

# **Az apolipoprotein A5 gén természetes polimorfizmusainak szerepe ischémiás stroke kialakulásában**

*Ph.D. értekezés tézisei*

Maász Anita

Témavezető: Prof. Dr. Melegh Béla

Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Orvosi Genetikai Intézet



Pécs, 2010

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACE	angiotenzin konvertáló enzim
APOA5	apolipoprotein A5
AT1R	angiotenzin receptor
BMI	body mass index - testtömeg index
bp	bázispár
CT	computed tomography - komputer tomográfia
DNS	deoxiribonukleinsav
dNTP	dezinukleotidtrifoszfát
EDTA	etilén-diamin-tetra-acetát
HDL	high density lipoprotein
IMT	intima media thickness - az érfal intima media vastagsága
IRE	inzulin reszponzív elem
IVS	intronikus szekvencia
LPL	lipoprotein lipáz enzim
LPL-HSPG	lipoprotein lipáz - heparin-szulfát-proteoglikán komplex
MELAS	mitokondriális encephalopátia, laktát-acidózis, stroke-szerű epizódok
MRI	magnetic resonance imaging – mágneses rezonanciás képalkotó eljárás
MTHFR	metilén-tetrahidrofolát-reduktáz enzim
OR	odds ratio - esélyhányados
PCR	polimerase chain reaction - polimeráz láncreakció
PLA	vérlemezke glikoprotein IIb/IIIa membránreceptor
RFLP	restriction fragment length polymorphism
PPRE	peroxiszóma proliferátor reszponzív elem
SEM	standard error of mean - standard hiba
SNP	single nucleotide polymorphism
TOAST	Trial of Org 10172 of Stroke Treatment
UTR	untranslated region - nem transzlálódó régió
VLDL	very low density lipoprotein
WHO	World Health Organization – Egészségügyi Világszervezet

## 1. BEVEZETÉS

Az utóbbi évtizedben jelentős progresszió volt tapasztalható nemcsak a stroke, de más cerebro- és kardiovaszkuláris betegség háttérében álló genetikai variánsok azonosításában. Ezen variánsok vizsgálata újfajta szemléletet nyújt a betegségek patogenezisének megismerésében. Dolgozatomban a cerebrovaszkuláris betegségek közül az ischémiás stroke kialakulásában szerepet játszó, általunk vizsgált genetikai faktorokat, mint lehetséges rizikótényezőket foglalom össze. Kutatásaimban ezek közül az apolipoprotein A5 gén (APOA5) variánsainak szerepével foglalkozom. A gén által kódolt fehérje az apolipoprotein család legutóbb felfedezett tagja. Mind a gén, mind az általa kódolt fehérje - a felfedezése óta - a kutatások középpontjába került. Ennek oka a lipidparaméterekre gyakorolt hatására vezethető vissza. Tudvalevő, hogy a lipidparaméterek változása – a trigliceridszint és a koleszterinszint emelkedése – sok kardio- és cerebrovaszkuláris betegség fő rizikótényezője.

Az agyi érbetegségek magas előfordulási aránya indokolja a megkülönböztetett figyelmet, hiszen a stroke-ot a szív- és érrendszeri megbetegedések és a rosszindulatú daganatok után a harmadik leggyakoribb halálozási okként tartják számon a fejlett gazdaságú országokban. A stroke-os megbetegedések száma a jövőben egyre növekedhet a demográfiai változások, illetve a befolyásolható rizikófaktorok nem megfelelő kezelése miatt.

Számos szervezet összefogásával és a lakosság kellő felvilágosításával, odafigyeléssel azonban biztató eredményeket érhetünk el a prevencióban. Hasonló elemzések segítségével több más rizikótényező feltárása is megtörténhet, és ezáltal ezen vizsgálatok is hozzájárulhatnak a betegség primer (a rizikófaktorok elleni küzdelem) és szekunder (a stroke-ra hajlamos egyének kiszűrése, gondozása) prevenciójához.

A génekben található polimorfizmusok minden emberre jellemző mintázatot mutatnak. Mivel a különböző variánsokat sokféle betegséggel és bizonyos gyógyszerhatóanyagok lebontásának különbözőségeivel is összefüggésbe hozták, így a polimorfizmusok vizsgálatával lehetőség nyílik személyre szabott medicina kidolgozására, amely így felhívja a figyelmet a populációvizsgálatok fontosságára.

## **2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS**

### **2.1. A stroke és rizikófaktorai**

A stroke a World Health Organization meghatározása szerint „az agy körülírt területeinek hirtelen kialakuló, átmenetileg fennálló vagy kedvezőtlen esetben véglegessé váló funkciókárosodása”. Ezt a definíciót több mint húsz éve használják a klinikai gyakorlatban e rendkívül heterogén betegségecsoport leírására. A betegség mindkét nemet érintheti, bármely életkorban manifesztálódhat, bár 45 éves kor felett gyakoribb. A stroke-ot kialakulásának módja szerint két nagy csoportba sorolhatjuk: vérzéses és ischémiás stroke. Az ischémiás stroke a stroke-os megbetegedések 80%-át teszi ki. Kialakulásának leggyakoribb oka az artériák elzáródása.

Az ischémiás stroke egyes altípusainak meghatározása kétségkívül az etiológiai szempontok alapján a legproblémásabb. Az ischémiás stroke-ot a kialakulás mechanizmusa alapján három csoportra osztották: trombozisos, embóliás és hemodinamikai zavar okozta stroke. Ezen csoportosítás jobbra a képzővizsgálatokkal kapott eredményeken alapult. Ma már tudjuk, hogy ezek átfedhetnek egymással és nem feltétlenül specifikusak. Az alcsoportok pontos meghatározása azonban a későbbi kezelés és az újabb stroke megelőzése szempontjából nem elhanyagolható. Bamford és munkatársai a betegség kimenetelében és az újabb stroke kialakulásának valószínűségében jelentős eltéréseket találtak az egyes stroke alcsoportok között. 1991-ben vezettek be egy elsődlegesen klinikai szempontok alapján felépített csoportosítást (Oxford Community Stroke Project). Egy másik rendszerezés 1993-ban készült el a stroke kialakulásában résztvevő leggyakoribb patofiziológiai mechanizmusokat alapul véve (TOAST). A rendszer 5 alcsoportot különít el: 1) nagyér ateroszklerotikus, 2) kísér okklúziós, 3) kardioembóliás, 4) egyéb etiológiájú stroke-ok, 5) nem ismert etiológiájú stroke-ok.

Az ischémiás stroke kialakulásában számos rizikófaktort azonosítottak, amely a betegség heterogén voltát támasztja alá. A rizikótényezőket befolyásolható és nem befolyásolható csoportokba sorolták. A nem befolyásolható kockázati tényezők közé soroljuk az életkort, a nemet. Ide sorolható az anamnézisben szereplő korábbi stroke is, mely jelentősen megnöveli egy újabb cerebrovaszkuláris esemény bekövetkezésének valószínűségét. A befolyásolható rizikótényezők közé a magas vérnyomás, a diabetes mellitus, az obesitas, kardiovaszkuláris betegségek megléte, magas triglicerid- és koleszterinszint, dohányzás, túlzott alkoholfogyasztás tartoznak. Az itt említett rizikófaktorok a betegség kialakulására nézve egyértelmű kockázati tényezőnek bizonyultak, míg ezeken kívül manapság további lehetséges rizikótényezők, például számos, a genomban található természetes variáns - mint lehetséges hajlamosító faktor - vizsgálata kerül az állatkísérletes és epidemiológiai tanulmányok középpontjába.

Az ischémiás stroke etiológiáját tekintve multifaktoriális betegség, több monogénes betegség állhat a háttérben, ugyanakkor maga a stroke is részét képezheti más multisztémás betegségnek

(MELAS-szindróma). A stroke kialakulásának esélyét akár egy gén egy polimorfizmusa is növelheti. De egy gén több polimorfizmusának vagy több gén polimorfizmusainak együttes előfordulása is többszörösére emelheti a stroke kialakulásának kockázatát, amelyet egyéb környezeti rizikótényezőkkel való interakció is befolyásolhat. Az ischémiás stroke háttérében eddig számos gént és génvariánst azonosítottak. Ezek közül a renin-angiotenzin rendszerben és a nitrogén-oxid produkcióban szerepet játszó enzimeket kódoló gének, illetve a hemosztázist, a homocisztein- és a lipid metabolizmust befolyásoló gének polimorfizmusait foglalom össze az 1. táblázatban a teljesség igénye nélkül.

**1. táblázat**  
**Az ischémiás stroke kialakulásának háttérében azonosított gének és polimorfizmusaik**

Gének	Polimorfizmusok
<i>hemosztázis</i>	
II. faktor (prothrombin) (OMIM+176930)	G20210A
V. faktor (Leiden) (OMIM*612309)	Arg506Gln
VII. faktor (OMIM+227500)	Arg353Gln
XIII. faktor (OMIM+134570)	Val34Leu
fibrinogen (OMIM*134830)	G-455A
<i>renin-angiotenzin rendszer</i>	
ACE (OMIM+106180)	I/D
AT1R (OMIM*106165)	A1166C
<i>nitrogén-oxid-szintáz rendszer</i>	
eNOS (OMIM+163729)	Glu298Asp
<i>homocisztein metabolizmus</i>	
MTHFR (OMIM*607093)	C677T A1298C
<i>lipidmetabolizmus</i>	
APOAI (OMIM*107680)	C-3031T 317-321ins
APOE (OMIM +107741)	ε4, ε3, ε2
APOCIII (OMIM*107720)	T-2854G, C-455T C-482T, C3238G
LPL (OMIM*609708)	Asn291Ser

Rövidítések: ACE: angiotenzin konvertáló enzimet kódoló gén; APOAI; -E; CIII: apolipoprotein AI; -E; -CIII fehérjét kódoló gének; Arg: arginin; Asn: aszparagin; AT1R: angiotenzin receptort kódoló gén; eNOS: endotheliális nitrogén-oxid szintáz enzimet kódoló gén; Gln: glutamin; Leu: leucin; LPL: lipoprotein-lipáz enzimet kódoló gén; MTHFR: metilén-tetrahidrofolát reduktáz enzimet kódoló gén

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

## 2.2. Az apolipoprotein A5 fehérje szerepe a lipid metabolizmusban

A lipidek meghatározó szerepet játszanak a sejtmembrán felépítésében (koleszterin) és az energiaraktározásban (triglicerid). Szállításuk elkülönült kompartmentek, ún. lipoproteinek révén valósul meg. A lipoproteinek foszfolipidekből és fehérjékből (apoproteinek) állnak. A lipoproteinek felszínén található apoproteinek strukturális és katalitikus funkciót töltenek be. Aktiválhatják, vagy gátolhatják a lipoproteinek metabolizmusában résztvevő enzimeket, illetve jelként funkcionálhatnak a máj és egyéb sejtek receptorai számára. Eddig megismert apoproteinek: AI, AII, AIV, B48, B100, CI-III, E. A fehérjecsald legutóbb felfedezett tagja az APOA5. A fehérjét kódoló gén a 11q23 kromozómán található, az APOA1/C3/A4 génklasztertől 3' irányban, 27 kilobázis távolságra az APOA4 géntől, amellyel 27%-os szekvencia-homológiát mutat. Számos tanulmány állásfoglalása szerint a géncsalád tagjai génduplikáció révén keletkeztek, bár a pontos mechanizmus, amely a génklaszter mai formáját kialakította, még nem ismert. Az APOA5 gén 366 aminosavat kódol, alternatív poliadeniláció eredményeként két transzkriptum keletkezik (1,3 és 1,9 kb hosszúságú), amelyeknek a funkcionális vonatkozásai még nem ismertek. A fehérje a májban expresszálódik, molekulásúlya 39 kDa, struktúrája 76%-ban  $\alpha$ -helikális (nagyobb fokú affinitást feltételez lipidfelületekhez), a coiled-coil elemei két domént formálnak, N-terminális régiója nagyfokú homológiát mutat más apolipoprotein doménnel. Koncentrációja a májban magas, HDL-hez és VLDL-hez kötöten exportálódik a plazmába, ahol a koncentrációja rendkívül alacsony lesz: 0,1-0,4  $\mu\text{g/ml}$ .

Az APOA5 fehérje a triglicerid metabolizmusának szabályozója. A fehérjét VLDL és HDL partikulumokon találták meg, ezek között transzportálódik a metabolizmus során. Egyes vizsgálatok alapján az APOA5 a kilomikronok és a VLDL katabolizmusát segíti elő, de a bél kilomikron és a máj VLDL termelését nem befolyásolja. A plazma trigliceridek hidrolízise révén hozzájárul a triglicerid-gazdag lipoproteinek eltávolításához. A pontos mechanizmus, amelyen keresztül az APOA5 a lipidszintet csökkentheti, még nem ismert. Egyes *in vitro* vizsgálatok direkt, mások indirekt kapcsolatot feltételeznek az APOA5 fehérje és a LPL között. Egyik feltételezés szerint az APOA5 a proteoglikánokhoz kötött LPL aktiválásával, mások szerint a lipoprotein-lipáz - heparin-szulfát-proteoglikán (LPL-HSPG) komplex stabilizálása révén fejt ki hatását. Nem kizárt azonban, hogy az APOA5 más apolipoproteinek (APOCIII) funkcióját módosítva csökkenti a trigliceridszintet.

Az APOA5 gén polimorf természetű, felfedezése óta közel 40 polimorfizmust (SNP) azonosítottak már a szekvenciájában. Ezek közül azonban csak néhánynak ismerjük a klinikai vonatkozásait. A strukturális változásokat okozó variánsok közül elsőként a C442T (Q148X) mutációt találták meg egy 9 éves fiúban, homozigóta formában. A fehérje a mutáció hatására elveszítette a teljes lipidkötő hidrofób, illetve a heparin-kötő régióját is, így a protein funkciója károsodást szenvedhetett. Az APOA5 gén egy másik, Q139X mutációját heterozigóta formában azonosították. A mutáció hatására egy

15 kDa molekulású csonka fehérje képződik, amely nem rendelkezik lipidkötő doménnel. A feltételezések szerint a mutáció következtében a fehérje nem tudja a LPL-HSPG komplex stabilitását biztosítani, így a plazmában trigliceridszint-emelkedés figyelhető meg. Később egy további ritka, strukturális változást okozó mutációt (IVS3+G3C) találtak heterozigóta formában. A mutáció a 3. intron donor splice site-ját érinti, a 3. exon kivágódását okozza, amelynek következtében egy 18 aminosavból álló fehérje expresszálódik.

Az APOA5 gén felfedezésekor 4 gyakori polimorfizmust azonosítottak, amelyek mindegyike emelkedett trigliceridszinttel társult. Azóta ezek számtalan tanulmány vizsgálati tárgyát képezték: a T-1131C a promóter régióban; a T1259C a 3' nem transzlálódó régióban; a C56G a 3. exonban és az IVS3+G476A pedig a 3. intronban található. Elhelyezkedése miatt közvetlen funkcionális következménye csak a C56G variánsnak van, a 19-es kodonban szerin - triptofán aminosavcsereét 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. A 19-es pozícióban bekövetkező aminosavcsere során egy nagyobb aminosav épül be, így az közvetlen hatással lehet az export folyamatra, az APOA5 plazmabeli koncentrációja csökkenhet, magasabb plazma trigliceridszintet eredményezve.

### **3. CÉLKITŰZÉSEK**

Az ischémiás stroke-ban szenvedő betegeken végzett vizsgálatainkkal a következő céljaink voltak:

1. a nemzetközi szakirodalomban más betegségek, mint például a metabolikus szindróma, a hipertrigliceridémia és az ischémiás szívbetegség kialakulásával összefüggésbe hozott, az apolipoprotein A5 gén gyakori természetes variánsai (T-1131C, C56G, IVS3+G476A és T1259C) alléleloszlásának vizsgálata a TOAST osztályozáshoz hasonlóan három alcsoportra osztott stroke-os betegpopulációban.

2. az APOA5 gén -1131C, 56G, IVS3+476A és 1259C alléljeinek a betegek és az egészséges kontrollok triglicerid- és koleszterinértékeire gyakorolt hatásának vizsgálata.

3. az APOA5 génben található négy variáns minor alléljeinek ischémiás stroke kialakulásában betöltött esetleges hajlamosító, kockázati szerepének felderítése.

## 4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. A vizsgálatban résztvevő személyek

A vizsgálatainkba bevont beteg és kontroll egyének intézetünk biobankjában található mintákból kerültek ki, amely az országos biobank részét képezi ([www.biobank.hu](http://www.biobank.hu)). A mintagyűjtésnél a helyi etikai bizottság és az 1975-ben készített Helsinki Nyilatkozat útmutatásai és szabályzata alapján jártunk el. A vizsgálatokba bevont betegek mindegyike beleegyezését adta mintájának biobankban történő elhelyezéséhez és a genetikai minta kutatási célú felhasználásához.

A vérminták biobankba történő gyűjtése 2001 óta folyik a gyulai Pándy Kálmán Kórház Agyérbetegségek Osztálya segítségével. A betegek mindegyike akutan kialakuló ischémiás stroke-ban szenvedett, vagy korábban diagnosztizált stroke miatt került a szakrendelőbe. Minden beteg részletes klinikai vizsgálaton esett át, amely magában foglalta a családi anamnézis felvételét, esetleges rizikófaktorok felmérését, teljeskörű fizikális, neurológiai, laboratóriumi és elektrokardiográfiás vizsgálatokat, az agyat ellátó erek extra- és transzkraniális Doppler-sonográfiás vizsgálatát. A tünetek kialakulását követő két napon belül mágneses rezonanciás képalkotó eljárással történt az érintett terület pontos feltérképezése. Az ilyen módon készített dokumentációt egy, a betegek klinikai és laboratóriumi adatait nem ismerő szakember értékelt ki. A nem megfelelően értékelhető MRI felvételekkel, vagy hiányos klinikai paraméterekkel rendelkező, illetve a vizsgálat időtartama alatt exitált betegeket kizártuk a tanulmányból. A betegeket, részletes neurológiai és MRI vizsgálat után, három stroke alcsoportba soroltuk, amely csoportok alapvetően a TOAST-ban szereplő csoportoknak felelnek meg. Az első csoportba (nagyér betegek) azok az egyének kerültek, akiknek nagyér infarktusuk volt, vagyis az MRI felvételeiken legalább 1,5 cm átmérőjű kortikális vagy cerebelláris léziók, és/vagy agytörzsi infarktusok, vagy féloldali szubkortikális infarktusok voltak megfigyelhetők. A második csoportot (kísér betegek) azok az egyének képezték, akiknél az MRI felvételek kísér elzáródást igazoltak, illetve a felvételeken 1,5 cm átmérőnél kisebb szubkortikális féloldali vagy agytörzsi infarktus volt látható. A harmadik csoportba (kevert) minden olyan beteget besoroltunk, akiknél a TOAST csoportosítás szerint kardioembólia, egyéb etiológia vagy nem tisztázott etiológia miatt kialakult stroke volt kimutatható, MRI felvételeiken egy vagy több lakunáris és nagyér infarktus volt látható. A betegek ilyenén egy csoportba rendezésére, az általunk képezett csoportokban található statisztikai szempontból kis esetszámok miatt volt szükség.

A vizsgálatban részt vevő kontroll egyének anamnézisében nem volt fellelhető stroke esemény, illetve MRI és CT felvételein neurológiai elváltozás nem volt látható. A beteg egyénekhez korban illeszkedő, egészséges személyeket véletlenszerűen választottuk ki a tanulmányhoz.

### 4.2. Alkalmazott módszerek

#### 4.2.1. Polimeráz láncreakció (PCR)

A munkánk során alkalmazott genomi DNS mintát alvadásgátolt perifériás vér fehérvérsejtjeiből nyertük rutin kisozásos módszerrel. A rendelkezésünkre álló DNS mintákból a vizsgálni kívánt szakaszokat általunk tervezett polimeráz láncreakcióval amplifikáltuk fel. A módszer tervezéséhez az AY422949 azonosítójú szekvenciát alkalmaztuk. A reakcióelegyet minden vizsgálatunknál 50 µl



végterfogatra állítottuk össze, melyhez 200  $\mu$ M dNTP oldatot, 1 U Taq polimeráz enzimet (10 U/ $\mu$ l), 5  $\mu$ l puffer oldatot (500 mM KCl, 14 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl; pH 9,0), 0,2 mM megfelelő primerpárt és 1  $\mu$ g DNS templátot használtunk. A vizsgálatokhoz alkalmazott primerek szekvenciáit és a PCR reakciók körülményeit a 2. táblázat foglalja össze.

#### **4.2.2. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) módszer**

A restrikciós endonukleázokkal történő hasításhoz 10-15  $\mu$ l PCR terméket használtunk fel. A reakcióhoz minden esetben 1 U megfelelő restrikciós endonukleázt, 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.

#### **4.3. 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. A kapott szekvenciák referencia-szekvenciával történő összehasonlítását a Winstar genetikai programcsomaggal végeztük.

#### **4.4. 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  $\chi^2$  tesztet alkalmaztunk. Normál eloszlású, folytonos változónál 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.

**2. táblázat**  
**Az általunk vizsgált polimorfizmusok PCR-RFLP körülményei**

Polimorfizmus	Az alkalmazott primerek szekvenciája	Amplifikátum hossza (bp)	A restrikciós enzim		A keletkezett fragmentek az egyes genotípusok esetén (bp)
			Neve	Felismerési és hasítási helye	
APOA5					
T-1131C (rs662799)	f: 5'-CCCCAGGAACTGGAGCGACCTT-3' r: 5'-TTCAAGCAGAGGGAAGCCTGTA-3'	398	<i>MseI</i>	5'-T <sup>^</sup> TAA-3' 3'-AAT <sup>^</sup> T-5'	homozigóta normál (TT): 22, 109, 267 heterozigóta (TC): 22, 109, 267, 289 homozigóta mutáns (CC): 109, 289
T1259C (rs2266788)	f: 5'-TCAGTCCTTGAAAGTGGCCT-3' r: 5'-ATGTAGTGGCACAGGCTTCC-3'	287	<i>BseGI</i>	5'-GGATGNN <sup>^</sup> -3' 3'-CCTAC <sup>^</sup> NN-5'	homozigóta normál (TT): 122, 165 heterozigóta (TC): 35, 87, 122, 165 homozigóta mutáns (CC): 35, 87, 165
C56G (rs3135506)	f: 5'-AGAGCTAGCACCGCTCCTTT-3' r: 5'-TAGTCCCTCTCCACAGCGTT-3'	256	<i>Cfr13I</i>	5'-G <sup>^</sup> GNCC-3' 3'-CCNG <sup>^</sup> G-5'	homozigóta normál (CC): 79, 177 heterozigóta (CG): 26, 79, 151, 177 homozigóta mutáns (GG): 26, 79, 151
IVS3+G476A (rs2072560)	f: 5'-CTCAAGGCTGTCTTCAG-3' r: 5'-CCTTTGATTCTGGGGACTGG-3'	280	<i>MnlII</i>	5'-CCTC(N) <sub>7</sub> <sup>^</sup> -3' 3'-GGAG(N) <sub>6</sub> <sup>^</sup> -5'	homozigóta normál (GG): 25, 114, 141 heterozigóta (GA): 25, 41, 73, 114, 141 homozigóta mutáns (AA): 25, 41, 73, 141

## 5. AZ EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

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

Az APOA5 gén természetes variánsai közül a legtöbbet vizsgált eltérés a gén promóter régióját érintő T-1131C tranzíció. Ezt a variánst az egészséges európai populáció 6%-ában találták meg. Az ázsiai populációk közül a japán populációban 35%-os, a kínai populációban 29%-os, az indiai populációban pedig 20%-os gyakoriságot mutatott. Tanulmányunkban a variáns vizsgálata során az eddig európai populációra leírt eredményeknek megfelelő 5%-os allélfrekvenciát találtunk az egészséges populációt reprezentáló kontroll csoportban, amelyet a 4. táblázat szemléltet. Ezen kívül megállapítottuk, hogy az APOA5 -1131C allél legalább kétszer gyakrabban fordult elő a stroke-os alcsoportokban és az összes stroke-os betegben, mint a kontroll csoportban. Az alléleloszlás minden csoportban megfelelt a Hardy-Weinberg egyensúlynak.

A plazma lipidszintek fontos szerepet töltenek be a kardio- és cerebrovaszkuláris betegségek kialakulásában. A trigliceridszint 1 mmol/l-es emelkedése férfiakban 14%-kal, nőkben 37%-kal emeli a kockázatot koronária-betegség kialakulására. A lipidek pontos szerepe azonban még vitatott. Az ellentmondásokat magyarázhatja a vizsgált populációk heterogén volta, illetve, hogy a trigliceridszintet számos genetikai tényező befolyásolja. Vizsgálatunk során a beteg és kontroll csoport triglicerid és összkoleszterin profilját tanulmányoztuk a -1131C genotípusok megoszlásában, eredményeinket az 5. táblázatban foglaltuk össze. Mind a beteg-, mind a kontroll csoportban szignifikánsan emelkedett trigliceridszintet találtunk a -1131C allélt homo- vagy heterozigóta formában hordozó egyének alcsoportjában azokhoz képest, akik nem hordozták a mutációt. A koleszterinértékekben ilyen eltéréseket nem tapasztaltunk a hordozó - nem hordozó csoportokat összehasonlítva.

A -1131C allél lipidparaméterekre gyakorolt hatását számos kutatócsoport vizsgálta mind felnőttekben, mind gyermekekben. Eredményeik a trigliceridszint tekintetében egységesek és eredményeinkkel megegyeznek: a mutáns allél a vizsgált populációktól függetlenül emeli a trigliceridszintet. A -1131C allél triglicerid-emelő hatásának hátterében álló pontos folyamat még nem ismert. Több hipotézis is felmerült a hatásmechanizmus megismerése során. Az egyik feltételezés szerint a promóter régiót érintő eltérés a gén transzkripciójára gyakorolhat hatást. Talmud és munkatársai sejtvonalakon végzett kísérleteik során a -1131C allél transzkripciót és translációt befolyásoló hatását nem tudták bizonyítani. Vu-Dac és munkatársai bioinformatikai módszerekkel sok más szabályozó szekvencia között egy peroxiszóma proliferátor reszponzív elemet (PPRE) azonosítottak ebben a promóter régióban (-272, -260), amely az APOA5 gén expressziójának szabályozásához szükséges. A -1131C allél a feltételezések értelmében megváltoztathatja az affinitást, illetve a kötődést ehhez vagy más hasonló szabályozó régiókhoz, csökkentve ezzel az APOA5 gén expresszióját, így emelve a trigliceridszintet.

Egyéb feltételezések szerint a -1131C más funkcionális variánsokkal erős kapcsoltságban van, így ezen a kapcsolaton keresztül fejtheti ki hatását a trigliceridszintre. Ilyen komplett kapcsoltságot az APOA5 T-1131C és A-3G variánsok között találtak. Ez a variáns a Kozak konszenzus szekvenciában (GACACCATGG), a feltételezett start kodontól 3 bp távolságra van 5' irányban. Az ebben a pozícióban történt báziscsere az APOA5 mRNS transláció csökkenését, alacsonyabb plazma APOA5 szintet, és ezáltal emelkedett trigliceridszintet von maga után.

A T-1131C nemcsak az APOA5 gén variánsaival állhat kapcsoltságban, hanem az apolipoprotein génklaszter - APOA5 génhez közel lokalizálódó - többi tagjának variánsaival is. Erős kapcsoltságot mutattak ki az általunk vizsgált variáns és az APOCIII gén C-482T vagy C-455T variánsai között. Az APOCIII gén promóter régiójában egy inzulin reszponzív elemet (IRE) azonosítottak, amely az APOCIII gén inzulin által történő szabályozásának kulcseleme. A gén promóter régiójában bekövetkezett mutációk ezt a fontos szabályozó régiót megváltoztatják, amelynek következtében megszűnik az inzulin APOCIII-ra kifejtett *in vitro* repressziója, így emelkedik az APOCIII szintje, amely a trigliceridszint szükségszerű emelkedésével jár. A T-1131C variáns a feltételezések szerint ezen a kapcsoltságon keresztül fejtheti ki hatását, azonban ez nem kizárólagosan ezen a mechanizmuson keresztül valósulhat meg.

Az APOA5 T-1131C variánsát, felfedezése óta, különböző populációkban, számos betegcsoportban vizsgálták. Familiáris hiperlipidemiában és hipertrigliceridemiában szenvedő holland, brit, spanyol és ír populációkból származó betegekben egyértelmű hajlamosító tényezőként azonosították a betegség kialakulására. A T-1131C variáns metabolikus szindrómában betöltött szerepét magyar és japán betegcsoportokban vizsgálták, mindkét kutatócsoport hajlamosító tényezőnek találta a T-1131C variánst. Egy nemzetközi kooperáció (Framingham Heart Study) kritériumai szerint kardiovaszkuláris betegségben szenvedő egyéneken elvégzett genotipizálás és statisztikai vizsgálat a -1131C allél hordozását a betegség kockázati tényezőjeként definiálja, ugyanakkor koronáriabetegségben betöltött szerepe még vitatott. Magyar és kínai betegcsoportban a mutáns allél hordozása emelkedett rizikót jelentett, ezzel ellentétben tunéziai és olasz betegcsoportokban ezt nem tudták kimutatni.

A kapott eredmények arra ösztönöztek minket, hogy a T-1131C variáns hajlamosító szerepét vizsgáljuk stroke-ban szenvedő betegekben, annál is inkább, mert az APOA5 variáns szerepét ebben a betegcsoportban még nem vizsgálták. A vizsgálatunk során logisztikus regressziós analízis segítségével kapott esélyhányadosokat (odds ratio, OR) a 6. táblázatban tüntettük fel. Az OR értékeket minden esetben a csoportok között fennálló - kor, nem, body mass index (BMI), szérum összkoleszterinszint, magas vérnyomás, ischémiás szívbetegség, diabetes mellitus, dohányzás és alkoholfogyasztásbeli - különbségekkel korrigáltuk. Az analízissel bizonyítani tudtuk, hogy a C allél hordozása minden csoportban magasabb rizikót jelent a betegség kialakulására. Az APOA5 T-1131C

valószínűleg a fejezet elején leírtak alapján kóros szintre emelheti a trigliceridértékeket, ami endothel dysfunctionhoz, az endotheliális sejtekben történő abnormális lipidlerakódáshoz, ateroszklerotikus plakkok kialakulásához vezethet; az érrendszer különböző pontjain elzáródásokat okozhat, ami ischémiás stroke kialakulását idézheti elő.

### 3. táblázat

#### A T-1131C vizsgálatában részt vevő betegek és kontrollok klinikai és laboratóriumi paraméterei

T-1131C	Stroke-os betegcsoport			Kontroll (n=289)
	Nagyér (n=149)	Kisér (n=85)	Kevert (n=68)	
Nem (férfi/nő)	70/79	40/45	32/36	132/157
Életkor (év)	62,5 ± 10,1*	65,3 ± 11,6*	60,2 ± 15,1*	54,6 ± 13,3
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25,8 ± 2,13*	26,7 ± 3,22*	25,9 ± 3,83*	23,0 ± 2,74
Összkoleszterin (mmol/l)	6,43 ± 1,76*	6,64 ± 2,43*	6,89 ± 1,74*	4,89 ± 0,74
Triglicerid (mmol/l)	1,82 ± 0,53*	1,72 ± 0,63*	2,34 ± 0,79*	1,29 ± 0,64
Magas vérnyomás	47,0%*	55,3%*	55,9%*	13,8%
Diabetes mellitus	32,9%*	43,5%*	29,4%*	5,88%
Dohányzás	28,9%*	31,8%*	33,8%*	13,8%
Alkoholfogyasztás	20,1%*	21,2%*	17,6%*	4,84%
Ischémiás szívbetege	17,5%*	16,5%*	19,1%*	5,88%

Az értékek átlag ± SEM-ként szerepelnek, \*p<0,05

### 4. táblázat

#### A T-1131C allélek eloszlása a beteg és kontroll csoportokban

T-1131C	Stroke-os betegcsoport				Kontroll csoport n=289
	Nagyér n=149	Kisér n=85	Kevert n=68	Összes beteg n=302	
TT	117 (78,5%)	67 (78,8%)	53 (77,9%)	237 (78,5%)	261 (90,3%)
TC+CC	30+2 (21,5%)	16+2 (21,2%)	14+1 (22,1%)	60+5 (21,5%)	28 (9,7%)
C allél frekvencia	11%*	12%*	12%*	12%*	5%

\*p<0,05 vs. kontroll csoport

### 5. táblázat

#### A lipidparaméterek alakulása a T-1131C genotípusok tükrében a vizsgált csoportokban

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*
Összkoleszterin (mmol/l)	6,61 ± 1,67	6,52 ± 1,89	5,03 ± 1,78	4,89 ± 1,56

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

### 6. táblázat

#### A -1131C allélvariáns vizsgálata logisztikus regressziós analízissel

T-1131C	Nagyér n=149	Kisér n=85	Kevert n=68	Stroke-os betegcsoport n=302
Korrigált OR érték <sup>#</sup>	1,9* (1,1-5,9)	2,3* (1,3-4,9)	2,2* (1,2-5,1)	2,1* (1,3-4,7)

\*p<0.05 vs. controls; <sup>#</sup>Kor, nem, BMI, szérum összkoleszterin, ischémiás szívbetegség, magas vérnyomás, diabetes mellitus, dohányzás-, és alkoholfogyasztási szokásokban fennálló különbségekre korrigálva.

#### 5.2. Az APOA5 gén C56G variánsának szerepe

Az APOA5 gén második leggyakrabban vizsgált természetes variánsa a gén harmadik exonjának 56-os nukleotid-pozíciójában található C/G tranzíció. A báziscsere a 19-es aminosavat (Ser) érinti a protein szekvenciájában. Helyette a mutáns allél egy triptofánt (Trp) kódol. Az 56G allél populációnként eltérő előfordulást mutat. A kínai és japán populációkban rendkívül alacsony arányban fordul elő (<0,1%), az indiai populáció 3%-ában található meg, afro-amerikai és francia populációkban 4,8%, spanyol populációban ~15% az előfordulási aránya. Vizsgálatainkban az európai populációkra általában jellemző, 5,6%-os mutáns allélfrekvenciát találtunk az egészséges kontroll egyénekben. A vizsgált allélek egyes csoportokban talált eloszlását a 8. táblázat szemlélteti. Az alléleloszlás minden csoportban megfelelt a Hardy-Weinberg egyensúlynak. A vizsgált pozícióban található mutáns G allél (56G) előfordulása a nagyér stroke-os alcsoportban bizonyult kétszer gyakoribbnak, a kontroll csoporthoz viszonyítva. A vizsgálati eredmény ebben az esetben is statisztikailag szignifikáns volt. A kisér infarktuszos és kevert etiológiájú stroke alcsoportokban a mutáns G allél halmozott előfordulása nem volt kimutatható.

Tanulmányunkban lehetőségünk nyílt a C56G variáns lipidparaméterekre gyakorolt hatásának vizsgálatára. A mutáns allélt homo-, vagy heterozigóta formában hordozók körében mindhárom betegcsoportban emelkedett triglicerid átlagértékeket találtunk a normál allélt hordozókhöz viszonyítva. A koleszterin értékekben ilyen eltéréseket nem tapasztaltunk a hordozó - nem hordozó csoportokat összehasonlítva. A betegek és a kontroll csoport triglicerid és összkoleszterin értékeinek alakulását a C56G genotípusok megoszlásának függvényében a 9. táblázat foglalja össze. Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy ennek a variánsnak a hordozása 16-28%-os trigliceridszint-emelkedéssel jár, amely eredmény jól illeszkedik más kutatócsoportok által leírtakhoz. Talmud és munkatársai 8-16%-os emelkedést tapasztaltak egy kaukázusi populációban 56G allél jelenlétekor. Török populációban pedig 18-26%-os volt az emelkedés mértéke a mutáns allél hatására.

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

Természetesen az sem zárható ki, hogy a C56G variáns esetleg más polimorfizmusokkal együtt, egymás hatását felerősítve játszik szerepet betegségek kialakulásában. Schaefer és munkatársai 170 hipertrigliceridemiás beteg vizsgálata során a betegek APOE és APOA5 C56G genotípusát határozták meg. Az APOE 2/2 genotípussal rendelkező betegek majdnem mindannyian hordozták az 56G allélt is. Normál lipidparaméterekkel rendelkező egyénekben azonban ezek együttesen nem voltak kimutathatók. Hipotézisük szerint, a C56G kofaktorként működve vezet hypertrigliceridemia kialakulásához. Ezt azonban nagyobb populációkban végzett vizsgálatokkal eddig még nem támasztották alá.

Az APOA5 C56G variánst trigliceridszintre gyakorolt drasztikus hatásai miatt számos betegcsoportban vizsgálták. A populációvizsgálatok eredményei alapján hordozása myocardialis infarktus, koronária betegség, metabolikus szindróma kialakulására jelent magasabb kockázatot. Talmud és munkatársai a mutáns allél jelenlétében gyorsabb aterogenezist mutattak ki. Az érfal intima-media vastagságának (IMT) meghatározása széles körben elterjedt módszer a vaszkuláris elzáródások mértékének megállapítására. Egyes tanulmányok szerint az IMT egyenes arányban áll a stroke vagy myocardialis infarktus kialakulásának valószínűségével. Logisztikus regressziós analízisünk segítségével kapott esélyhányadosokat (OR) minden esetben a kor, a nem, a BMI, a szérum összkoleszterinszint, a magas vérnyomás, az ischémiás szívbetegség, a diabetes mellitus, a dohányzás és az alkoholfogyasztás

csoporthoz fennálló különbségeivel is korrigáltuk (10. táblázat). A táblázatok alapján elmondható, hogy az APOA5 génben található mutáns 56G allél hordozása a nagyér infarktuszos betegekben nagyobb előfordulást mutatott, mint más csoportokban. Az 56G allél hordozása - a logisztikus regressziós vizsgálat eredménye szerint is - kizárólag a nagyér etiológiájú stroke kialakulására jelent nagyobb hajlamosítást, egyértelmű rizikót. Megléte kísér és egyéb etiológiájú stroke-ok kialakulását nem befolyásolja. Alátámasztják megfigyelésünket a Framingham-tanulmány résztvevői körében elvégzett vizsgálatok eredményei, melyek alapján a C56G variánst nagyobb arteria carotis communis IMT-vel hozták összefüggésbe.

**7. táblázat**  
**A csoportok klinikai és laboratóriumi paraméterei a C56G variáns esetében**

C56G	Stroke-os betegcsoport			Kontroll csoport (n=171)
	Nagyér (n=124)	Kísér (n=180)	Kevert (n=99)	
Nem (férfi/nő)	46/78	70/110	43/56	58/113
Kor (év)	65, ± 1,28	66,7 ± 1,14	64,7 ± 1,44	57,7 ± 1,33
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25,0 ± 0,22	25,5 ± 0,14	24,7 ± 0,16	24,5 ± 0,22
Triglicerid (mmol/l)	1,75 ± 0,06*	1,77 ± 0,05*	1,70 ± 0,07*	1,55 ± 0,04
Összkoleszterin (mmol/l)	5,81 ± 0,11*	5,74 ± 0,09*	5,67 ± 0,11*	5,20 ± 0,08

#p<0.001 vs. Kontroll csoport; \*p<0,05 vs. kontroll csoport

**8. táblázat**  
**A C56G allélek eloszlása a beteg és kontroll csoportokban**

C56G	Stroke-os betegcsoport			Kontroll csoport (n=171)
	Nagyér (n=124)	Kísér (n=180)	Kevert (n=99)	
CC	98 (79,0%)	163 (90,6%)	84 (84,9%)	153 (89,5%)
CG+GG	25+1 (21,0%)*	16+1 (9,44%)*	14+1 (15,1%)*	17+1 (10,5%)*
G allél frekvencia	10,9*	5	8,1	5,6

\*p<0.05 vs. kontroll csoport



**9. táblázat**  
**A egyes csoportok lipidparamétereinek alakulása a C56G genotípusok hatására**

C56G	Stroke-os betegcsoport						Kontroll csoport (n=171)	
	Nagyér (n=124)		Kisér (n=180)		Kevert (n=99)		CC (n=153)	CG+GG (n=18)
	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*	1,56 ± 0,05	1,71 ± 0,19*
Összkoleszterin (mmol/l)	5,79 ± 0,12	5,92 ± 0,28	5,79 ± 0,09	5,30 ± 0,26	5,65 ± 0,12	5,80 ± 0,25	5,18 ± 0,08	5,35 ± 0,22

\*p<0,05 vs. nem hordozó egyének (CC)

**10. táblázat**  
**Az 56G variáns logisztikus regressziós vizsgálata stroke kialakulásában**

C56G	Stroke-os betegcsoport		
	Nagyér (n=124)	Kisér (n=180)	Kevert (n=99)
OR	2,122* (1,258-3,580) p=0,005	0,615 (0,348-1,089) p=0,095	1,250 (0,678-2,304) p=0,474
<sup>#</sup> Korrigált OR	2,132* (1,184-3,840) p=0,012	0,650 (0,334-1,263) p=0,203	1,315 (0,676-2,558) p=0,421

\*p<0,05 vs. controls; <sup>#</sup>Kor, nem, BMI, szérum összkoleszterin, ischémiás szívbetegség, magas vérnyomás, diabetes mellitus, dohányzás-, és alkoholfogyasztási szokásokban fennálló különbségekre korrigálva.

### 5.3. Az APOA5 gén T1259C és IVS3+G476A variánsai szerepének vizsgálata

Az APOA5 gén intronikus és 3'-nem transzlálódó régióját (3'-UTR) érintő variánsokról az előzőekben felsorolt két variánshoz viszonyítva csekély ismeretanyaggal rendelkezünk. Vizsgálataink során az IVS3+G476A variáns esetében a mutáns allél (A) nagyobb gyakorisággal volt megtalálható a betegcsoportban, mint a kontroll csoportban. A T1259C variáns esetében nem volt szignifikáns eltérés az allélek eloszlásában sem a kontroll, sem a betegcsoportban. (12. táblázat)

A triglicerid-és koleszterinszintekre irányuló vizsgálatainkból és más, európai populációkon végzett tanulmányokból is világosan látszik, hogy a 1259C vagy IVS3+476A alléleket hordozók trigliceridszintje minden csoportban szignifikáns emelkedést mutatott a mutációt nem hordozókkal szemben (13. táblázat). Egy vizsgált costa ricai populációban azonban nem találtak triglicerid-emelkedést a mutáns allél hordozásakor. A mechanizmus, amelyen keresztül ezen allélek befolyásolják a trigliceridszintet, még ismeretlen; a feltételezések szerint más variánsokkal való szoros kapcsoltság játszhat szerepet ebben. Európai populációkban teljes kapcsoltságot állapítottak meg az APOA5 variánsai között. A costa ricai populációban a kapcsoltság csak részleges volt, ami magyarázatot szolgáltat arra, miért nem találtak összefüggést a mutáns allélek és emelkedett trigliceridszint között.

Logisztikus regressziós analízissel kapott esélyhányadosokat elemezve azonban azt mondhatjuk, hogy a T1259C variáns trigliceridszint-emelő hatása ellenére a mutáns C allél hordozása nem tekinthető hajlamosító tényezőnek ischémiás stroke kialakulására. Ezzel ellentétben az IVS3+G476A eltérés hordozása mind önmagában, mind egyéb tényezőkkel együttesen 3-4-szeresére emelheti stroke kialakulásának esélyét (14. táblázat). A pontos mechanizmus megértése érdekében azonban további haplotípus-vizsgálatokra van szükség, amely segítségével az egyes SNP-ek együttes előfordulása és hatása tanulmányozható.

### 5.4. Az APOA5 gén leggyakoribb haplotípusainak lehetséges szerepe

Pennacchio és munkatársai az APOA5 gén természetes variánsainak tanulmányozása során erős kapcsoltságot igazoltak a leggyakoribb variánsok között, amelyek így két fő haplotípust determinálnak: APOA5\*2 (-1131C, 1259C, IVS3+476A) és APOA5\*3 (56G). A két haplotípus a vad típusú haplotípussal (APOA5\*1: -1131T, 1259T, IVS3+476G, 56C) együtt a populáció ~98%-át lefedi. A fennmaradó ~2%-ba ritka haplotípusok, mint APOA5\*4 (-1131C) és APOA5\*5 (1259C), tartoznak.

A haplotípus variánsok vizsgálatához és szerepének statisztikai elemzéséhez az általunk vizsgált beteganyag nem elég nagy méretű. A haplotípus-analízis jelen értekezésnek nem témája, azonban előzetes értékeléseink alapján elmondható, hogy az APOA5\*2 haplotípus hordozása szignifikáns trigliceridszint-emelkedést okoz és az összes stroke-alcsoportban hajlamosító tényezőnek bizonyult a betegség kialakulására nézve, amely eredmény alátámasztja más kutatócsoportok ezirányú megfigyeléseit.

Terveink szerint további minták gyűjtésével és vizsgálatával az APOA5 gén természetes variánsai által determinált összes haplocsoport megoszlását, lipidparaméterekre gyakorolt hatását és a stroke kialakulásában betöltött szerepét a későbbiekben vizsgálni tudjuk.

**11. táblázat**  
**A T1259C és IVS3+G476A variánsok vizsgálatába bevont betegek és kontrollok klinikai és laboratóriumi paraméterei**

	Stroke-os betegcsoport				Kontroll csoport n=131
	Nagyér n=122	Kisér n=176	Kevert n=80	Összes beteg n=378	
Nem (férfi/nő)	50/72	67/109	33/47	150/228	41/90
Életkor (év)	67,6 ± 1,30	66,6 ± 1,17	63,0 ± 1,35	66,1 ± 0,74	58,1 ± 1,51
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25,2 ± 0,16	25,5 ± 0,15	24,9 ± 0,18	25,2 ± 0,09	24,0 ± 0,17
Triglicerid (mmol/l)	1,71 ± 0,06*	1,76 ± 0,04 <sup>#</sup>	1,83 ± 0,08*	1,76 ± 0,03 <sup>#</sup>	1,53 ± 0,05
Összkoleszterin (mmol/l)	5,90 ± 0,11 <sup>#</sup>	5,75 ± 0,09 <sup>#</sup>	5,67 ± 0,13 <sup>#</sup>	5,78 ± 0,06 <sup>#</sup>	5,18 ± 0,09

Az értékek átlag ± SEM-ként szerepelnek, \*p<0,05 vs. kontroll csoport; <sup>#</sup>p<0,001 vs. kontroll csoport

**12. táblázat**  
**A T1259C és az IVS3+G476A variánsok alléleloszlása a beteg és a kontroll csoportokban**

	Stroke-os betegcsoport				Kontroll csoport n=131	
	Nagyér n=122	Kisér n=176	Kevert n=80	Összes beteg n=378		
T1259C	TT	95 (77,9%)	137 (77,8%)	60 (75,0%)	292 (77,2%)	103 (78,6%)
	TC+CC	27 (22,1%)	39 (22,2%)	20 (25,0%)	86 (22,8%)	28 (21,4%)
	C allél frekvencia	11,5%	11,6%	13,1%	11,9%	11,1%
IVS3+G476A	GG	104 (85,2%)	147 (83,5%)	68 (85,0%)	319 (84,4%)	123 (93,9%)
	GA+AA	18 (14,8%)	29 (16,5%)	12 (15,0%)	59 (15,6%)	8 (6,10%)
	A allél frekvencia	7,40%*	8,52%*	7,50%*	7,94%*	3,05%

\* p<0,05 vs. kontroll csoport

**13. táblázat**  
**A T1259C és az IVS3+G476A variánsok hordozásának hatása a vizsgált csoportok lipidparamétereire**

	Stroke-os betegcsoport								Kontroll csoport n=131	
	Nagyér n=122		Kisér n=176		Kevert n=80		Összes beteg n=378		TT	TC+CC
<b>T1259C</b>	TT	TC+CC	TT	TC+CC	TT	TC+CC	TT	TC+CC	TT	TC+CC
	n=95	n=27	n=137	n=39	n=60	n=20	n=292	n=86	n=103	n=28
Triglicerid	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*	1,45 ± 0,05	1,86 ± 0,17*
Összkoleszterin	5,90 ± 0,13	5,86 ± 0,24	5,71 ± 0,11	5,90 ± 0,19	5,57 ± 0,12	5,95 ± 0,34	5,75 ± 0,07	5,90 ± 0,14	5,25 ± 0,09	4,95 ± 0,20
<b>IVS3+G476A</b>	GG	GA+AA	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	n=123	n=10
Triglicerid	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*	1,49 ± 0,05	2,08 ± 0,37*
Összkoleszterin	5,87 ± 0,12	6,04 ± 0,334	5,79 ± 0,10	5,60 ± 0,21	5,66 ± 0,13	5,73 ± 0,45	5,79 ± 0,07	5,75 ± 0,17	5,23 ± 0,09	4,54 ± 0,31

Az értékek átlag ± SEM-ként szerepelnek. A triglicerid- és összkoleszterin-értékek mmol/l-ben vannak megadva. \*p<0,05 vs. nem hordozó egyének

**14. táblázat**

**Az APOA5 gén T1259C és IVS3+G476A variánsai hordozásának vizsgálata a betegcsoportokon logisztikus regressziós analízissel**

		Stroke-os betegcsoport			
		Nagyér n=122	Kisér n=176	Kevert n=80	Összes beteg n=378
T1259C	OR	1,045 (0,575 - 1,901)	1,047 (0,605 - 1,813)	1,226 (0,636 – 2363)	1,083 (0,669 – 1,754)
	Korrigált OR <sup>#</sup>	1,054 (0,454 – 2,451)	1,477 (0,668 - 3,267)	1,391 (0,631 – 3,066)	1,400 (0,751 - 2,609)
IVS3+G476A	OR	2,661* (1,112 – 6,369)	3,033* (1,338 – 6,877)	2,713* (1,057 – 6,962)	2,844* (1,320 – 6,124)
	Korrigált OR <sup>#</sup>	3,905* (1,355 – 11,253)	4,748* (1,540 - 14,640)	2,926* (1,021 – 8,384)	3,644* (1,452 – 9,144)

\*p<0,05 vs. controls; <sup>#</sup>Kor, nem, BMI, szérum összkoleszterin, ischémiás szívbetegség, magas vérnyomás, diabetes mellitus, dohányzás-, és alkoholfogyasztási szokásokban fennálló különbségekre korrigálva.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Tanulmányunkban a következő megfigyeléseket tettük:

1. Az apolipoprotein A5 variánsainak lipidparaméterekre gyakorolt hatásait vizsgálva elmondható, hogy a –1131C, 56G, IVS3+476A, 1259C allélek jelenléte a trigliceridek statisztikailag szignifikánsan emelkedett koncentrációját eredményezte az összes vizsgált stroke-os csoportban és a kontrollokban is.
2. A koleszterinértékeket vizsgálva sem a betegek, sem a kontrollok körében nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést egyik apolipoprotein A5 variáns hordozásának hatására sem.
3. Az allélek eloszlását vizsgálva a T–1131C, IVS3+G476A variánsok esetében a –1131C, IVS3+476A allélek szignifikáns akkumulációját találtuk minden stroke-os betegcsoportban a kontroll egyénekhez viszonyítva. Ezzel ellentétben az 56G allél kizárólag nagyér infaktusos betegek csoportjában fordult elő halmozottan a kontrollokhoz képest.
4. Az apolipoprotein A5 gén T1259C variánsa esetében azonban nem tudtunk kimutatni különbséget egyik allél előfordulásában sem a beteg, sem a kontroll csoportokban, annak ellenére, hogy a tanulmányunk során, hasonlóan a másik három variánshoz, a 1259C allélvariáns hordozásának hatására is szignifikáns trigliceridszint-emelkedést tapasztaltunk.
5. Eredményeink alapján a T-1131C és az IVS3+G476A variánsok esetében a –1131C, IVS3+G476A allélek hordozása minden stroke-os alcsoportban (kisér, nagyér, kevert) független kockázati tényezőnek bizonyult a betegség kialakulásában. A C56G variáns esetében ez a nagyér infarktusos csoportban volt bizonyítható. Ezekkel ellentétben, a T1259C variánst vizsgálva elmondható, hogy egyik allél hordozása sem jelent nagyobb kockázatot ischémiás stroke kialakulására.

## 7. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

### *A dolgozat alapjául szolgáló eredeti közlemények*

1. Havasi V, Szolnoki Z, Talian GC, Bene J, Komlosi K, **Maasz A**, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, Bodor A, Melegh B. Apolipoprotein A5 gene promoter region T-1131C polymorphism associates with elevated circulating triglyceride levels and confers susceptibility for development of ischemic stroke. *J Mol Neurosci.* 2006;29(2):177-183.
2. Szolnoki Z, **Maasz A**, Magyar L, Horvatovich K, Farago B, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, Bodor A, Hadarits F, Melegh B. Coexistence of angiotensin II type 1 receptor A1166C and angiotensin-converting enzyme D/D polymorphism represents susceptibility for small vessel associated ischaemic stroke. *Neuromolecular Med.* 2006;8(3):353-360.
3. **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.
4. **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.

### *Egyéb közlemények*

1. Putnoky P, Deak V, Bekasi K, Palvolgyi A, **Maasz A**, Palagyi Z, Hoffmann G, Kerepesi I. H protein of bacteriophage 16-3 and RkpM protein of *Sinorhizobium meliloti* 41 are involved in phage adsorption. *J Bacteriol.* 2004;186(6):1591-1597.
2. Komlosi K, Kellermayer R, **Maasz A**, Havasi V, Hollody K, Vincze O, Merkli H, Pal E, Melegh B. Maternally inherited deafness and unusual phenotypic manifestations associated with A3243G mitochondrial DNA mutation. *Pathol Oncol Res.* 2005;11(2):82-86.
3. **Maász A**, Horvatovich K, Magyar L, Talián C G, Bokor S, Laczy B, Tamaskó M, Molnár D, Wittmann I, Melegh B. Search for mitochondrial DNA T4291C mutation in Hungarian patients with metabolic syndrome. *Orv Hetil.* 2006;147(15):693-696.
4. **Maász A**, Melegh B. A mitokondriális DNS és mutációi. *Gyermekorvos Továbbképzés.* 2006;5(5):324-330.
5. **Maasz A**, Kisfali P, Horvatovich K, Mohas M, Marko L, Csongei V, Farago B, Jaromi L, Magyar L, Safrany E, Sipeky C, Wittmann I, Melegh B. Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome. *Pathol Oncol Res.* 2007;13(3):243-247.
6. Szolnoki Z, **Maasz A**, Magyar 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.
7. Sáfrány E, Csöngéi V, Járomi L, **Maász A**, Magyar L, Sipeky C, Melegh B. Mitochondrial DNA and its mutations: new advances in a new field. *Orv Hetil.* 2007; 148(21):971-978.

8. Farago B, Talian GC, **Maasz A**, Magyar L, Horvatovich K, Kovacs B, Cserep V, Kisfali P, Kiss CG, Czirjak L, Melegh B. Prevalence of functional haplotypes of the peptidylarginine deiminase/citrullinating enzyme gene in patients with rheumatoid arthritis: no influence of the presence of anti-citrullinated peptide antibodies. *Clin Exp Rheumatol*. 2007;25(4):523-528.
9. 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 allele confers risk for metabolic syndrome. *Circ J*. 2008;72(1):40-43.
10. Farago B, Magyar L, Safrany E, Csongei V, Jaromi L, Horvatovich K, Sipeky C, **Maasz A**, Radics J, Gyetvai A, Szekanecz Z, Czirjak L, Melegh B. Functional variants of interleukin-23 receptor gene confer risk for rheumatoid arthritis but not for systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(2):248-250.
11. **Maasz A**, Komlosi K, Hadzsiev K, Szabo Z, Willems PJ, Gerlinger I, Kosztolanyi G, Mehes K, Melegh B. Phenotypic variants of the deafness-associated mitochondrial DNA A7445G mutation. *Curr Med Chem*. 2008;15(13):1257-62.
12. 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.
13. Kisfali P, Mohás M, **Maász A**, Hadarits F, Markó L, Késői L, Horvatovich K, Oroszlán T, Bagosi Z, Bujtor Z, Rinfel J, Gasztonyi B, Wittmann I, Melegh B. Haplotype analysis of the apolipoprotein A5 gene in patients with metabolic syndrome. *Nutr Metab Card Dis*, 2009 közlés alatt
14. Mohás M, Kisfali P, Baricza E, Mérei A, **Maász A**, Cseh J, Mikolás E, Szijártó IA, Melegh B, Wittmann I. A Polymorphism within the Fructosamine-3-kinase Gene is Associated with HbA1c Levels and the Onset of Type 2 Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2009 közlés alatt
15. Járomi L, Csöngéi V, Polgár N, Szolnoki Z, **Maász A**, Horvatovich K, Faragó B, Sipeky C, Sáfrány E, Magyar L, Kisfali P, Mohás M, Janicsek I, Lakner L, Melegh B. Functional Variants of Glucokinase Regulatory Protein and Apolipoprotein A5 Genes in Ischemic Stroke. *J Mol Neurosci*, 2009 közlés alatt
16. Polgar N, Jaromi L, Csongei V, **Maasz A**, Sipeky C, Safrany E, Szabo M, Melegh B. Triglyceride level modifying functional variants of GALTN2 and MLXIPL in patients with ischaemic stroke. *European Journal of Neurology*, 2010 közlés alatt

**Összesített impakt faktor (idézhető absztraktok nélkül): 45,112**



## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A doktori disszertációm alapjául szolgáló kutatómunkát a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karán az Orvosi Genetikai Intézetben végeztem.

Köszönettel tartozom mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Melegh Béla Professor Úrnak, hogy lehetővé tette a Ph.D. programba való bekapcsolódásomat. Szeretnék köszönetet mondani támogatásáért, bizalmáért, munkám irányításáért és bírálataiért.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Szolnoki Zoltánnak és munkatársainak a terjedelmes beteganyag összegyűjtéséért és a gyümölcsöző kollaborációért.

Köszönet illeti Ph.D. hallgató társaimat, hogy munkámat szakmai tudásukkal és hasznos tanácsaikkal segítették. Külön köszönetemet szeretném kifejezni Kisfali Péternek, aki tapasztalatait és tudását megosztva nagyban hozzájárult az értekezés alapjául szolgáló genetikai vizsgálatok kivitelezéséhez.

Köszönettel tartozom a laboratóriumban dolgozó valamennyi asszisztensnek, különösképpen Papp Editnek és Szegfűné Ózdi Melindának, akik munkájukkal a technikai problémák áthidalásában sok segítséget nyújtottak.

Végül, de nem utolsósorban őszinte hálával tartozom Férjemnek, Szüleimnek és Öcsémnek, amiért szerető gondoskodásukkal és türelmükkel segítettek, bíztattak és mindig mellettem álltak, megteremtve ezzel munkámhoz a harmonikus családi hátteret.

Az értekezést Édesapám emlékének ajánlom.