal felismerik és endocitózissal felveszik. A trigliceridek az anyagcsere állapotától függően vagy lebomlanak és energiát szolgáltatnak, vagy ketontestekké alakulnak. A trigliceridek hidrolízisét a hepatikus lipáz is végzi a májsejtek felszínén. A zsírszövetben szintetizálódó trigliceridek alkotóelemei a glükóz-anyagcseréből származnak (1-4. ábra) (Robinson 1973, Williams KJ 2008).

Az *1. ábra* az egyes vérzsír összetevők szervezeten belüli útját mutatja. A pancreasban termelt lipáz és a májban keletkező epesavak hatására megemésztett zsírok felszívódása a bélhámsejteken (enterocytá) keresztül zajlik (*2. ábra*). Ez egyrészt az úgynevezett apoB-függő úton, apoB molekulák által, az endoplazmás retikulum segítségével, másrészt az úgynevezett apoB független úton, az enterocytákon kívül található apoA molekulák által történik.

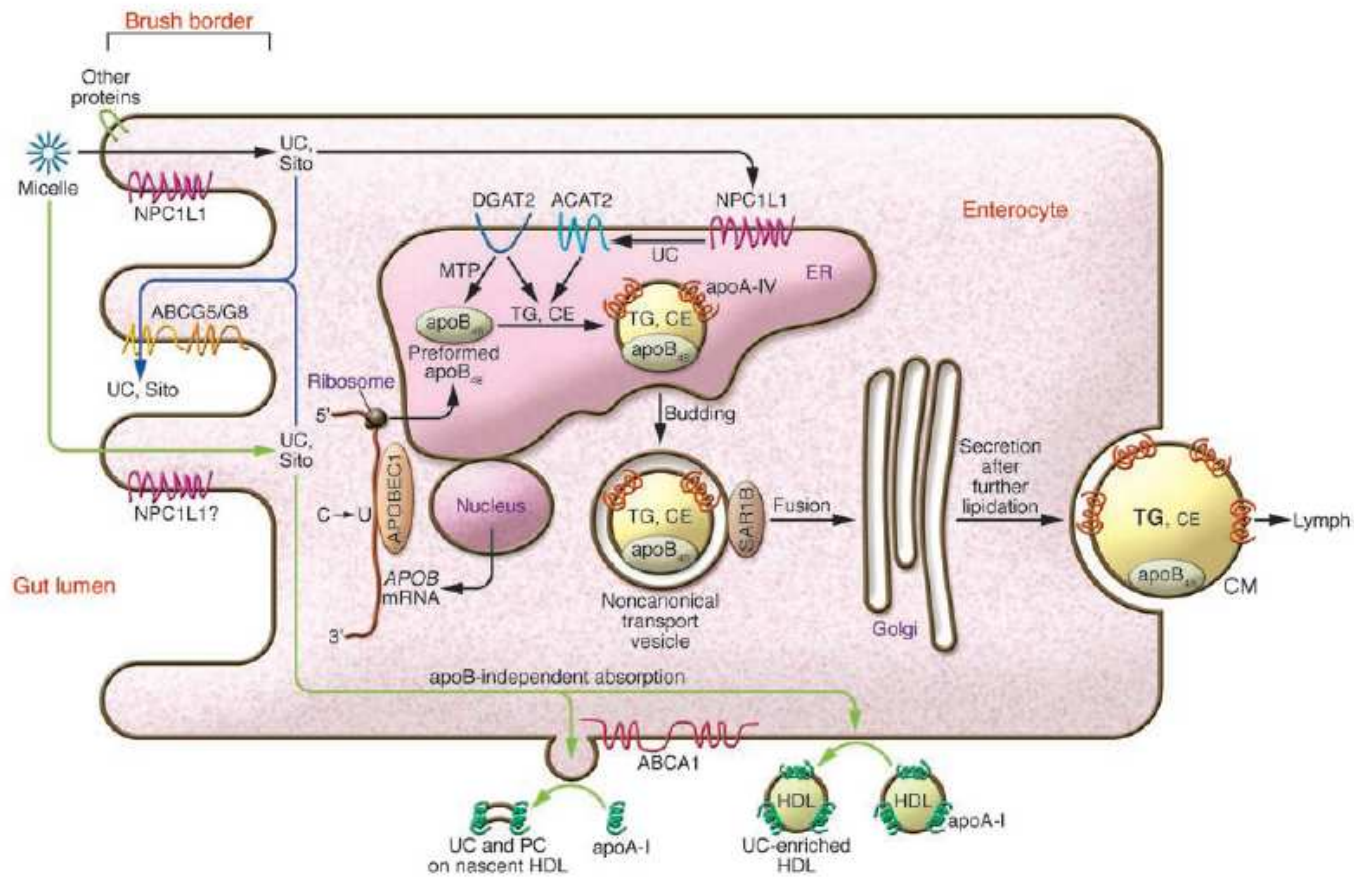
A trigliceridekben gazdag kilomikronok a nyirokkeringés és szisztémás keringés által jutnak el az egyes szöveti sejtekhez és a májba. A *3. ábrán* a májban zajló folyamatok látszanak. A Disse terekben egyfelől az LDL receptorokhoz közvetlenül kötődve, apoE felhasználásával, másfelől a hepaticus lipáz [HL] által, más receptorok segítségével {syndecan, glypican, collagen} jut a triglicerid a májsejtekbe.

Az erekből a lipidek az endothel sejteken keresztül a zsírsejtekbe és egyéb szöveti sejtekbe juthatnak (*4. ábra*). Az egyes célsejtekbe jutáshoz szükséges folyamatot, a trigliceridek hidrolízisét az apoAV fehérje által szabályozott LPL végzi.



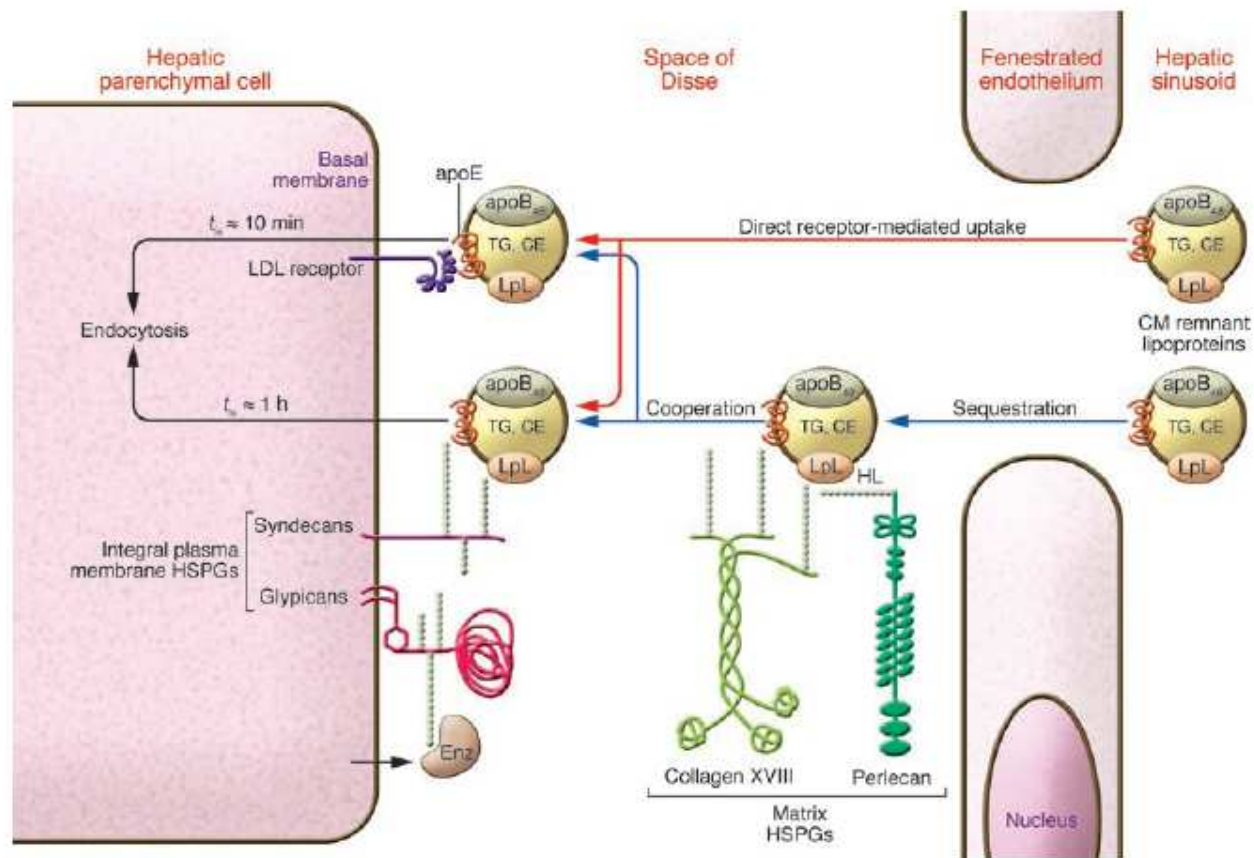
1. ábra: A vérzsírok útja a szervezetben (Williams KJ, 2008)

A trigliceridben gazdag kilomikron a béllumenből az enterocytákon keresztül a lymphaticus majd a szisztémás keringésbe kerül, s a véráram útján jut el az egyes szervekhez.



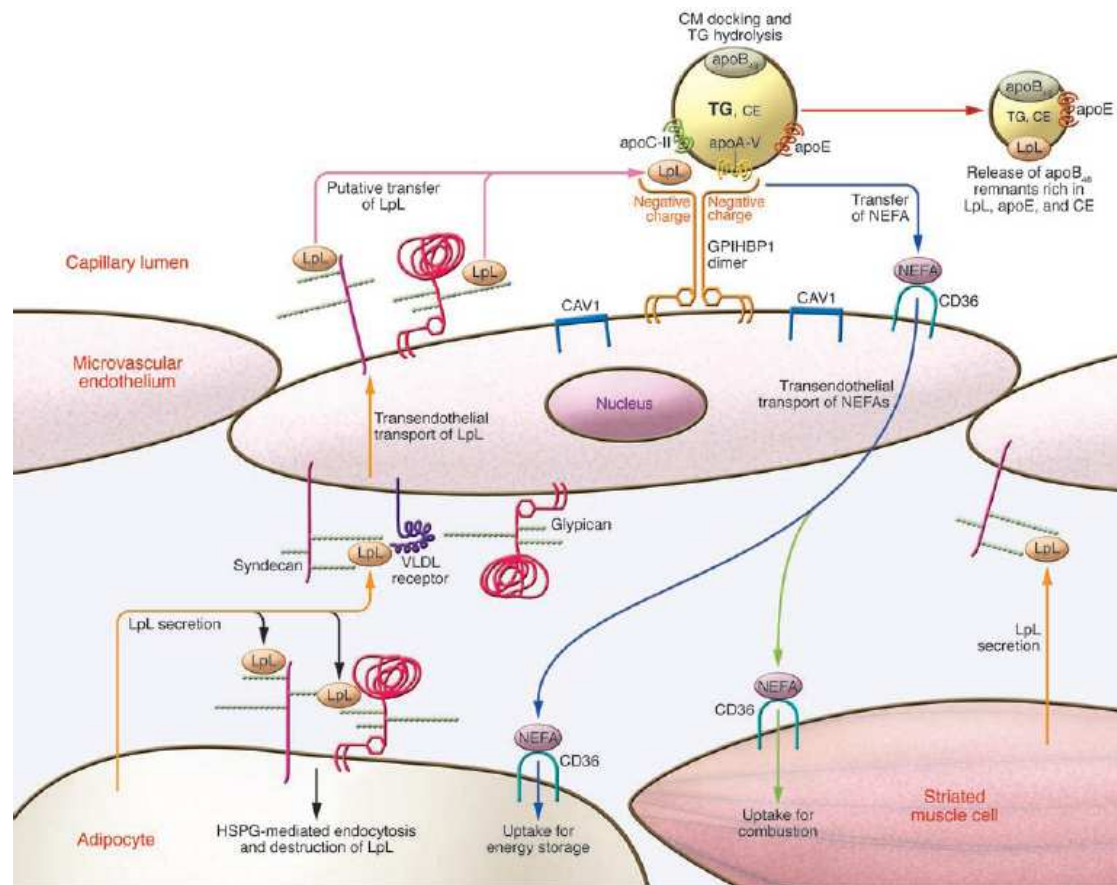
2. ábra: A vérsírok útja a bélhámsejtekben (Williams KJ, 2008)

A TG az enterocytákon keresztül részben az úgynevezett apoB-függő úton, az endoplazmás retikulum segítségével [fekete nyíl], részben az úgynevezett apoB-független úton [zöld nyíl], apoA molekulák segítségével szívódik fel.



3. ábra: A vérsírok metabolizmusa a májban (Williams KJ, 2008)

A májsejtekbe a TG egyrészt közvetlenül az LDL receptorhoz kötődve, a lipoprotein lipáz enzim közreműködésével [piros nyíl], másfelől a hepatikus lipáz enzim közreműködésével kerül be [kék nyíl].



4. ábra: A vérsírok útja az endothelen keresztül az egyes sejtekbe (Williams KJ, 2008)

Végso felhasználási helyükre, az egyes sejtekbe a TG az endothelsejteken keresztül jut be. Az ehhez szükséges hidrolízis folyamatát az apoA-V által szabályozott LpL végzi.

3.2. A hypertrigliceridaemia kialakulásában szerepet játszó genetikai tényezők

A korábbiakban említett agy, szív- és egyéb érrendszeri betegségek kialakulásában szerepet játszó, jól ismert környezeti rizikótényezők (elhízás, cukorbetegség, metabolikus szindróma stb.) vizsgálata mellett egyre inkább a genomban található természetes variánsok – mint lehetséges hajlamossító faktorok – vizsgálata került úgy a kísérletes, mint a humán tanulmányok középpontjába.

Míg korábbi vizsgálatok eredményeként az elsőként említett rizikófaktorok a betegségek kialakulására nézve egyértelmű kockázati tényezőnek bizonyultak, a közelmúltban további lehetséges rizikótényezőként számos hajlamossító gént azonosítottak. A lipid metabolizmust befolyásoló gének polimorfizmusait – a teljesség igénye nélkül – az 1. táblázat mutatja.

1. táblázat: A hypertrigliceridaemia kialakulásának hátterében azonosított gének és polimorfizmusaik

Gének	Polimorfizmusok	Referenciák
<i>APOA1</i> (OMIM*107680)	C-3031T	Eichenbaum-Voline 2004
	317-321ins	Waterworth 2000
<i>APOE</i> (OMIM* 107741)	ε4, ε3, ε2	Pedro-Botet 1992, Couderc 1993, Frikke-Schmidt 2001, MacLeod 2001
<i>APOC3</i> (OMIM*107720)	T-2854G, C-455T	Talmud 2002, Wang 2004, Ruiz-Narvaez 2005
	C-482T, C3238G	
<i>APOA5</i> (OMIM* 606368)	T-1131C, T1259C, C56G, IVS3+G476A	Hubacek 2005, Talmud 2007, Matsunaga 2007
<i>LPL</i> (OMIM*609708)	Asn291Ser	Huang 1997, Wittrup 2000
<i>GCKR</i> (OMIM* 600842)	C1337T, rs780094	Saxena 2007, Kathiresan 2008
<i>MLXIPL</i> (OMIM* 605678)	G771C	Kooner 2008, Kathiresan 2009

Rövidítések: APOA1; -E; C3: apolipoprotein A1; -E; -C3 gének; Asn: aszparagin; Ser: szerin; LPL: lipoprotein-lipáz enzimet kódoló gén; GCKR: glukokináz szabályozó fehérje; MLXIPL: MLX interacting protein-like

OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM>

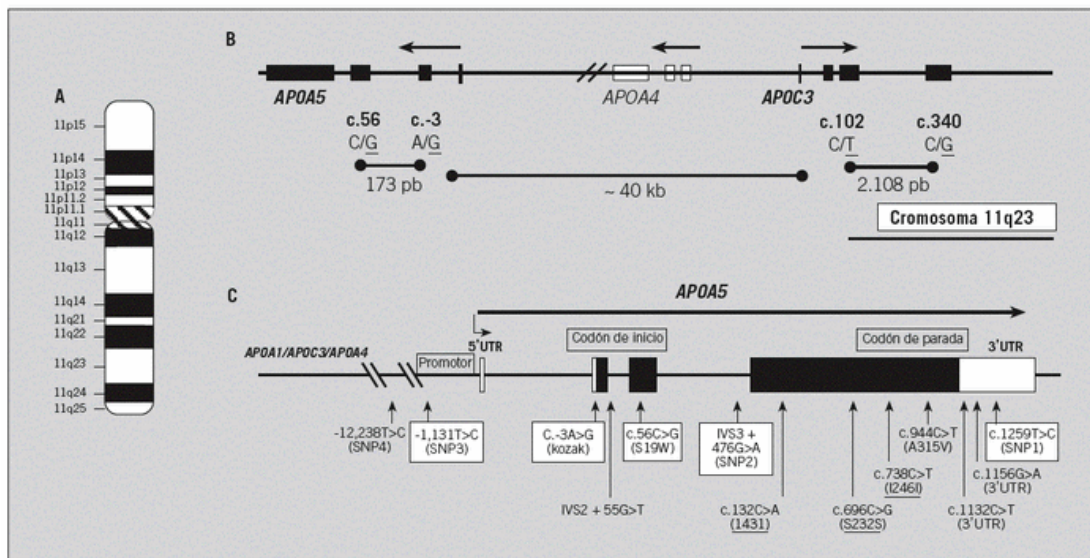
A dolgozatban ezek közül az *APOA5* és a *GCKR* gének bizonyos polimorfizmusait vizsgáltuk.

3.3. Az apolipoprotein géncsalád

A lipidek szervezeten belüli szállítását úgynevezett lipoproteinek végzik. Ezek felszínükön olyan, úgynevezett apoprotein molekulákat tartalmaznak, melyek strukturális és katalitikus funkciót töltenek be (Fredrickson 1974, Schaefer 1978, Mahley 1984). Egyfelől aktiválhatják, vagy gátolhatják a lipoproteinek metabolizmusában résztvevő enzimeket, másfelől jelként funkcionálhatnak a máj és egyéb sejtek receptorai számára. Az először megismert apoproteinek a következők voltak: AI, AII, AIV, B48, B100, CI-III, E.

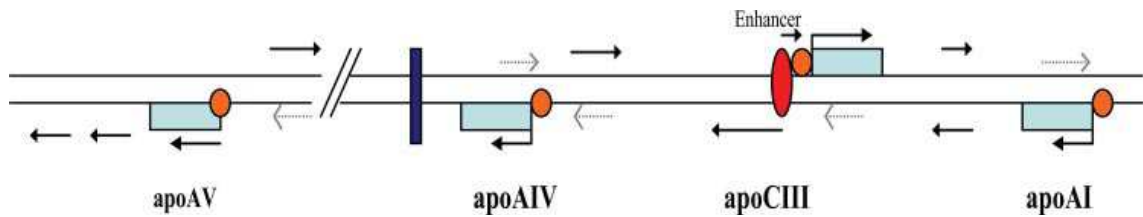
Az apoprotein fehérjéket kódoló géncsalád a 11-es kromoszóma hosszú karján, a q23-as locuson helyezkedik el.

Az 5. és 6. ábrák a géncsalád egyes tagjainak és az azonosított variánsok egymáshoz viszonyított elhelyezkedését mutatják.



5. ábra: A 11. kromoszóma és az APO géncsalád. (Sousa 2008)

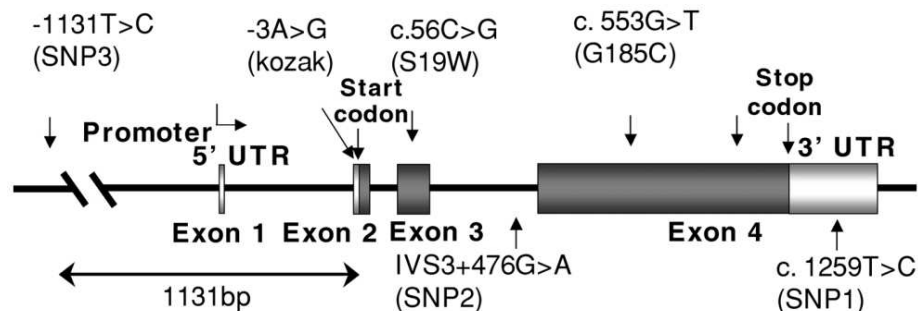
Az APO géncsalád a 11-es kromoszóma hosszú karján helyezkedik el. Az ábrán egyes tagjainak egymáshoz való elhelyezkedése, valamint a leggyakoribb polimorfizmusok látszanak.



6. ábra: Az APO géncsalád tagjainak egymáshoz való viszonya (Li 2008)

Az ábra az egyes apoA fehérjéket kódoló gének elhelyezkedésének egymáshoz való viszonyát mutatja a 11-es kromoszóma hosszú karján.

A fehérjecsalád legutóbb felfedezett tagja az apoA-V. A fehérjét egymástól függetlenül két munkacsoport is azonosította (van der Vliet 2001, Pennacchio 2001). Van der Vliet és munkatársai a máj regenerálódásában szerepet játszó faktorokat kutatták, Pennacchio és munkatársai pedig a lipid metabolizmus lehetséges szabályozó génjeit keresték. A 7. ábra a gén felépítését részleteiben mutatja be, a legfontosabb variánsokkal.



7. ábra: Az APOA5 gén szerkezete és természetes variánsai. (Matsunaga 2007).

A vastag fekete vonal a nem kódoló régiókat jelöli, a világos- és sötétszürke téglalapok az exonokat (Exon 1 – 4) és az 5' vagy 3' nem transzlálódó régiókat ábrázolják. A fontosabb variánsokat az érintett pozíciót mutató számok, a normál és a mutáns allélok mutatják. A C56G és G553T variánsok esetében zárójelben a következményes aminosavcsere van feltüntetve. Az ábra alján látható kétirányú nyíl a promóter régiót érintő polimorfizmus és a gén start kodonjának távolságát fejez ki (bp = bázispár)

Az APOA5 az APOA1/C3/A4 génklasztertől 3' irányban, 27 kilobázis távolságra van az APOA4 géntől, amellyel szekvenciájában 27%-os homológiát mutat (Pennacchio 2001, Groenendijk 2001). Az apolipoprotein A5 gén négy exont és három intront, ezekben mintegy 17 kb-t tartalmaz, s ezzel 366 aminosavat kódol.

Bár a pontos mechanizmus, amely a génklaszter mai formáját kialakította, még nem ismert, több tanulmány állásfoglalása szerint a géncsalád tagjai gén-duplikáció

révén keletkeztek. (Boguski 1986, Scott 1987). Az a tény, hogy az apo génklaszter négy tagja mind emberben, mind egérben megtalálható, arra utalhat, hogy az evolúciós gén-duplikációs esemény a két emlősfaj utolsó közös őse létezésének idejére tehető, de mivel további tanulmányok ezen géneket a csirke genomjában is azonosították, így a gén-duplikációs esemény még korábbi időpontban történő, az emlősök és a madarak evolúciós szétválása előtti bekövetkezését valószínűsíti (Pennacchio 2003).

Az *APOA5* gén nagyfokú változatosságot mutat. Felfedezése óta szekvenciájában – a dbSNP adatbázis szerint eddig – 47 egy pontos nukleotid polimorfizmust (SNP) azonosítottak (Hubacek 2005, Talmud 2007). Klinikai vonatkozásait azonban ezek közül csak néhánynak ismerjük.

Az *APOA5* gén felfedezésekor 4 gyakori polimorfizmust találtak, amelyek mindegyike emelkedett triglicerid szinttel társult (Pennacchio 2002). Azóta ezeket számtalan tanulmányban tovább vizsgálták. Ez a négy eltérés a következő: a T-1131C a promóter régióban; a T1259C a 3' nem transzlálódó régióban; a C56G a 3. exonban és az IVS3+G476A pedig a 3. intronban található (a variánsok az 5. és 7. ábrán láthatók). Elhelyezkedése miatt közvetlen funkcionális következménye csak a C56G variánsnak van, mely a 19-es kodonban szerin - triptofán aminosav cserét eredményez. Más apolipoproteinekhez hasonlóan az *APOA5* is rendelkezik egy N-terminális export szignál szekvenciával, amelynek segítségével a fehérje a képződés helyéről a keringésbe jut. Az *APOA5* esetében ez a szekvencia a 23 és 24-es aminosavakat érinti. Mivel a 19-es pozícióban bekövetkező aminosav csere során egy nagyobb aminosav épül be a fehérjébe, így az közvetlen hatással lehet az export folyamatra, mely által az *APOA5* plazma koncentrációja csökkenhet, végeredményben magasabb plazma triglicerid szintet eredményezve.

Különböző variánsok előfordulhatnak anélkül, hogy következményük strukturális változás legyen. Az eddig azonosított, strukturális változásokat okozó számos variáns közül elsőként a Q148X ritka allélt homozigóta formában egy 9 éves fiúban írták le (Priore Oliva 2005). A gén 4-es exonját érintő C442T nonszensz allélikus variáns hatására glutamin helyett egy korai stop kodon keletkezik a 148-as pozícióban. A fehérje a változás hatására elveszíti a teljes lipidkötő hidrofób valamint a heparinkötő régióját is, így a protein funkciója is károsodást szenvedhet. A családtagok vizsgálatai alapján a ritka allél recesszív módon öröklődik. Ezen kívül minden 148X variánst hordozó egyénnél obligát módon megtalálható a trigliceridszint-emelő 19W mutáns allél is.

Az *APOA5* gén egy másik, Q139X allélikus variánsát Marçais azonosította, heterozigóta formában (Marçais 2005). A gén 4-es exonjának 415-ös pozícióját érintő nonszensz variáns hatására egy 15 kDa molekulásúlyú csonka fehérje képződik, amely nem rendelkezik lipidkötő doménnel. A feltételezések szerint az így előálló változás következtében a fehérje nem tudja a LPL-HSPG komplex stabilitását biztosítani, ennek következtében a plazmában a triglicerid szint emelkedése figyelhető meg.

2006-ban egy további ritka, strukturális változást okozó allélikus variánst (IVS3+G3C) találtak, heterozigóta formában (Priore Oliva 2006). Az elváltozás a 3. intron donor splice site-ját érinti, és a 3. exon kivágódását okozza, amelynek következtében egy 18 aminosavból álló fehérje expresszálódik. Az *APOA5* szintje a ritka allélt hordozó személyben a normál határértéken belüli volt. További vizsgálat során kiderült, hogy a beteg az IVS3+G3C variánson kívül hordozta a -1131C allél variánst is.

Az *APOA5* gén 366 aminosavat kódol. Úgynevezett alternatív poliadeniláció révén két transzkriptum keletkezik (egy 1,3 és egy ,9 kb hosszúságú), amelyeknek a funkcionális vonatkozásai még nem ismertek (Pennacchio 2003). A fehérje a májban keletkezik, molekulásúlya 39 kDa. Szerkezeti felépítésére jellemző, hogy 76%-ban α -helikális (nagyobb fokú affinitást feltételez lipid felületekhez); az úgynevezett coiled-coil elemei két domént formálnak, és N-terminális régiója nagyfokú homológiát mutat más apolipoprotein doménnel (Weinberg 2003).

Koncentrációja a májban magas. A plazmába HDL-hez és VLDL-hez kötötten kerül, ahol koncentrációja rendkívül alacsony lesz: 0,1-0,4 $\mu\text{g/ml}$ (Ishihara 2005, O'Brien 2005). Ez 2000-szer kevesebb, mint az APOAI és APOC3 plazma koncentrációja (Merkel 2005/1). A feltételezések szerint ez az alacsony plazma koncentráció az oka, hogy a fehérjecsald többi tagjához képest az apoAV fehérjét csak a közelmúltban, az apoprotein családban utolsóként fedezték fel (Merkel 2005/1).

3.4. Az apolipoprotein A-V fehérje szerepe a lipid metabolizmusban

A lipidek közül az LDL az úgynevezett B-100 apoproteint tartalmazza, amelyet a sejt felszínén található receptor felismer és megköt. Az LDL ily módon endocitózis által jut be a sejtbe. Az LDL ezt követően disszociál a receptorról, mely

ezután visszakerül a sejt felszínére, az LDL pedig lizoszómális enzimek hatására elbomlik.

A másik lipid molekula, a HDL reverz koleszterin-transzporttal egyéb szervekből és az artériák falából szállít koleszterint a májba. Ott az vagy epesavakká alakul és az epébe választódik ki, vagy a VLDL-be épül be (Packard 2000, Tall 1980, Myant 1982).

Az apoAV fehérje a trigliceridek metabolizmusának fő szabályozója (Nabika 2002, Pennacchio 2003, Kluger 2008, Tai 2008). A fehérjét VLDL és HDL részecskéken azonosították. A lipidek metabolizmusa során ezek között transzportálódik (Charlton-Menys 2005, O'Brien 2005). Egyes vizsgálatok alapján az apoA-V a kilomikronok és a VLDL katabolizmusát segíti elő, de a bél kilomikron és a máj VLDL termelését nem befolyásolja (Fruchart-Najib 2004, Schaap 2004, Merkel 2005/2). A trigliceridek hidrolízise révén hozzájárul a triglicerid-gazdag lipoproteineknek a vérből történő eltávolításához (Weinberg 2003, Schaap 2004). A pontos mechanizmus, amelyen keresztül az ApoA-V a lipidszintet csökkentheti, még nem ismert. Egyes *in vitro* vizsgálatok direkt, mások indirekt kapcsolatot feltételeznek az apoAV fehérje és az LPL enzim között. Egyik feltételezés szerint az apoA-V a proteoglikánokhoz kötött LPL aktiválásával, mások szerint a lipoprotein-lipáz - heparin-szulfát-proteoglikán (LPL-HSPG) komplex stabilizálása révén fejt ki hatását (Lookene 2005). Az sem kizárt, hogy az apoA-V más apolipoproteinek (apoCIII) funkcióját módosítva csökkenti a trigliceridszintet (Pennacchio 2003, Merkel 2005/1).

4. CÉLKITŰZÉSEK

Az átlag magyar népességben előforduló, különböző szérumból triglicerid koncentrációjú egyének APOA5 génjének egyes variánsainak vizsgálatával a következő céljaink voltak:

1. Az APOA5 gén -1131C, 56G, IVS3+476A és 1259C alléljeinek feltérképezése a magyar populációban, az allélok gyakoriságának összehasonlítása a más, az irodalomból ismert populációs adatokkal.
2. Az APOA5 gén gyakori természetes variánsainak (T-1131C, C56G, IVS3+G476A és T1259C) vizsgálata a szérumból triglicerid szintekkel összefüggésben.
3. Az APOA5 haplotípusok előfordulási gyakoriságának vizsgálata.
4. A haplotípusok és a szérumból triglicerid szintek esetleges asszociációjának felderítése.

További célul tűztük ki különböző betegcsoportok (metabolikus szindróma és stroke) vizsgálatát, az APOA5 gén polimorfizmusai és a szérumból triglicerid szint összefüggésének vonatkozásában:

4. Található-e összefüggés metabolikus szindrómás betegek APOA5 gén alléljeinek típusai és a betegek szérumból triglicerid szintje között?
5. Felfedezhető-e az előzőhöz hasonló kapcsolat stroke-os betegeknél is, és van-e különbség a különböző stroke-os alcsoportok között?

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Betegek

5.1.1. Átlag magyar népesség

Az átlag magyar népesség *APOA5* variánsainak – a szérum triglicerid szintjével összefüggő – vizsgálataihoz használt vérminták a Vas Megyei Markusovszky Lajos Általános, Rehabilitációs és Gyógyfürdő Kórház, Egyetemi Oktató Kórház szombathelyi telephelyén működő Központi Laboratóriumából származtak. A kiválasztáshoz szükséges adatokat (szérum triglicerid és összes koleszterin szint, életkor, nem) a Laboratórium Informatikai Rendszeréből nyertük. Az elemzésekhez a páciensek beleegyezésüket adták.

5.1.2. és 5.1.3. Metabolikus szindrómás és stroke-os betegek

Ezen elemzésekhez (MSZ páciensek *APOA5* haplotípusai) az országos biobank (www.biobank.hu) részeként az Intézetünkben megtalálható mintákból használtunk. A metabolikus szindrómás és a stroke-os betegek elemzéséhez a minták az Intézet biobankjában található archívumból kerültek ki. A vérminták gyűjtése 2001 óta a gyulai Pándy Kálmán Kórház Neurológia és Agyérbetegségek Osztálya segítségével történt. A stroke-os betegek mindegyike akután vagy korábban diagnosztizált betegség miatt került felvételre. A szérum laboratóriumi paraméterei, így a triglicerid szint is a kivizsgálás során váltak ismertté. A betegek – részletes neurológiai és MRI vizsgálat után – három stroke (ischemias) alcsoportba kerültek: nagyér betegek, kisér betegek és kevert betegcsoport. Az alcsoportok kialakítása az Adams és munkatársai által, a TOAST tanulmányban, 1993-ban leírt alapelvek alapján történt (Adams 1993).

Az egyes elemzésekhez kialakított betegcsoportoknál a Hardy-Weinberg equilibrium elvárásainak minden csoport megfelelt.

5.2. Módszerek

5.2.1. Polimeráz láncreakció (PCR)

A munkánk során alkalmazott genomi DNS mintát etilén-diamin-tetra-acetáttal (EDTA) alvadásgátolt perifériás vér fehérvérsejtjeiből nyertük rutin kisózásos módszerrel (Miller 1988). A rendelkezésünkre álló DNS mintákból a vizsgálni kívánt szakaszokat általunk tervezett polimeráz láncreakcióval amplifikáltuk fel. A módszer tervezéséhez az AY422949 azonosítójú szekvenciát alkalmaztuk (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucore&id=37499458>). A reakcióelegyet minden vizsgálatunknál 50 µl végtérfogatra állítottuk össze, melyhez 200 µM dNTP oldatot, 1 U Taq polimeráz enzimet (10 U/µl), 5 µl puffer oldatot (500 mM KCl, 14 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl; pH 9,0), 0,2 mM megfelelő primerpárt (Metabion International AG, Martinsried, Germany) és 1 µg DNS templátot használtunk. A vizsgálatokhoz alkalmazott primerek szekvenciáit és a PCR reakciók körülményeit a 2. táblázat foglalja össze.

5.2.2. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) módszer

A restrikciós endonukleázokkal történő hasításhoz 10-15 µl PCR terméket használtunk fel. A reakcióhoz minden esetben 1 U megfelelő restrikciós endonukleázt (Fermentas Inc., Burlington, ON, Canada), az enzim működéséhez szükséges 10x puffert és steril desztillált vizet használtunk, majd a reakcióelegyet a restrikciós enzimnek megfelelő hőmérsékleten inkubáltuk. A restrikciós hasítás tervezésénél minden esetben arra törekedtünk, hogy az enzimnek a felsokszorozott DNS szakaszban a genotípustól függetlenül legyen egy obligát hasítási helye, amely segítségével meggyőződhetünk az enzim megfelelő működéséről. A vizsgálatokhoz szükséges restrikciós endonukleázokat és azok felismerési és hasítási helyeit a 2. táblázat mutatja. A keletkezett fragmenteket 3%-os etídium-bromiddal festett agaróz gélben analizáltuk UVIdoc géldokumentációs rendszer segítségével.

2. táblázat: Az általunk vizsgált polimorfizmusok PCR-RFLP jellemzői

Polimorfizmus	Az alkalmazott primerek szekvenciája	Annealing hőmérséklet (°C)	Amplifikátum hossza (bp)	A restrikciós enzim	
				Neve	Felismerési és hasítási helye
<i>APOA5</i>					
T-1131C (<i>rs662799</i>)	f: 5'-CCCCAGGAACTGGAGCGACCTT-3' r: 5'-TTCAAGCAGAGGGAAGCCTGTA-3'	55	398	<i>MseI</i>	5'-T [^] TAA-3' 3'-AAT [^] T-5'
T1259C (<i>rs2266788</i>)	f: 5'-TCAGTCCTTGAAAGTGGCCT-3' r: 5'-ATGTAGTGGCACAGGCTTCC-3'	64	287	<i>BseGI</i>	5'-GGATGNN [^] -3' 3'-CCTAC [^] NN-5'
C56G (<i>rs3135506</i>)	f: 5'-AGAGCTAGCACCGCTCCTTT-3' r: 5'-TAGTCCCTCTCCACAGCGTT-3'	64	256	<i>Cfr13I</i>	5'-G [^] GNCC-3' 3'-CCNG [^] G-5'
IVS3+G476A (<i>rs2072560</i>)	f: 5'-CTCAAGGCTGTCTTCAG-3' r: 5'-CCTTTGATTCTGGGGACTGG-3'	62	280	<i>MnlII</i>	5'-CCTC(N) ₇ [^] -3' 3'-GGAG(N) ₆ [^] -5'

f: forward primer; r: reverse primer

5.3. DNS szekvencia meghatározás és analízis

Eredményeink alátámasztása érdekében mindkét irányból történő direkt szekvenálással meghatároztuk néhány minta nukleotidsorrendjét. A vizsgálatot ABI Prism 3100 Avant típusú automata szekvenáló készüléken végeztük (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A kapott szekvenciák referencia-szekvenciával történő összehasonlítását a Winstar genetikai programcsomaggal végeztük (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA).

5.4. Statisztikai kiértékelés

A klinikai adatok minden esetben átlag \pm SEM értéként vannak feltüntetve. A változók eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk. Ha a változók normál eloszlást mutattak, akkor az úgynevezett paraméteres próbákat; nem normál eloszlású változók esetén nem paraméteres próbákat alkalmaztunk. Minden esetben Kruskal-Wallis-teszttel állapítottuk meg, hogy van-e különbség az egyes csoportok értékei között. A csoportok klinikai és laboratóriumi paramétereit közötti különbségek páronkénti összehasonlításához normál eloszlású, diszkrét változók esetében χ^2 tesztet alkalmaztunk. Normál eloszlású, folytonos változóknál a két csoport paramétereit Student-féle páros t-teszttel vizsgáltuk. Nem normál eloszlású változók esetén pedig Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk. 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, SPSS 11.5 és SAS programok segítségével végeztük (SPSS Inc, Chicago, IL; SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

6. EREDMÉNYEK

6.1. APOA5 allél variánsok és a szérum triglicerid szintje közötti kapcsolat vizsgálata metabolikus szindrómás (MSZ) pácienseknél

Ezen vizsgálatokat több részletben végeztük. Egyrészt elemeztük MSZ-s betegekben az IVS3+G476A és a T1259C variáns előfordulási gyakoriságát, ezeknek a szérum triglicerid szintjével való kapcsolatát (6.1.1.). Másrészt elemeztük az APOA5 gén különböző haplotípusainak a MSZ-s betegekben való gyakoriságát (6.1.2.). Harmadrészt – TG szintjeik alapján – kvartiliseket alakítottunk ki a MSZ páciensek között, és ezen kvartilisekben vizsgáltuk az APOA5 gén négy allélvariánsának előfordulási gyakoriságát (6.1.3.).

6.1.1. Metabolikus szindrómás betegek APOA5 bizonyos allél variánsai és szérum triglicerid szintek

Ezen vizsgálatainkhoz 213 MSZ-s beteg mintáit használtuk. A betegek közül 99 férfi és 114 nő volt. Átlagéletkoruk: $61,09 \pm 1,01$ év (25 – 82 évesek).

A 3. táblázatban a kapott eredményeket tüntettük fel.

3. táblázat: Az APOA5 gén IVS3 +G476A és T1259C variánsainak előfordulása és a szérum TG szintek közötti kapcsolat MSZ-s betegekben

MSZ betegek		
	Nem hordozók (GG) n=180	Hordozók (GA+AA) n=33
IVS3 +G476A		
Szérum triglicerid (mmol/l)	2,31±0,11	3,21±0,48*
	Nem hordozók (TT) n=179	Hordozók (TC+CC) n=34
T1259C		
Szérum triglicerid (mmol/l)	2,89±0,11	3,28±0,47 [#]

*p = 0,035; [#]p = 0,016 vs. nem hordozók

A kapott eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a IVS3+G476A és a T1259C variánsok tekintetében a minor alléleket hordozó MSZ-s betegekben a szérum triglicerid szint szignifikánsan magasabb a nem-hordozókhoz viszonyítva.

Ezen eredmények ellenére a többszörös logisztikai regressziós analízis csak a IVS3+G476A variánsnál talált kapcsolatot a MSZ előfordulásával, s ezt a T1259C variáns tekintetében nem tudta megerősíteni.

6.1.2. A metabolikus szindrómás betegek haplotípusai

A haplotípus analízis egy másik tanulmányban történt. Ezen vizsgálatokhoz 343 MSZ-s páciens mintáit használtuk; nemek szerinti megoszlás: 149 férfi és 194 nő; életkoruk: $60,9 \pm 0,58$ év (25 – 81 évesek).

Az *APOA5* gén különböző haplotípusait a 4. táblázat mutatja.

4. táblázat: Az *APOA5* gén különböző haplotípusai

Allél variánsok Haplotípusok	T-1131C	IVS3 G+476A	T1259C	C56G
<i>APOA5</i> *1	T	G	T	C
<i>APOA5</i> *2	C	A	C	C
<i>APOA5</i> *3	T	G	T	G
<i>APOA5</i> *4	C	G	T	C
<i>APOA5</i> *5	T	G	C	C

A MSZ-s betegek vizsgált variánsainak és a szérum triglicerid szintjének kapcsolatát az 5. táblázat szemlélteti.

5. táblázat A különböző genotípusú MSZ-s betegek szérum triglicerid szintjei

	T-1131C		IVS3+G476A		T1259C		C56G	
	TT N=282	TC+CC n=61	GG n=285	GA+AA n=58	TT n=284	TC+CC n=59	CC n=300	CG+GG n=43
Szérum triglicerid (mmol/l) (átlag±SEM)	2,33± 0,11	2,90± 0,30 [#]	2,39± 0,11	2,90± 0,32 ^{##}	2,34± 0,11	2,89± 0,31 ^{###}	2,42± 0,11	2,48± 0,33
	[#] p=0,02; ^{##} p=0,033; ^{###} p=0,029 vs. nem hordozók							

Az eredményekből az látszik, hogy a C56G variáns kivételével a MSZ-s betegek másik három *APOA5* variánsában a hordozók szérum triglicerid szintje szignifikánsan magasabb a nem-hordozókhöz viszonyítva. A MSZ-s betegek *APOA5* haplotípus elemzésének eredményei a 6. és 7. táblázatban látható.

Haplotípus variánsok	<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 haplotípus variánsok
Szérum triglicerid (mmol/l) (átlag±SEM)	2,29±0,11	2,95±0,36 [§]	2,57±0,36	2,84±0,70	2,68±0,84	2,43±0,10
	# p=0,02; ## p=0,033; ### p=0,029 vs. nem hordozók					

6. táblázat: A különböző *APOA5* haplotípusú MSZ-s betegek és szérum triglicerid szintjük megoszlása

Az eredményekből az látszik, hogy az elemzett MSZ-s páciensek különböző haplotípusai közül a magasabb szérum triglicerid szinttel szignifikáns korrelációt a 2-es haplotípus mutatott. Az egyes kvartilisekben a haplotípusok vizsgálati eredményei a 7. táblázaton láthatók.

	<1,38 mmol/l n=81	1,38-1,93 mmol/l n=81	1,94-2,83 mmol/l n=82	>2,83 mmol/l n=81
<i>APOA5</i> *1/1	60 (74,07%)	56 (69,13%)	58 (70,73%)	48 (59,25%)
<i>APOA5</i> *1/2- 2/2	8 (9,87%)	12 (14,8%)*	15 (18,3%)*	17 (21%)*
<i>APOA5</i> *1/3- 3/3	12 (14,8%)	11 (13,6%)	8 (9,80%)	12 (14,7%)
Egyéb haplotípus variánsok	1 (1,23%)	2 (2,46%)	1 (1,23%)	4 (4,96%)
	*p≤0.05 vs. TG<1.38;			

7. táblázat: A különböző *APOA5* haplotípusok előfordulási gyakorisága az egyes kvartilisekben

Hasonlóan a korábbi haplotípus vizsgálatokhoz, ezen páciens csoportban is, a különböző kvartilisekbe való bontásban is szignifikáns eltérés a 2-es haplotípusban volt megfigyelhető.

6.1.3. *Négy, triglicerid szint szerinti kvartilisben a vizsgált APOA5 allél variánsok gyakorisága*

Vizsgálataink ezen részéhez 325 metabolikus szindrómás páciens (141 férfi és 184 nő, átlag életkoruk: $60,5 \pm 10,8$ év, eloszlásuk: 23 – 74 éves korig) mintáit használtuk.

A triglicerid szintek alapján négy kvartilist alakítottunk ki. Q1: TG < 1,38 mmol/L, Q2: 1,38 – 1,93 mmol/L, Q3: 1,94 – 2,83 mmol/L és Q4: > 2,83 mmol/L.

A vizsgálatban részt vett páciensek főbb klinikai adatait a 8. táblázatban foglaltuk össze.

8. táblázat A főbb klinikai paraméterek a négy kvartilisben

	Vérplazma TG kvartilisek			
	<1,38 n=81	1,38-1,93 n=81	1,94-2,83 n=82	>2,83 n=81
Férfiak/Nők	41/40	33/48	27/55	40/41
Életkor (évek)	$61,5 \pm 1,00$	$61,2 \pm 1,31$	$63,5 \pm 1,06$	$58,5 \pm 1,33$
Triglicerid (mmol/l)	$1,07 \pm 0,03$	$1,63 \pm 0,02^*$	$2,36 \pm 0,03^*$	$5,22 \pm 0,44^*$
Össz- cholesterin (mmol/l)	$4,90 \pm 0,12$	$5,05 \pm 0,12$	$5,44 \pm 0,11^*$	$6,26 \pm 0,23^*$

* $p \leq 0,001$ vs. TG<1,38

A kapott eredmények azt mutatják, hogy az 1,38 mmol/l-es szinthez viszonyítva mindhárom másik kvartilisben a metabolikus szindrómás páciensek átlagos triglicerid szintje szignifikánsan magasabb volt.

A metabolikus szindrómás páciensekben az egyes allél variánsok TG kvartilisek szerinti megoszlását a 9. táblázat számértékei mutatják.

9. táblázat: APOA5 genotípusok és a különböző allélok előfordulási gyakorisága az egyes kvartilisekben

		TG kvartilisek			
		<1,38 n=81	1,38-1,93 n=81	1,94-2,83 n=82	2,83< n=81
T-1131C	TT	74 (89,0%)	67 (82,7%)	66 (80,5%)	62 (76,5%)
	TC+CC	6+1 (11,0%)	12+2 (17,3%)	13+3 (19,5%)	18+1 (23,5%)
	C allél frekvencia	4,94%	8,64%	11,6%*	12,3%*
C56G	CC	69 (82,9%)	70 (86,4%)	74 (90,2%)	69 (85,2%)
	CG+GG	12+0 (17,1%)	11+0 (13,6%)	7+1 (9,8%)	9+3 (14,8%)
	G allél frekvencia	7,41%	6,79%	5,48%	9,26%
T1259C	TT	73 (89,0%)	69 (85,2%)	67 (80,5%)	62 (76,5%)
	TC+CC	8+0 (11,0%)	12+0 (14,8%)	13+2 (19,5%)	19+0 (23,5%)
	C allél frekvencia	4,94%	7,41%	10,4%*	11,7%*
IVS3+G476A	GG	74 (87,8%)	69 (85,2%)	66 (80,5%)	64 (79,0%)
	GA+ AA	7+0 (12,2%)	12+0 (14,8%)	13+2 (19,5%)	16+1 (21,0%)
	A allél frekvencia	4,32%	7,4%	10,36%*	11,1%*

* p≤0,05 vs. TG<1,38;

Eredményeink szerint – a C56G allél variáns kivételével a többi három variánsnál – lépcsőzetes emelkedés mutatkozott az egyes kvartilisek pácienseinek TG szintjében. Ez a lépcsőzetes emelkedés ezen három allélnál a harmadik és a negyedik kvartilisben volt szignifikáns (az első kvartilishez viszonyítva).

6.2. Stroke-os betegek APOA5 allél variánsai és szérum triglicerid szintjeinek elemzése

6.2.1. A T-1131C APOA5 variáns vizsgálata

Munkánk ezen részében is az előzőekben is vizsgált négy leggyakoribb variáns előfordulását elemeztük egy másik, nevezetesen stroke-os betegcsoportban. A 10. táblázatban a T-1131C variáns vizsgálatba bevont, különböző stroke-os betegek és a kontroll mintákban mért szérum triglicerid értékeket tüntettük fel. A stroke-os betegek alcsoport beosztása a már korábban említett Adams-féle csoportosítás alapján történt.

10. táblázat: A T-1131C vizsgálatában részt vevő betegek és kontrollok szérum triglicerid értékei

T-1131C	Stroke-os betegcsoport			Kontroll (n=289)
	Nagyér (n=149)	Kisér (n=85)	Kevert (n=68)	
Triglicerid (mmol/l)	1,82 ± 0,53*	1,72 ± 0,63*	2,34 ± 0,79*	1,29 ± 0,64

Az értékek átlag ± SEM-ként szerepelnek, *p<0,05 vs. kontroll csoport

Eredményeinkből jól látszik, hogy a kontroll csoporthoz viszonyítva mindhárom stroke-os alcsoportban a szérum triglicerid szint szignifikánsan magasabb. A 11. táblázat a T-1131C genotípusok megoszlását szemlélteti.

11. táblázat: A szérum triglicerid szintek alakulása a T-1131C genotípusok tükrében

T-1131C	Stroke-os betegcsoport n=302		Kontroll csoport n=289	
	TT n=237	TC+CC n=65	TT n=261	TC+CC n=28
Triglicerid (mmol/l)	1,81 ± 0,62	2,21 ± 0,61*	1,48 ± 0,05	2,00 ± 0,30*

Az értékek átlag ± SEM-ként szerepelnek, *p<0,05 vs. nem hordozó egyének (TT)

A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a vizsgált -1131C genetikai variánst hordozóknál – a nem-hordozókhoz viszonyítva – a szérumban a triglicerid szint szignifikánsan magasabb.

6.2.2. A C56G APOA5 variáns vizsgálata

Vizsgáltuk továbbá az egyes stroke-os alcsoportokban az APOA5 gén C56G variánsa és a szérumban a triglicerid szintjének a kapcsolatát is. A 12. táblázat ezen eredményeinket mutatja.

12. táblázat: A stroke-os betegcsoportok szérumban a triglicerid értékei a C56G variáns esetében

C56G	Stroke-os betegcsoport			Kontroll csoport (n=171)
	Nagyér (n=124)	Kisér (n=180)	Kevert (n=99)	
Triglicerid (mmol/l)	1,75 ± 0,06*	1,77 ± 0,05*	1,70 ± 0,07*	1,55 ± 0,04

*p<0,05 vs. kontroll csoport

A táblázat értékei alapján megállapítható, hogy a szérumban a triglicerid szintje mindhárom stroke-os alcsoportban szignifikánsan magasabb a kontroll csoportban mért értékekhez viszonyítva.

Vizsgáltuk a különböző stroke-os betegekben ezen variáns előfordulási gyakorisága és a szérumban a triglicerid szintje közötti kapcsolatot. Az eredményeket a 13. táblázat szemlélteti.

13. táblázat: A szérumban triglicerid szintek alakulása a C56G genotípusok hatására

C56G	Stroke-os betegcsoport					
	Nagyér (n=124)		Kisér (n=180)		Kevert (n=99)	
	CC n=98	CG+GG n=26	CC n=163	CG+GG n=17	CC n=84	CG+GG n=15

Triglicerid (mmol/l)	1,70±0,06	1,97±0,15*	1,72±0,05	2,21±0,18*	1,73±0,08	2,05±0,23*
----------------------	-----------	------------	-----------	------------	-----------	------------

*p<0.05 vs. nem hordozó egyének (CC)

A kapott eredmények azt mutatják, hogy az *APOA5* gén C56G variánsának tekintetében a vizsgált három stroke-os alcsoportban az 56G variánst hordozó betegek szérumban triglicerid szintje szignifikánsan magasabb volt, a nem-hordozók triglicerid szintjeihez viszonyítva.

6.2.3. A T1259C és IVS3+G476A variánsok vizsgálata

Végül – a stroke-os betegekben is – megvizsgáltuk az *APOA5* gén további két, gyakori variánsának (T1259C és IVS3+G476A) és a szérumban triglicerid szintek közötti kapcsolatot. A stroke-os betegek és a kontroll csoport szérumban triglicerid értékeit a 14. táblázatban foglaltuk össze.

14. táblázat: A T1259C és IVS3+G476A variánsok vizsgálatába bevont betegek és kontrollok szérumban triglicerid értékei

	Stroke-os betegcsoport				Kontroll csoport n=131
	Nagyér n=122	Kisér n=176	Kevert n=80	Összes beteg n=378	
Triglicerid (mmol/l)	1,71 ± 0,06*	1,76 ± 0,04 [#]	1,83 ± 0,08*	1,76 ± 0,03 [#]	1,53 ± 0,05

Az értékek átlag ± SEM-ként szerepelnek, *p<0,05 vs. kontroll csoport; [#]p<0,001 vs. kontroll csoport

Az eredményekből szembetűnik, hogy a kontroll csoporthoz viszonyítva mindhárom stroke-os alcsoport szérum triglicerid értékei szignifikánsan magasabbak. Ez a szignifikancia még szembetűnőbb, ha nem az egyes stroke-os alcsoportokat, hanem a stroke-os betegeket együtt elemezzük. A stroke-os betegek T1259C és IVS3+G476A polimorfizmusainak és ezeknek a szérum triglicerid szinttel való kapcsolatát 15. táblázatban láthatjuk.

15. táblázat: A T1259C és az IVS3+G476A variánsok hordozásának és a szérum triglicerid szintek kapcsolata

	Stroke-os betegcsoport							
	Nagyér (n=122)		Kisér (n=176)		Kevert (n=80)		Összes beteg (n=378)	
	TT	TC+CC	TT	TC+CC	TT	TC+CC	TT	TC+CC
T1259C	n=95	n=27	n=137	n=39	n=60	n=20	n=292	n=86
Triglicerid (mmol/L)	1,64 ± 0,06	2,01 ± 0,15*	1,67 ± 0,04	2,08 ± 0,14*	1,67 ± 0,07	2,33 ± 0,24*	1,66 ± 0,03	2,12 ± 0,10*
IVS3+G476A	GG	GA+AA	GG	GA+AA	GG	GA+AA	GG	GA+AA
	n=105	n=17	n=147	n=29	n=89	n=12	n=342	n=57
Triglicerid (mmol/L)	1,65 ± 0,06	2,17 ± 0,22*	1,67 ± 0,03	2,22 ± 0,18*	1,70 ± 0,07	2,63 ± 0,36*	1,67 ± 0,03	2,29 ± 0,13*

Az értékek átlag ± SEM-ként szerepelnek. *p<0.05 vs. nem hordozó egyének

Az eredményekből szembetűnő, hogy mindkét polimorfizmus tekintetében a rizikó allélt hordozó egyének szérum triglicerid szintje külön-külön, mindhárom stroke-os alcsoportban, és az összes beteget együttesen vizsgálva is szignifikánsan magasabb a nem-hordozókhöz viszonyítva.

6.3. A vizsgálati csoportok kialakítása az átlag magyar népesség APOA5 allél polimorfizmusai és triglicerid szintjei kapcsolatához

6.3.1. Alcsoportok kialakítása, genotipizálás

A vizsgálathoz 436 személy (235 férfi és 201 nő) – átlagéletkoruk $60,5 \pm 10,1$ év, legfiatalabb 23, legidősebb 74 év – EDTA-val alvadásgátolt vérmintáit használtuk fel. A vizsgálati alanyokat a szérum triglicerid szintje alapján négy kvartilisbe osztottuk; nevezetesen, q1: TG < 1,31 mmol/l, q2: TG = 1,31 – 2,90 mmol/l, q3: TG = 2,91 – 4,85 mmol/l és q4: TG > 4,85 mmol/l. Az adatokat részletesen a 16. táblázat szemlélteti.

16. táblázat: A páciensek alapadatai a szérum triglicerid szint alapján kialakított kvartilisokban

	Szérum triglicerid kvartilisek			
	TG<1,31 n=124	TG=1,31-2,90 n=95	TG=2,91-4,85 n=108	TG>4,85 n=109
Férfi/nő	45/79	45/50	64/44	81/28
Életkor (évek)	55,3 ± 1,69	57,2 ± 1,68	53,7 ± 1,53	52,6 ± 1,30
HDL (mmol/l)	1,40 ± 0,05	1,12 ± 0,03 ^{*,#}	1,02 ± 0,02 ^{*,#}	1,01 ± 0,08 ^{*,#}
Triglicerid (mmol/l)	1,01 ± 0,02	2,10 ± 0,05 ^{*,#}	3,70 ± 0,05 ^{*,#}	7,06 ± 0,25 ^{*,#}
Szérum össz-koleszterin (mmol/l)	4,76 ± 0,10	5,20 ± 0,10 ^{*,#}	5,62 ± 0,11 ^{*,#}	6,10 ± 0,14 ^{*,#}

*a nemre történt korrekció után; # p<0,05 vs. TG<1,31

A táblázatból látható, hogy az egyes kvartilisekbe tartozó személyek között az életkort tekintve nincs szignifikáns különbség. Az egyes szérum lipid összetevők vonatkozásában azonban mind az összes koleszterin, mind a triglicerid és a HDL tekintetében is szignifikáns eltérés látszik az első kvartilishez viszonyítva, az összes többi kvartilisben.

A 17. táblázatban részletesen összefoglaltuk az egyes kvartilisek APOA5 genotípus és allél megoszlásait.

17. táblázat: APOA5 genotípusok és az allélek gyakorisága az egyes kvartilisekben

		TG<1,31 n=124	TG=1,31-2,90 n=95	TG=2,91-4,85 n=108	TG>4,85 n=109
T-1131C	TT	113 (91,9%)	81 (85,3%)	80 (74,1%)	69 (63,3%)
	TC+CC	11+0 (8,9%)	11+3 (14,7%)	28+0 (25,9%)	35+5 (33,7%)
	C allél gyakoriság	4,44%	8,95%	12,9% [#]	20,6%*
T1259C	TT	113 (91,1%)	82 (86,3%)	86 (79,6%)	70 (64,2%)
	TC+CC	11+0 (8,9%)	13+0 (13,7%)	20+2 (20,4%)	33+6 (35,8%)
	C allél gyakoriság	3,63%	6,84%	11,1%**	20,6% ^{##}
C56G	CC	111 (89,5%)	84 (88,4%)	83 (76,9%)	85 (78,0%)
	CG+GG	12+1 (10,5%)	10+1 (11,6%)	15+0 (23,1%)	22+2 (22,0%)
	G allél gyakoriság	5,64%	6,31%	6,94%	11,9%*
IVS3+G476A	GG	113 (91,1%)	85 (89,5%)	84 (77,8%)	71 (65,1%)
	GA+ AA	11+0 (8,9%)	9+1 (10,5%)	24+0 (22,2%)	33+5 (34,9%)
	A allél gyakoriság	4,44%	5,79%	11,1% [§]	16,5%*

[#] p=0,001; * p<0,001; ^{##} p=0,003; ** p=0,019; [§] p=0,006 vs. q1 (TG<1.31.) allél frekvenciák

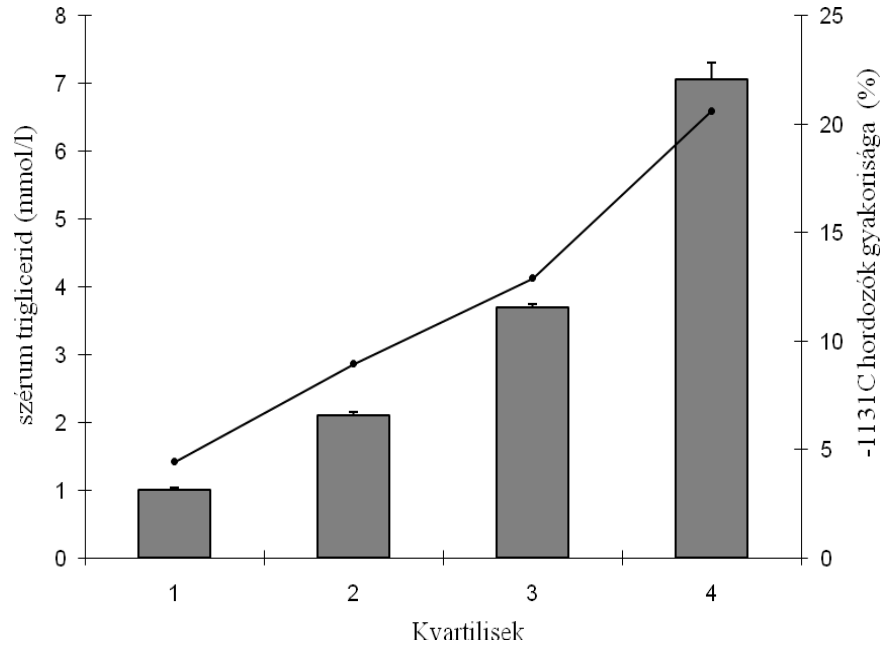
Az 18. táblázat részletesen mutatja az egyes genotípusokban a szérum triglicerid pontos koncentrációját.

18. táblázat: Pontos triglicerid szintek a különböző APOA5 genotípusoknál, az egyes kvartilisekben

mmol/l	T-1131C		IVS3+G473A		T1259C		C56G	
	TT	TC+CC	GG	GA+AA	TT	TC+CC	CC	CG+GG
TG<1,31	1,01± 0,02	0,98± 0,02	1,01± 0,02	1,03± 0,02	1,01± 0,02	1,04± 0,02	1,01± 0,02	0,99± 0,02
TG=1,31-2,90	2,05± 0,03	2,39± 0,04	2,07± 0,42	2,31± 0,05	2,07± 0,03	2,31± 0,05	2,11± 0,03	2,05± 0,04
TG=2,91-4,85	3,63± 0,05	3,89± 0,07	3,62± 0,04	3,96± 0,05	3,59± 0,04	4,06± 0,06	3,69± 0,04	3,72± 0,06
TG>4,85	6,97± 0,11	7,20± 0,14	6,92± 0,13	7,4± 0,18	6,29± 0,11	7,26± 0,14	6,91± 0,09	7,33± 0,10

A következőkben részletesen elemezzük az egyes – általunk is vizsgálat, leggyakoribb – allél variánsok előfordulási gyakoriságát a különböző kvartilisekben.

6.3.2. Az APOA5 gén promóter régiójában található T-1131C variáns vizsgálata

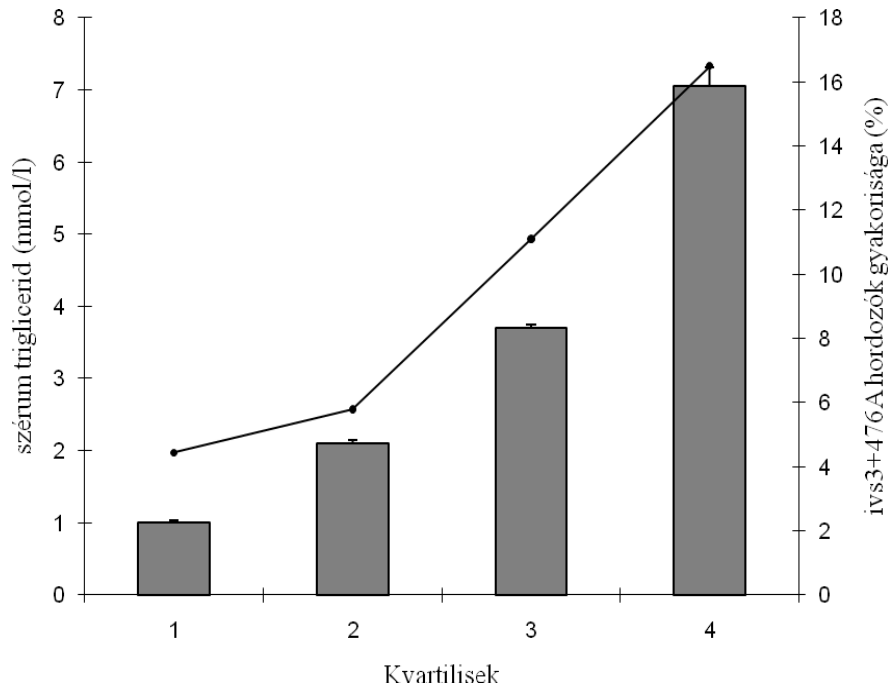


8. ábra: A -1131C variánst hordozók előfordulási gyakorisága az egyes kvartilisekben

A 8. ábrán látható oszlopok az egyes kvartilisek átlagos triglicerid szintjét mutatják (átlag \pm SEM) (a pontos számértékek az 5. táblázatban találhatóak).

A folyamatos vonallal összekötött pontok a T-1131C minor variáns előfordulási gyakoriságát jelentik, az egyes kvartilisekben. Megállapítható, hogy a harmadik és negyedik kvartilisbe tartozó személyek szignifikánsabb nagyobb arányban hordozzák ezt a variánst az első kvartilis pácienseihez viszonyítva. A szignifikancia a negyedik kvartilisre nézve erősebb, mint a harmadik kvartilis tekintetében ($p < 0,001$ illetve $p = 0,001$). A második kvartilis értékei nem mutattak szignifikáns változást a legalacsonyabb szérum triglicerid koncentrációjú személyekhez viszonyítva.

6.3.3. Az APOA5 gén intronikus IVS3+G476A variánsának vizsgálata



9. ábra: Az IVS3+G476A variánst hordozók előfordulási gyakorisága az egyes kvartilisekben

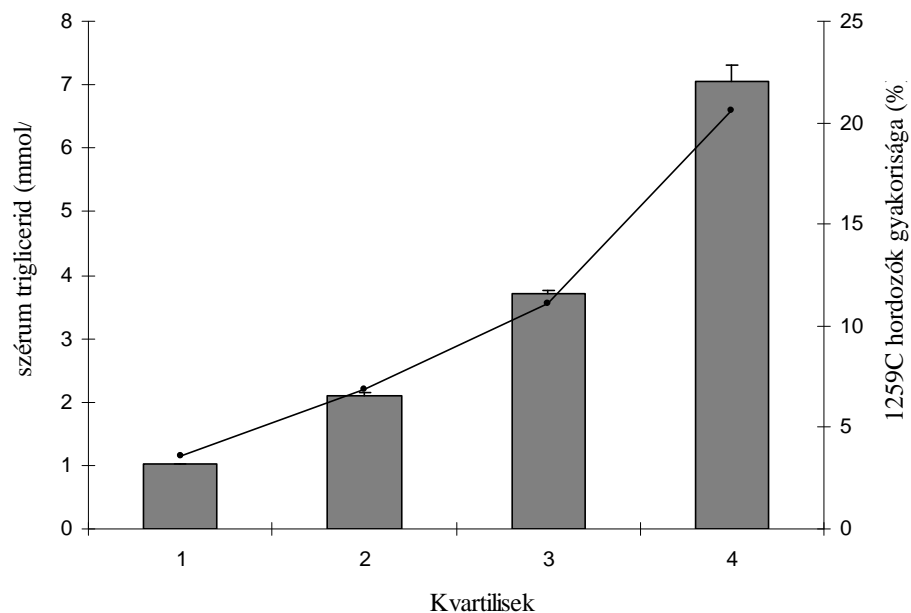
Az IVS3+G476A minor variánsainak vizsgálata a T-1131C variánshoz hasonló eredményeket mutatott.

A 9. ábra jelölései a 8. ábráéval azonosak. Az elemzés eredményeként az látható, hogy az első kvartilisben előforduló variánsok arányához képest szignifikáns eltérés a harmadik és negyedik kvartilisben lelhető fel (4,44%-os gyakorisághoz képest 11,1%-os illetve 16,5%-os előfordulás). A szignifikancia szintje a negyedik kvartilis tekintetében erősebb volt, mint a harmadik kvartilist tekintve ($p < 0,001$ illetve $p = 0,006$). A második kvartilisbe tartozó személyek ezen variáns tekintetében sem mutattak szignifikáns változást az első kvartilis pácienseihez viszonyítva.

6.3.4. Az APOA5 gén T1259C variáns vizsgálata

Harmadikként az APOA5 gén T1259C variánst vizsgáltuk. Az eredményeket a 10. ábrán tüntettük fel. Az ábra jelölései megegyeznek a korábbi két táblázat jelöléseivel.

Az eredmények az előző két variáns vizsgálati eredményeihez voltak hasonlatosak. Nevezetesen, a harmadik és negyedik kvartilis pácienseiben található allélok gyakorisága szignifikáns eltérést mutatott az első kvartilis pácienseihez viszonyítva.

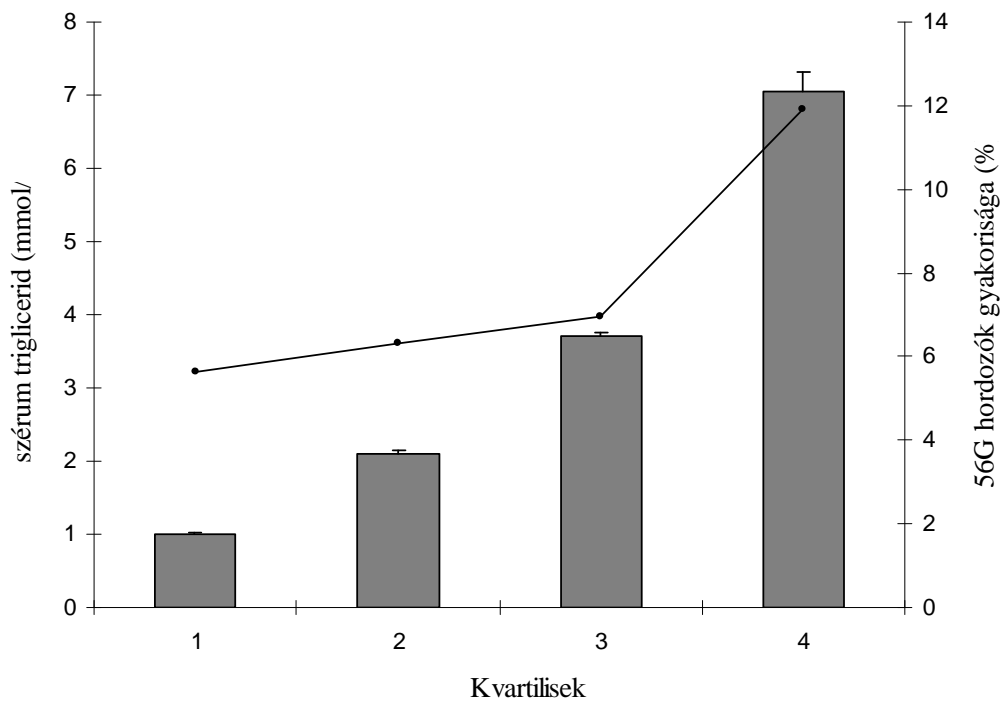


10. ábra: A 1259C variánst hordozók előfordulási gyakorisága az egyes kvartilisekben

Ezen APOA5 minor variáns tekintetében a rizikó allélok gyakoriságát a harmadik kvartilisben 11,1%-nak, a negyedikben 20,6%-nak találtuk.

6.3.5. Az APOA5 gén harmadik exonjában található C56G variáns vizsgálata

Eredményeinket a 11. ábra szemlélteti. Az ábrán használt jelölések – a korábbiakhoz hasonlóan – megegyeznek az előző ábrák felépítésével.



11. ábra: Az 56G variánst hordozók előfordulási gyakorisága az egyes kvartilisekben

Az előző három variánsnál kapott eredményekkel ellentétben itt csak a negyedik kvartilis mutatott szignifikáns különbséget az első kvartilishez történt összehasonlításnál. A C56G minor variáns előfordulási gyakorisága az első kvartilisben 5,64%-nak, a másodikban 6,31%-nak, a harmadikban 6,94%-nak, míg a negyedikben 11,9%-nak bizonyult. Bár szignifikáns különbség csak a negyedik kvartilisben mutatkozott, a szignifikancia szintje kifejezetten erős: $p < 0,001$.

6.3.6. Az APOA5 haplotípusok

A 19. táblázatban az egyes APOA5 haplotípusok előfordulási gyakoriságát tüntettük fel a különböző kvartilisekben.

19. táblázat: Az egyes APOA5 haplotípusok előfordulási gyakorisága az egyes kvartilisekben

	TG<1,31 mmol/l n=124	TG=1,31-2,90 mmol/l n=95	TG=2,90-4,85 mmol/l n=108	TG>4,85 mmol/l n=109
<i>APOA5</i> *1/1	100 (80,7%)	70 (73,7%)	63 (58,3%)	44 (40,4%)
<i>APOA5</i> *1/2-2/2	11 (8,9%)	10 (10,5%)	22* (20,4%)	38* (34,9%)
<i>APOA5</i> *1/3-3/3	13 (10,5%)	11 (11,6%)	15 (13,9%)	24* (22,0%)
Egyéb haplotípus variánsok	-	4 (4,2%)	8 (7,4%)	3 (2,7%)

* $p \leq 0,05$ vs. TG<1.31;

Ezen eredmények szerint az *APOA5* *1-es haplotípusának előfordulási gyakoriságában nem találtunk különbséget az egyes kvartilisek között. Az *APOA5* *2-es haplotípusánál a harmadik és negyedik kvartilis pácienseinél, míg az *APOA5* *3-as haplotípusánál kizárólag a negyedik kvartilisnél mutatkozott szignifikáns különbség az egyes kvartilisekben észlelhető haplotípus előfordulási gyakoriságához viszonyítva. A szignifikancia szintek mindhárom esetben $p \leq 0,05$ értéknek adódtak.

7. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A vérben található különböző lipidek kóros változásai, ezek között a szérumban triglicerid emelkedése, az úgynevezett hypertrigliceridaemia sokféle betegség és betegségcsoport (elhízás, agyi-, szív- és érrendszeri betegségek, metabolikus szindróma, stb.) rizikófaktorának számít (Dawber 1951). A szérumban triglicerid szintjére vonatkoztatva azt találták, hogy a triglicerid szint 1 mmol/l-es emelkedése növeli a koszorús erek elváltozásaiból származó betegségek előfordulását. Ez a növekedés férfiakban 14%-nak, nőkben 37%-nak bizonyult (Austin 1998). Az elváltozások kialakulásának folyamata sok részletében ismert, de az egyes oki tényezők pontos szerepe még kutatások tárgyát képezi.

A különböző tanulmányokban olvasható ellentmondások az egyes vizsgált népcsoportok különbözőségeivel, de az egyes népcsoportokon belül, azok heterogenitásával is magyarázhatók.

A szérumban triglicerid szintjét számos genetikai tényező befolyásolja. Ezek egyike az apoproteinek géncsaládjának legutóbb felfedezett, általunk is vizsgált tagja, az *APOA5* is, melynek több természetes variánsa is ismert. Munkánkban ezek közül a négy leggyakoribbat vizsgáltuk, azok előfordulási gyakoriságát és a szérumban triglicerid szinttel való kapcsolatát kutattuk átlag magyar népességben, valamint metabolikus szindrómás és stroke-os betegekben.

7.1. Az *APOA5* gén promóter régiója, a T-1131C variáns lehetséges szerepe

Az *APOA5* gén természetes eltérései között a gén promóter régióját érintő T-1131C tranzíció a legtöbbet vizsgált elváltozás. A vizsgált variáns a nemzetközi szakirodalom közleményei szerint a különböző népcsoportokban különböző gyakorisággal fordul elő: egészséges európai populációban 6%, ázsiai populációknál Japánban 35%, Kínában 29%, Indiában pedig 20% (The International HapMap Project 2003, Lai 2003, Chandak 2006).

Tanulmányunkban a variáns vizsgálata során az eddigi európai populációra leírt 6%-os allélfrekvenciánál némileg magasabb előfordulási gyakoriságot, 8,9%-ot detektáltunk.

A metabolikus szindrómás betegekben egyrészt a haplotípus elemzésnél találtunk az *APOA5**1/2-2/2 haplotípus variánssal szignifikáns kapcsolatot. Másrészt a triglicerid szint alapján kvartilisekbe osztott metabolikus szindrómás betegekben az allél variáns fokozatosan gyakoribb előfordulását figyeltük meg a magasabb TG szinttel rendelkező egyének körében.

A stroke-os betegcsoportban minden alcsoport (nagyér, kisér és vegyes) betegekben a -1131C allélt hordozók szérumban triglicerid szintje szignifikánsan magasabb volt a nem-hordozókhöz viszonyítva.

Vizsgálatainkban azt találtuk, hogy a C allél a szérumban triglicerid szint alapján kvartilisekbe osztott átlag magyar népesség páciensei közül a magasabb szérumban triglicerid szintű személyeknél a harmadik és negyedik kvartilisben fordult elő szignifikánsan nagyobb arányban – az első kvartilishez, a normál triglicerid szinthez viszonyítva. A ritka allél gyakoribb előfordulása lépcsőzetes emelkedést mutatott, azaz a negyedik kvartilisben gyakoribb volt, mint a harmadikban.

A -1131C allél szerepét a szérumban lipid szintek vonatkozásában, úgy felnőtt, mind gyermek populációkban, többen kutatták (Endo 2002, Aouizerat 2003, Evans 2003, Austin 2004, Bi 2004, Hubacek 2004, Szalai 2004, Talmud 2004, Chaaba 2005, Yan 2005, Calandra 2006, Martinelli 2007, Grallert 2007, Yamada 2007). S bár a triglicerid szint emelő hatás hátterében több elmélet is napvilágot látott, a pontos mechanizmus még nem ismert.

Egyes kutatók szerint a promóter régiót érintő eltérés befolyásolhatja a transzkripciót, ezáltal okozhat közvetve TG szint változást. Állatkísérletes munkák is napvilágot láttak, de a sejtvonalakon végzett kísérletekben nem tudták bizonyítani, hogy a TG vagy lipid szintre gyakorolt hatás úgy alakulna ki, hogy a mutáns allél a transzkripciót és translációt befolyásolná (Talmud 2005). Mások bioinformatikai módszerekkel próbálkoztak. A szabályozó szekvenciák között találtak egy úgynevezett peroxiszóma proliferátor reszponzív elemet (PPRE), amely a gén promóter régiójában (-272, -260) található, és azt feltételezik, hogy az *APOA5* gén expressziójának szabályozásához szükséges (Prieur 2003, Vu-Dac 2003). Ezen kutatók elképzelései szerint a -1131C allél megváltoztathatja a génszabályozásban résztvevő fehérjék kötődését, s így befolyásolja a szérumban triglicerid szintet.

Egyes feltételezések szerint az elváltozás nem önmagában hat, hanem más funkcionális eltérésekkel kapcsolódik, és ezek együtt fejtik ki növelő hatásukat a

szérum triglicerid szintjére. Az *APOA5* itt leírt T-1131C variánsa, és az A-3G variáns között találtak ilyen kapcsoltságot (Talmud 2004, Hubacek 2005, Marcais 2005). Ez utóbbi variáns a Kozak konszenzus szekvenciában (GACACCATGG), a feltételezett start kodontól 3 bp távolságra van 5' irányban (Kozak 1987). A létrejövő báziscsere következtében csökken az *APOA5* mRNS átíródása, ezért csökkenni fog az *APOA5* szintje a vérben, és ez fog aztán végeredményben a magasabb szérum triglicerid szint kialakulásához vezetni.

A T-1131C alléllal kapcsolatos kutatások nem csak ezen variánsnak az *APOA5* gén eltéréseivel való kapcsoltságára terjedtek ki, hanem vizsgálták az egész apolipoprotein gén család többi, az *APOA5* génhez közel elhelyezkedő tagjának összefüggéseit is. Ezen vizsgálatokban szoros kapcsoltságot fedeztek fel az általunk is vizsgált variáns és az APOCIII gén C-482T vagy C-455T variánsai között.

További kutatások során felfedeztek egy úgynevezett inzulin reszponzív elemet (IRE), amely az APOCIII gén promóter régiójában helyezkedik el (Ruiz-Narvaez 2005). Ha ezen a területen történik változás, akkor annak hatásai a fontos szabályozó régiót is megváltoztathatják, amelynek az lesz a következménye, hogy megszűnik az inzulin APOCIII-ra kifejtett repressziója. Ezáltal emelkedik az APOCIII szintje, amely a triglicerid szint növekedését vonja maga után (Li 1995, Olivieri 2003). Egyes feltételezések szerint a T-1131C variáns ezen a kapcsolaton keresztül fejtheti ki hatását, de minden valószínűség szerint nem ez az egyedüli ok.

Az *APOA5* gén T-1131C variánsát felfedezése óta nemcsak különböző populációkban, hanem különböző, a lipid anyagcserét érintő betegcsoportban is vizsgálták. Ilyenek például a familiáris hiperlipidemiában és hipertrigliceridaemia. Holland, brit, spanyol és ír populációkból származó betegekben az *APOA5* gén ezen variánsát egyértelmű hajlamosító tényezőként azonosították ezen betegségek kialakulására (Eichenbaum-Voline 2004, Wright 2005, van Der Vleuten 2007).

A T-1131C variáns metabolikus szindrómában betöltött szerepét saját munkacsoportunk magyar beteganyagban, míg más szerzők japán betegcsoportokban is vizsgálták, és mindkét kutatócsoport hajlamosító tényezőnek találta a T-1131C variánst (Yamada 2007, Maasz 2007).

A szív- és érrendszeri betegségeket nemzetközi kooperációban vizsgáló, úgynevezett Framingham Heart Study kritériumai szerint az ilyen egyéneken elvégzett genotipizálás és statisztikai vizsgálat a -1131C mutáns allél hordozását ezen elváltozások kockázati tényezőjeként definiálta (Lai 2004, Elosua 2006). Különböző

népcsoportokban különböző eredmények születtek. Míg magyar és kínai betegcsoportban a minor allél hordozását emelkedett rizikónak találták (Bi 2004, Szalai 2004), addig tunéziai és olasz betegcsoportokban nem sikerült ugyanezt kimutatni (Chaaba 2005, Martinelli 2007).

7.2. Az *APOA5* gén T1259C variánsának szerepe

Az *APOA5* gén leggyakrabban vizsgált természetes variánsai közül másodikként a T1259C eltérést elemeztük.

A metabolikus szindrómás betegekben azoknál, akik a 1259C variánst hordozták, a szérum triglicerid szint szignifikánsan magasabbnak adódott, összehasonlítva a nem-hordozókkal (Kisfali 2008). Egy másik megközelítésben a triglicerid szint alapján kvartilisekbe osztottuk a metabolikus szindrómás betegeket. Ebben az elemzésben az allél variáns fokozatosan gyakoribb előfordulását figyeltük meg a magasabb TG szintek esetén.

A metabolikus szindrómás betegek haplotípusra irányuló vizsgálatainál nem találtunk szignifikáns eltérést a szérum triglicerid szintekben az ezen variánst hordozó és nem-hordozó páciensek között (Kisfali 2009).

Saját, stroke-os betegekre irányuló vizsgálatainkban minden altípusban szignifikáns kapcsolat volt megfigyelhető az 1259C *APOA5* variáns előfordulása és a magasabb szérum triglicerid szintek között. A variánst nem hordozó betegek szérum triglicerid szintje normálisnak mutatkozott (Maász 2008).

Az átlag magyar népességben a T1131C variánsnál észleltekhez hasonlóan azt találtuk, hogy ezen variáns is szignifikánsan gyakrabban volt megtalálható a magasabb szérum triglicerid szintű személyeknél, pontosabban itt is a harmadik és negyedik kvartilisbe sorolt pácienseknél. A gyakoribb előfordulásra itt is jellemző volt a lépcsőzetes emelkedés (a negyedik kvartilisben magasabb érték, mint a harmadikban). Megjegyzendő, hogy a témában ezidáig ilyen vizsgálat nem történt, ilyen eredményekről nincs beszámoló.

7.3. Az *APOA5* gén intronikus IVS3+G476A variánsának szerepe

Az előzőekhez viszonyítva jóval kevesebbet tudunk az *APOA5* gén intronikus és 3'-nem transzlálódó régióját (3'-UTR) érintő variánsokkal kapcsolatban. A világ különböző tájain itt is eltérőek az eredmények. Míg saját eredményeinkből és más európai populációkon végzett tanulmányokból is világosan látszik, hogy mindkét SNP emeli a szérum triglicerid szintet (Elosua 2006, Hodoglugil 2006, Grallert 2007), addig egy costa ricai tanulmányban nem találtak szérum triglicerid szintemelkedést a mutáns allél hordozásakor (Ruiz-Narvaez 2005).

Az a mechanizmus, amelyen keresztül ezek a variánsok befolyásolják a triglicerid szintet, még ismeretlen. Azt feltételezik, hogy más variánsokkal való szoros kapcsoltság szerepe lehet elsődleges. Az európai populációkban az *APOA5* variánsai között teljes kapcsoltságot állapítottak meg (Pennacchio 2002, Talmud 2005), míg a costa ricai tanulmány szerint a kapcsoltság ott csak részleges volt. Ez utóbbi némi magyarázatot adhat arra is, hogy costa ricai tanulmányban miért nem találtak összefüggést a minor allélek és emelkedett trigliceridszint között (Ruiz-Narvaez 2005).

A metabolikus szindrómás betegek elemzése ezen *APOA5* variáns tekintetében az előzővel azonos képet mutatott. Nevezetesen, a ritka allélt hordozók szérum triglicerid szintje szignifikánsan magasabbnak adódott a nem-hordozókhoz viszonyítva.

Másik munkánkban a TG szint alapján kvartilisekbe soroltuk metabolikus szindrómás pácienseinket. Ekkor lépcsőzetesen emelkedő előfordulását találtuk ezen allél variánsnak az egyes kvartilisekben.

A stroke-os betegcsoport elemzése is az előbb tárgyalt variáns eredményét követte: minden stroke-os alcsoportban a hordozók szérum triglicerid szintje szignifikánsan magasabb volt a nem hordozókhoz viszonyítva.

Saját vizsgálatainkban az átlag magyar népesség elemzésekor ezen variáns szérum triglicerid szintet emelő hatását találtuk: a hordozó és nem-hordozó páciensek szérum triglicerid szintje közötti különbség – a harmadik és negyedik kvartilisben (a másodikban nem) – szignifikánsnak mutatkozott. A változás itt is a korábbiakhoz hasonló lépcsőzetességet mutatta. Amint azt a korábbi fejezetben is említettük, a témában ezidáig ilyen irányú vizsgálat nem történt.

7.4. Az *APOA5* gén C56G variánsának lehetséges szerepe

Az *APOA5* gén négy leggyakrabban előforduló variánsa közül ez a második leggyakrabban vizsgált természetes variáns, mely a gén második exonjának 56-os nukleotid pozíciójában található C/G transzverzió. A báziscsere eredményeként a 19-es pozícióban normálisan előforduló szerin aminosav helyett a felépülő fehérje molekulában – az allélikus variánsban – egy triptofán fog beépülni (S19W). Ez feltehetően úgy változtatja meg az ApoA-V szignál fehérjét, hogy önmagában vagy más polimorfizmusokkal együtt meggátolja a fehérje szekrécióját (Talmud 2008), ezzel úgynevezett funkcionális változást eredményezhet.

Amint azt láthattuk a többi variánsnál, az jellemző az 56G allélra is, hogy populációnként eltérő előfordulást mutat. A megoszlásban rendkívül nagymértékű szórás tapasztalható. Míg az előfordulási arány ázsiai népeknél kifejezetten alacsony, addig amerikai, afrikai és európai csoportoknál jóval magasabb. Kínai és japán populációkban <0,1%, az indiai populáció 3%-ában található meg, afro-amerikai és francia populációkban 4,8%, spanyol populációban ~15%. (Pennacchio 2002, Lai 2003, Martin 2003, Austin 2004, Klos 2006, Payseur 2006, The International HapMap Project 2003).

A metabolikus szindrómás betegcsoport elemzésekor ezen variáns tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget a szérum triglicerid szintben a hordozók és a nem-hordozók között. Ehhez hasonlóan akkor sem találtunk különbséget ezen allél típus előfordulási gyakoriságában, mikor a TG szint alapján kvartilisekbe soroltuk pácienseinket.

Stroke-os beteganyagunk elemzése során a korábbiakhoz hasonlóan azt találtuk, hogy minden alcsoportban a szérum triglicerid szint a variánst hordozókban szignifikánsan magasabb volt a nem-hordozókhoz képest.

Saját, az átlag magyar népességet reprezentáló vizsgálatainkban az európai populációkra általában jellemző, 4,44%-os allélikus variáns frekvenciát találtunk a legalacsonyabb kvartilisekbe sorolt egyéneknél. A változás szignifikánsan nagyobb arányban ezen variáns esetében – az előzőekkel ellentétben – csak a negyedik kvartilisekbe tartozó személyeknél fordult elő (20,6%).

Az előzőekben tárgyalt polimorfizmusokhoz hasonlóan sokan vizsgálták, hogy ezen variáns milyen úton eredményezi a szérum triglicerid szintjének emelkedését

(Corella 2007, Dorfmeister 2007, Dallongeville 2008). Ezek a vizsgálatok azt találták, hogy az *APOA5* variánsok közül ez, a C56G az egyetlen önálló „funkcionális” variáns.

A fent leírt báziscserének, s az ebből adódó aminosav cserének az a következménye, hogy az ApoA-V fehérje hidrofíli doménje oly mértékben megváltozik, ami jelentősen – negatívan – befolyásolja a fehérjének az endoplazmatikus retikulumon keresztül történő vándorlását. Ennek következtében a kiválasztott ApoA-V fehérje mennyisége csökken, s ennek lesz eredménye a magasabb szérumban triglicerid szint (Talmud 2005).

Amellett, hogy ez a változás ilyen eredménnyel jár, természetesen az sem zárható ki, hogy a C56G variáns esetleg más polimorfizmusokkal együtt is, más hatást is eredményez.

Schaefer és munkatársai hipertrigliceridaemiás betegekben az *APOE* gént, valamint az *APOA5* gén C56G genotípusát vizsgálták. Azt találták, hogy az *APOE* 2/2 genotípussal rendelkező betegek majdnem mindannyian hordozták az 56G allélt is (Schaefer 2004). Azon személyeknél azonban, akikben a lipid paraméterek normál értékeket mutattak, ezek az eltérések együttesen nem voltak kimutathatók. Ezek alapján azt a hipotézist állították fel, hogy a C56G kofaktorként szerepel, s ily módon vezet hipertrigliceridaemiához (Schaefer 2004, Evans 2005).

Mivel ezen *APOA5* variáns (C56G) hatására kifejezetten magas szérumban triglicerid szinteket találtak, az elváltozást számos betegcsoportban vizsgálták (Dallongeville 2006, Martinelli 2007, van der Vleuten 2007). A populációvizsgálatok eredményei alapján hordozását számos betegcsoportban kimutatták, így leírták, hogy myocardialis infarktuszban, koronária betegségben, metabolikus szindrómában is magasabb kockázatot jelent (Hubacek 2004, Liu 2005, Grallert 2007). A mutáns allél jelenlétét gyorsabb aterogenezissel is összefüggésbe hozták (Talmud 2005).

7.5. Az *APOA5* gén leggyakoribb haplotípusainak lehetséges szerepe

Az *APOA5* gént elsőként leíró Pennacchio és munkatársai későbbi közleményükben ismertették a gén haplotípusait leíró eredményeiket. Ezek szerint az *APOA5* gén természetes variánsainak feltérképezése során erős kapcsoltságot igazoltak a leggyakoribbnak tartott, ezért a leggyakrabban vizsgált variánsok között. Az idézett

munkában két fő haplotípust determinálnak: *APOA5*2* (-1131C, 1259C, IVS3+476A) és *APOA5*3* (56G) (Pennacchio 2002). Ezen két haplotípus, valamint a vad típusú haplotípus (*APOA5*1*: -1131T, 1259T, IVS3+476G, 56C) összességében a populációnak mintegy 98%-ában található meg. A fennmaradó kb. 2%-ba az előzőeknél jóval ritkább haplotípusok tartoznak. Ilyenek pl. az *APOA5*4* (-1131C), vagy az *APOA5*5* (1259C) (Olivier 2004, Ruiz-Narvaez 2005, Hallman 2006).

A metabolikus szindrómás betegcsoportban elvégzett haplotípus elemzésnél saját vizsgálatainkban azt találtuk, hogy a szérum triglicerid szint az *APOA5*1/2-2/2* haplotípusban szignifikánsan magasabb volt.

Az átlag magyar népességre irányuló vizsgálataink során azt találtuk, hogy míg az egyes kvartilisekben a vad típusú egyének előfordulási gyakoriságában nincs szignifikáns különbség, addig a második haplotípus (*APOA5*2*) a harmadik és negyedik kvartilisekben is, a harmadik haplotípus (*APOA5*3*) pedig a negyedik kvartilisben volt gyakrabban megtalálható. Az egyéb haplotípusokat olyan kis számban találtuk, amelyekből statisztikai számítások nem voltak végezhetőek.

Összességében a haplotípus elemzésekből levonható az a következtetés, hogy a vizsgált *APOA5* variánsok közül az átlag magyar népességben a szérum triglicerid szintjét befolyásoló tényezők között az *APOA5*2* és *APOA5*3* haplotípusok, a metabolikus szindrómás betegekben pedig az *APOA5*1/2-2/2* haplotípus tekinthető rizikó faktornak.

A haplotípusokat illetően a genetikai determináltság rendkívül összetett voltára világít rá egy, a saját vizsgálatainkat követően megjelent összefoglaló közlemény (Johansen 2010). Ebben a szerzők GWAS (Genom-wide association studies) elemzéssel, kiterjedt szekvenálással végzett vizsgálatok alapján azt ismerték fel, hogy a magas TG szinttel összefüggésben az egyes haplotípusokon belül nagy számú ritka variáns is előfordul, és a gyakran előforduló variánsok mellett ezen ritka variánsok halmozott előfordulása is magyarázhatja a HTG kialakulását.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az elvégzett munkából az alábbi következtetések vonhatók le:

1. A metabolikus szindrómás betegeket vizsgálva elmondható, hogy a –1131C, IVS3+476A, 1259C alléleket hordozók szérumszintje szignifikánsan magasabb, mint a nem-hordozó egyéneké. A C56G variáns esetében ez az összefüggés nem kimutatható.
2. A metabolikus szindrómás betegek haplotípus elemzésének eredménye alapján az *APOA5**1/2-2/2 hordozása szignifikánsan magasabb szérumszinttel jár együtt, míg ez a többi haplotípusnál nem kimutatható.
3. A stroke-os (ischemias stroke) betegekben vizsgált allélek hordozása és a szérumszintjének kapcsolata terén végzett elemzésekből megállapítható, hogy a szérumszint mind a négy polimorfizmus hordozása esetén, minden stroke alcsoportban szignifikánsan magasabb.
4. Az *apolipoprotein A5* variánsainak és a szérumszintjének kapcsolatát vizsgálva elmondható, hogy a –1131C, IVS3+476A, 1259C és 56G alléleknek az átlag magyar népességben való előfordulási gyakorisága és a magasabb szérumszintek között szignifikáns, lépcsőzetesen emelkedő összefüggés van.
5. Ez az összefüggés a –1131C, IVS3+476A, 1259C allélek vonatkozásában a 2,91 mmol/l-nél magasabb TG értékekkel (Q3; Q4) rendelkező egyének esetében igazolható, míg az 56G variánsnál csak a 4,85 mmol/l-nél magasabb TG értékekkel (Q4) rendelkezőknél volt megtalálható, az első kvartilis, azaz a legalacsonyabb szérumszintű páciensekkel szemben (TG<1,31).
6. Az átlag magyar népesség *apolipoprotein A5* gén egyes haplotípusait tekintve – a legalacsonyabb szérumszintű csoporthoz viszonyítva – az alábbiakat találtuk:
 - a. Az *APOA5**1/1 haplotípus előfordulási gyakoriságában nem volt szignifikáns eltérés az egyes kvartilisek között.
 - b. Az *APOA5**1/2-2/2 haplotípus a 2,91 mmol/l-nél magasabb TG értékekkel (Q3; Q4) rendelkező páciensek esetében, míg az *APOA5**1/3-3/3 haplotípus a 4,85 mmol/l-nél magasabb TG értékekkel (Q4) bíró személyeknél volt szignifikánsan gyakoribb, az első kvartilishoz viszonyítva.

9. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

A dolgozat alapjául szolgáló eredeti közlemények:

1. Kisfali P, Mohás M, Maasz A, **Hadarits F**, Markó L, Horvatovich K, Oroszlán T, Bagosi Z, Bujtor Z, Gasztonyi B, Wittmann I, Melegh B. *Apolipoprotein A5* IVS3+476A allelic variant associates with increased triglyceride levels and confers risk for development of metabolic syndrome in Hungarians. *Circ J.* 2008; 72(1):40-3

Impact Faktor: 2,387 (2008)

2. Maasz A, Kisfali P, Szolnoki Z, **Hadarits F**, Melegh B. *Apolipoprotein A5* gene C56G variant confers risk for the development of large-vessel associated ischemic stroke. *J Neurol.* 2008; 255(5):649-54.

Impakt Faktor: 2,536 (2008)

3. Maasz A, Kisfali P, Horvatovich K, Szolnoki Z, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Sipeky C, **Hadarits F**, Melegh B. *Apolipoprotein A5* gene IVS3+G476A allelic variant confers susceptibility for development of ischemic stroke. *Circ J.* 2008; 72(7):1065-70.

Impakt Faktor: 2,387 (2008)

4. Kisfali P, Mohas M, Maasz A, Polgar N, **Hadarits F**, Marko L, Brasnyo P, Horvatovich K, Oroszlan T, Bagosi Z, Bujtor Z, Gasztonyi B, Rinfel J, Wittmann I, Melegh B. Haplotype analysis of the *apolipoprotein A5* gene in patients with the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010;20(7):505-11.

Impakt Faktor: 3.517 (2009)

5. **Hadarits F**, Kisfali P, Mohas M, Maasz A, Sumegi K, Szabo M, Hetyesy K, Valasek A, Janicsek I, Wittmann I, Melegh B. Stepwise Positive Association Between *APOA5* Minor Allele Frequencies and Increasing Plasma Triglyceride Quartiles in Random Patients with Hypertriglyceridemia of Unclarified Origin. *Pathol Oncol Res.* 2011;17(1):39-44

Impakt Faktor: 1.152 (2009)

6. **Hadarits F**, Kisfali P, Mohas M, Maasz A, Duga B, Janicsek I, Wittmann I, Melegh B. Common functional variants of *APOA5* and *GCKR* accumulate gradually in association with triglyceride increase in metabolic syndrome patients. *Molecular Biology Reports*. 2011. közlés alatt.

Impakt Faktor: 2.04 (2010)

További közlemények:

1. Brittig F., Garzuly F., Mázló M., **Hadarits F.** Fabry-kór arteria basilaris thrombosissal. *Morph. és Ig. Orv. Szemle.* 26 :15-24; 1986.
2. **Hadarits F.** Balogh M. Oroszlán G. Kovács L. G. Hyperimmunglobulinaemia E (Jób) syndroma. *Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina*, 1998;25,4:187-189.
3. **Hadarits Ferenc:** Human Papillomavírusok (HPV) és cervixrák szűrés. Új Bábakalauz, 1998; II, 4, 27-32.
4. Horváth B. **Hadarits F.**_Szabó L. Hüvelyi fertőzések kezelése, 144 beteg Gynoflor-kezelésének prospektív vizsgálata. *Magyar Nőorvosok Lapja*, 2004, 67, 85-91.
5. Z Szolnoki, A Maasz, L Magyarai, K Horvatovich, B Farago, F Somogyvari, A Kondacs, M Szabo, L Fodor, A Bodor, **F Hadarits**, B Melegh. Coexistence of angiotensin II type 1 receptor A1166C and angiotensin-converting enzyme D/D polymorphism represents susceptibility for small-vessel-associated ischaemic stroke. *NeuroMolecular Medicine*, 2006, 8 (3), 353-60.

Impakt Faktor: 3,396 (2006)

6. Szolnoki Z, Maasz A, Magyarai L, Horvatovich K, Farago B, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Bodor A, **Hadarits F**, Melegh B. The combination of homozygous *MTHFR* 677T and angiotensin II type-1 receptor 1166C variants

confers the risk of small-vessel-associated ischemic stroke. J Mol Neurosci. 2007;31(3):201-207.

Impakt Faktor: 1,735 (2007)

7. Szolnoki Z, Maasz A, Magyar L, Horvatovich K, Farago B, Kondacs A, Bodor A, **Hadarits F**, Orosz P, Ille A, Melegh B. Galectin-2 3279TT variant protects against the lymphotoxin-alpha 252GG genotype associated ischaemic stroke. Clin Neurol Neurosurg. 2009;111(3):227-30.

Impakt Faktor: 1,323 (2008)

8. **Hadarits F**, Iván, A., Márkus, Cs. és Nagy, L. Kardiális troponin méréssel szerzett tapasztalataink. Orvosi Hetilap 2009;150(43):1988-1993

Összesített impakt faktor (idézhető absztraktok nélkül): 20,473

Idézhető absztraktok

Maasz A, Kisfali P, Jaromi L, Szolnoki Z, **Hadarits F**, Melegh B. Apolipoprotein A5 gene IVS3+G476A allelic variant confers susceptibility for development of ischemic stroke. Eur J Hum Genet, 2008;16(S2):293.

Impakt Faktor: 3,925 (2008)

Kisfali P, Mohas M, Maasz A, **Hadarits F**, Marko L, Késői I, Oroszlán T, Bagosi Z, Bujtor Z, Rinfel J, Gasztonyi B, Wittmann I, Melegh B. Apolipoprotein A5 gene APOA5*2 haplotype variant confers risk for the development of metabolic syndrome. Eur J Hum Genet, 2008;16(S2):328.

Impakt Faktor: 3,925 (2008)

Hadarits F., Horváth M., Nyuli L. and Kovács L.G. Abnormalities of cellular and humoral immune parameters in chronic alcoholic patients with delirium tremens

3rd Alpe-Adria Congress on Clinical Chemistry and Laboratory Medicine,
Hungary, Pécs, 1994.

Hadarits F, Csanaky G, Donhoffer Á. Kovács L. G. HPV-DNA detection and cervical cancer screening. 20th World Congress of Pathology and Laboratory Medicine. Brazil, Sao Paulo, 1999.

Hadarits, F., Hajnal, A., Norgren, R. Conditioned taste aversion affects gustatory taste neuron responses in awake rats. Society for Neuroscience, 31st Annual Meeting, USA, San Diego, California, 2001.

Összesített impakt faktor (idézhető absztraktokkal): 28,323

10. IRODALOM

Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3rd. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. Stroke. 1993;24:35-41.

Aouizerat BE, Kulkarni M, Heilbron D, Drown D, Raskin S, Pullinger CR, Malloy MJ, Kane JP. Genetic analysis of a polymorphism in the human apoA-V gene: effect on plasma lipids. J Lipid Res 2003;44:1167-1173.

Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. Am J Cardiol. 1998;81:7B-12B.

Austin MA, Talmud PJ, Farin FM, Nickerson DA, Edwards KL, Leonetti D, McNeely MJ, Viernes HM, Humphries SE, Fujimoto WY. Association of *apolipoprotein A5* variants with LDL particle size and triglyceride in Japanese Americans. Biochim Biophys Acta. 2004;1688:1-9.

Bi N, Yan SK, Li GP, Yin ZN, Chen BS. A single nucleotide polymorphism -1131T>C in the *apolipoprotein A5* gene is associated with an increased risk of coronary artery disease and alters triglyceride metabolism in Chinese. Mol Genet Metab. 2004;83:280-286.

Boguski MS, Birkenmeier EH, Elshourbagy NA, Taylor JM, Gordon JI. Evolution of the apolipoproteins. Structure of the rat apo-A-IV gene and its relationship to the human genes for apo-A-I, C-III, and E. J Biol Chem. 1986;261:6398-6407.

Calandra S, Priore Oliva C, Tarugi P, Bertolini S. *APOA5* and triglyceride metabolism, lesson from human *APOA5* deficiency. Curr Opin Lipidol. 2006;17:122-127.

Chaaba R, Attia N, Hammami S, Smaoui M, Mahjoub S, Hammami M, Masmoudi AS. Association of SNP3 polymorphism in the apolipoprotein A-V gene with plasma triglyceride level in Tunisian type 2 diabetes. Lipids Health Dis. 2005;4:1.

Chandak GR, Ward KJ, Yajnik CS, Pandit AN, Bavdekar A, Joglekar CV, Fall CH, Mohankrishna P, Wilkin TJ, Metcalf BS, Weedon MN, Frayling TM, Hattersley AT. Triglyceride associated polymorphisms of the *APOA5* gene have very different allele frequencies in Pune, India compared to Europeans. BMC Med Genet. 2006;7:76.

Charlton-Menys V, Durrington PN. *Apolipoprotein A5* and hypertriglyceridemia. Clin Chem. 2005;51:295-297.

Corella D, Lai CQ, Demissie S, Cupples LA, Manning AK, Tucker KL, Ordovas JM. *APOA5* gene variation modulates the effects of dietary fat intake on body mass index and obesity risk in the Framingham Heart Study. J Mol Med. 2007;85:119-128.

Couderc R, Mahieux F, Bailleul S, Fenelon G, Mary R, Fermanian J. Prevalence of apolipoprotein E phenotypes in ischemic cerebrovascular disease: a case control study. Stroke. 1993;24:661-664.

Dallongeville J, Cottel D, Montaye M, Codron V, Amouyel P, Helbecque N. Impact of *APOA5/A4/C3* genetic polymorphisms on lipid variables and cardiovascular disease risk in French men. *Int J Cardiol.* 2006;106:152-156.

Dallongeville J, Cottel D, Wagner A, Ducimetière P, Ruidavets JB, Arveiler D, Bingham A, Ferrières J, Amouyel P, Meirhaeghe A. The *APOA5* Trp19 allele is associated with metabolic syndrome via its association with plasma triglycerides. *BMC Med Genet.* 2008;9:84.

Dawber TR, Meadors GF, Moore FE. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am J Public Health Nations Health.* 1951;41:279-281.

Dorfmeister B, Cooper JA, Stephens JW, Ireland H, Hurel SJ, Humphries SE, Talmud PJ. The effect of *APOA5* and *APOC3* variants on lipid parameters in European Whites, Indian Asians and Afro-Caribbeans with type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772:355-363.

Eichenbaum-Voline S, Olivier M, Jones EL, Naumova RP, Jones B, Gau B, Patel HN, Seed M, Betteridge DJ, Galton DJ, Rubin EM, Scott J, Shoulders CC, Pennacchio LA. Linkage and association between distinct variants of the *APOA1/C3/A4/A5* gene cluster and familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:167-174.

Elosua R, Ordovas JM, Cupples LA, Lai CQ, Demissie S, Fox CS, Polak JF, Wolf PA, D'Agostino RB Sr, O'Donnell CJ. Variants at the *APOA5* locus, association with carotid atherosclerosis, and modification by obesity: the Framingham Study. *J Lipid Res* 2006;47:990-996.

Endo K, Yanagi H, Araki J, Hirano C, Yamakawa-Kobayashi K, Tomura S. Association found between the promoter region polymorphism in the apolipoprotein A-V gene and the serum triglyceride level in Japanese schoolchildren. *Hum Genet* 2002;111:570-572.

Evans D, Buchwald A, Beil FU: The single nucleotide polymorphism -1131T>C in the *apolipoprotein A5 (APOA5)* gene is associated with elevated triglycerides in patients with hyperlipidemia. *J Mol Med* 2003;81:645-654.

Evans D, Seedorf U, Beil FU. Polymorphisms in the *apolipoprotein A5 (APOA5)* gene and type III hyperlipidemia. *Clin Genet.* 2005;68:369-372.

Fredrickson DS. Plasma lipoproteins and apolipoproteins. *Harvey Lect.* 1974;68:185-237.

Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Thudium D, Moes Gronholdt ML, Tybjaerg-Hansen A. APOE genotype predicts AD and other dementia but not ischemic cerebrovascular disease. *Neurology.* 2001;56:194-200.

Fruchart-Najib J, Baugé E, Niculescu LS, Pham T, Thomas B, Rommens C, Majd Z, Brewer B, Pennacchio LA, Fruchart JC. Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human *apolipoprotein A5*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;319:397-404.

Grallert H, Sedlmeier EM, Huth C, Kolz M, Heid IM, Meisinger C, Herder C, Strassburger K, Gehringer A, Haak M, Giani G, Kronenberg F, Wichmann HE, Adamski J, Paulweber B, Illig T, Rathmann W. *APOA5* variants and metabolic syndrome in Caucasians. *J Lipid Res.* 2007;48:2614-2621.

Groenendijk M, Cantor RM, De Bruin TW, Dallinga-Thie GM. The apoAI-CIII-AIV gene cluster. *Atherosclerosis* 2001;157:1-11.

Hallman DM, Srinivasan SR, Chen W, Boerwinkle E, Berenson GS. Longitudinal analysis of haplotypes and polymorphisms of the *APOA5* and *APOC3* genes associated with variation in serum triglyceride levels: the Bogalusa Heart Study. *Metabolism* 2006;55:1574-1581.

Hodoglugil U, Tanyolaç S, Williamson DW, Huang Y, Mahley RW. Apolipoprotein A-V: a potential modulator of plasma triglyceride levels in Turks. *J Lipid Res.* 2006;47:144-153.

Huang P, Kostulas K, Huang WX, Crisby M, Kostulas V, Hillert J. Lipoprotein lipase gene polymorphisms in ischaemic stroke and carotid stenosis. *Eur J Clin Invest.* 1997;27:740-742.

Hubacek JA, Skodova Z, Adamkova V, Lanska V, Poledne R. The influence of *APOAV* polymorphisms (T-1131>C and S19>W) on plasma triglyceride levels and risk of myocardial infarction. *Clin Genet* 2004;65:126-130.

Hubacek JA. *Apolipoprotein A5* and triglyceridemia. Focus on the effects of the common variants. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43:897-902.

Ishihara M, Kujiraoka T, Iwasaki T, Nagano M, Takano M, Ishii J, Tsuji M, Ide H, Miller IP, Miller NE, Hattori H. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human plasma apolipoprotein A-V concentration. *J Lipid Res.* 2005;46:2015-2022.

Johansen CT, Wang J, Lanktree MB, Cao H, McIntyre AD, Ban MR, Martins RA, Kennedy BA, Hassell RG, Visser ME, Schwartz SM, Voight BF, Elosua R, Salomaa V, O'Donnell CJ, Dallinga-Thie GM, Anand SS, Yusuf S, Huff MW, Kathiresan S, Hegele RA. Excess of rare variant in genes identified by genome-wide association study of hypertriglyceridaemia. *Nat Gen.* 2010;42:684-688.

Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burt N, Rieder M, Cooper G, Roos C, Voight B, Havulinna A, Wahlstrand B, Hedner T, Corella D, Tai E, Ordovas J, Berglund G, Vartiainen E, Jousilahti P, Hedblad B, Taskinen M, Newton-Cheh C, Salomaa V, Peltonen L, Groop L, Altshuler D, Orho-Melander M. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat. Genet.*, 2008, 40, 189-97.

Kathiresan S, Willer C, Peloso G, Demissie S, Musunuru K, Schadt E, Kaplan L, Bennett D, Li Y, Tanaka T, Voight B, Bonnycastle L, Jackson A, Crawford G, Surti A, Guiducci C, Burt N, Parish S, Clarke R, Zelenika D, Kubalanza K, Morken M, Scott L, Stringham H, Galan P, Swift A, Kuusisto J, Bergman R, Sundvall J, Laakso M, Ferrucci

L. Scheet P. Sanna S. Uda M. Yang Q. Lunetta K. Dupuis J. de Bakker P. O'Donnell C. Chambers J. Kooner J. Hercberg S. Meneton P. Lakatta E. Scuteri A. Schlessinger D. Tuomilehto J. Collins F. Groop L. Altshuler D. Collins R. Lathrop G. Melander O. Salomaa V. Peltonen L. Orho-Melander M. Ordovas J. Boehnke M. Abecasis G. Mohlke K. Cupples L. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat. Genet.*, 2009, 41, 56-65.

Kisfali P, Mohas M, Maasz A, Hadarits F, Marko L, Horvatovich K, Oroszlan T, Bagosi Z, Bujtor Z, Gasztonyi B, Wittmann I, Melegh B. *Apolipoprotein A5* IVS3+476A allelic variant associates with increased triglyceride levels and confers risk for development of metabolic syndrome in Hungarians. *Circ J.* 2008;72(1):40-3.

Kisfali P, Mohas M, Maasz A, Polgar N, Hadarits F, Marko L, Brasnyo P, Horvatovich K, Oroszlan T, Bagosi Z, Bujtor Z, Gasztonyi B, Rinfel J, Wittmann I, Melegh B. Haplotype analysis of the *apolipoprotein A5* gene in patients with the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009 Aug 17. [Epub ahead of print]

Klos KL, Hamon S, Clark AG, Boerwinkle E, Liu K, Sing CF. *APOA5* polymorphisms influence plasma triglycerides in young, healthy African Americans and whites of the CARDIA Study. *J Lipid Res.* 2005;46:564-571.

Kluger M, Heeren J, Merkel M. Apoprotein A-V: An important regulator of triglyceride metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 2008 közlés alatt

Kooner J. Chambers J. Aguilar-Salinas C. Hinds D. Hyde C. Warnes G. Gómez Pérez F. Frazer K. Elliott P. Scott J. Milos P. Cox D. Thompson J. Genome-wide scan identifies variation in *MLXIPL* associated with plasma triglycerides. *Nat. Genet.*, 2008, 40, 149-51.

Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 1987;15:8125-8148.

Lai CQ, Tai ES, Tan CE, Cutter J, Chew SK, Zhu YP, Adiconis X, Ordovas JM. The *APOA5* locus is a strong determinant of plasma triglyceride concentrations across ethnic groups in Singapore. *J Lipid Res* 2003;44:2365-2373.

Lai CQ, Demissie S, Cupples LA, Zhu Y, Adiconis X, Parnell LD, Corella D, Ordovas JM. Influence of the *APOA5* locus on plasma triglyceride, lipoprotein subclasses, and CVD risk in the Framingham Heart Study. *J Lipid Res* 2004;45:2096-2105.

Li WW, Dammerman MM, Smith JD, Metzger S, Breslow JL, Leff T. Common genetic variation in the promoter of the human apo CIII gene abolishes regulation by insulin and may contribute to hypertriglyceridemia. *J Clin Invest.* 1995;96:2601-2605.

Li YJ, Wei YS, Fu XH, Hao DL, Xue Z, Gong H, Zhang ZQ, Liu DP, Liang CC. The Apolipoprotein CIII enhancer regulates both extensive histone modification and intergenic transcription of human apolipoprotein AI/CIII/AIV genes but not apolipoprotein AV. *J Biol Chem* 2008;283:28436-28444.

- Liu H, Zhang S, Lin J, Li H, Huang A, Xiao C, Li X, Su Z, Wang C, Nebert DW, Zhou B, Zheng K, Shi J, Li G, Huang D. Association between DNA variant sites in the *apolipoprotein A5* gene and coronary heart disease in Chinese. *Metabolism* 2005;54:568-572.
- Lookene A, Beckstead JA, Nilsson S, Olivecrona G, Ryan RO. Apolipoprotein A-V-heparin interactions: implications for plasma lipoprotein metabolism. *J Biol Chem*. 2005;280:25383-25387.
- Maasz A, Kisfali P, Horvatovich K, Mohas M, Marko L, Csongei V, Farago B, Jaromi L, Magyari L, Safrany E, Sipeky C, Wittmann I, Melegh B. *Apolipoprotein A5* T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome. *Pathol Oncol Res*. 2007;13:243-247.
- Maasz A, Kisfali P, Jaromi L, Horvatovich K, Szolnoki Z, Csongei V, Safrany E, Sipeky C, Hadarits F, Melegh B. *Apolipoprotein A5* gene IVS3+G476A allelic variant confers susceptibility for development of ischemic stroke. *Circ J*. 2008;72(7):1065-70.
- MacLeod MJ, De Lange RP, Breen G, Meiklejohn D, Lemmon H, Clair DS. Lack of association between apolipoprotein E genotype and ischaemic stroke in a Scottish population. *Eur J Clin Invest*. 2001;31:570-573.
- Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*. 1984;25:1277-1294.
- Marçais C, Verges B, Charrière S, Pruneta V, Merlin M, Billon S, Perrot L, Draï J, Sassolas A, Pennacchio LA, Fruchart-Najib J, Fruchart JC, Durlach V, Moulin P. *APOA5* Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment. *J Clin Invest*. 2005;115:2862-2869.
- Martin S, Nicaud V, Humphries SE, Talmud PJ; EARS group. Contribution of *APOA5* gene variants to plasma triglyceride determination and to the response to both fat and glucose tolerance challenges. *Biochim Biophys Acta* 2003;1637:217-225.
- Martinelli N, Trabetti E, Bassi A, Girelli D, Friso S, Pizzolo F, Sandri M, Malerba G, Pignatti PF, Corrocher R, Olivieri O. The -1131 T>C and S19W *APOA5* gene polymorphisms are associated with high levels of triglycerides and apolipoprotein C-III, but not with coronary artery disease: an angiographic study. *Atherosclerosis* 2007;191:409-417.
- Merkel M, Heeren J. Give me A5 for lipoprotein hydrolysis! *J Clin Invest* 2005;115:2694-2696. (Merkel 2005/1)
- Merkel M, Loeffler B, Kluger M, Fabig N, Geppert G, Pennacchio LA, Laatsch A, Heeren J. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 2005;280:21553-21560. (Merkel 2005/2)
- Miller S. A., Dykes D. D., and Polesky H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215-1218.

Morrisett JD, Jackson RL, Gotto AM Jr. Lipoproteins: structure and function. *Annu Rev Biochem.* 1975;44:183-207.

Myant NB. Cholesterol transport through the plasma. *Clin Sci (Lond).* 1982;62:261-71.

Nabika T, Nasreen S, Kobayashi S, Masuda J. The genetic effect of the apolipoprotein AV gene on the serum triglyceride level in Japanese. *Atherosclerosis* 2002;165:201-204.

O'Brien PJ, Alborn WE, Sloan JH, Ulmer M, Boodhoo A, Knierman MD, Schultze AE, Konrad RJ. The novel apolipoprotein A-V is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clin Chem.* 2005;51:351-359.

Olivier M, Wang X, Cole R, Gau B, Kim J, Rubin EM, Pennacchio LA. Haplotype analysis of the apolipoprotein gene cluster on human chromosome 11. *Genomics* 2004;83:912-923.

Olivieri O, Bassi A, Stranieri C, Trabetti E, Martinelli N, Pizzolo F, Girelli D, Friso S, Pignatti PF, Corrocher R. Apolipoprotein C-III, metabolic syndrome, and risk of coronary artery disease. *J Lipid Res.* 2003;44:2374-2381.

Packard CJ, Demant T, Stewart JP, Bedford D, Caslake MJ, Schwertfeger G, Bedynek A, Shepherd J, Seidel D. Apolipoprotein B metabolism and the distribution of VLDL and LDL subfractions. *J Lipid Res.* 2000;41:305-18.

Payseur BA, Clark AG, Hixson J, Boerwinkle E, Sing CF. Contrasting multi-site genotypic distributions among discordant quantitative phenotypes: the APOA1/C3/A4/A5 gene cluster and cardiovascular disease risk factors. *Genet Epidemiol.* 2006;30:508-518.

Pedro-Botet J, Sentí M, Nogués X, Rubiés-Prat J, Roquer J, D'Olhaberriague L, Olivé J. Lipoprotein and apolipoprotein profile in men with ischemic stroke. Role of lipoprotein(a), triglyceride-rich lipoproteins, and apolipoprotein E polymorphism. *Stroke.* 1992;23:1556-1562.

Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, Krauss RM, Rubin EM. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 2001;294:169-173.

Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Krauss RM, Rubin EM, Cohen JC. Two independent *apolipoprotein A5* haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Hum Mol Genet* 2002;11:3031-3038.

Pennacchio LA, Rubin EM: *Apolipoprotein A5*, a newly identified gene that affects plasma triglyceride levels in humans and mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:529-534.

Prieur X, Coste H, Rodriguez JC. The human apolipoprotein AV gene is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and contains a novel farnesoid X-activated receptor response element. *J Biol Chem* 2003;278:25468-25480.

- Priore Oliva C, Pisciotta L, Li Volti G, Sambataro MP, Cantafora A, Bellocchio A, Catapano A, Tarugi P, Bertolini S, Calandra S. Inherited apolipoprotein A-V deficiency in severe hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:411-417.
- Priore Oliva C, Tarugi P, Calandra S, Pisciotta L, Bellocchio A, Bertolini S, Guardamagna O, Schaap FG. A novel sequence variant in *APOA5* gene found in patients with severe hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis.* 2006;188:215-217.
- Robinson DS. Plasma triglyceride metabolism. *J Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol).* 1973;5:5-10.
- Ruiz-Narvaez EA, Yang Y, Nakanishi Y, Kirchdorfer J, Campos H. APOC3/A5 haplotypes, lipid levels, and risk of myocardial infarction in the Central Valley of Costa Rica. *J Lipid Res* 2005;46:2605-2613.
- Saxena R. Voight B. Lyssenko V. Burt N. de Bakker P. Chen H. Roix J. Kathiresan S. Hirschhorn J. Daly M. Hughes T. Groop L. Altshuler D. Almgren P. Florez J. Meyer J. Ardlie K. Bengtsson Boström K. Isomaa B. Lettre G. Lindblad U. Lyon H. Melander O. Newton-Cheh C. Nilsson P. Orho-Melander M. Råstam L. Speliotes E. Taskinen M. Tuomi T. Guiducci C. Berglund A. Carlson J. Gianniny L. Hackett R. Hall L. Holmkvist J. Laurila E. Sjögren M. Sterner M. Surti A. Svensson M. Tewhey R. Blumenstiel B. Parkin M. Defelice M. Barry R. Brodeur W. Camarata J. Chia N. Fava M. Gibbons J. Handsaker B. Healy C. Nguyen K. Gates C. Sougnez C. Gage D. Nizzari M. Gabriel S. Chirn G. Ma Q. Parikh H. Richardson D. Ricke D. Purcell S. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science*, 2007, 316, 1331-6.
- Schaap FG, Rensen PC, Voshol PJ, Vrans C, van der Vliet HN, Chamuleau RA, Havekes LM, Groen AK, van Dijk KW. ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J Biol Chem* 2004; 279: 27941-27947.
- Schaefer EJ, Eisenberg S, Levy RI. Lipoprotein apoprotein metabolism. *J Lipid Res.* 1978;19:667-87.
- Schaefer JR, Sattler AM, Hackler B, Kurt B, Hackler R, Maisch B, Soufi M. Hyperlipidemia in patients with apolipoprotein E 2/2 phenotype: *apolipoprotein A5* S19W mutation as a cofactor. *Clin Chem.* 2004;50:2214.
- Scott J. The human apolipoprotein genes. *Oxf Surv Eukaryot Genes.* 1987;4:168-197.
- Smith LC, Pownall HJ, Gotto AM Jr. The plasma lipoproteins: structure and metabolism. *Annu Rev Biochem.* 1978;47:751-7.
- Sousa OM, Alia P, Pinto X. *Apolipoprotein A5* gene: association with triglyceride metabolism and cardiovascular disease. *Med Clin (Barc).* 2008;130(20):787-93.

- Szalai C, Keszei M, Duba J, Prohászka Z, Kozma GT, Császár A, Balogh S, Almássy Z, Fust G, Czinner A. Polymorphism in the promoter region of the *apolipoprotein A5* gene is associated with an increased susceptibility for coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2004;173:109-114.
- Tai ES, Ordovas JM. Clinical significance of *apolipoprotein A5*. *Curr Opin Lipidol.* 2008;19:349-354.
- Tall AR, Small DM. Body cholesterol removal: role of plasma high-density lipoproteins. *Adv Lipid Res.* 1980;17:1-51.
- Talmud PJ, Hawe E, Martin S, Olivier M, Miller GJ, Rubin EM, Pennacchio LA, Humphries SE. Relative contribution of variation within the APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides. *Hum Mol Genet* 2002;11:3039-3046.
- Talmud PJ, Martin S, Taskinen MR, Frick MH, Nieminen MS, Kesäniemi YA, Pasternack A, Humphries SE, Syväne M. *APOA5* gene variants, lipoprotein particle distribution, and progression of coronary heart disease: results from the LOCAT study. *J Lipid Res.* 2004;45:750-756.
- Talmud PJ, Palmen J, Putt W, Lins L, Humphries SE. Determination of the functionality of common *APOA5* polymorphisms. *J Biol Chem.* 2005;280:28215-28220.
- Talmud PJ. Rare *APOA5* mutations--clinical consequences, metabolic and functional effects: an ENID review. *Atherosclerosis.* 2007;194:287-292.
- Tan MH. The lipoprotein lipase system: new understandings. *Can Med Assoc J.* 1978;118:675-80.
- The International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* 2003;426:789-796.
- Toole JF. *Cerebrovascular Disorders.* New York, Raven Press, 1986
- van der Vleuten GM, Isaacs A, Zeng WW, ter Avest E, Talmud PJ, Dallinga-Thie GM, van Duijn CM, Stalenhoef AF, de Graaf J. Haplotype analyses of the *APOA5* gene in patients with familial combined hyperlipidemia. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772:81-88.
- van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC, Levels JH, Reitsma PH, Boers W, Chamuleau RA. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *J Biol Chem.* 2001;276:44512-44520.
- Vu-Dac N, Gervois P, Jakel H, Nowak M, Bauge E, Dehondt H, Staels B, Pennacchio LA, Rubin EM, Fruchart-Najib J, Fruchart JC. *Apolipoprotein A5*, a crucial determinant of plasma triglyceride levels, is highly responsive to peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators. *J Biol Chem.* 2003;278:17982-17985.

Wang Q, Liu X, O'Connell J, Peng Z, Krauss RM, Rainwater DL, VandeBerg JL, Rubin EM, Cheng JF, Pennachio LA. Haplotypes in the APOA1-C3-A4-A5 gene cluster affect plasma lipids in both humans and baboons. *Hum Mol Genet* 2004;13:1049-1056.

Waterworth DM, Hubacek JA, Pitha J, Kovar J, Poledne R, Humphries SE, Talmud PJ. Plasma levels of remnant particles are determined in part by variation in the APOC3 gene insulin response element and the APOCI-APOE cluster. *J Lipid Res.* 2000;41:1103-1109.

Weinberg RB, Cook VR, Beckstead JA, Martin DD, Gallagher JW, Shelness GS, Ryan RO. Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V. *J Biol Chem.* 2003;278:34438-34444.

Williams KJ, Molecular processes that handle – and mishandle – dietary lipids. *J Clin Invest.* 2008;118(10)3247-59.

Wittrup HH, Nordestgaard BG, Sillesen H, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. A common mutation in lipoprotein lipase confers a 2-fold increase in risk of ischemic cerebrovascular disease in women but not in men. *Circulation.* 2000;101:2393-2397.

Wright WT, Young IS, Nicholls DP, Patterson C, Lyttle K, Graham CA. SNPs at the *APOA5* gene account for the strong association with hypertriglyceridaemia at the *APOA5/A4/C3/A1* locus on chromosome 11q23 in the Northern Irish population. *Atherosclerosis.* 2005;185:353-360.

Yamada Y, Kato K, Hibino T, Yokoi K, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, Ichihara S, Yoshida H, Satoh K, Nozawa Y. Prediction of genetic risk for metabolic syndrome. *Atherosclerosis.* 2007;191:298-304.

Yan SK, Cheng XQ, Song YH, Xiao XH, Bi N, Chen BS. *Apolipoprotein A5* gene polymorphism -1131T-->C: association with plasma lipids and type 2 diabetes mellitus with coronary heart disease in Chinese. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:607-612.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozatomhoz szükséges kutatómunka a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Orvosi Genetikai Intézetében készült.

Mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Melegh Béla Professor Úrnak tartozom köszönettel, hogy lehetővé tette a Ph.D. programba – egyéni felkészülőként – történő bekapcsolódásomat. Szeretném megköszönni munkám irányítását, támogatását.

Rendkívül hálás vagyok Ph.D. hallgató társaimnak, hogy munkámat önzetlenül, áldozatkészen, türelmesen segítették. Külön köszönet illeti Maász Anitát és Kisfali Pétert, akiknek hathatós segítsége nélkül ez a dolgozat csak sokkal nehezebben készülhetett volna el.

Köszönettel tartozom az Intézet, a laboratórium valamennyi dolgozójának, akik részben technikai munkájukkal, részben tanácsaikkal, javításaikkal segítettek végighaladni az idáig vezető úton.

Végül, de nem utolsó sorban családomnak, Feleségemnek és lányaimnak köszönöm, hogy mindig bátorítottak, támogattak, megadták a lehetőséget, hogy ez a tudományos eredmény megszülethessen.