

Lipid és glükóz metabolizmust befolyásoló polimorfizmusok vizsgálata elhízott gyermek populációs mintákban

Ph.D. értekezés tézisei

Horvatovich Katalin

Témavezető: Prof. Dr. Melegh Béla



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Genetikai Intézet
Pécs

2011

1. BEVEZETÉS

Az elhízás és a következményeként fellépő betegségek csírái már a korai életszakaszokban is egyre gyakrabban megfigyelhetők, ezért egyre nagyobb kihívást jelent a gyermekgyógyászok számára is. A WHO (World Health Organization) 2004-ben végzett felmérések alapján az egész világon körülbelül 22 millióra becsüli az öt év alatti túlsúlyos vagy elhízott gyermekek számát. Széleskörű epidemiológiai vizsgálatok azt mutatják, hogy Európában, Amerikában és Ázsiában a gyermekkori túlsúly és elhízás prevalenciája már 10-20% közé tehető. Magyarországon, az iskolás gyermekek között az elhízás prevalenciája az 1980-as és 1990-es évek között elérte a 15%-ot. Irodalmi adatok szerint az elhízott gyermekek 58%-ánál társult kockázati tényezők is jelen lehetnek (magas vérzsír szint, magasabb vérnyomás vagy inzulinrezisztencia). Az elsődleges (exogén) elhízás eseteinek nagy többségére vonatkozóan elmondható, hogy az elhízás egy komplex, heterogén állapot, amelyben környezeti és genetikai tényezők egyaránt szerepet játszanak. Ikervizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy az öröklött tényezők 50-90%-ban játszanak szerepet a zsírszövet kialakulásában. Ma már kb. 200 olyan, 12 különböző kromoszómán elhelyezkedő kandidátus (hajlamosító) gén, lókuszt vagy kromoszómarégiót ismert, melyek kapcsolatba hozhatók az elhízással.

1.1. A gyermekkori elhízás kapcsolata kardiovaszkuláris betegségekkel

Irodalmi adatok igazolják, hogy a gyermekkori elhízás kritikus szerepet játszik az ateroszklerózis és az MS (metabolikus szindróma) korai kialakulásában, amely jelentősen megnöveli a nem-inzulin-dependens diabétesz mellitusz (T2DM) és a kardiovaszkuláris betegségek kockázatát. Irodalmi adatok szerint az elhízott gyermekekben is kimutathatók olyan szív-érrendszeri rizikófaktorok, mint a dyslipidemia (emelkedett koleszterin és triglicerid koncentráció), hipertónia, glükóz intolerancia és 2-es típusú diabétesz. Ezen faktorok együttes előfordulása jellemző a MS fellépése esetén. Epidemiológiai vizsgálatok során Magyarországon a 8-18 év közötti elhízott serdülők 8,9%-ánál detektálták a metabolikus szindrómát. Gyermekkorban az MS fellépése nemcsak kedvezőtlen prognosztikai problémát jelent a szív és érrendszeri megbetegedések kockázatát illetően, hanem jelen idejű kedvezőtlen jelenségekkel is jár, mint a csökkent fizikai terhelhetőség. A T2DM klasszikus példája a környezeti, viselkedési és genetikai hatások közötti kölcsönhatások eredményeképpen létrejött komplex betegségeknek. Az elhízással kapcsolatos kedvezőtlen tendencia a T2DM gyermek- és serdülőkorban való megjelenése is. A betegség érinti a

szénhidrát-, a lipid-, sőt a fehérje és a nukleinsav-anyagcserét is. Az utóbbi években egyes populációkban járványszerű mértékben növekedett a gyermek- és serdülőkori T2DM esetek száma, arányuk megközelíti az új megbetegedések 50%-át.

1.2. Molekuláris genetikai háttér

Különböző vizsgálatok bizonyították, hogy a testsúly variabilitás 30-80%-a genetikailag meghatározott. A genetikai tényezők közül legjelentősebbek a glükóz- és lipidmetabolizmusban résztvevő fehérjéket kódoló gének defektusai, melyek a glükóz- és lipidháztartás zavarát okozzák, és következményesen szív- és érrendszeri károsodást eredményeznek.

1.2.1. Az apolipoprotein A5 gén (*APOA5*)

A 11-es kromoszómán található *APOA1-C3-A4-A5* gén család tartalmaz legalább három olyan gént amely befolyásolja a plazma lipoprotein metabolizmusát. Az apolipoprotein család legújabb tagját, az apolipoprotein A5 (*APOA5*) gént az egér és humán genom összehasonlító szekvenálása során fedezték fel 2001-ben. Számos különböző felnőtt populációt vizsgáló tanulmány bizonyítottan leírta, hogy az *APOA5* gén variánsainak jelenléte [*T-1131C* (rs662799), *IVS3+G476A* (rs2072560), *T1259C* (rs2266788) és a *C56G* (rs3135506)] emelkedett triglicerid koncentrációt eredményez. Az *APOA5* gén vizsgálatai során kiderítették, hogy a gén természetes variánsai által determinált haplocsoportok fontosabb, komplexebb hatással bírnak a lipid paraméterekre.

Egészséges, felnőtt, kaukázusi populációkban végzett haplocsoport analízisek azt mutatták, hogy az *APOA5**2 (*-1131C*, *IVS3+476A* és *I259C*) haplotípus kockázati tényezőt jelent különböző kardiovaszkuláris betegségek kialakulására, ezen felül egy korábbi felnőttpopulációs vizsgálatunkban a haplotípus jelenléte kizárólagos hajlamosító kockázatot mutatott a metabolikus szindróma kialakulására.

1.2.2. A glükokináz regulátor enzim génje (*GCKR*)

A glükokináz regulátor gént (*GCKR*) a 23-as kromoszómán lokalizálták (2p23.3-p23.2), amely 19 exont tartalmaz, és egy 625 aminosavból álló proteint kódol. A glükokináz regulátor protein (*GCKR*) a máj kulcsfontosságú glükokináz (*GCK*) enzimének működését szabályozza. A glükokináz enzim központi szerepet játszik a vér glükóz-homeosztázisában, valamint a májsejtekben, és a hasnyálmirigy β -sejtjeiben a glükóz-foszforilációt végzi. Több irodalmi adat utal rá, hogy a *GCKR* gén inverz hatást gyakorol a glükóz- és triglicerid-szintekre, mely szerint a gén bizonyos polimorfizmusainak közvetett hatására emelkedik a plazma triglicerid-szintje, ezzel egyidejűleg a glükóz koncentráció csökkenése figyelhető meg. A *GCKR* gén két leggyakrabban vizsgált polimorfizmusa az intronikus rs780094 (intron 16) variáns és az exonikus rs1260326 (1337T) (exon 15) variáns. A T2DM-re irányuló genomi asszociációs (GWAS=genom wide association study) vizsgálatok kimutatták, hogy a *GCKR* mindkét polimorfizmusa összefüggést mutat magas triglicerid koncentrációval, alacsony glükóz szinttel és csökkent inzulin rezisztenciával. Ezen felül az rs780094 A és az rs1260326 T allél hordozása kisebb kockázatot mutatott a 2-es típusú diabétesz kialakulására nézve.

2. VIZSGÁLATI CÉLKITŰZÉSEK

Lipid,- és glükóz metabolizmusban szerepet játszó genetikai variánsok analízise, melyek összefüggésbe hozhatóak az elhízással.

1. Elhízott gyermekpopulációban végzett vizsgálataim egyik fő tárgyát a felnőtt MS-sel, hipertrigliceridémiával összefüggésbe hozott *APOA5* gén gyakori természetes variánsainak alléleloszlása (*T-1131C*, *C56G*, *IVS3+G476A*, *T1259C*) és a variánsok által képzett haplocsoportok (*APOA5*1*, *APOA5*2*, *APOA5*3*, *APOA5*4*, *APOA5*5*) prevalenciája képezte.
2. Továbbá vizsgáltam az *APOA5 T-1131C*, *C56G*, *IVS3+G476A*, *T1259C* alléljeinek és a variánsok által képzett haplocsoportoknak az elhízott és normál súlyú, egészséges gyermekek triglicerid- és koleszterin értékeire gyakorolt hatását.

3. Megfigyeléseim egy részét az *APOA5* génben található négy variáns minor alléljeinek, másik részét az általuk képezett haplocsoportoknak a gyermekkori elhízás kialakulásában betöltött esetleges kockázati, hajlamosító szerepének felderítése képezte.
4. Az elhízott gyermekpopulációban végzett vizsgálataim másik fő tárgyát a glükóz metabolizmusban kulcs szerepet játszó glükokináz regulátor (*GCKR*) gén két gyakori, természetes variánsának (rs1260326T, rs780094A) alléleloszlása képezte.
5. További megfigyeléseket végeztem annak kiderítésére, hogy a *GCKR* génben található két eltérés a nemzetközi szakirodalomban leírtakhoz hasonlóan ellentétes hatást gyakorolnak-e a triglicerid és glükóz értékekre.
6. Végül vizsgálataimmal arra kerestem a választ, hogy az rs1260326T és rs780094A variánsok milyen összefüggést mutatnak a gyermekkori elhízás kialakulásával.

3. BETEG ÉS MÓDSZER

3.1. A vizsgált betegpopuláció jellemzői

Az *APOA5* gén vizsgálatában 232 elhízott gyermek (138 fiú, 94 lány, kor: $13,7 \pm 0,16$ év, BMI: $31,8 \pm 0,34$ kg/m²) és 137 egészséges, normál testsúlyú kontroll (58 fiú, 79 lány, kor: $14,8 \pm 0,19$ év, BMI: $20,0 \pm 0,25$ kg/m²) gyermek vett részt; míg a *GCKR* gén esetében 221 elhízott gyermek (122 fiú, 99 lány, kor: $13,5 \pm 0,16$ év, BMI: $31,5 \pm 0,32$ kg/m²) és 115 kontroll egyén (56 fiú, 59 lány, kor: $14,1 \pm 0,21$ év, BMI: $20,2 \pm 0,32$ kg/m²) mintájával dolgoztunk. Munkánk során a rendelkezésünkre álló DNS vizsgálati minták egy része elfogyott, ez magyarázza az egyes polimorfizmusok esetén a különböző mintaszámokat. A vizsgálatból kizártuk azokat az egyéneket, akik bármiféle krónikus megbetegedésben szenvedtek, endokrinológiai, táplálkozási zavart, növekedésbeli és renális problémákat vagy hormonális elhízást mutattak. A vizsgálatban résztvevők közül egyik egyén sem kapott gyógyszerkezelést. A vizsgált alanyok DNS mintái és klinikai adatai egy helyi biobankban lettek elhelyezve. A helyi biobank létrejötté az Egészségügyi Tudományos Tanács és Kutatásértékelési Bizottság engedélye alapján valósult meg.

3.2. Antropológiai mérések és klinikai paraméterek

Az antropológiai méréseket azonos mértékegységben végeztük. A testmagasságot 0.1 cm pontosságú Holtain stadiométerrel, a testsúlyt 0,1 kg pontosságú mérlegkaron végeztük. A BMI (body mass index) értékét a mért testsúly és a magasság négyzetének hányadosával (kg/m^2) kaptuk meg. Egy gyermeket akkor tekintettünk elhízottnak, ha a BMI értéke túllépte a Cole és mtsai. által leközölt határértéket, amely a 18 éves korra nézve 25 (Cole és mtsai). Az éhgyomri vérminták levétele és megfelelő előkészítése után a triglicerid és a totál koleszterin paraméterek mérését Roche Modular automatikus rendszer (Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) segítségével végeztük.

Azokat a gyermekeket tekintettük hipertrigliceridémiásnak (HTG), akiknek a triglicerid-szintje egyenlő vagy nagyobb értéket mutatott a gyermekeknél leírt határértékkel ($\text{TG} \geq 1.1$ mmol/l, de Ferranti és mtsai).

3.3. Genotípus elemzés

A DNS-izolálást EDTA-val alvadásgátolt vérmintákból rutin kisózásos módszerrel végeztük. A DNS-analízis kiindulópontja a polimeráz lánreakció (PCR) útján végzett amplifikáció volt, mely standard módon az adott szekvenciára specifikus, szintetikus oligonukleotid primerek, Taq polimeráz, dNTP, reakció puffer és az adott genomiális DNS-templát jelenlétében játszódott le. A vizsgált összes variáns esetén a PCR reakció 50 μl végtérfogata 5 μl reakció puffert (500 mM KCl, 14 mM MgCl_2 , 10 mM Tris-HCl, pH 9,0), 1 μl 50 mM MgCl_2 -ot, 0,2 mM dNTP-t, 1 Unit egység Taq polimerázt, 0,2 mM adekvát specifikus primer párt és 1 μg DNS templátot tartalmazott. A vizsgált SNP-ket tartalmazó szekvenciák amplifikációjához MJ Research PTC 200 PCR készüléket (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) alkalmaztunk. A PCR termékek analizálása gélelektroforézis, etidium bromidos festés és UV-megvilágítás segítségével történt. A polimeráz lánreakciót követően a különböző génekben (*APOA5*, *GCKR*) lévő eltérések esetén a mutációk/polimorfizmusok meghatározására RFLP módszert alkalmaztunk. Ennek során a felsokszorozott DNS szakaszokat restrikciós endonukleáz enzimekkel hasítottuk. Mindegyik módszer úgy lett tervezve, hogy a restrikciós enzimek egy obligát hasító hellyel rendelkezzenek, így ellenőrizve az enzimátikus emésztés eredményességét.

3.4. Statisztikai elemzés

A statisztikai analíziseket az SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) szoftver programcsomaggal végeztük. Minden kvantitatív analízis eredménye átlag \pm SEM (standard error of the mean) formájában van feltüntetve. A kvantitatív paraméterek elhízott és kontroll csoport közötti összehasonlítására Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk (*APOA5*, *GCKR*). Az allélok (*APOA5* és *GCKR* gén) és a haplotípus-csoportok (*APOA5* gén) frekvenciáit χ^2 -teszt segítségével hasonlítottuk össze a beteg és a kontroll csoportok között. A kvantitatív paraméterek az egyedi polimorfizmusok közötti (*APOA5*, *GCKR*) és a haplotípus-csoportok (*APOA5* gén) közötti összehasonlításait ANOVA tesztel végeztük. Az elhízás és a vizsgált genetikai variánsok, illetve haplotípus-csoportok között fennálló összefüggés feltárására logisztikus regressziós analízist alkalmaztunk. A szignifikancia (p) határértéke $p \leq 0.05$, míg a konfidencia intervallum (CI) 95%-os volt minden egyes számításnál.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az Apolipoprotein A5 vizsgálat eredményei

Az egyes *APOA5* variáns és a triglicerid szintek közötti összefüggések vizsgálata során azt találtuk, hogy *C56G* polimorfizmust kivéve, az összes allélikus variáns (*-1131C*, az *IVS3+476A* és a *I259C*) összefüggést mutatott emelkedett triglicerid szinttel, mind az elhízott és kontroll gyermek csoportban, összehasonlítva a hordozó és a normál genotípusú alanyok triglicerid értékeit. A *-1131C* allélikus variáns prevalenciája szignifikánsan emelkedett értéket mutatott az elhízott csoportban összehasonlítva az egészséges, normál testsúlyú egyénnel. A regressziós analízis eredményei kimutatták, hogy a *-1131C* mutáns allél jelentős független kockázati faktort jelent a gyermekkori elhízás kialakulására.

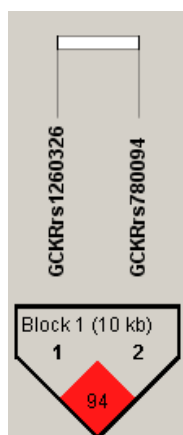
A haplocsoport analízis eredményei azt mutatták, hogy az *APOA5*2* és *APOA5*4* haplotípus hordozása szignifikáns trigliceridszint emelkedést eredményezett mindkét csoportban. Ezzel ellentétben, az *APOA5*5* haplotípus jelentős trigliceridszint-csökkentő hatást mutatott.

Az elhízott gyermekekben az *APOA5*2* prevalenciája 2.59-szer nagyobb, míg az *APOA5*5* előfordulási gyakorisága 3.88-szor kisebb értéket mutat, mint a kontroll gyermekekben. A logisztikus regressziós analízis eredményei azt mutatták, hogy az *APOA5*2* haplotípus gyermekekben erősen hajlamosít az elhízás kialakulására (OR: 2.87, CI: (1.29-

6.37), $p=0.01$), míg az *APOA5**5 haplotípus védő fakorként hat az elhízással szemben (OR: 0.25, CI: (0.08-0.83), $p=0.02$).

4.2. A glükokináz regulátor gén vizsgálata (*GCKR*)

Korábban felismerték azt a tényt, hogy a *GCKR* variánsok között (rs780094, rs1260326) szoros LD figyelhető meg, amelyet gyermekpopuláción végzett vizsgálataink során mi is megerősítettünk (LD; $r^2=0.94$) (1. Ábra). Az egyedi *GCKR* variánsok laboratóriumi paraméterekre kifejtett hatásainak vizsgálatakor azt tapasztaltam, hogy mindkét SNP esetén (rs1260326T és rs780094A) a hordozó genotípus (CT+TT az rs1260326 és GA+AA az rs780094) szignifikáns összefüggést mutatott emelkedett triglicerid szinttel és csökkent glükóz koncentrációval összehasonlítva a normál genotípussal, mind az elhízott és mind a kontroll csoportban. Az allélfrekvenciákat vizsgálva egyik SNP esetén sem detektáltunk szignifikáns különbséget az elhízott és kontroll gyermekek között. De a két variánst hordozók (CT+TT az rs1260326 és GA+AA az rs780094 esetén) szignifikánsan kisebb prevalenciát mutattak az elhízott gyermekekben az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. A logisztikus regressziós analízis eredményei alapján azt detektáltuk, hogy azoknak, akik hordozzák a *GCKR* rs780094 A vagy az rs1260326 T eltérést kisebb a rizikójuk az elhízás kialakulására (rs780094 A esetén: OR: 0.49, CI: (0.28-0.84), $p=0.010$; rs1260326 T esetén: OR: 0.56, CI: (0.34-1.01), $p=0.035$). Amikor az összevont (elhízott és kontroll) és elhízott gyermekcsoportot triglicerid szint (TG) alapján további két alcsoportba soroltuk, azt tapasztaltuk, hogy mindkét *GCKR* variáns minor allélja nagyobb frekvenciát mutatott a hipertrigliceridémiás gyermekek (HTG) körében a normál triglicerid szintet (NTG) mutató gyermekekhez viszonyítva, mind az összevont és mind az elhízott gyermekcsoportban. A regressziós analízis eredményei alapján azt találtuk, hogy a *GCKR* variánst hordozók (CT + TT rs1260326, GA + AA rs780094) erős korrelációt mutatnak a hipertrigliceridémiával (HTG), mind az elhízott és mind az összes vizsgált gyermeket tartalmazó csoportban, de úgy tűnik, hogy az összefüggés erősebb volt az elhízott csoport esetében.



1. ábra. Az LD-blokk a két *GSKR* SNP esetében.

5. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Az egészségügy egyik legfőbb problémájaként ismert metabolikus szindróma kialakulásában (MS) az elhízás és az inzulin rezisztencia központi szerepet játszik. A gyermekkori elhízás növeli a metabolikus szindróma fiatal felnőtt kori megjelenésének kockázatát. Ez a tény magában foglalja a gyermekkori elhízás megelőzésének és kezelésének jelentős szerepét, hogy csökkentsük az MS felnőttkori kialakulásának az esélyét. Az MS fontos kritériumai közé tartozik az emelkedett triglicerid koncentráció. Humán és egér vizsgálatokban kimutatták, hogy az apolipoprotein-kódoló *APOA5* gén jelentős meghatározója a plazma triglicerid szintjének, ezért széleskörűen kezdtek tanulmányozni különböző nemzetiségű felnőtt MS populációkban. Az *APOA5* hajlamosító variánsait eddig csak egy japán tanulmány vizsgálta elhízott gyermekekben. Ezért döntöttünk úgy, hogy magyar gyermekpopulációban megvizsgáljuk az *APOA5* funkcionális variánsainak a frekvenciáját, eloszlását, és megnézzük, hogy milyen hatást gyakorolnak a lipid paraméterekre, illetve milyen kapcsolatban állhatnak a gyermekkori elhízással magyar populációban. Elhízott, magyar kaukázusi gyermekpopulációban végzett vizsgálataink során, Endo és mtsai eredményeihez hasonlóan, összefüggést találtunk az *APOA5* promóter régió *-1131C* polimorfizmusa és az emelkedett triglicerid szint között. Ezenkívül, az eredményeink azt mutatták, hogy a felnőtt populációkban kapott eredményekkel megegyezően az *APOA5*, *IVS3+476A* és *1259C* variánsok elhízott gyermekekben trigliceridszint-növelő hatást mutattak. Néhány felnőttpopulációt vizsgáló tanulmány foglalkozott a főbb természetesen előforduló *APOA5* haplocsoportok megfigyelésével, de elhízott gyermekeknél mi végeztünk el először haplotípus analízist. Eredményeink azt mutatják, hogy mind az elhízott és kontroll csoportban az *APOA5*2* (*-1131C*, *IVS3+476A*, *1259C*) és *APOA5*4* (*-1131C*) haplocsoport emelkedett triglicerid szintet okozott összehasonlítva az *APOA5*1* (*-1131T*, *IVS3+476G*, *1259T*, *56C*) haplotípusok adataival. Ráadásul a logisztikus regressziós analízis kimutatta, hogy gyermekekben az *APOA5*2* haplotípus hordozása hajlamosító kockázatot jelent az elhízás kialakulására. Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a *-1131C* allél csak az *IVS3+476A* és *1259C* allélok együttes jelenlétével tudja kifejtetni hajlamosító szerepét az elhízás kialakulására. Ezenfelül, eredményeink azt mutatták, hogy a ritka *APOA5*5* haplotípus védő faktort jelent az elhízással szemben a gyermekpopulációban. A felnőtt populációban végzett korábbi vizsgálataink során hasonló eredményt kaptunk, ahol ez a haplocsoport az MS-el szemben mutatott védő hatást.

Összefoglalva az eredményeinket azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az *APOA5* - *1131C* allél hajlamosító hatását az *APOA5*2* haplotípus korlátozza (*-1131C*, *IVS3+476A*

és *I259C* eltérést tartalmazó allélok). Az *APOA5*2* és *APOA5*4* haplotípus variánsok összefüggést mutatnak emelkedett triglicerid-szinttel, míg ezzel ellentétben az *APOA5*5* haplotípus trigliceridszint-csökkentő hatást mutatott, és védő szereppel bírt az elhízással szemben. Megfigyeléseink megerősítéséhez azonban további, nagyobb esetszámú gyermekpopulációs vizsgálatra van szükség.

A korábbi években (2007 és 2008) végzett genomi asszociációs vizsgálatok felismerték, hogy a *GCKR* lókuszon található rs780094 és rs1260326 polimorfizmusok összefüggést mutatnak csökkent glükóz és inzulin koncentrációval illetve emelkedett triglicerid szinttel. Emellett a szakirodalomban közölt eredmények azt mutatták, hogy az rs780094 A allél és az rs1260326 T variáns hordozása csökkenti a T2D kialakulásának a kockázatát. A munkám célja az volt, hogy egyrészt megvizsgáljam a lehetséges összefüggéseket a *GCKR* gén variánsai és a triglicerid- illetve éhgyomri vércukorszint között, másrészt, hogy tanulmányozzuk az rs1260326 és az rs780094 polimorfizmus allél eloszlását magyar elhízott és egészséges, normál súlyú gyermekek csoportjában. Jelenlegi gyermekpopuláción végzett vizsgálatunk eredményei megerősítik a szakirodalomban jelenlévő tényt, hogy a *GCKR* gén két funkcionális variánsa (rs780094A és rs1260326T) inverz hatást fejt ki a triglicerid és a glükóz szintre. Mindkét SNP esetén, a hordozók prevalenciája szignifikánsan alacsonyabb értéket mutatott az elhízott gyermekeknél, mint a kontroll, normál súlyú gyermekek esetén, habár az allélfrekvenciában nem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között. Logisztikus regressziós eredményeink azt mutatták, hogy mindkét *GCKR* variáns hordozása kisebb kockázatot jelent az elhízásra ebben a gyermek populációban, hasonlóan egy kínai felnőtt populáción végzett vizsgálat rs780094 polimorfizmusra irányuló eredményeihez. A gyermekkori elhízás és a 2-es típusú diabétesz mellitusz kialakulási kockázata közötti összefüggésre alapozva, eredményeink azt sugallják, hogy a *GCKR* gén funkcionális alléljei védő hatással bírnak a gyermekkori elhízás manifesztációjával szemben, ennek következtében védő hatást jelenthetnek a felnőttkori diabétesz és metabolikus szindróma kifejlődésével szemben. *GCKR* gént érintő vizsgálatunk eredményeinek alátámasztásához további, nagyobb létszámú gyermekpopulációt érintő vizsgálatokra van szükség.

6. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Megállapítottuk, hogy a vizsgált obese (elhízott) gyermek populációban az *APOA5* variánsok közül a *C56G* polimorfizmust kivéve, az összes allélikus variáns (*-1131C*, az *IVS3+476A* és a *1259C*) összefüggést mutatott az emelkedett triglicerid szinttel, mindkét gyermekcsoportban.
2. Ugyanazon populáció *APOA5* analízise során felismertük, hogy a *-1131C* variánst tartalmazó allél önmagában jelentős független szuszeptibilitási ágenst jelent a gyermekkori elhízás kialakulására.
3. A haplocsoport-vizsgálat eredményei alapján elmondhatjuk, hogy az *APOA5* haplocsoportok közül az *APOA5*2* és *APOA5*4* haplotípus variáns hordozása szignifikáns trigliceridszint emelkedést eredményez mindkét csoportban.
4. A haplocsoportok és az elhízás közötti asszociációs analízis után kijelenthetjük, hogy egy korábbi felnőtt metabolikus szindrómás populációs vizsgálatunk eredményeihez hasonlóan az *APOA5*2* haplotípus jelentős hajlamosító faktorként viselkedett az elhízás kialakulására nézve gyermekkorban, míg a kis előfordulási gyakoriságú *APOA5*5* haplocsoport védő hatást mutatott az elhízás kifejlődésével szemben.
5. A *GCKR* gén variánsainak vizsgálata során, megállapítottuk, hogy a rs780094 és rs1260326 polimorfizmus ellentétes hatást fejt ki a triglicerid és a glükóz szintre. Azok a gyermekek, akik hordozták akár az rs780094A, akár az rs1260326T variánst, emelkedett triglicerid és csökkent glükóz értéket mutattak.
6. A *GCKR* variánsok és az elhízás közötti kapcsolat vizsgálata során detektált eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy mindkét variáns hordozása csökkenti az elhízás kialakulásának kockázatát, annak ellenére, hogy ezek a variánsok emelkedett triglicerid szinttel járnak együtt.

7. PUBLIKÁCIÓS LISTA

7.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Horvatovich K**, Bokor Sz, Barath A, Maasz A, Kisfali P, Jaromi L, Polgar N, Toth D, Repasy J Endreffy E, Molnar D, Melegh D, Haplotype analysis of the apolipoprotein A5 gene in obese pediatric patients. *Int J Pediatr Obes.* 2010 septembere 30.IF: 3.53
2. **Horvatovich K**, Bokor Sz, Polgar N, Kisfali P, Hadarits F, Jaromi L, Csongei V, Repasy J, Molnar D, Melegh B, Functional GCKR gene variants have inverse effects on triglyceride and glucose levels and decreases the risk of obesity in children. *Diab Met.* 2011 IF: 2.43 (Közlésre elfogadva).

7.2. Egyéb közlemények

1. 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.
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 suggests susceptibility for small-vessel-associated ischemic stroke. *Neuromolecular Med.* 2006;8(3):353-60. IF: 2.631
3. 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):201-7. IF: 2.061.
4. Magyar L, Farago B, Bene J, **Horvatovich K**, Lakner L, Varga M, Figler M, Gasztonyi B, Mozsik G, Melegh B. No association of the cytotoxic T-lymphocyte associated gene CTLA4 +49A/G polymorphisms with Crohn's disease and ulcerative colitis in Hungarian population samples. *World J Gastroenterol.* 2007;13(15):2205-8. IF: 2.081.

5. Farago B, Talian G, Maasz A, Magyar L, **Horvatovich K**, Kovacs B, Cserep V, Kisfali P, Kiss G C, 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):523-8. IF:2.189
6. Maász, A., Kisfali, P., **Horvatovich, K.**, Mohás, M., Markó, L., Csöngéi, V., Faragó, B., Járomi, L. Magyar L., Sáfrány, E., Sipeky, Cs., Wittman, I., Melegh, B., Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome, *Journal of Pathology Oncology Research*, . 2007, 13(3):243-7. IF: 1.272
7. 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 Jan;72(1):40-3. 2.387.
8. **Horvatovich, K.**, Orkenyi, M., Bíró, E., Pongrácz, K., Kisfali, P., Talián, G., Csöngéi, V., Járomi L., Sáfrány, E., Harangi, F., Sulyok, E., Melegh, B., Pseudo-Bartter syndrome in a case of cystic fibrosis caused by C1529G and G3978A compound heterozygosity, *Hungarian Medical Journal (Orvosi Hetilap)*, 2008, 149(7):325-8.
9. Faragó, B., Magyar L., Sáfrány, E., Csöngéi, V., Járomi, L., **Horvatovich, K.**, Sipeky, Cs., Maász, A., Radics, J., Gyetvai, Á., Szekanecz Z., Czirják, L., Melegh, B., Functional variants of interleukin-23 receptor gene confer risk for rheumatoid arthritis but not for systemic sclerosis, *Ann Rheum Dis* Published, doi:10.1136/ard.2007.072819; 2008 Feb;67(2):248-50. IF: 6.411
10. Maasz, A., Kisfali, P., Járomi L., **Horvatovich, K.**, Szolnoki, Z., Csöngéi, V., Sáfrány, E., Sipeky, C., Hadarits, F., Melegh, B., Apolipoprotein A5 gene IVS3+G476A allelic variant confers susceptibility for development of ischemic stroke, *Circulation Journal*, 2008, 72(7):1065-70. IF: 2.373
11. Szolnoki Z, Maasz A., Magyar L., **Horvatovich K.**, Farago B., Kondacs A., Bodor A.,Hadarits F., Orosz P., Ille A., and Melegh B., Galectin-2 3279TT variant protects

against the lymphotoxin-alpha 252GG genotype associated ischaemic stroke. *Clinical neurology and neurosurgery* 111(3):227-30, 2009 Apr IF: 1.32.

12. Kisfali P, Mohás M, Maász A, Polgár N, Hadarits F, Markó L, Brasnyó P, **Horvatovich K**, Oroszlán T, Bagosi Z, Bujtor Z, Gasztonyi B, Rinfel J, Wittmann I, Melegh B. Haplotype analysis of the apolipoprotein A5 gene in patients with the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009 Aug 17. IF: 3.565
13. 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.* 2010 May;41(1):121-8. IF: 1

7.3. Idézhető absztraktok (konferencia szereplések)

1. **Horvatovich KZ**, Magyari L, Maasz A, Talian C G, Tamasko M, Laczy B, Wittmann I, Melegh B. Search for mitochondrial DNA T4,291C mutation in Hungarian metabolic syndrome patients. *Eur J Hum Genet.* 2005;13 Suppl. 1, 279.
2. Magyari L, **Horvatovich K**, Bene J, Komlosi K, Nemes E, Melegh B. Novel phenotypic ariant of the OCTN2 V295X mutation. *Eur J Hum Genet.* 2006;14 Suppl. 1, 268
3. **Horvatovich K**, Magyari L, Maasz A, Farago B, Laczy B, Marko L, Wittmann I, Melegh . Association between APOA5-T1131C mutation and triglyceride level in Hungarian patients with metabolic syndrome and diabetes mellitus. *Eur J Hum Genet.* 2006;14 Suppl. 1,236.
4. Farago B, Talian G, Maasz A, Magyari L, **Horvatovich K**, Kovacs B, Cserep V, Kisfali P, Kiss C, Melegh B. Padi4_89*G/A, padi4_90*T/C and padi4_92*G/C SNPs in the gene of the peptidylarginine deiminase citrullinating enzyme type 4 (PADI4) are not associated with rheumatoid arthritis in Hungarian patients. *Eur J Hum Genet.* 2006;14 Suppl. 1, 326.
5. Talian C G, **Horvatovich K**, Maasz A, Magyari L, Illes T, Melegh B. New polymorphisms n the filaminB gene: novel candidates for causing disease? *Eur J Hum Genet.* 2006;14 Suppl. , 250.
6. Faragó B, Talián CsG, Maász A, Magyari L, **Horvatovich K**, Kovács B, Cserép V, Kisfali P, Kiss Cs, Czirják L, Melegh B. A peptidilarginin deimináz enzimet ódoló gén funkcionális haplotípusainak gyakorisága rheumatoid arthritis betegekben. *Klin Kísérl Lab Med* 2006;(S32):101.
7. **Horvatovich K**, Magyari L, Maász A, Faragó B, Laczy B, Markó L, Wittmann I, Melegh B. APOA5 T-1131C mutáció és trigliceridszint közötti összefüggés vizsgálata metabolikus szindrómában és II. típusú diabetes mellitusban szenvedő betegcsoportban. *Klin Kísérl Lab Med* 2006;(S32):69.

8. Magyari L, Farago B, Safrany E, Csongei V, **Horvatovich K**, Jaromi L, Sipeky C, Melegh B. IL-23 receptor 3'UTR C2370A variant in inflammatory bowel disease: differential profile in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 255.
9. Farago B, Magyari L, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, **Horvatovich K**, Sipeky C, Maasz A, adics J, Czirjak L, Melegh B. Interleukin 23 receptor 3'-UTR C2370A SNP confers risk for rheumatoid arthritis. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 256.
10. **Horvatovich K**, Magyari L, Maasz A, Kisfali P, Bokor S, Farago B, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Sipeky C, Molnar D, Melegh B. Apolipoprotein A5 T-1131C alleles in pediatric patients with obesity and metabolic syndrome. *Eur J Hum Genetics*, 2007;15(S1):178.
11. Járomi, L., Maász, A., Szolnoki, Z., Kiszfali, P., **Horvatovich, K.**, Csöngői, V., Sáfrány, E., Sipeky, Cs., Melegh, B., Apolipoprotein A5 gene T1259C polymorphism associated with elevated circulating triglyceride levels but does not confer susceptibility for ischaemic stroke, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th -19th June 2007.
12. Csöngői, V., Járomi, L., Sáfrány, E., Sipeky, Cs., Maász, A., Magyari, L., **Horvatovich, K.**, Faragó, B., Takács, I., Melegh, B., Polymorphisms of the MDR1 gene in Hungarian Roma population samples, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th - 19th June 2007.
13. Maász, A., **Horvatovich, K.**, Kiszfali, P., Mohás, M., Markó, L., Csöngői, V., Faragó, B., Járomi, L., Magyari, L., Sáfrány, E., Sipeky, Cs., Wittman, I., Melegh, B., Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th -19th June 2007.
14. Sipeky, Cs., Csöngői, V., Faragó, B., **Horvatovich, K.**, Járomi, L., Magyari, L., Sáfrány, E., Takács, I., Melegh, B., Polymorphisms of CYP2C9 and VKORC1 genes associated with the warfarin metabolism in Hungarian Roma population, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th -19th June 2007.

15. Sáfrány, E., Faragó, B., Csöngéi, V., Magyari, L., Maász, A., Sipeky, Cs., Járomi, L., **Horvatovich, K.**, Radics, J., Czirják, L., Melegh, B., Interleukin-23 receptor (IL23R) gene C2370A polymorphism in scleroderma patients, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th -19th June 2007.
16. Faragó, B., Magyari, L., Csöngéi, V., Járomi, L., Sáfrány, E., **Horvatovich, K.**, Sipeky, Cs., Maász, A., Radics, J., Czirják, L., Melegh, B., Interleukin-23 receptor 3'-UTR C2370A SNP confers risk for rheumatoid arthritis, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th -19th June 2007.
17. Magyari, L., Faragó, B., Sáfrány, E., Csöngéi, V., **Horvatovich, K.**, Járomi, L., Sipeky, Cs., Melegh, B., Interleukin-23 receptor 3'-UTR C2370A variant in inflammatory disease: differential profile in Crohn's disease and ulcerative colitis, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th -19th June 2007.
18. Kisfali, P., Mohás, M., **Horvatovich, K.**, Maász, A., Markó, L., Csöngéi, V., Faragó, B., Járomi, L., Magyari, L., Sáfrány, E., Sipeky, cs., Wittman, I., Melegh, B., Common allelic variants of APOA5 gene in the metabolic syndrome, *European Human Genetics Conference*, Nice (France), 16th-19th June 2007.
19. Sipeky, Cs., Csöngéi, V., Faragó, B., **Horvatovich, K.**, Járomi, L., Kisfali, P., Maász, A., Magyari, L., Sáfrány, E., Takács, I., Melegh, B., Haplotype profile of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) as determinant of warfarin sensitivity in Roma population, *European Human Genetics Conference*, Barcelona (Spain), 31st May - 4th June 2008.
20. Járomi, L., Csöngéi, V., Sáfrány, E., Faragó, B., Magyari, L., **Horvatovich, K.**, Maász, A., Sipeky, Cs., Melegh, B., Analysis of GCKR and ApoA5 genes in Hungarian patients with ischemic stroke, *European Human Genetics Conference*, Vienna (Austria), 23rd - 26th May 2009.

Összesített impakt faktor (citálható absztraktok nélkül): 32.34