

PHD ÉRTEKEZÉS

**LIPID ÉS GLÜKÓZ METABOLIZMUST BEFOLYÁSOLÓ
POLIMORFIZMUSOK VIZSGÁLATA ELHÍZOTT GYERMEK
POPULÁCIÓS MINTÁKBAN**

Horvatovich Katalin

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Orvosi Genetikai Intézet**



Témavezető: Dr. Melegh Béla

Pécs

2011

TARTALOMJEGYZÉK

1	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
2	BEVEZETÉS	5
2.1	A gyermekkori elhízás kapcsolata kardiovaszkuláris betegségekkel.....	8
2.2	Molekuláris genetikai háttér.....	12
2.2.1	Az apolipoprotein A-5 (APOA5).....	14
2.2.2	A glükokináz regulátor enzim génje (GCKR).....	18
3	VIZSGÁLATI CÉLKITŰZÉSEK	20
3.1	APOA5 gén polimorfizmusainak, haplocsoportjainak vizsgálata.....	20
3.2	GCKR gén polimorfizmusainak vizsgálata.....	21
4	BETEGEK ÉS MÓDSZEREK	22
4.1	A vizsgált betegpopuláció jellemzői.....	22
4.2	Antropológiai mérések és klinikai paraméterek.....	22
4.3	Elhízás definiálása.....	23
4.4	Genotípus elemzés.....	23
4.4.1	APOA5 gén polimorfizmusainak detektálása haplocsoport analízishez.....	24
4.4.2	A GCKR gén polimorfizmusainak detektálása.....	25
4.5	Statisztikai elemzés.....	26
4.6	A linkage disequilibrium (LD-blokk) számítások.....	26
5	EREDMÉNYEK	27
5.1	Apolipoprotein A5 gén haplocsoport (APOA5) analízise.....	27
5.2	A glükokináz regulátor gén vizsgálata (GCKR).....	33
6	EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE ÉS KÖVETKEZTETÉSEK	37
6.1	Az APOA5 gén polimorfizmusainak és haplocsoportjainak szerepe.....	37
6.2	A GCKR gén polimorfizmusainak egyedi szerepe.....	40
7	EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	43
8	PUBLIKÁCIÓS LISTA	44
8.1	AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK.....	44
8.2	EGYÉB KÖZLEMÉNYEK.....	44
8.3	IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK.....	47
9	IRODALOMJEGYZÉK	50
10	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	64

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADA	American Diabetes Association
APOA1	apolipoprotein A1
APOA4	apolipoprotein A4
APOA5	apolipoprotein A5
APOC2	apolipoprotein C2
APOC3	apolipoprotein C3
BMI	body mass index - testtömeg index
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CM	kilomikron
D.E.S.I.R.	Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance syndrome
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
FFA	free fatty acid – szabad zsírsav
GCK	glükokináz enzim
GCKR	glükokináz regulátor
GPIHBP1	glycosylphosphatidylinositol high-density lipoprotein binding protein 1
GWAS	genome wide association study - genomi asszociációs tanulmány
HAPSTAT	haplotype statistic - haplocsoport statisztika
HDL	high-density lipoprotein
HOMA-IR	homeostasis model assessment of insulinresistance
HSPG	heparan sulfate proteoglycan
HTG	hipertriglyceridaemia
IDDM	inzulin-dependens diabétesz mellitusz
IDF	International Diabetes Federation
IOTF	International Obesity Task Force
LADA	latent onset diabetes in adults
LD	linkage disequilibrium
LDL	Low density lipoprotein
LDLR	LDL receptor
LPL	lipoprotein lipáz
MAF	minor allél frekvencia
MS	metabolic syndrome - metabolikus szindróma
NCEP	National Cholesterol Education Program

NIDDM	nem inzulin-dependens diabétesz mellitusz
NHANES	National Health and Nutrition Examination Surveys
NHBPEP	National High Blood Pressure Education Program
NGHS	Northeast Georgia Health System
NTG	normál triglicerid
OÉTI	Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet
PCR	polymerase chain reaction - polimeráz láncreakció
PROCAM	Prospective Cardiovascular Münster Study
RFLP	restriction fragment length polymorphism - restrikciós fragment hosszúság polimorfizmus
SNP	single nucleotide polymorphism - egy pontos nukleotid polimorfizmus
T2DM	type 2 of diabetes mellitus - 2-es típusú diabétesz mellitusz
TG	triglicerid
VLDL	Very low density lipoprotein
WC	waist circumference - derékkörfogat
WHO	World Health Organisation - Egészségügyi Világszervezet

2 BEVEZETÉS

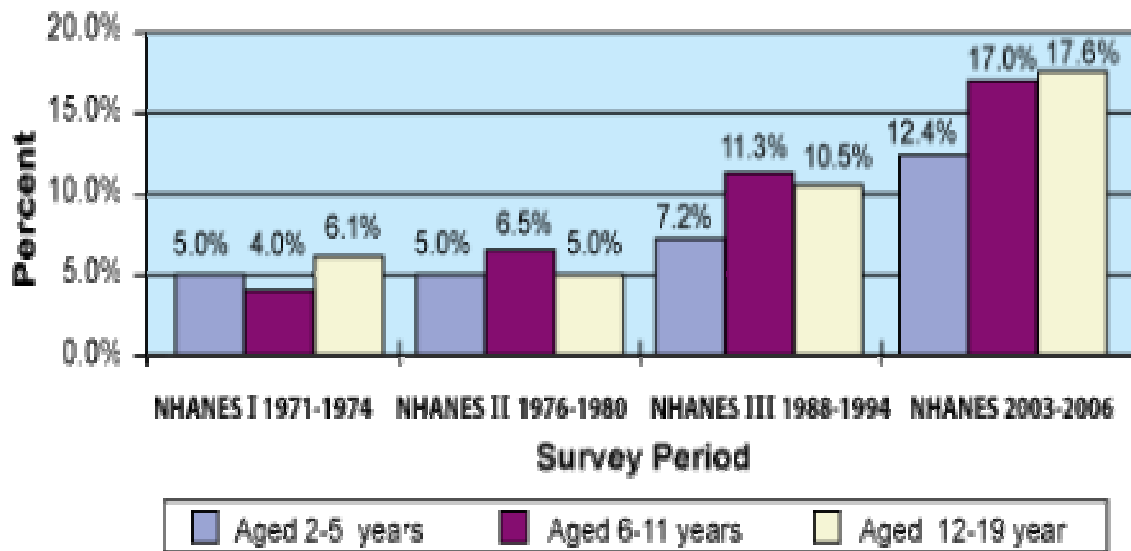
A szervezet energiaigényénél nagyobb kalóriájú tápanyagbevitel és mozgásszegény életmód miatt egyre elterjedtebb a túlsúlyosság gyermek és serdülőkorban, ami mára epidemiológiai jelentőségűvé vált. Az elhízás problémája Európában és világszerte riasztó, járványos méreteket öltött, ezért a World Health Organisation (WHO) az elhízást a nyugati fejlett és fejlődő kultúrák tíz legsúlyosabb egészségügyi problémája között tartja számon, melyet a globális szó hozzákapcsolásával globesity-nek nevezett el. 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 2004-ben végzett felmérések alapján az egész világon körülbelül 22 millióra becsüli az öt év alatti túlsúlyos vagy elhízott gyermekek számát. Az International Obesity Task Force (IOTF) felmérése szerint világszerte az 5-17 év közötti iskolás gyermekek 2-3 %-a (35-40 millió) tekinthető elhízottnak (60). Széleskörű epidemiológiai vizsgálatok azt mutatják, hogy Európában (1. táblázat), Amerikában (1971-2006 év között, 1. ábra) és Ázsiában a gyermekkori túlsúly és elhízás prevalenciája már 10-20% közé tehető (42, 58). Magyarországon az iskolás gyermekek között az elhízás prevalenciája az 1980-as és 1990-es évek között elérte a 15%-ot (43). Napjainkban az Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet (OÉTI) legutóbbi felmérése alapján a 7-14 éves fiúk 18 százaléka, a lányoknak pedig 20 százaléka túlsúlyos, emellett a fiúk 7,5 százaléka és a lányok 6 százaléka tekinthető elhízottnak (86).

Irodalmi adatok szerint az elhízott gyermekek 58%-ánál társult kockázati tényezők is jelen lehetnek (magas vérzsír szint, magasabb vérnyomás vagy inzulinrezisztencia) (10).

A gyermekkori leginkább célravezető, ún. etiológiai (oki) osztályozás szerint az elhízás két nagy csoportja különböztethető meg, az esetek 95 %-át adó exogén (elsődleges, egyszerű, idiopátiás) és az 5%-ban előforduló másodlagos elhízás (www.diabetesonline.hu). A másodlagos típus egy részében endokrin okok közvetlenül vezetnek elhízáshoz (pl. a pajzsmirigy alulműködése), de ide tartoznak pszichiátriai rendellenességek, bizonyos gyógyszerek okozta elhízásformák és genetikai betegségek. A genetikai kutatásoknak köszönhetően egyre nő az elhízás azon másodlagos formáinak száma, melyek öröklődésmenete és pontos genetikai háttere ismert (www.diabetesonline.hu). 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 (www.diabetesonline.hu). A genom szintű kapcsoltság és társulásvizsgálatok segítik az elhízásra hajlamosító genetikai variánsok feltárását. Ma már kb. 200 olyan, 12 különböző kromoszómán

elhelyezkedő kandidátus (hajlamosító) gén, lókuszt vagy kromoszómarégió ismert, melyek kapcsolatba hozhatók az elhízással. Feltételezhető, hogy egyes kandidátus gének a modern (az elhízást elősegítő) környezetben jutnak érvényre, és ez okozza az elhízás „járványát” (www.diabetesonline.hu).

**Elhízás prevalenciája* Amerikai gyermek és serdülők körében az életkor függvényében (Kor 2 –19 év)
National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES)**



*Nem-és kor-specifikus BMI \geq 95-ös percentilis CDC növekedési grafikonjai alapján.
Forrás: www.cdc.gov. NHANES data on the Prevalence of Overweight Among Children and Adolescents: United States, 2003–2006. CDC National Center for Health Statistics, Health E-Stat.

1. ábra: Az elhízás prevalenciája gyermek- és serdülőkorban az Egyesült Államokban.

Az ábrán a NHANES által végzett epidemiológiai vizsgálatok adatai láthatóak.

1. táblázat: A gyermekkori elhízás prevalenciája Európában IOTF (International Obesity task Force) összegyűjtött adatai alapján 10 éves kor körüli gyermekek körében.

	túlsúlyos és elhízott (%)	Vizsgálat dátuma	Gyermek kor/mintaszám.	Forrás
Belgium	18%*	1992	8-10 / 348	M Guillaume et al, <i>IJO</i> , 19, S5-S9, 1995
Bulgária	20%	2000	10 / 618	S Petrova et al, <i>Hygiene and Public H</i> , XIV, 2001
Horvátország	27%*	1998	10 / 581	Antoinette Kaic-Rak to IOTF/GBD
Csehország	16%	2000	7-11 / 3345	Jana Vignerova, NIPH Prague
Dánia	18%	1998	10 / 319	Anne Nielsen to IOTF/GBD
Finnország	13%*	1999	7-12 / 33000	M Fogelholm, <i>IJOB</i> , 23, 1262-1268, 1999
Franciaország	18%	2000	7-9.9 / 1582	M-F R-Cachera, et al, (<i>IJO</i> in press)
Németország	15%	1995	10 / 2960	(Kromeyer-Hauschild) to IOTF/GBD
Görögország	31%	2000	6-10 / 1226	GE Krassas et al, <i>JPedEndMet</i> 14, 2001
Magyarország	18%	1993-4	10 / 232	Cole, Bellizzi IOTF, <i>BMJ</i> , 2000 (19)
Olaszország	36%	2001	9 / 41149	M Caroli et al to IOTF unpub
Málta	35%	1992	10 / 519	Bellizzi IOTF Ministry of Health, Malta, 1992
Hollandia	14%*	1997	10 / ~700	AM Frederiks et al, <i>ArchDisCh</i> , 82, 2000
Norvégia	21%	1996	10 / 174	S Tonstad, M Sivertsen <i>ArchDisCh</i> 76, 416-420 1997
Lengyelország	19%	1996-99	10 / 250	I Palczewska to IOTF/GBD
Szlovákia	10%	1995-99	11 / 635	K Babinska, A Bederova to IOTF/GBD
Spanyolország	30%	1998-2000	6-13 / 970	LS Majem et al Factors in Childhood Obesity (book) Barcelona, 2001.
Svédország	18%	2000-01	10 / 6700	Staffan Marild to IOTF unpub
Svájc	16%	1999	9-10 / ~90	M Zimmerman et al, <i>EuJClinNut</i> , 54, 568-572 2000
Anglia	22%*	1998	10 / 257	Health Survey for England 1999

*BMI± SD paraméteren alapuló becslés

2.1 A gyermekkori elhízás kapcsolata kardiovaszkuláris betegségekkel

Irodalmi adatok igazolják, hogy a gyermekkori elhízás kritikus szerepet játszik az ateroszklerózis és a metabolikus szindróma (MS) korai kialakulásában, amely jelentősen megnöveli a nem-inzulin-dependens diabétesz mellitusz és a kardiovaszkuláris betegségek (CVD) kockázatát (50, 134). Bár az elhízáshoz társuló kórképek többsége jellemzően felnőttkorban jelenik meg, az obezitás bizonyos ateroszklerotikus következményei már gyermek- és serdülőkorban elkezdődnek (9, 117), továbbá klinikai vizsgálatok azt mutatják, hogy a fokozott kardiovaszkuláris kockázat már az intrauterin időszakban is fennállhat (62). Prospektív vizsgálatok egyértelműen bizonyították, hogy a gyermekkori elhízás - a felnőttkori testsúlytól függetlenül is – lényegesen befolyásolja a felnőttkori megbetegedést és halálozást (22). Irodalmi adatok szerint az elhízott gyermekekben is kimutathatóak olyan szív-érrendszeri rizikófaktorok, mint a dyslipidemia (emelkedett koleszterin és triglicerid koncentráció), hipertónia, glükóz intolerancia, 2-es típusú diabétesz és a zsírmáj jelenléte (14, 34, 137. 138). Ezen faktorok együttes előfordulása jellemző a metabolikus szindróma fellépése esetén (14, 34, 137. 138). Az elhízás és MS kialakulásának hátterében a környezeti faktorok, beleértve a táplálkozási szokásokat és az életstílust (csökkent fizikai aktivitás, fokozott zsír- és szénhidrátfogyasztás), és a genetikai tényezők állnak (37). Az MS 7-30%-ban fordul elő a kaukázusi felnőtt populációkban (17). A betegség gyermek és fiatalkori prevalenciájára vonatkozóan igen kevés adat áll rendelkezésre. Epidemiológiai vizsgálatok során Magyarországon a 8-18 év közötti elhízott serdülők 8,9%-ánál (20), míg Amerikában a 12-19 év közötti elhízott serdülők 28,7%-ánál és a 8-13 éves elhízott gyermekek 30%-ánál detektálták a metabolikus szindrómát (125, 127) (www.americanheart.org). 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 (96). További különböző klinikai vizsgálatok azt mutatják, hogy a gyermekkorban már fennálló MS kb. 25–60%-ban perzisztál felnőttkorra (125, 141, 142). Ami a metabolikus szindróma definícióját illeti, a felnőttekre nézve több kritérium rendszer is rendelkezésre áll, míg a gyermek és serdülőkori betegség definíciójára még nem született általánosan elfogadott konszenzus, habár néhány tanulmány segítséget nyújt az azonosításhoz (14, 122) (2. táblázat).

2. táblázat. A gyermekkorban fellépő metabolikus szindróma definíciójával kapcsolatos határértékek bemutatása néhány publikált tanulmányban.

	Cook et al. <i>Arch Pediatr Adolesc Med</i> , 2003; 157, 821-27 (125)	de Ferranti et al. <i>Circulation</i> , 2004; 110, 2494-97 (127)	Cruz et al. <i>J Clin Endocrinol Metab</i> , 2004; 89, 108-13 (126)	Weiss et al. N Engl J Med , 2004; 350, 2362-74 (117)	Ford et al. <i>Diabetes Care</i> , 2005; 28, 878-81 (129)
Három vagy több a következők közül:					
1.	Éhgyomri glükóz ≥110 mg/dL	Éhgyomri glükóz ≥6.1 mmol/L (≥110 mg/dL)	Csökkent glükóz tolerancia (ADA kritérium)	Csökkent glükóz tolerancia (ADA kritérium)	Éhgyomri glükóz ≥110 mg/dL (további elemzés szerint ≥100 mg/dL)
2.	WC (derékkörfogat) ≥90-es percentilis (kor- és nem-specifikus) <i>NHANES III</i>	WC (derékkörfogat) >75-ös percentilis	WC (derékkörfogat) ≥90-es percentilis (kor-, nem- és rassz-specifikus) <i>NHANES III</i>	BMI -Z érték* ≥2.0 (kor- és nem-specifikus)	WC (derékkörfogat) ≥90-es percentilis (nem-specifikus) <i>NHANES III</i>
3.	Triglicerid ≥110 mg/dL (kor-specifikus) <i>NCEP</i>	Triglicerid ≥1.1 mmol/L (≥100 mg/dL)	Triglicerid ≥90-es percentilis (kor- és nem-specifikus) <i>NHANES III</i>	Triglicerid >95-ös percentilis (kor-, nem- és rassz-specifikus) <i>NGHS</i>	Triglicerid ≥110 mg/dL (kor-specifikus) <i>NCEP</i>
4.	HDL-C ≤40 mg/dL (összes kor/nem) <i>NCEP</i>	HDL-C <1.3 mmol/L (<50 mg/dL)	HDL-C ≤10-es percentilis (kor- és nem-specifikus) <i>NHANES III</i>	HDL-C <5-ös percentilis (kor-, nem- és rassz-specifikus) <i>NGHS</i>	HDL-C ≤40 mg/dL (összes kor/nem) <i>NCEP</i>
5.	Vérnyomás ≥90-es percentilis (kor-, nem- és magasság-specifikus) <i>NHBPEP</i>	Vérnyomás >90-es percentilis	Vérnyomás >90-es percentilis (kor-, nem- és magasság-specifikus) <i>NHBPEP</i>	Vérnyomás >95-ös percentilis (kor-, nem- és magasság-specifikus) <i>NHBPEP</i>	Vérnyomás ≥90-es percentilis (kor-, nem- és magasság-specifikus) <i>NHBPEP</i>

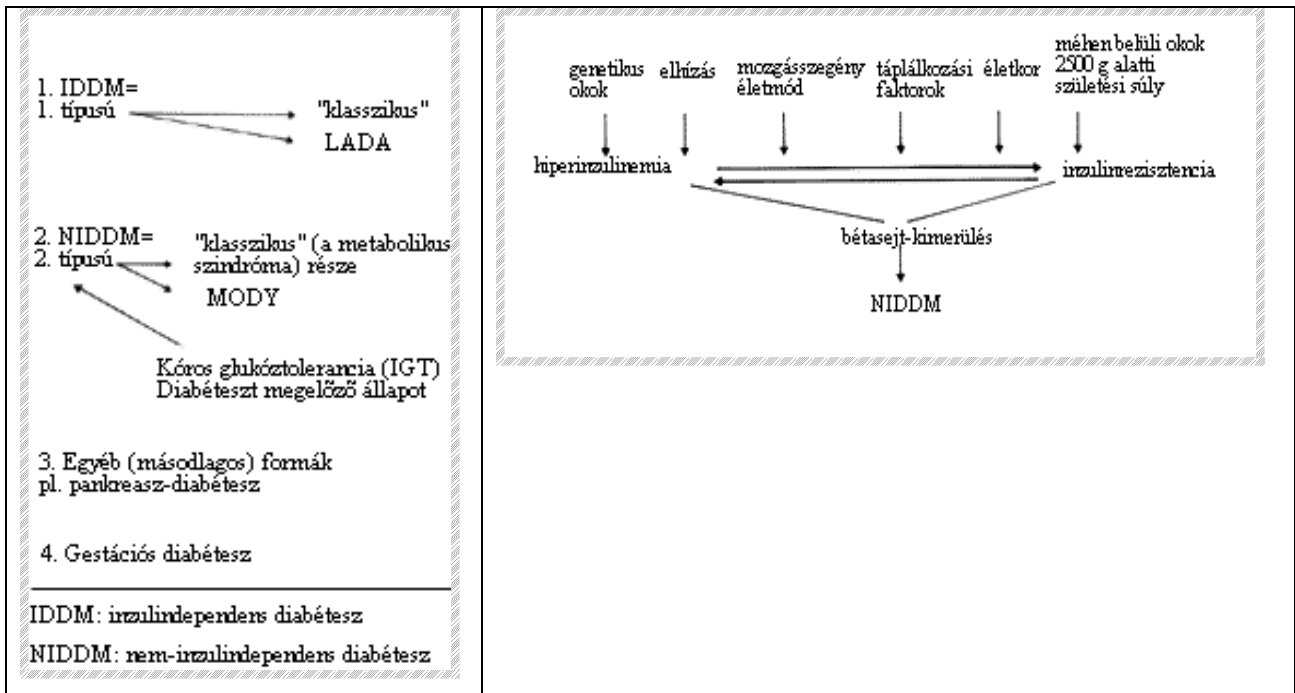
*Z érték: a mintaelem értékének standardizált pontszáma, azt adja meg, hogy a mintaelem értékének az átlagtól való eltérése hányszorosa a standard deviációnak.

Forrás: www.idf.org,

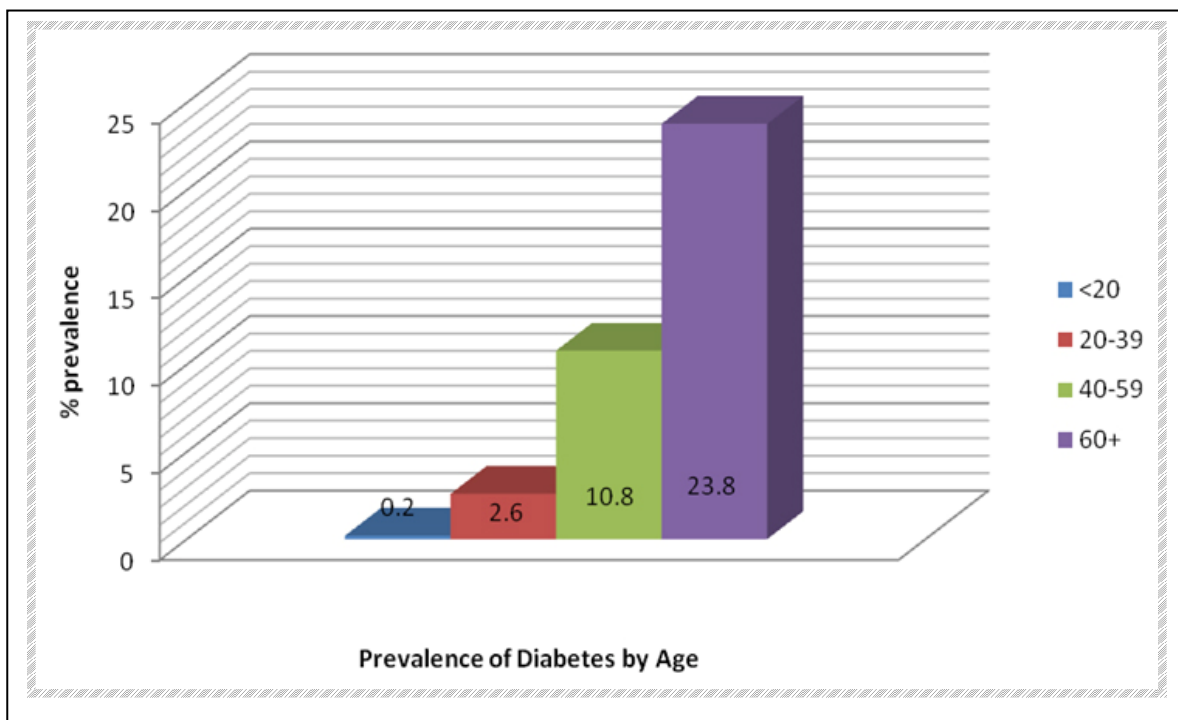
A 2-es típusú diabétesz klasszikus példája a környezeti, viselkedési és genetikai hatások közötti kölcsönhatások eredményeképpen létrejött komplex betegségeknek (128, 131, 135, 136). Alapos bizonyíték van rá, hogy az elhízás a betegség egyik fő kiváltó nem-genetikai tényezője (44, 66). Az elhízással kapcsolatos kedvezőtlen tendencia a 2-es típusú diabétesz mellitusz (T2DM) gyermek- és serdülőkorban való megjelenése is (29, 134). A 2-es típusú diabéteszben szenvedők 80%-a túlsúlyos (<http://diabetes.niddk.nih.gov>). A betegség érinti a szénhidrát-, a lipid-, sőt a fehérje és a nukleinsav-anyagcserét is. A kórképet kezdetben hiperinzulinémia jellemzi, majd hipertónia lép fel, és sokszor kísérik kardiovaszkuláris megbetegedések (36). A 2. ábra mutatja be a cukorbetegségek típusait és a T2DM kialakulásának a kóroki hátterét. Egy 2007-es Amerikai Egyesült Államokban végzett felmérés szerint a T2DM előfordulási gyakorisága a 20 év alatti korosztálynál eléri a 2 %-ot (3. ábra).

Az utóbbi években egyes populációkban járványszerű mértékben növekedett a gyermek- és serdülőkori T2DM esetek száma, arányuk megközelíti az új megbetegedések 50%-át (61, 76, 88). A T2DM gyermek- és serdülőkori előfordulása mindegyik etnikai csoportot érinti, de egyeseket jobban, mint másokat: elsősorban ott figyelhető meg, ahol a felnőttkori esetek száma is jelentős (61). Ezt először a pima indiánok körében észlelték, ahol a T2DM incidenciája a legnagyobb értéket mutatta a világon (29, 76). A pima indián gyermekek között a T2DM előfordulási aránya nagyobb, mint az átlagnépességben, és ez az arány az életkorral tovább nő (29, 76). Az 1980-as évek végétől az 1990-es évek közepéig a T2DM előfordulási aránya 54%-kal nőtt a tizenéves pima indiánok körében (29, 76). Hasonló növekedésről számoltak be japán, ázsiai-amerikai, mexikói-amerikai és afroamerikai gyermekek esetében is (29, 88). Egyes adatok szerint a mexikói-amerikai származású cukorbeteg gyermekek 21%-a T2DM-ban szenved (88). Több intézet adatai szerint a T2DM-ban szenvedő gyermekek 69%-a afroamerikai származású (61, 76, 88).

A T2DM öröklődési formája lehet monogénes vagy poligénes (www.cdc.gov) (88). Az igen ritka előfordulású monogénes formához az autoszómális domináns öröklődésű 2-MODY (maturity-onset type 2 diabetes of the young), valamint az anyai öröklődésű, ún. mitokondriális diabétesz szindrómák tartoznak, az utóbbiak súlyos fejlődési rendellenességekkel járnak együtt (www.cdc.gov) (88). Genetikai vizsgálatok során azonosították ezen monogénes típusú formák hátterében álló géneket és lókuszeket (www.cdc.gov). A poligénes öröklődésű diabéteszhez kapcsolódó genetikai vizsgálatokat napjainkig szinte kizárólag felnőtt betegeken végezték el, a legjelentősebbnek eddig a 2-es kromoszóma ún. NIDDM1 (nem inzulin dependens diabétesz mellitusz 1) lókusza bizonyult, amely mexikói etnikumú családok diabéteszes tagjaiban 30%-ban volt kimutatható (88).



2. ábra. A cukorbetegségek típusai és a 2-es típusú diabétesz mellitusz kialakulásának kóroktana. LADA: latent onset diabetes in adults. Forrás: www.kfki.hu



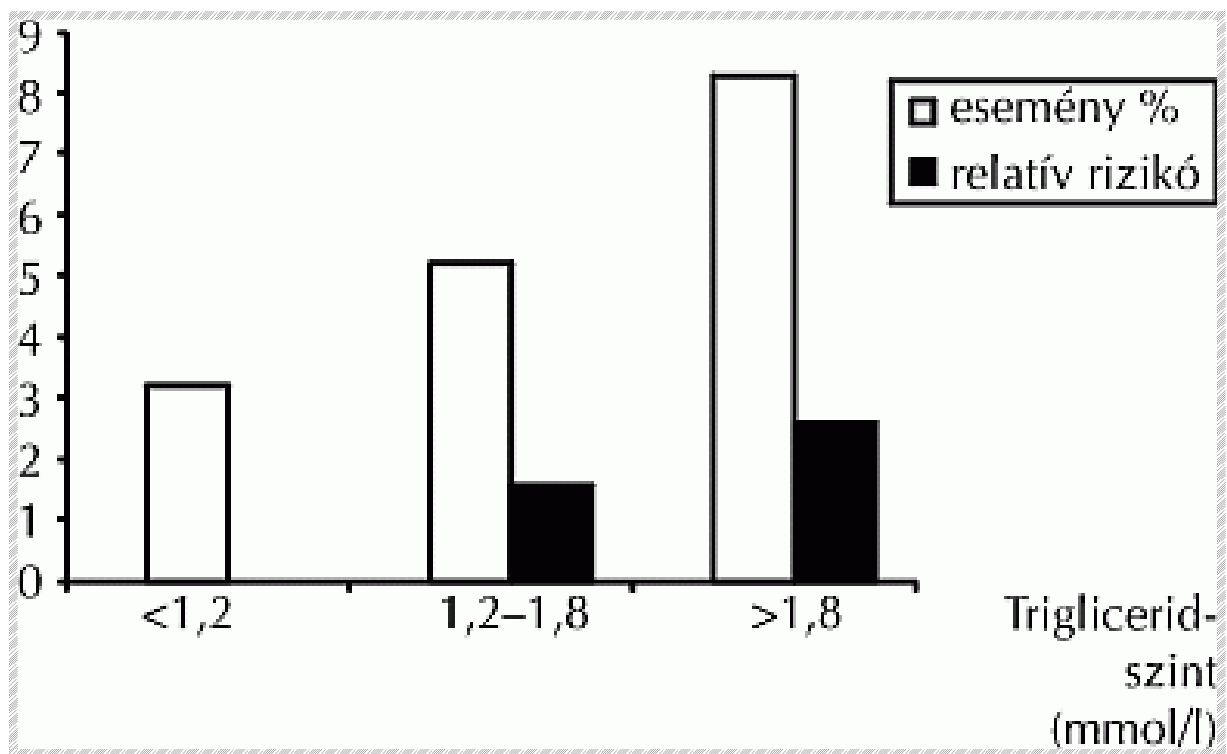
3. ábra: A 2-es típusú diabétesz mellitusz prevalenciája az életkor függvényében az Egyesült Államokban (2007-es becslés).

Forrás: www.img.medscape.com

2.2 Molekuláris genetikai háttér

Az elhízás környezeti (helytelen táplálkozási szokások vagy csökkent fizikai aktivitás) valamint öröklődő tényezők kölcsönhatásának eredménye. Különböző vizsgálatok bizonyították, hogy a testsúly variabilitás 30-80%-a genetikailag meghatározott (52). Az elhízás molekuláris markereinek vizsgálata rövid múltat tekint vissza, de az obezitással kapcsolatos genetikai ismereteink az elmúlt évtizedben jelentősen bővültek. A genetikai tényezők közül kiemelt jelentőséggel bírnak a glükóz- és lipidmetabolizmusban résztvevő fehérjéket kódoló gének defektusai, melyek a glükóz- és lipidháztartás zavarát okozzák, és következményesen szív- és érrendszeri károsodást eredményeznek (112). A viscerális típusú elhízás súlyos anyagcsere-abnormalitást okoz (112). Ennél az elhízás típusnál, a portális vénán keresztül emelkedett szabadzsírsav készlet kerül a májba, amely nagymértékben módosítja a máj lipid és szénhidrát anyagcseréjét, fokozva ezzel a glükoneogenezist és a trigliceridgazdag VLDL (very low density lipoprotein) szintézist (112). Emellett a megnövekedett szabad zsírsav gátolja az inzulin hatását és az inzulin clearance gátlás révén hiperinzulinémia és inzulinrezisztencia kialakulásához vezet (112).

Számos tanulmányban az emelkedett triglicerid-szint hajlamosító tényezőnek bizonyult a kardiovaszkuláris megbetegedések manifesztációjában (6, 51, 69), ezért a vizsgálatok kiterjedtek a gének által kifejtett közvetett hatásokra, így a triglicerid-szint változásokra is (99, 118). A 4. ábra egy nyolc évig tartó tanulmány triglicerid-szint és a koronária rizikó közötti kapcsolatra vonatkozó adatait mutatja be (6).

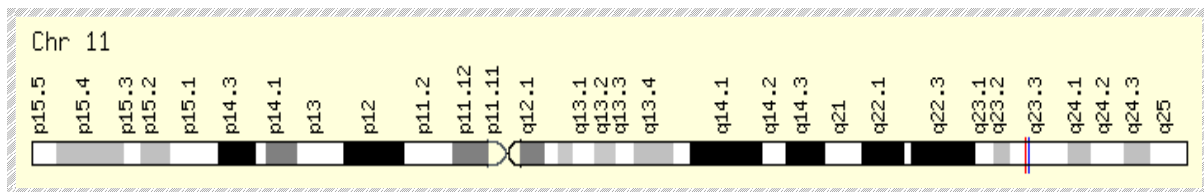


4. ábra. A triglicerid-szint emelkedése együtt jár a koronária események számának emelkedésével (százalékos előfordulás). A triglicerid 1,8 mmol/l szintje esetén a relatív rizikó már meghaladja a kétszeres értéket. PROCAM (Prospective Cardiovascular Münster Study) tanulmány (6).

2.2.1 Az apolipoprotein A5 (APOA5)

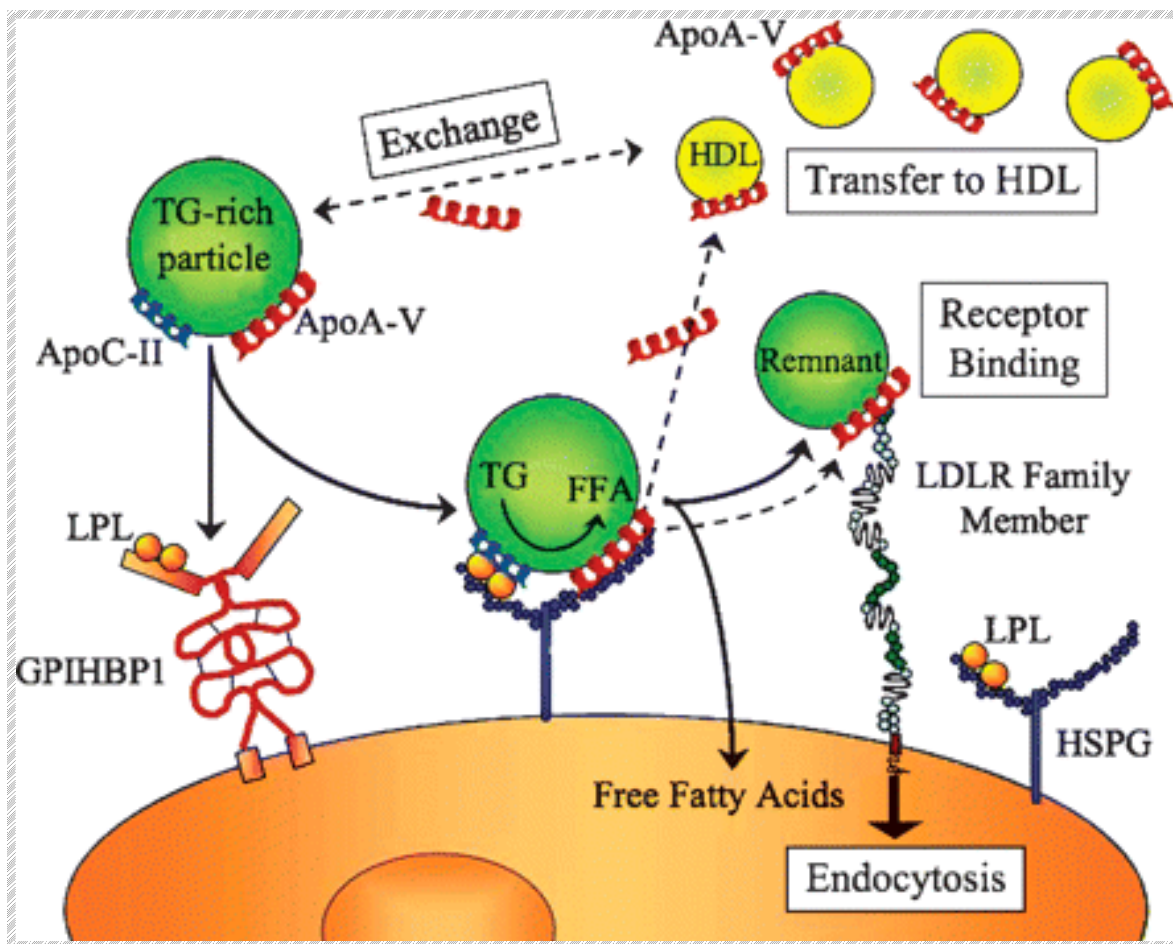
A 11-es kromoszómán található *APOA1-C3-A4-A5* gén család tartalmaz legalább három olyan gént, amely befolyásolja a plazma lipoprotein metabolizmusát (56, 59). Az elmúlt közel két évtizedben a legtöbb tanulmány az *APOA1* szerepével foglalkozott, amely befolyásolja a HDL szintézis mértékét (31), illetve az *APOC3* kutatása is előtérbe került, ugyanis a génben előforduló polimorfizmus szerepet játszik a plazma triglicerid szintjének modulációjában (16). A 80-as években kezdték vizsgálni az *APOA4* gént, amelyről kiderült, hogy kapcsolatban áll a kilomikron és HDL partikulumok képződésével (116). Ezen kívül számos tanulmány kiderítette, hogy ez a gén fontos szerepet játszik a postprandiális lipoproteinémia és a szív és érrendszeri betegségek kialakulásában (49, 55).

Az apolipoprotein család legújabb tagját, az apolipoprotein A5 (*APOA5*) gént az egér és humán genom összehasonlító szekvenálása során fedezték fel 2001-ben (83). Az *APOA5* gén vizsgálatai fényt derítettek arra, hogy ennek a génnek szignifikáns szerepe van a lipidek és lipoproteinek modulációjában (83). A humán *APOA5* gént az *APOA1-APOC3-APOA4* génklasztertől 27 kb távolságra azonosították a 11q23-as kromoszómális régióban (83) (5.ábra).



5. ábra: Az *APOA5* gén lokalizációja a 11-es kromoszómán. Az ábrán függőleges piros vonal jelzi a 2q23.3 pozícióban elhelyezkedő *APOA5* gént (forrás: www.ncbi.nih.gov).

A négy exont tartalmazó *APOA5* gén egy 366 aminosavból álló, 39kDa molekulású polipeptidet kódol, amely a májban történő expresszáldását követően a HDL és VLDL alkotórészeként a plazmába szekretálódik, ahol központi szabályozó hatást fejt ki a triglicerid metabolizmusára (41, 85). A 6. ábra mutatja be az ApoA-V fehérje triglicerid metabolizmusára kifejtett hatását (6. ábra)



Forrás: www.nature.berkeley.edu (119)

6. ábra. Az APOA-V fehérjének a TG-ben gazdag lipoprotein anyagcserére irányuló, feltételezett extracelluláris hatásai:

Az ApoA-V kölcsönhatása a heparin-szulfát-proteoglikánnal (HSPGs) megkönnyíti a lipoprotein lipáz (LPL) apoC-II-re ható aktiválását, ami gyorsított TG hidrolízist eredményez (33, 119). A TG-ben gazdag lipoproteinek [VLDL és kilomikronok (CM)] lebontása során keletkezett maradék partikulum az ApoA-V fehérje disszociációját eredményezi a TG-ben gazdag partikulumokról, ezt követően az ApoA-V fehérje rákapcsolódik a HDL partikulumra, ahol addig marad, amíg a plazmában vissza nem kerül az ott keletkező TG-ben gazdag lipoproteinek (33, 119). Az ApoA-V kapcsolódása a GPIHBP1 (glycosylphosphatidylinositol high-density lipoprotein binding protein 1) proteinhez megkönnyítheti a TG szabadzsírsavakra (FFA) történő hidrolízisét a CM-ban (33, 119). A GPIHBP1 fehérje homodimert alkot, melynek negatív töltésű doménjei hozzákötődnek az LPL és az ApoA-V fehérjékhez, amely a CM hatékony lipolitikus folyamatát eredményezi (82). Az ApoA-V kölcsönhatása az LDLR (LDL receptor) család tagjaival megkönnyítheti a maradék lipoprotein részecskék endocitózisát (33, 119). Folytonos nyilak jelzik a lipoprotein részecskék útját; szaggatott nyilak jelzik az ApoA-V molekula útját.

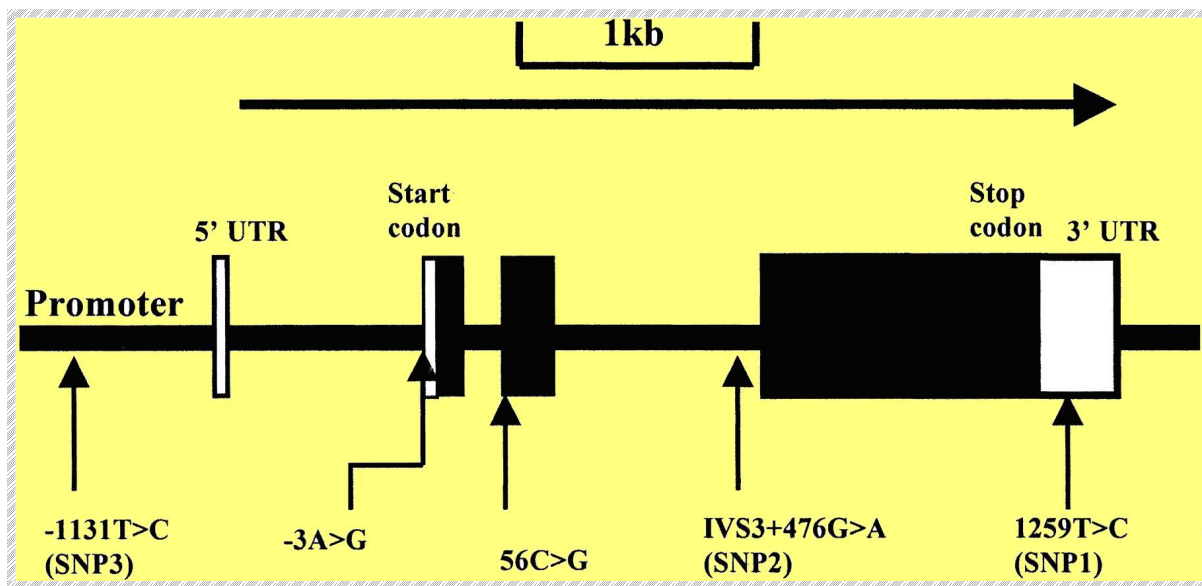
Számos különböző felnőtt populációt vizsgáló tanulmány bizonyítottan leírta, hogy az *APOA5* gén variánsainak jelenléte [*T-1131C* (rs662799), *IVS3+G476A* (rs2072560), *T1259C* (rs2266788) és *C56G* (rs3135506)] emelkedett triglicerid koncentrációt eredményez (4, 54, 84). A *T-1131C* az *APOA5* gén promóter régiójában, a *T1259C* a 3' nem transzlálódó régiójában, az *IVS3+G476A* a 3. intronban, míg a *C56G* a 3. exonban található (83). Felnőtt betegpopulációkban végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a *-1131C* allél hajlamosító tényezőként hat a szívkoszorúér betegség, a stroke és a metabolikus szindróma kialakulásában (47, 94, 121). Az *APOA5* gén vizsgálatai során kiderítették, hogy a gén természetes variánsai által determinált haplocsoportok fontosabb, komplexebb hatással bírnak a lipid paraméterekre és egyes haplocsoportok szoros genetikai kapcsoltságban állnak az *APOC3* gén természetes variánsaival (80).

Egészséges, felnőtt, kaukázusi populációban végzett haplocsoport analízisek azt mutatták, hogy az *APOA5**2 (*-1131C*, *IVS3+476A* és *1259C*) és *3 (*-1131T*, *IVS3+476G*, *1259T*, *56G*) haplotípusok kockázati tényezőt jelentenek különböző kardiovaszkuláris betegségek kialakulására (74). Ezen felül, az *APOA5**2 haplotípus jelenléte felnőtt MS populációban az *APOA5* haplotípusok közül kizárólagos hajlamosító kockázatot mutatott a metabolikus szindróma kialakulására (54). Gyermekek tekintetében a szakirodalom kevés információt nyújt az *APOA5* gén haplocsoport-jelölő polimorfizmusainak prevalenciáját illetően (28).

Mindezen túl, az *APOA5* haplocsoportok lehetséges hajlamosító hatásait elhízott gyermekekben még eddig nem vizsgálták. Ez arra ösztönzött minket, hogy magyar elhízott gyermekekben megvizsgáljuk az *APOA5* gén természetes haplocsoportjainak előfordulási gyakoriságát, továbbá, hogy tanulmányozzuk a klinikai paraméterekre és az elhízásra kifejtett hatását.

3. táblázat. Az Apolipoprotein A5 (APOA5) gén haplotípusai. *a pirossal jelölt betűk a variánst jelentik.

Haplotípusok	<i>T-1131C*</i>	<i>IVS3+ G476A*</i>	<i>T1259C*</i>	<i>C56G*</i>
<i>APOA5*1</i>	T	G	T	C
<i>APOA5*2</i>	C	A	C	C
<i>APOA5*3</i>	T	G	T	G
<i>APOA5*4</i>	C	G	T	C
<i>APOA5*5</i>	T	G	C	C



7. ábra Az Apolipoprotein A5 (APOA5) gén variánsainak elhelyezkedése a 11q23 kromoszómális régióban.

Forrás: www.jlr.org

2.2.2 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) 68 kDa molekulásúlyú, és a máj kulcsfontosságú glükokináz (GCK, hexokináz IV) enzimének működését szabályozza (24, 65, 91, 102, 104, 107). A glükokináz enzim központi szerepet játszik a vér glükóz-homeosztázisában, valamint a májsejtekben, és a hasnyálmirigy β -sejtjeiben a glükóz-foszforilációt végzi (2, 23, 24, 91, 107). A glükóz-szenzorként működő enzim közvetve fokozza a májban a glükóz metabolizmusát és a hasnyálmirigy β -sejtjeinek inzulin-szekrécióját (2, 113).

A GCKR protein regulátor- és receptorfehérjeként egyaránt szerepet játszik a GCK enzim működésében (104, 114, 123, 124, 130, 132). A glükokináz-regulátor protein negatívan szabályozza a GCK enzim aktivitását: reverzibilisen hozzákötődve inaktív komplexet alkot, amely képes a sejtmagba jutni (39, 48). A sejtmagban a komplexképzés révén a GCKR protein stabilizálja és védi a GCK enzimet a degradációtól (3, 30, 35, 39, 48). A vér glükóz szintje befolyásolja a komplex képződését (13, 15, 18). A vér magas glükóz koncentrációja esetén (>10mM), a glükóz a GLUT2 transzporterrel keresztül bejut a májsejtbe, ahol aktiválja a GCK enzimet, aminek következtében a glükóz foszforilálódik (13, 15, 18). A glükóz szint drasztikus csökkenése (éhezés, 5 mM alatti koncentráció) és/vagy a fruktóz-6-foszfát jelenléte előidézi a GCKR protein GCK enzim működésére irányuló inhibitor funkcióját (103, 106). A sejtmagban a GCKR-GCK inaktív komplex addig marad fent, amíg a sejtplazma glükóz koncentrációja meg nem emelkedik, a glükóz át nem áramlik a nukleáris pórusokon keresztül a sejtmagba, melynek hatására a GCK disszociál a GCKR proteintól és visszaáramlik a sejtplazmába, ahol megindul a glükóz-foszforiláció (103, 106). A GCKR szabad ligand-kötőhelyére a fruktóz-1-foszfát kapcsolódik megakadályozva a protein glükokináz enzimre irányuló gátló funkcióját (103, 106). *In vitro* kísérletek megerősítették, hogy a GCKR mind a GCK protein expresszióját, mind az enzimaktivitását képes fokozni (92).

Az elmúlt években végzett genomi asszociációs tanulmányok (GWAS, genome-wide association studies) eredményei szoros összefüggést mutattak ki a *GCKR* gén több funkcionális variánsa és a hipertrigliceridemia között (90, 110, 111). 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 (81, 90, 109). A glükokináz enzim

aktivitásának fokozása (vagy kevésbé hatékony gátlása) segítséget nyújthat a 2-es típusú diabétesz terápiás stratégiájának felépítésében (27, 35, 40, 64).

A *GCKR* gén két leggyakrabban vizsgált polimorfizmusa az intronikus (intron 16) rs780094 variáns és az exonikus (exon 15) rs1260326 (*I337T*) variáns, mely a 446. aminosavpozícióban prolin-leucin cserét eredményez (P446L). A 2-es típusú diabéteszre irányuló GWAS vizsgálatok kimutatták, hogy az intronikus rs780094 polimorfizmus közvetve magas triglicerid koncentrációval, alacsony glükóz szinttel és csökkent inzulin rezisztenciával van összefüggésben (87, 90, 93). Ezen felül az rs780094 A allél hordozása kisebb kockázatot mutatott a 2-es típusú diabétesz kialakulására nézve (87, 93).

Vaxillaire és mtsai korábban azt tapasztalták, hogy a *GCKR* gén exonikus rs1260326 variánsa szintén kapcsolatban áll a glükóz-homeosztázis paramétereivel (glükóz-, inzulin-koncentráció, HOMA-IR) és a 2-es típusú diabétesz kialakulásával (109). A *GCKR*-446L variánst hordozók esetén alacsonyabb éhgyomri glükóz szintet, kisebb inzulin rezisztenciát állapítottak meg, és ez a variáns csökkent rizikót jelentett a 2-es típusú diabétesz manifesztációjára a mért emelkedett TG szint és dyslipidemia ellenére (109).

2009-ben egy kínai felnőtt populáción végzett vizsgálat során azt tapasztalták, hogy az rs780094 A allél hordozói védettebbek a 2-es típusú diabétesz és az elhízás kialakulásával szemben, emellett megerősítették mindazokat a szakirodalomban leközölt adatokat, miszerint ez a polimorfizmus inverz hatást gyakorol a triglicerid és glükóz koncentrációkra (87).

A munkánk célja az volt, hogy egyrészt megvizsgáljuk a lehetséges összefüggéseket a *GCKR* gén variánsai és a triglicerid- illetve éhgyomri vércukorszint között, másrészt, hogy tanulmányozzuk rs1260326 és rs780094 polimorfizmus allél eloszlását magyar elhízott és egészséges, normál súlyú gyermekek csoportjában. Egy genom-méretű tanulmány összefüggést talált a *GCKR* gén rs1260326 polimorfizmusa és a plazma kórosan megemelkedett triglicerid szintje között. A tanulmányban az rs1260326 446L változat (MAF 52%) jelentős felhalmozódást mutatott a hipertrigliceridémiás alanyok körében (HTG) (133). Elhízott gyermekek tekintetében a szakirodalomban hasonló adatok nem állnak rendelkezésünkre, azonban egészséges felnőtt és serdülő populációban egy kínai tanulmány vizsgálta a *GCKR* rs780094 variánsának és *GCK* gén rs1799884 variánsának metabolikus paraméterekre kifejtett interakciós hatásait. (137). A munkánk célja az volt, hogy egyrészt megvizsgáljuk 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.

3 VIZSGÁLATI CÉLKITŰZÉSEK

Az elhízott gyermekeken végzett vizsgálatainkban két gén kapcsolatát elemeztük a lehetséges triglicerid- és glükóz-szint változásokkal, valamint tanulmányoztuk az esetleges összefüggéseket a gyermekkori elhízás kialakulásával.

Vizsgálataink céljai a következők voltak:

3.1 *APOA5* gén polimorfizmusainak, haplocsoportjainak vizsgálata

1. Elhízott gyermekpopuláción végzett vizsgálataink egyik fő tárgya a felnőtt metabolikus szindrómával, hipertrigliceridémiával és ischémiás szívbetegséggel összefüggésbe hozott apolipoprotein A5 gén (*APOA5*) gyakori természetes variánsainak alléloszlására (*T-1131C*, *C56G*, *IVS3+G476A*, *T1259C*) és a variánsok által képzett haplocsoportok (*APOA5*1*, *APOA5*2*, *APOA5*3*, *APOA5*4*, *APOA5*5*) prevalenciájára irányult.
2. Továbbá vizsgáltuk az *APOA5 T-1131C*, *C56G*, *IVS3+G476A*, *T1259C* alléljeinek és a variánsok által képzett haplocsoportoknak (*APOA5*1*, *APOA5*2*, *APOA5*3*, *APOA5*4*, *APOA5*5*) az elhízott és normál súlyú, egészséges gyermekek laborparamétereire gyakorolt hatását (triglicerid, koleszterin, BMI).
3. Megfigyeléseink egy részét az *APOA5* génben található négy variáns minor alléljeinek, másik részét az általuk képezett haplocsoportoknak (*APOA5*1*, *APOA5*2*, *APOA5*3*, *APOA5*4*, *APOA5*5*) a gyermekkori elhízás kialakulásában betöltött esetleges kockázati, hajlamosító szerepének felderítése képezte.

3.2 *GCKR* gén polimorfizmusainak vizsgálata

1. Az elhízott gyermekpopuláción végzett vizsgálataink másik fő tárgyát a glükóz metabolizmusban kulcs szerepet játszó glükokináz regulátor (*GCKR*) gén két gyakori, természetes variánsának (rs1260326, rs780094) alléleloszlása képezte.
2. További megfigyeléseket végeztünk annak kiderítésére, hogy a *GCKR* génben található két eltérés (rs1260326, rs780094) a nemzetközi szakirodalomban leírtakhoz hasonlóan ellentétes hatást gyakorolnak-e a triglicerid és glükóz értékekre.
3. Végül vizsgálatainkkal arra kerestük a választ, hogy az rs1260326 és az rs780094 variánsok összefüggésbe hozhatóak-e emelkedett trigliceridszinttel illetve, hogy ezek a variánsok milyen összefüggést mutatnak a gyermekkori elhízás kialakulásával.

4 BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

4.1 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. Az elhízott és kontroll gyermekminták a Szegedi és a Pécsi Gyermekklinika Endokrinológiai Osztályáról származnak.

A vizsgált alanyok DNS mintái és klinikai adatai egy helyi biobankban lettek elhelyezve. A vizsgált gyermekek szülei írásban engedélyezték gyermekeik mintáinak felhasználását genetikai vizsgálatokhoz és adataik analízisét. A helyi biobank létrejötté az Egészségügyi Tudományos Tanács és Kutatásetikai Bizottság engedélye alapján valósult meg.

4.2 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 értékét a mért testsúly és a magasság négyzetének hányadosával (kg/m²) kaptuk meg. 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 (TG \geq 1.1 mmol/l) (127).

4.3 Elhízás definiálása

Az elhízás biztos felismeréséhez antropometriai mérési adatokra van szükség. Az elhízás egyik legalapvetőbb diagnosztikai paramétere a testtömeg index (BMI), amely a kg-ban kifejezett testsúly és a méterben kifejezett testmagasság négyzetének a hányada (kg/m^2). Egy gyermeket akkor tekintettünk elhízottnak, ha a BMI értéke túllépte a Cole és mtsai. által közölt határértéket, amely a 18 éves korra nézve 25 (19).

4.4 Genotípus elemzés

A DNS-izolálást EDTA-val alvadásgátolt vérmintákból rutin kisózásos módszerrel végeztük. A DNS-analízis kiindulópontja a polimeráz láncreakció (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-eket 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 láncreakciót követően a különböző génekben (*APOA5*, *GCKR*) lévő eltérések esetén a mutációk/polimorfizmusok meghatározására RFLP módszert alkalmaztunk. Ennek során a felsokszorozott DNS szakaszokat restriktív endonukleázokkal hasítottuk. Mindegyik módszert úgy terveztük, hogy a restriktív enzimek egy obligát hasító helyel rendelkezzenek az amplifikált fragmentumon belül, így ellenőrizhettük az enzimátikus emésztés eredményességét. Az analízisekre etikai bizottsági engedély birtokában került sor.

4.4.1 APOA5 gén polimorfizmusainak detektálása haplocsoport analízishez

A genotípus analízishez a haplocsoportokat meghatározó négy variánst alkalmaztuk. A PCR reakció kivitelezése a négy SNP esetében 35 cikluson keresztül az alábbi kondíciók alapján történt: kezdeti denaturáció 96°C-on 2 percre, denaturáció 96 °C-on 20 másodpercig, primerkötődés 60 °C-on 20 másodpercig, DNS-szintézis 72 °C-on 20 másodpercig, majd befejező lépésként további DNS-szintézis 72 °C-on 5 percre. A *T-1131C* polimorfizmus amplifikációjához a következő primer párokat alkalmaztuk: a forward primer: 5'-CCC CAG GAA CTG GAG CGA AATT-3' és a reverse primer: 5'-TTC AAG CAG AGG GAA GCC TGT A-3'. Az amplifikált DNS szakaszokat allélspecifikus, obligát hasítóhellyel rendelkező restriktív endonukleázzal emésztettük. Mismatch primertervezés során a forward primerbe egy hamis timidint vittünk be a normál guanin helyére, melynek következtében egy mesterséges *TruI* felismerő helyet kaptunk. A 2 órán keresztül tartó 65°-os *TruI* enzimmel történő emésztési folyamat után a keletkezett restriktív fragmenteket 3%-os, etídium-bromidot tartalmazó agaróz gélen futtattuk meg és UV transzilluminátor segítségével detektáltuk (Uvitec, Cambridge, UK). Normál esetben TT genotípusnál 22, 109, 267 bp hosszúságú terméket detektáltunk. Heterozigótáknál (TC genotípus) 22, 109, 267, 289 bp, homozigóták esetén (CC genotípus) 109, 289 bp nagyságú szakaszok keletkeztek.

Az *IVS3+G476A* SNP-t tartalmazó szekvencia amplifikációjához a következő primereket terveztük: forward: 5'-CTC AAG GCT GTC TTC AG-3' és reverse: 5'-CCT TTG ATT CTG GGG ACT GG-3' (Metabion, Planegg-Martinsried, Germany). A 15 µl PCR terméket 1 Unit egységnyi *MnII* restriktív endonukleázzal emésztettük (Fermentas, Burlington, ON, Canada) 37 °C-on egy éjszakán keresztül. A homozigóta, normál egyénekénél (GG genotípus) az emésztés 25, 114 és 141 bp hosszúságú termékeket, a homozigóta variáns esetén (AA forma) 25, 41, 73 és 141 bp nagyságú restriktív fragmenteket eredményezett.

A *T1259C* polimorfizmust a következő primer párokkal detektáltuk: 5'-TCA GTC CTT GAA AGT GGC CT -3' (sense) és 5'-ATG TAG TGG CAC AGG CTT CC -3' (antisense). A PCR termék *BseGI* (Fermentas, Burlington, ON, Canada) enzimmel történő emésztése (37 °C-on egy éjszakán keresztül) a normál (TT) genotípus esetén 122 és 165 bp hosszúságú termékeket, míg a homozigóta formánál (CC) 35, 87 és 165 bp nagyságú restriktív fragmenteket eredményezett.

A *C56G* polimorfizmust tartalmazó szekvencia amplifikációjához az 5'-AGA GCT AGC ACC GCT CCT TT-3' szekvenciájú forward és 5'-TAG TCC CTC TCC ACA GCG TT-3' szekvenciájú reverse primereket terveztük. A PCR termék emésztése *Cfr13I* restriktív

enzimmel történt 65°C-on 2 órán keresztül (Fermentas, Burlington, ON, Canada). Az emésztési folyamat végén a normál CC homozigóta minták esetén 79, 177 bp hosszúságú fragmentek, míg a homozigóta GG variánsoknál 26, 79 és 151 bp nagyságú szakaszok keletkeztek.

4.4.2 A GCKR gén polimorfizmusainak detektálása

A *GCKR* gén rs1260326 polimorfizmusának detektálásához a következő primer párokat terveztük: forward 5'-TGC AGA CTA TAG TGG AGC CG-3' és reverse 5'-CAT CAC ATG GCC ACT GCT TT-3'; míg a *GCKR* rs780094 polimorfizmust tartalmazó szekvencia amplifikációjához a 5'-GAT TGT CTC AGG CAA ACC TGG TAG-3' szekvenciájú forward és 5'-CTA GGA GTG GTG GCA TAC ACC TG-3' bázissorrendű reverse primerpárt alkalmaztuk. Az rs1260326 SNP esetén az amplifikáció kivitelezése 35 cikluson keresztül az alábbi kondíciók alapján történt: kezdeti denaturáció 96°C-on 2 percig, denaturáció 96°C-on 20 másodpercig, primerkötődés 60°C-on 20 másodpercig, DNS szintézis 72°C-on 30 másodpercig; majd befejező lépésként további DNS-szintézis 72°C-on 5 percig. Az rs780094 SNP esetén a kezdeti denaturáció, a DNS szintézis és a befejező DNS szintézis kondíciói azonosak voltak az előző polimorfizmus kondícióival. Ugyanakkor a DNS szakasz felsokszorozása 30 cikluson keresztül zajlott le, illetve a denaturáció 96°C-on 20 másodpercig, a primerkötődés 62°C-on 30 másodpercig tartott.

A felsokszorozott DNS szakaszokat az rs1260326 esetén *HpaII*, míg az rs780094 esetén *PscI* restriktív endonukleázzal hasítottuk (Fermentas, Burlington, ON, Canada). Az rs1260326 SNP-t tartalmazó amplifikált szakaszok emésztése (231 bp), normál CC genotípus esetén 18, 63, 150 bp hosszúságú fragmenteket eredményezett, a homozigóta TT genotípusú minták esetén 18 és 213 bp nagyságú szakaszokat, míg a heterozigóta genotípusoknál 18, 63, 150, 213 bp nagyságú termékeket mutatott. Az rs780094 (427 bp) SNP-t tartalmazó szekvenciák emésztése során a normál GG genotípus esetében 62, 177, 188 bp nagyságú szakaszokat kaptunk, a homozigóta AA genotípusnál 62, 365 bp, míg heterozigóta genotípusnál 62, 177, 188, 365 bp hosszúságú restriktív fragmenteket detektáltunk.

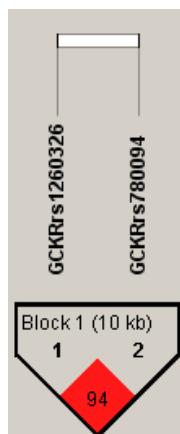
4.5 Statisztikai elemzés

A statisztikai analíziseket az SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programcsomaggal végeztük. Minden kvantitatív analízis eredménye átlag \pm SEM (standard error of mean) formájában van feltüntetve. A változók eloszlását Kolmogorov-Smirnov-teszt segítségével állapítottuk meg. Normál eloszlás esetén paraméteres próbákat, míg a nem-normál eloszlású változóknál nem-paraméteres próbákat alkalmaztunk. Az egyes csoportok paramétereinek vizsgálatához Student-féle páros t-tesztet alkalmaztunk normál eloszlású, folytonos változók esetében, míg a nem-normál eloszlású változók esetén Mann-Whitney-teszttel dolgoztunk. A klinikai paraméterek különbségeinek összehasonlításához a betegcsoport és a kontroll csoport között szintén a Mann-Whitney-tesztet használtuk.

Az *APOA5* gén esetében, a variánsok haplotípus-csoportba való osztályozásához a HAPSTAT 3.0 verziójú programot alkalmaztuk (<http://www.bios.unc.edu/~lin/hapstat>). Az allélok (*APOA5* és *GCKR* gén variánsai) és a haplotípus-csoportok (*APOA5* gén) frekvenciáit (direkt változók) χ^2 -teszt segítségével hasonlítottuk össze a beteg és a kontroll csoportok között. A kvantitatív paraméterek haplotípus-csoportok (*APOA5* gén) közötti összehasonlításait ANOVA teszttel végeztük. Az elhízás és a vizsgált genetikai variánsok, illetve haplotípus-csoportok között fennálló összefüggés feltárására logisztikus regressziós analízist alkalmaztunk (korreláció analízis és esélyhányadosok). A szignifikancia (p) határértéke $p = 0.05$, míg a konfidencia intervallum (CI) 95%-os volt minden egyes számításnál.

4.6 A linkage disequilibrium (LD-blokk) számítások

A vizsgált variánsok közötti LD meghatározásához az SNP genotípus adatokat a HapMap adatbázisából töltöttük le (HapMap Data Rel 24 / phase II Nov 08. on NCBI B36 assembly dbSNP b126), és az LD számításokat a HaploView 4.2 szoftver segítségével végeztük.



8. ábra. Az LD-blokk a két *GCKR* SNP esetében.

5 EREDMÉNYEK

5.1 Apolipoprotein A5 gén genotípus és haplocsoport (*APOA5*) analízise

A vizsgált elhízott és kontroll gyermekek fő klinikai és laboratóriumi paramétereit a 4. táblázatban foglaltam össze. A BMI, a triglicerid, a totál koleszterin szintek mind szignifikánsan emelkedett értéket mutattak az elhízott gyermek csoportban viszonyítva az egészséges, normál testsúlyú kontroll gyermekekhez ($p < 0.05$).

4. táblázat: Az elhízott és kontroll gyermek csoport főbb klinikai és laboratóriumi paramétereit.

	Elhízott gyermekek n=232	Kontroll gyermekek n=137
Nem (fiú/lány)	138/94	58/79
Kor (évek)	13.7±0.16	14.8±0.19
fiú/lány	13.7±0.25/13.7±0.21 [#]	14.2±0.28/15.2±0.25 [#]
BMI (kg/m ²)	31.8±0.34*	20.0±0.25
fiú/lány	31.8±0.45/31.9±0.52 [#]	20.0±0.38/20.0±0.32 [#]
Szérum triglicerid (mmol/l)	1.27±0.03*	0.88±0.02
fiú/lány	1.28±0.04/1.26±0.05 [#]	0.88±0.03/0.87±0.02 [#]
Összkoleszterin (mmol/l)	4.42±0.06*	4.07±0.06
fiú/lány	4.49±0.07/4.33±0.08 [#]	3.93±0.08/4.17±0.08 [#]

átlagok±SEM

* $p < 0.05$ vs. egészséges, normál testsúlyú gyermekekhez viszonyítva.

[#] nincs nembeli különbség

Az egyes *APOA5* variáns és a triglicerid szintek közötti összefüggéseket a 5. táblázat mutatja. A *C56G* polimorfizmust kivéve, az összes minor allél (*-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 értékeivel. A BMI és a összkoleszterin szinteket tekintve, nem kaptunk variáns-függő különbségeket.

5. táblázat: Az egyedi genotípusok triglicerid, összkoleszterin és BMI értékei a elhízott és kontroll gyermekekben.

	T-1131C		IVS3+G476A		T1259C		C56G	
	(TT)	(TC+CC)	(GG)	(GA+AA)	(TT)	(TC+CC)	(CC)	(CG+GG)
Genotípus	n=177	n=55	n=184	n=48	n=184	n=48	n=203	n=29
BMI (kg/m ²)	31.9±0.40	31.8±0.65	31.9±0.37	31.7±0.80	32.0±0.39	31.1±0.70	32.0±0.37	31.0±0.82
Szérum triglicerid (mmol/l)	1.17±0.02	1.61±0.09 [§]	1.22±0.03	1.49±0.10 [*]	1.22±0.03	1.49±0.10 [*]	1.29±0.03	1.17±0.06
Összkoleszterin (mmol/l)	4.37±0.06	4.60±0.11	4.41±0.06	4.49±0.13	4.40±0.06	4.50±0.13	4.42±0.06	4.42±0.17
Genotípus	n=121	n=16	n=125	n=12	n=118	n=19	n=116	n=21
BMI (kg/m ²)	19.9±0.23	20.5±1.18	20.0±0.24	20.1±1.13	20.0±0.24	20.0±0.99	19.9±0.26	20.7±0.69
Szérum triglicerid (mmol/l)	0.83±0.02	1.19±0.08 [§]	0.85±0.02	1.03±0.07 [#]	0.86±0.02	0.99±0.07 [*]	0.88±0.02	0.83±0.07
Összkoleszterin (mmol/l)	4.05±0.06	4.17±0.18	4.06±0.06	4.09±0.16	4.06±0.06	4.10±0.15	4.08±0.06	4.01±0.14
átlagok±SEM								

*p<0.05, [#]p<0.01, [§]p<0.005 vs. normál homozigóta genotípushoz viszonyítva (a T1131C és a T1259C esetén TT, az IVS3+G476A esetén GG, a C56G esetén CC)

A 6. táblázat tartalmazza az *APOA5* variánsok alléleloszlását, allélfrekvenciáját és a logisztikus regressziós analízis eredményeit. Az *APOA5* gén variánsainak allélfrekvenciái követték a Hardy-Weinberg ekvilibrium szabályát mindkét csoportban. A *-1131C* allélikus variáns prevalenciája szignifikánsan emelkedett értéket mutatott az elhízott csoportban összehasonlítva az egészséges, normál testsúlyú egyénekkel. A regressziós analízis eredményei kimutatták, hogy a *-1131C* rizikó allél jelentős független kockázati faktort jelent a gyermekkori elhízás kialakulására. Az *IVS3+476A* allél frekvenciája az elhízott gyermekekben szignifikánsan magasabb értéket mutatott a normál testsúlyú, egészséges csoporthoz viszonyítva. Ennek ellenére az *IVS3+476A* allél hordozása nem jelentett rizikófaktort az elhízás kialakulására nézve. A *1259C* és *56G* allélikus variáns eloszlása nem mutatott szignifikáns különbséget az elhízott és kontroll gyermekek között, és a két polimorfizmus jelenléte nem mutatott korrelációt az elhízással (6. táblázat.).

A haplocsoport analízis eredményeit a 7. táblázatban foglaltam össze. A haplocsoportokat az analízis előtt az *APOA5* gén négy haplocsoportot meghatározó variánsai alapján osztályoztuk a HAPSTAT 3.0 verziójú program segítségével. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a vizsgált négy *APOA5* haplotípus milyen hatást gyakorolhat a lipid paraméterekre és a BMI-re. A vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy az *APOA5*2* és *APOA5*4* haplotípus variáns hordozása szignifikáns trigliceridszint emelkedést eredményez mindkét csoportban. Ezzel ellentétben, az *APOA5*5* haplotípus jelentős trigliceridszint-csökkentő hatást mutatott. Egyik haplocsoport esetén sem találtunk haplotípus-függő változást a BMI és össz koleszterin szinteket tekintve (7. táblázat).

Az *APOA5* haplotípusok frekvenciáját a vizsgált két csoportban a 7. és 8. táblázatban tüntettem fel. 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 (7. táblázat, 8. táblázat). A logisztikus regressziós analízis kimutatta, hogy az *APOA5*2* haplotípus gyermekekben erősen hajlamosít az elhízás kialakulására. Ezzel ellentétben, az *APOA5*5* haplotípus védő fakorként hat az elhízással szemben (8. táblázat).

6. táblázat: Az APOA5 variánsok prevalenciái és az elhízással kapcsolatos esélyhányados értékei (odds ratio; OR) 95%-os konfidencia intervallumon (CI).

APOA5 variánsok	Kontroll gyermekek		Elhízott gyermekek		Nem-korrigált			Korrigált		
	n=137	n=232	p	OR	modell	95% CI	p	modell	95% CI	p
T-1131C (TC+CC) hordozó	16 (0.12) 0.066	55 (0.24) 0.13*	0.010	2.35	2.35	(1.29-4.29)	0.005	2.34	(1.28-4.31)	0.006
IVS+G476A (GA+AA) hordozó	16 (0.12) 0.047	45 (0.19) 0.11*	0.005	1.82	1.82	(0.98-3.37)	0.06	1.83	(0.98-3.40)	0.058
T1259C (TC+CC) hordozó	18 (0.13) 0.073	48 (0.21) 0.11	0.084	1.73	1.73	(0.96-3.11)	0.07	1.69	(0.93-3.06)	0.084
C56G (CG+GG) hordozó	21 (0.15) 0.088	29 (0.13) 0.065	0.25	0.79	0.79	(0.43-1.45)	0.44	0.72	(0.39-1.33)	0.30

#Korrigálva korra, nemre és összkoleszterinre.

*p<0.05 vs. egészséges, normál testsúlyú gyermekcsoportához viszonyítva.

7. táblázat: Az APOA5 haplotípusok triglicerid, összkoleszterin és BMI értékei az elhízott és kontroll csoportban.

Haplotípus variánsok	APOA5*1 (TGTC)	APOA5*2 (CACC)	APOA5*3 (TGTC)	APOA5*4 (CGTC)	APOA5*5 (TGCC)
Elhízott gyermekek					
Frekvencia	0.58	0.15	0.13	0.069	0.017
BMI (kg/m ²)	32.0±0.46	30.8±0.71	31.0±0.82	33.0±1.13	31.6±3.28
Szérum triglicerid (mmol/l)	1.18±0.02	1.57±0.12 [^]	1.17±0.06	1.68±0.15 [#]	0.91±0.08 [‡]
Összkoleszterin (mmol/l)	4.40±0.07	4.61±0.15	4.42±0.17	4.60±0.17	3.38±0.23
Kontroll gyermekek					
Frekvencia	0.65	0.058	0.14	0.051	0.066
BMI (kg/m ²)	19.9±0.26	21.1±2.11	21.0±0.74	19.7±1.32	19.5±0.52
Szérum triglicerid (mmol/l)	0.84±0.01	1.11±0.06 [#]	0.78±0.06	1.30±0.17 [§]	0.74±0.03 [‡]
Összkoleszterin (mmol/l)	4.08±0.07	4.15±0.10	3.96±0.13	4.25±0.40	4.06±0.27

átlagok ±SEM, [^]p=0.001; [#]p=0.0001; [‡]p=0.026; [§]p=0.002; [‡]p=0.036 vs. APOA5*1 haplotípushoz viszonyítva.

Az analízishez használt SNP-k sorrendje: T-1131C, IVS3+G476A, T1259C, C56G. (A variánsok aláhúzva).

8. táblázat: Az APOA5 haplotípusok prevalenciái és az elhízással kapcsolatos esélyhányados értékei (OR) 95%-os konfidencia intervallumon (CI).

Haplotípus variánsok	Kontroll gyermekek n=137	Elhízott gyermekek n=232	p	Nem-korrigált modell OR	95% CI	p	Korrigált modell OR [#]	95% CI	p
APOA5*1	89 (0.65)	135 (0.58)	0.20	1.33	(0.86-2.06)	0.20	1.25	(0.80-1.95)	0.32
APOA5*2	8 (0.058)	35 (0.15) [^]	0.007	2.87	(1.29-6.37)	0.01	2.92	(1.30-6.55)	0.009
APOA5*3	19 (0.14)	29 (0.13)	0.71	1.13	(0.61-2.10)	0.71	1.25	(0.67-2.35)	0.49
APOA5*4	7 (0.051)	16 (0.069)	0.19	0.73	(0.29-1.81)	0.50	0.73	(0.29-1.84)	0.51
APOA5*5	9 (0.066) [^]	4 (0.017)	0.015	0.25	(0.08-0.83)	0.02	0.24	(0.07-0.80)	0.02

[#]Korrigálva korra, nemre és összkoleszterinre.

[^]p<0.05 vs. egészséges, normál testsúlyú kontroll gyermek csoporthoz viszonyítva.

5.2 A glükokináz regulátor gén vizsgálata (*GCKR*)

A 9. táblázatban láthatók a *GCKR* analízisben résztvevő elhízott és kontroll alanyok főbb klinikai és laboratóriumi paramétereit. A BMI, szérumszint triglicerid, összkoleszterin és glükóz szintek szignifikánsan emelkedett értéket mutattak az elhízott csoportban az egészséges, normál testsúlyú kontroll gyermekekhez viszonyítva ($p < 0.05$).

9. táblázat: Az elhízott és kontroll gyermek csoport főbb klinikai és laboratóriumi paramétereit.

	Elhízott gyermekek n=221	Kontroll gyermekek n=115
Nem (fiú/lány)	122/99	56/59
Kor (évek)	13.5±0.16	14.1±0.21
BMI (kg/m ²)	31.5±0.32*	20.2±0.32
Szérumszint triglicerid (mmol/l)	1.43±0.03*	1.00±0.03
Összkoleszterin (mmol/l)	4.51±0.06*	4.00±0.06
Plazma glükóz (mmol/l)	4.71±0.03*	4.17±0.03

átlagok±SEM

* $p < 0.05$ vs egészséges, normál testsúlyú gyermekekhez viszonyítva.

A 10. táblázatban foglaltam össze a *GCKR* rs1260326 és rs780094 variánsok allélfrekvenciáit és az elhízással és hipertrigliceridémiával (HTG) kapcsolatos összefüggéseik eredményeit. Az rs1260326 és rs780094 variáns alléljai követték a Hardy-Weinberg szabályt mindegyik vizsgált csoportban. Az allélfrekvenciákat vizsgálva egyik SNP esetén sem detektáltunk szignifikáns különbséget az elhízott és kontroll gyermekek között. De a variánst hordozók mindkét polimorfizmust tekintve (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. Amellett, hogy csökkent glükóz szintet és az elhízás kialakulását tekintve kisebb kockázatot tapasztaltunk, az rs780094 és rs1260326 SNP variánsait hordozó gyermekek magas triglicerid értékeket mutattak (10. táblázat). Amikor az összevont (elhízott és kontroll) és elhízott gyermekcsoportot TG szint 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. Továbbá, a *GCKR* variánsokat hordozók aránya is nagyobb volt a HTG csoportokban, mind az összevont, mind az elhízott gyermekek körében. 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.

Az egyedi *GCKR* variánsok laboratóriumi paraméterekre kifejtett hatásait a 11. táblázatban foglaltam össze. A triglicerid és glükóz szintekre nézve mind az rs1260326 és mind az rs780094 polimorfizmus ellentétes hatást mutatott. Mindkét SNP esetén a hordozó genotípus szignifikáns összefüggést mutatott emelkedett triglicerid szinttel és csökkent glükóz koncentrációval összehasonlítva a normál genotípussal, mind az elhízott és mind a kontroll csoportban. Az elhízott gyermekcsoportban az rs1260326 variáns homozigóta TT formája erősebb TG-növelő hatást mutatott a heterozigóta (CT) és hordozó típushoz (CT+TT) viszonyítva. Továbbá emelkedett totál szérum koleszterin szintet tapasztaltunk a TT genotípusú elhízott gyermekeknél.

A BMI szintet tekintve nem detektáltunk variáns-függő változásokat.

10. táblázat: A GCKR rs1260326 és rs780094 SNP-ék prevalenciái, illetve hipertrigliceridémiával (HTG) és az elhízással kapcsolatos esélyhányados értékeik (odds ratio; OR; 95%-os konfidencia intervallumon (CI) a különböző csoportokban.

	Elhízásra irányuló logisztikus regresszió				HTG-ra irányuló logisztikus regresszió						
	Kontroll gyermekek n=115		Elhízott gyermekek n=221		Összes csoport n=336		Elhízott gyermekek				
	OR, 95% CI, p érték	λ^2	p	OR, 95% CI, p érték	OR, 95% CI, p érték	NTG n=105	HTG n=231	NTG n=37	HTG n=184	λ^2	p
GCKR rs1260326 T MAF%	0.47	0.43	1.20	0.27	0.35	0.48**	0.32	0.18	0.48**	22.5	2.2×10^{-6}
CT+TT hordozó	0.81	0.70*	4.51	0.034	0.60	0.80**	0.32	0.32	0.78**	30.2	4.0×10^{-8}
Nem-korrigált modell OR, 95% CI, p érték	0.56 (0.34-1.01) p=0.035					2.68 (1.62-4.45) p=0.0001			7.27 (3.36-15.7) p=4.6 x10 ⁻⁷		
Korrigált modell OR, 95% CI, p érték	0.46# (0.25-0.83) p=0.010					3.95## (2.10-7.43) p=2.2 x10 ⁻⁶			7.32## (3.35-16.0) p=6.0 x10 ⁻⁷		
GCKR rs780094 A MAF%	0.47	0.42	1.21	0.27	0.35	0.47**	0.20	0.20	0.46**	17.3	3.1×10^{-5}
GA+AA hordozó	0.81	0.67*	6.79	0.009	0.61	0.77* *	0.35	0.35	0.74**	21.1	4.4×10^{-6}
Nem-korrigált modell OR, 95% CI, p érték	0.49 (0.28-0.84) p=0.010					2.15 (1.31-3.54) p=0.003			5.23 (2.47-11.1) p=1.6 x10 ⁻⁵		
Korrigált modell OR, 95% CI, p érték	0.41# (0.23-0.74) p=0.003					3.41## (1.85-6.28) p=5.2 x10 ⁻⁵			5.14## (2.41-11.0) p=2.4 x10 ⁻⁵		

Korrigálva korra, nemre, trigliceridre, koleszterinre és glükózra. *p<0.05 egészséges, normál testsúlyú gyermekcsoporthoz viszonyítva.

Korrigálva korra, nemre, BMI-re, koleszterinre és glükózra. * *p<0.005 NTG-hez viszonyítva az összesített és elhízott gyermekcsoportban.

NTG: normál triglicerid szintű minták, HTG: hipertrigliceridémiás minták (kórosan magas triglicerid: TG≥1.1mmol/l)

λ^2 -teszt: két SNP MAF%-ának összehasonlítása a különböző csoportok között (MAF=minor allél frekvencia). Logisztikus regresszió analízis: a két SNP elhízással és HTG-val kapcsolatos összefüggéseinek vizsgálatára.

11. táblázat: Az egyedi genotípusok triglicerid, glükóz, koleszterin és BMI értékei a elhízott és kontroll gyermekekben.

	GCKR rs1260326				GCKR rs780094			
	(CC) n=66	(CT+TT) n=122+33	(CT) 122	(TT) 33	(GG) n=73	(GA+AA) n=110+38	(GA) 110	(AA) 38
BMI (kg/m ²)	31.2±0.61	31.7±0.37	31.6±0.42	31.8±0.78	31.4±0.58	31.6±0.38	31.2±0.42	32.8±0.85
Szérum triglicerid (mmol/l)	1.25±0.04	1.50±0.04* p=0.0001	1.43±0.03* p=0.001	1.77±0.13 p=8.8x10 ⁻⁵ * p=0.019 ^{&}	1.27±0.04	1.51±0.04* p=0.006	1.47±0.04*	1.60±0.10*
Összkoleszterin (mmol/l)	4.43±0.11	4.55±0.07	4.51±0.08	4.73±0.14* p=0.04	4.39±0.11	4.57±0.07	4.57±0.08	4.60±0.14
Plazma glükóz (mmol/l)	4.84±0.06	4.65±0.04* p=0.006	4.64±0.04* p=0.026	4.69±0.07	4.83±0.05	4.65±0.04* p=0.044	4.66±0.05*	4.63±0.06*
	(CC) n=21	(CT+TT) n=79+15	(CT) 79	(TT) 15	(GG) n=22	(GA+AA) n=79+14	(GA) 79	(AA) 14
BMI (kg/m ²)	19.1±0.59	20.5±0.37	20.6±0.42	19.6±0.60	19.2±0.61	20.4±0.36	20.5±0.41	19.9±0.68
Szérum triglicerid (mmol/l)	0.83±0.06	1.04±0.03* p=0.006	1.03±0.04* p=0.013	1.06±0.08* p=0.03	0.83±0.06	1.04±0.03* p=0.0001	1.03±0.04*	1.06±0.06*
Összkoleszterin (mmol/l)	4.02±0.15	3.99±0.06	3.99±0.06	4.02±0.16	4.03±0.16	3.99±0.06	3.99±0.06	4.02±0.15
Plazma glükóz (mmol/l)	4.30±0.05	4.13±0.04* p=0.04	4.14±0.04	4.12±0.08	4.30±0.05	4.14±0.04* p=0.006	4.15±0.04*	4.05±0.07*

*p<0.05 a GCKR rs1260326 SNP esetén CC genotípushoz viszonyítva, míg a GCKR rs780094 SNP esetén GG genotípushoz viszonyítva.

&p<0.05 CT genotípushoz viszonyítva a GCKR rs1260326 SNP esetén. ANOVA teszt és Mann-Whitney-U teszt (átlagok±SEM).

6 EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

6.1 Az *APOA5* gén polimorfizmusainak és haplocsoportjainak szerepe

Az egészségügy egyik legfőbb problémájaként ismert MS kialakulásában az elhízás és az inzulin rezisztencia központi szerepet játszik (70, 73). Az elhízás prevalenciája egyre nő hazánkban és világszerte (11). Az MS egy olyan komplex betegség, amelyre az elhízás és inzulinrezisztencia mellett magas vérnyomás és diszlipidémia is jellemző (26). Az MS a felnőtteket érinti, de már gyermekkorban is detektálható (12, 72). A gyermekkori elhízás növeli a metabolikus szindróma fiatal felnőttkori megjelenésének kockázatát (108). Ez a tény magában foglalja a gyerekkori elhízás megelőzésének és kezelésének jelentős szerepét, hogy csökkentsük az MS felnőttkori kialakulásának az esélyét (7). Az MS fontos kritériumai közé tartozik az emelkedett triglicerid koncentráció (21). Humán és egér vizsgálatokban kimutatták, hogy az apolipoprotein-kódoló *APOA5* gén jelentős meghatározója a plazma triglicerid szintjének (101), ezért széleskörűen kezdték tanulmányozni különböző nemzetiségű felnőtt MS populációkban (38, 53, 63, 115, 120). Habár az elhízást gyermekeknél már összefüggésbe hozták a vér triglicerid szintjével, (5, 117) az *APOA5* hajlamosító variánsait eddig csak egy japán tanulmány vizsgálta elhízott gyermekekben (28). 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.

A *T-1131C*, *IVS3+G476A*, *T1259C* és *C56G* *APOA5* variánsok eltérései felnőtt populációkban emelkedett triglicerid szintet eredményeztek (47, 53, 63). Elhízott, magyar kaukázusi gyermekpopulációban végzett vizsgálataink során, Endo és mtsai eredményeihez hasonlóan (28), 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. Elhízott gyermekekben eddig még nem vizsgálták ezeket a variánsokat. A *C56G* esetén viszont nem sikerült trigliceridszint-növelő hatást kimutatni a felnőtt eredményekkel ellentétben.

Számos tanulmány leírta az *APOA5* haplotípust meghatározó variánsok trigliceridnövelő hatását (25, 67), néhány felnőttpopulációt vizsgáló tanulmány foglalkozott a főbb, természetesen előforduló *APOA5* haplocsoportok megfigyelésével (71, 84, 100), de elhízott gyermekeknél mi végeztünk el először haplotípus analízist.

Eredményeink azt mutatják, hogy az elhízott és kontroll csoportban az *APOA5*2* (*-1131C, IVS3+476A, 1259C*) és *APOA5*4* (*-1131C* egyedül) haplocsoport emelkedett triglicerid szinttel társult összehasonlítva az *APOA5*1* (*-1131T, IVS3+476G, 1259T, 56C*) haplotípus adataival. Ráadásul a logisztikus regressziós analízis kimutatta, hogy gyermekekben az *APOA5*2* haplotípus hordozása hajlamosító kockázatot jelent az elhízás kialakulására; hasonlóan a korábban végzett felnőtt tanulmányunk eredményeihez, ahol az *APOA5*2* haplotípus növelte az MS kifejlődésének a kockázatát (54). Ellenben, az *APOA5*4* haplocsoport (*T-1131C* egyedül) nem mutatott hajlamosító szerepet az elhízás kifejlődésére, amely szintén megegyezik az előző MS felnőtt populációt vizsgáló tanulmányunk eredményeivel (54). Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a *-1131C* allél csak az *IVS3+476A* és *1259C* allélok együttes jelenlétében tudja kifejezni hajlamosító szerepét az elhízás kialakulására. Ezenfelül, eredményeink azt mutatták, hogy a ritka *APOA5*5* haplotípus védő faktort jelent az elhízással szemben a gyermek populációban. A felnőtt populációban végzett korábbi vizsgálataink során hasonló eredményt kaptunk, ahol ez a haplocsoport az MS kialakulásával szemben mutatott védő hatást (54).

Az *APOA5 -1131C* allél külön és együtt az *IVS3+476A* és *1259C* alléllal (*APOA5*2*) kapcsolságban van az *APOC3* gén variánsaival (e.g. *C-482T*) (80, 84, 95, 120). Számos tanulmány leírta, hogy az *APOA1-C3-A4-A5* génklaszter több variánsa is jelentős szereppel bír a glükóz metabolizmusában (89). Waterworth és mtsai cukorterheléses vizsgálataik során összefüggést találtak növekedett inzulin és glükóz szint és az *APOC3-482T* variáns között (115). Ebből azt a következtetést lehet levonni, hogy az inzulin rezisztencia kialakulásának hátterében az *APOA5* variánsokkal kapcsolási kiegyensúlyozatlanságban (linkage disequilibrium, LD) lévő *APOC3* allél állhat (57, 89). Úgy tűnik, hogy az inzulin rezisztencia a testben a zsír abnormális akumulálódásához vezet, így elmondható, hogy az *APOC3-482T* allél másodlagos jelentőséggel bír az elhízás kifejlődésében (97).

Összefoglalva az eredményeinket azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az *APOA5 -T 1131C* allél hajlamosító hatását az *APOA5*2* haplotípusra korlátozódik (*-1131C, IVS3+476A* és *1259C* eltérést tartalmazó allélok). A *-1131C* allélt önmagában tartalmazó *APOA5*4* haplotípus nem hajlamosít az elhízásra gyermekekben. Tehát, eredményeink alapján

kijelenthetjük, hogy az *APOA5*2* és *APOA5*4* haplotípusok összefüggést mutatnak emelkedett trigliceridszinttel; azonban ilyen összefüggés a koleszterin koncentrációt nézve nem állapítható meg. Az *APOA5*2* és *APOA5*4* haplotípus variánsokkal 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.

6.2 A *GCKR* gén polimorfizmusainak egyedi szerepe

A 2-es típusú diabétesz mellitusz (T2DM) incidenciája fokozottan nő világszerte. A cukorbetegség a genetikai hajlamosító faktorok, a magatartásbeli valamint, környezeti kockázati tényezők közötti interakciókból ered (75). Szilárd bizonyítékok szólnak amellet, hogy az elhízás egyike a betegség főbb nem-genetikai kiváltó tényezőjének (79, 98). A csökkent glükóztolerancia köztes állapotot jelent normál glükóz tolerancia és a diabétesz manifesztálódása között (45). Számos tanulmány megállapította, hogy azoknak az érintetteknek, akik csökkent glükóztoleranciát mutattak nagyobb esélyük volt a T2D kialakulására (1).

Bár a glükokináz-*GCKR* tengely funkcionális genomikai vizsgálata új az irodalomban, nemrég világossá vált, hogy ez a komplex lényeges szerepet játszik a 2-es típusú cukorbetegség manifesztációjában. A glükokináz (GCK) egyike a négy hexokináz izoenzimnek, melyek katalizálják a glükóz foszforilációját, és amelyeknek a szabályozása a glükokináz regulátor protein (*GCKR*) ellenőrzése alatt áll (68, 105, 114). A GCK kapcsolata a diabétesz mellitusszal már nyilvánvalóvá vált, ugyanis a glükokináz génben (*GCK*) azonosított specifikus ritka mutációkat összefüggésbe hozták a monogénes öröklődésű, felnőtt diabétesz fiatal korban való megjelenési formájával (2-MODY) (46) és az újszülöttkori diabétesz mellitusszal (77). Az egér májban a *GCKR* gén adenovírussal történő fokozott expressziója a GCK protein erőteljes aktivitását és az éhgyomri vércukorszint csökkenését okozta (92), míg *GCK* gén fokozott kifejeződése alacsonyabb vércukor koncentrációt és emelkedett triglicerid szintet eredményezett (32).

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 (90, 109, 118, 138). A francia Diabétesz Genetikai Iniciatíva (DGI) T2DM-re irányuló genom-asszociációs tanulmányának szerzői megállapították, hogy az rs780094 SNP csökkent éhgyomri glikémiával, kisebb inzulin rezisztenciával jár együtt, és a variáns hordozása csökkenti a T2DM kialakulásának a kockázatát (90). Korábban felismerték azt a tényt, hogy a *GCKR* variánsok között (rs780094, rs1260326) szoros LD figyelhető meg (109), amelyet gyermekpopuláción végzett vizsgálataink során mi is megerősítettünk (LD; $r^2=0.94$). Egy nagy populációméretű, 12 etnikailag független ősi csoportot bemutató vizsgálat határozott bizonyítékkal szolgált arra, hogy a *GCKR* génben található funkcionális variánsok ellentétes hatást fejtenek ki a triglicerid,- és glükózkoncentrációra, és hordozásuk védelmet jelent a 2-es típusú diabétesz manifesztációjával szemben (81). Ezen túlmenően, egy felnőtt kínai

populáción végzett vizsgálat során kimutatták, hogy az rs780094 A allél hordozása nem csak a diabétesz kialakulásával szemben nyújt védelmet, hanem csökkenti az elhízás rizikóját is (87). Később, Vaxillaire és mtsai megerősítették, hogy az rs780094 polimorfizmussal funkcionális kapcsoltságban lévő rs1260326 T variánsának hordozása együtt jár alacsony glükóz szinttel, a hiperglikémia csökkent rizikójával és a triglicerid szint emelkedésével, ezenfelül hasonlóan a többi tanulmányhoz a T variáns védő hatást fejtett ki a T2DM-mel szemben (109).

Egér, patkány és humán vizsgálatokra alapozva (48, 78, 92), Sparso és mtsai úgy gondolták, hogy a *GCKR* gén két egymással szoros LD-ben lévő funkcionális variánsa (rs780094 és rs1260326) a *GCKR* gén expressziójának szabályozásán keresztül a GCKR enzim fokozott aktivitásához vezet (93). Feltételezték, hogy a *GCKR* rs780094 A allélhordozóknál tapasztalt csökkent inzulintermelés, a máj zsírsavoxidáció fokozásának következtében, indukálhat egy másodlagos trigliceridszint emelést (93). Beer és mtsai bizonyították, hogy a prolin/ leucin cserét okozó 446L-*GCKR* variáns (rs1260326) a fruktóz-6 foszfát (F6P) fiziológias koncentrációjának csökkenésén keresztül közvetve fokozza a GCK protein aktivitását (8). Az enzim erőteljesebb működése együtt jár a glikolízis fokozásával, amely elősegíti a máj glükóz metabolizmusát és növeli a malonil-CoA, a *de novo* lipogenezis szubsztrát koncentrációját (8). Ez a tény olyan mechanizmust feltételez, amely hozzásegíti a 446L-*GCKR* variánst bizonyított triglicerid emelő és glükóz csökkentő hatásához. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy az rs1260326 polimorfizmussal szoros kapcsoltságban (LD=0.94) lévő rs780094 SNP hasonló hatásmechanizmuson keresztül fejt ki hatását a triglicerid és glükóz metabolizmusra.

Jelenlegi vizsgálataink eredményei megerősítik a szakirodalomban jelenlévő tény, hogy a *GCKR* gén két funkcionális variánsa (rs780094A és rs1260326T) inverz hatást fejt ki a triglicerid és a glükóz szintre. Azok a gyermekek, akik, akár az rs780094, akár az rs1260326 variánst tartalmazó allélt hordozták, emelkedett triglicerid és csökkent glükóz koncentrációt mutattak, összehasonlítva a homozigóta normál allélt hordozók triglicerid és glükóz szintjeivel. Ezt a hatást mind az elhízott, mind a kontroll, normál súlyú gyermekeknél kimutattuk. 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. Ezzel ellentétben a hipertrigliceridémiás gyermekek (HTG) körében mindkét *GCKR* variáns nagyobb allélfrekvenciát mutatott a normál triglicerid szintet (NTG) mutató gyermekekhez viszonyítva, mind az összevont (elhízott és egészséges), mind az elhízott gyermekeket tekintve.

Vizsgálataink során, logisztikus regressziós modellt alkalmazva, azt találtuk, hogy mindkét *GCKR* variáns hordozása kisebb kockázatot jelent az elhízásra ebben a gyermek populációban, hasonlóan a kínai felnőtt populáción végzett vizsgálat rs780094 polimorfizmusra irányuló eredményeihez (87). A variánsok védő funkciója a korrigálás mellett is fennmaradt.

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 vizsgálataink eredményeinek alátámasztásához további, nagyobb létszámú gyermekpopulációt átfogó vizsgálatokra van szükség.

7 EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- I. Megállapítottuk, hogy a vizsgált elhízott gyermek populációban az *APOA5* variánsok közül a *C56G* polimorfizmust kivéve, az összes variánst tartalmazó allélja (*-1131C*, az *IVS3+476A* és a *1259C*) összefüggést mutatott az emelkedett triglicerid szinttel, mindkét gyermekcsoportban.
- II. Ugyanazon populáció *APOA5* analízise során felismertük, hogy a *-1131C* variánst tartalmazó allél önmagában jelentős független szuszeptibilitási ágens a gyermekkori elhízás kialakulására.
- III. 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.
- IV. A haplocsoportok és az elhízás közötti asszociációs analízis után kijelenthetjük, hogy egy korábbi felnőtt metabolikus szindrómás populációs vizsgálatunk eredményeihez hasonlóan az *APOA5*2* haplotípus (*-1131C*, az *IVS3+476A* és a *1259C kombinációja*) jelentős hajlamosító faktorként viselkedett az elhízás kialakulására gyermekkorban, míg a kis előfordulási gyakoriságú *APOA5*5* haplocsoport védő hatást mutatott az elhízás kifejlődésével szemben.
- V. A *GCKR* gén variánsainak vizsgálata során, megállapítottuk, hogy a rs780094A és rs1260326T 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.
- VI. 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.

8 PUBLIKÁCIÓS LISTA

8.1 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).

8.2 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, Meleg 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, Meleg 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., Meleg, 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, Meleg 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., Meleg, 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., Meleg, 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

Összesített impakt faktor: 32.34

8.3 IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK

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., Kisfali, 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.**, Kisfali, 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., Csöngői, 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., Csöngői, 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., Csöngői, 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., Csöngői, 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., Csöngői, 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., Csöngői, 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.

9 IRODALOMJEGYZÉK

1. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. The DECODE study group. European Diabetes Epidemiology Group. Diabetes Epidemiology: Collaborative analysis Of Diagnostic criteria in Europe. Lancet 1999; 354:617-21.
2. Agius L, Peak M, Newgard CB, Gomez-Foix AM, Guinovart JJ. Evidence for a role of glucose-induced translocation of glucokinase in the control of hepatic glycogen synthesis. J Biol Chem 1996; 271:30479-86.
3. Agius L, Peak M, Van Schaftingen E. The regulatory protein of glucokinase binds to the hepatocyte matrix, but, unlike glucokinase, does not translocate during substrate stimulation. Biochem J 1995; 309 (Pt 3):711-3.
4. Aouizerat BE, Kulkarni M, Heilbron D, Drown D, Raskin S, Pullinger CR et al. Genetic analysis of a polymorphism in the human apoA-V gene: effect on plasma lipids. J Lipid Res 2003; 44:1167-73.
5. Aristimuno GG, Foster TA, Voors AW, Srinivasan SR, Berenson GS. Influence of persistent obesity in children on cardiovascular risk factors: the Bogalusa Heart Study. Circulation 1984; 69:895-904.
6. Assmann G, Cullen P, Schulte H. The Munster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years. Eur Heart J 1998; 19 Suppl A:A2-11.
7. Barkai L, Paragh G. [Metabolic syndrome in childhood and adolescence]. Orv Hetil 2006; 147:243-50.
8. Beer NL, Tribble ND, McCulloch LJ, Roos C, Johnson PR, Orho-Melander M et al. The P446L variant in GCKR associated with fasting plasma glucose and triglyceride levels exerts its effect through increased glucokinase activity in liver. Hum Mol Genet 2009; 18:4081-8.
9. Belay B, Belamarich P, Racine AD. Pediatric precursors of adult atherosclerosis. Pediatr Rev 2004; 25:4-16.

10. Biro L, Regoly-Merei A, Nagy K, Peter S, Arato G, Szabo C et al. Dietary habits of school children: representative survey in metropolitan elementary schools. Part two. *Ann Nutr Metab* 2007; 51:454-60.
11. Bloom SR, Kuhajda FP, Laher I, Pi-Sunyer X, Ronnett GV, Tan TM et al. The obesity epidemic: pharmacological challenges. *Mol Interv* 2008; 8:82-98.
12. Bokor S, Frelut ML, Vania A, Hadjiathanasiou CG, Anastasakou M, Malecka-Tendera E et al. Prevalence of metabolic syndrome in European obese children. *Int J Pediatr Obes* 2008; 3 Suppl 2:3-8.
13. Bosco D, Meda P, Iynedjian PB. Glucokinase and glucokinase regulatory protein: mutual dependence for nuclear localization. *Biochem J* 2000; 348 Pt 1:215-22.
14. Brambilla P, Lissau I, Flodmark CE, Moreno LA, Widhalm K, Wabitsch M et al. Metabolic risk-factor clustering estimation in children: to draw a line across pediatric metabolic syndrome. *Int J Obes (Lond)* 2007; 31:591-600.
15. Brown KS, Kalinowski SS, Megill JR, Durham SK, Mookhtiar KA. Glucokinase regulatory protein may interact with glucokinase in the hepatocyte nucleus. *Diabetes* 1997; 46:179-86.
16. Brown S, Ordovas JM, Campos H. Interaction between the APOC3 gene promoter polymorphisms, saturated fat intake and plasma lipoproteins. *Atherosclerosis* 2003; 170:307-13.
17. Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2004; 33:351-75, table.
18. Chu CA, Fujimoto Y, Igawa K, Grimsby J, Grippo JF, Magnuson MA et al. Rapid translocation of hepatic glucokinase in response to intraduodenal glucose infusion and changes in plasma glucose and insulin in conscious rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286:G627-G634.
19. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 2000; 320:1240-3.
20. Csabi G, Torok K, Jeges S, Molnar D. Presence of metabolic cardiovascular syndrome in obese children. *Eur J Pediatr* 2000; 159:91-4.

21. Cullen P. Evidence that triglycerides are an independent coronary heart disease risk factor. *Am J Cardiol* 2000; 86:943-9.
22. Daniels SR, Arnett DK, Eckel RH, Gidding SS, Hayman LL, Kumanyika S et al. Overweight in children and adolescents: pathophysiology, consequences, prevention, and treatment. *Circulation* 2005; 11:1999-2012.
23. de I, I, Mukhtar M, Seoane J, Guinovart JJ, Agius L. The role of the regulatory protein of glucokinase in the glucose sensory mechanism of the hepatocyte. *J Biol Chem* 2000; 275: 10597-603.
24. Detheux M, Van Schaftingen E. Heterologous expression of an active rat regulatory protein of glucokinase. *FEBS Lett* 1994; 355: 27-9.
25. Dorfmeister B, Zeng WW, Dichlberger A, Nilsson SK, Schaap FG, Hubacek JA et al. Effects of six APOA5 variants, identified in patients with severe hypertriglyceridemia, on in vitro lipoprotein lipase activity and receptor binding. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28:1866-71.
26. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365:1415-28.
27. Efanov AM, Barrett DG, Brenner MB, Briggs SL, Delaunois A, Durbin JD et al. A novel glucokinase activator modulates pancreatic islet and hepatocyte function. *Endocrinology* 2005; 146:3696-701.
28. 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; 111:570-2.
29. Fagot-Campagna A, Pettitt DJ, Engelgau MM, Burrows NR, Geiss LS, Valdez R et al. Type 2 diabetes among North American children and adolescents: an epidemiologic review and a public health perspective. *J Pediatr* 2000; 136:664-72.
30. Farrelly D, Brown KS, Tieman A, Ren J, Lira SA, Hagan D et al. Mice mutant for glucokinase regulatory protein exhibit decreased liver glucokinase: a sequestration mechanism in metabolic regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:14511-6.

31. Ferns GA, Galton DJ. Haplotypes of the human apoprotein AI-CIII-AIV gene cluster in coronary atherosclerosis. *Hum Genet* 1986; 73:245-9.
32. Ferre T, Riu E, Bosch F, Valera A. Evidence from transgenic mice that glucokinase is rate limiting for glucose utilization in the liver. *FASEB J* 1996; 10:1213-8.
33. Forte TM, Shu X, Ryan RO. The ins (cell) and outs (plasma) of apolipoprotein A-V. *J Lipid Res* 2009; 50 Suppl:S150-S155.
34. Freedman DS, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS. The relation of overweight to cardiovascular risk factors among children and adolescents: the Bogalusa Heart Study. *Pediatrics* 1999; 103:1175-82.
35. Futamura M, Hosaka H, Kadotani A, Shimazaki H, Sasaki K, Ohyama S et al. An allosteric activator of glucokinase impairs the interaction of glucokinase and glucokinase regulatory protein and regulates glucose metabolism. *J Biol Chem* 2006; 281:37668-74.
36. Garber AJ. Attenuating cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes. *Am Fam Physician* 2000; 62:2633-6.
37. Gomez M, Ramirez M, Disdier O. Prevalence of the metabolic syndrome among a determined Puerto Rican population. *P R Health Sci J* 2006; 25:111-6.
38. Grallert H, Sedlmeier EM, Huth C, Kolz M, Heid IM, Meisinger C et al. APOA5 variants and metabolic syndrome in Caucasians. *J Lipid Res* 2007; 48:2614-21.
39. Grimsby J, Coffey JW, Dvorozniak MT, Magram J, Li G, Matschinsky FM et al. Characterization of glucokinase regulatory protein-deficient mice. *J Biol Chem* 2000; 275:7826-31.
40. Grimsby J, Sarabu R, Corbett WL, Haynes NE, Bizzarro FT, Coffey JW et al. Allosteric activators of glucokinase: potential role in diabetes therapy. *Science* 2003; 301:370-3.
41. Groenendijk M, Cantor RM, De Bruin TW, Dallinga-Thie GM. The apoAI-CIII-AIV gene cluster. *Atherosclerosis* 2001; 157:1-11.
42. Guillaume M, Lissau I. Child and Adolescent Obesity: Causes and Consequences, Prevention and Management . *Epidemiology* 2002.

43. Halmy L. Az elhízás kezelési irányelvei az ateroszklerotikus eredetű kardiovaszkuláris betegségek prevenciója keretében. *Metabolizmus* 2004; 13-6/2.
44. Hamman RF. Genetic and environmental determinants of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Diabetes Metab Rev* 1992; 8:287-338.
45. Harris MI. Impaired glucose tolerance in the U.S. population. *Diabetes Care* 1989; 12:464-74.
46. Hattersley AT, Turner RC, Permutt MA, Patel P, Tanizawa Y, Chiu KC et al. Linkage of type 2 diabetes to the glucokinase gene. *Lancet* 1992; 339:1307-10.
47. Havasi V, Szolnoki Z, Talian G, Bene J, Komlosi K, Maasz A et al. 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; 29:177-83.
48. Hayward BE, Fantes JA, Warner JP, Intody S, Leek JP, Markham AF et al. Co-localization of the ketohexokinase and glucokinase regulator genes to a 500-kb region of chromosome 2p23. *Mamm Genome* 1996; 7:454-8.
49. Hockey KJ, Anderson RA, Cook VR, Hantgan RR, Weinberg RB. Effect of the apolipoprotein A-IV Q360H polymorphism on postprandial plasma triglyceride clearance. *J Lipid Res* 2001; 42:211-7.
50. Holst-Schumacher I, Nunez-Rivas H, Monge-Rojas R, Barrantes-Santamaria M. Components of the metabolic syndrome among a sample of overweight and obese Costa Rican schoolchildren. *Food Nutr Bull* 2009; 30:161-70.
51. Izar MC, Fonseca FA, Ihara SS, Kasinski N, Sang WH, Lopes IE et al. Risk Factors, biochemical markers, and genetic polymorphisms in early coronary artery disease. *Arq Bras Cardiol* 2003; 80:379-95.
52. Johnston LB, Clark AJ, Savage MO. Genetic factors contributing to birth weight. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2002; 86:F2-F3.
53. Kisfali P, Mohas M, Maasz A, Hadarits F, Marko L, Horvatovich K et al. Apolipoprotein A5 IVS3+476A allelic variant associates with increased triglyceride levels and confers risk for development of metabolic syndrome in Hungarians. *Circ J* 2008; 72:40-3.

54. Kisfali P, Mohas M, Maasz A, Polgar N, Hadarits F, Marko L et al. Haplotype analysis of the apolipoprotein A5 gene in patients with the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009.
55. Kronenberg F, Stuhlinger M, Trenkwalder E, Geethanjali FS, Pachinger O, von Eckardstein A et al. Low apolipoprotein A-IV plasma concentrations in men with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36:751-7.
56. Lai CQ, Parnell LD, Ordovas JM. The APOA1/C3/A4/A5 gene cluster, lipid metabolism and cardiovascular disease risk. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16:153-66.
57. 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; 96:2601-5.
58. Lissau I. Overweight and obesity epidemic among children. Answer from European countries. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; Suppl 3: S10-S15.
59. Liu Y, Ordovas JM, Gao G, Province M, Straka RJ, Tsai MY et al. Pharmacogenetic association of the APOA1/C3/A4/A5 gene cluster and lipid responses to fenofibrate: the genetics of lipid-lowering drugs and diet network study. *Pharmacogenet Genomics* 2009; 19:161-9.
60. Lobstein T, Baur L, Uauy R. Obesity in children and young people: a crisis in public health. *Obes Rev* 2004; 5 Suppl 1:4-104.
61. Ludwig DS, Ebbeling CB. Type 2 diabetes mellitus in children: primary care and public health considerations. *JAMA* 2001; 286:1427-30.
62. Luft FC. Obesity, low for gestational age birth weight, and subsequent cardiovascular risk. *J Mol Med* 2001; 79:1-3.
63. Maasz A, Kisfali P, Horvatovich K, Mohas M, Marko L, Csongei V et al. Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome. *Pathol Oncol Res* 2007; 13:243-7.
64. Magnuson MA, Jetton TL. Evolutionary conservation of elements in the upstream glucokinase promoter. *Biochem Soc Trans* 1993; 21:160-3.

65. Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Davies DR, Vandercammen A, Van Schaftingen E. Regulation of glucokinase by a fructose-1-phosphate-sensitive protein in pancreatic islets. *Eur J Biochem* 1990; 190:539-45.
66. Manson JE, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Krolewski AS et al. Physical activity and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. *Lancet* 1991; 338:774-8.
67. Martinelli N, Trabetti E, Bassi A, Girelli D, Friso S, Pizzolo F et al. 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; 191:409-17.
68. Matschinsky FM. Glucokinase, glucose homeostasis, and diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 2005; 5:171-6.
69. Meigs JB, Nathan DM, D'Agostino RB, Sr., Wilson PW. Fasting and postchallenge glycemia and cardiovascular disease risk: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care* 2002; 25:1845-50.
70. Meigs JB, Rutter MK, Sullivan LM, Fox CS, D'Agostino RB, Sr., Wilson PW. Impact of insulin resistance on risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in people with metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2007; 30:1219-25.
71. Merkel M, Heeren J. Give me A5 for lipoprotein hydrolysis! *J Clin Invest* 2005; 115:2694-6.
72. Molnar D. The prevalence of the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28 Suppl 3:S70-S74.
73. Moreno LA, Pineda I, Rodriguez G, Fleta J, Sarria A, Bueno M. Waist circumference for the screening of the metabolic syndrome in children. *Acta Paediatr* 2002; 91:1307-12.
74. Moreno LR, Perez-Jimenez F, Marin C, Perez-Martinez P, Gomez P, Jimenez-Gomez Y et al. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes modulate postprandial lipoprotein metabolism in a healthy Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:2280-5.

75. Neel JV. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet* 1962; 14:353-62.
76. Nesmith JD. Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *Pediatr Rev* 2001; 22:147-52.
77. Njolstad PR, Sovik O, Cuesta-Munoz A, Bjorkhaug L, Massa O, Barbetti F et al. Neonatal diabetes mellitus due to complete glucokinase deficiency. *N Engl J Med* 2001; 344:1588-92.
78. O'Doherty RM, Lehman DL, Telemaque-Potts S, Newgard CB. Metabolic impact of glucokinase overexpression in liver: lowering of blood glucose in fed rats is accompanied by hyperlipidemia. *Diabetes* 1999; 48:2022-7.
79. Ohlson LO, Larsson B, Bjorntorp P, Eriksson H, Svardsudd K, Welin L et al. Risk factors for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. Thirteen and one-half years of follow-up of the participants in a study of Swedish men born in 1913. *Diabetologia* 1988; 31:798-805.
80. Olivier M, Wang X, Cole R, Gau B, Kim J, Rubin EM et al. Haplotype analysis of the apolipoprotein gene cluster on human chromosome 11. *Genomics* 2004; 83:912-23.
81. Orho-Melander M, Melander O, Guiducci C, Perez-Martinez P, Corella D, Roos C et al. Common missense variant in the glucokinase regulatory protein gene is associated with increased plasma triglyceride and C-reactive protein but lower fasting glucose concentrations. *Diabetes* 2008; 57:3112-21.
82. Ory DS. Chylomicrons and lipoprotein lipase at the endothelial surface: bound and GAG-ged? *Cell Metab* 2007; 5:229-31.
83. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 2001; 294:169-73.
84. 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; 11:3031-8.

85. Pennacchio LA, Rubin EM. Apolipoprotein A5, a newly identified gene that affects plasma triglyceride levels in humans and mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:529-34.
86. Peter S, Regoly-Merei A, Biro L, Nagy K, Arato G, Szabo C et al. Lifestyle of school children: representative survey in metropolitan elementary schools. Part one. *Ann Nutr Metab* 2007; 51:448-53.
87. Qi Q, Wu Y, Li H, Loos RJ, Hu FB, Sun L et al. Association of GCKR rs780094, alone or in combination with GCK rs1799884, with type 2 diabetes and related traits in a Han Chinese population. *Diabetologia* 2009; 52:834-43.
88. Rosenbloom AL, Joe JR, Young RS, Winter WE. Emerging epidemic of type 2 diabetes in youth. *Diabetes Care* 1999; 22:345-54.
89. 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; 46:2605-13.
90. Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI, Chen H et al. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 2007; 316:1331-6.
91. Shiota M, Galassetti P, Monohan M, Neal DW, Cherrington AD. Small amounts of fructose markedly augment net hepatic glucose uptake in the conscious dog. *Diabetes* 1998; 47:867-73.
92. Slosberg ED, Desai UJ, Fanelli B, St D, I, Connelly S, Kaleko M et al. Treatment of type 2 diabetes by adenoviral-mediated overexpression of the glucokinase regulatory protein. *Diabetes* 2001; 50:1813-20.
93. Sparso T, Andersen G, Nielsen T, Burgdorf KS, Gjesing AP, Nielsen AL et al. The GCKR rs780094 polymorphism is associated with elevated fasting serum triacylglycerol, reduced fasting and OGTT-related insulinaemia, and reduced risk of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2008; 51:70-5.
94. Szalai C, Keszei M, Duba J, Prohaszka Z, Kozma GT, Csaszar A et al. Polymorphism in the promoter region of the apolipoprotein A5 gene is associated with an increased susceptibility for coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2004; 173:109-14.

95. Talmud PJ, Hawe E, Martin S, Olivier M, Miller GJ, Rubin EM et al. Relative contribution of variation within the APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides. *Hum Mol Genet* 2002; 11:3039-46.
96. Torok K, Szelenyi Z, Porszasz J, Molnar D. Low physical performance in obese adolescent boys with metabolic syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25:966-70.
97. Travers SH, Jeffers BW, Eckel RH. Insulin resistance during puberty and future fat accumulation. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:3814-8.
98. Tuomilehto J, Wolf E. Primary prevention of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1987; 10:238-48.
99. Vaessen SF, Schaap FG, Kuivenhoven JA, Groen AK, Hutten BA, Boekholdt SM et al. Apolipoprotein A-V, triglycerides and risk of coronary artery disease: the prospective Epic-Norfolk Population Study. *J Lipid Res* 2006; 47:2064-70.
100. van der Vleuten GM, Isaacs A, Zeng WW, ter Avest E, Talmud PJ, Dallinga-Thie GM et al. Haplotype analyses of the APOA5 gene in patients with familial combined hyperlipidemia. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772:81-8.
101. van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC, Levels JH, Reitsma PH, Boers W et al. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *J Biol Chem* 2001; 276:44512-20.
102. Van Schaftingen E. A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose 6-phosphate and fructose 1-phosphate. *Eur J Biochem* 1989; 179:179-84.
103. Van Schaftingen E, Davies DR. Fructose administration stimulates glucose phosphorylation in the livers of anesthetized rats. *FASEB J* 1991; 5:326-30.
104. Van Schaftingen E, Vandercammen A, Detheux M, Davies DR The regulatory protein of liver glucokinase. *Adv Enzyme Regul* 1992; 32:133-148.
105. Van Schaftingen E, Detheux M, Veiga da CM. Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein. *FASEB J* 1994; 8:414-9.

106. Vandercammen A, Van Schaftingen E. The mechanism by which rat liver glucokinase is inhibited by the regulatory protein. *Eur J Biochem* 1990; 191:483-9.
107. Vandercammen A, Van Schaftingen E. Competitive inhibition of liver glucokinase by its regulatory protein. *Eur J Biochem* 1991; 200:545-51.
108. Vanhala M, Vanhala P, Kumpusalo E, Halonen P, Takala J. Relation between obesity from childhood to adulthood and the metabolic syndrome: population based study. *BMJ* 1998; 317:319.
109. Vaxillaire M, Cavalcanti-Proenca C, Dechaume A, Tichet J, Marre M, Balkau B et al. The common P446L polymorphism in GCKR inversely modulates fasting glucose and triglyceride levels and reduces type 2 diabetes risk in the DESIR prospective general French population. *Diabetes* 2008; 57:2253-7.
110. Vaxillaire M, Vionnet N, Vigouroux C, Sun F, Espinosa R, III, Lebeau MM et al. Search for a third susceptibility gene for maturity-onset diabetes of the young. Studies with eleven candidate genes. *Diabetes* 1994; 43:389-95.
111. Veiga-da-Cunha M, Delplanque J, Gillain A, Bonthron DT, Boutin P, Van SE et al. Mutations in the glucokinase regulatory protein gene in 2p23 in obese French caucasians. *Diabetologia* 2003; 46:704-11.
112. Ver A., Csermely P., Mandl Machovich. Metabolic syndrome, obesity, diabetes mellitus. In: *Medical Pathobiochemistry . Medical Pathobiochemistry*. 2006.
113. Wang H, Iynedjian PB. Modulation of glucose responsiveness of insulinoma beta-cells by graded overexpression of glucokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:4372-7.
114. Warner JP, Leek JP, Intody S, Markham AF, Bonthron DT. Human glucokinase regulatory protein (GCKR): cDNA and genomic cloning, complete primary structure, and chromosomal localization. *Mamm Genome* 1995; 6:532-6.
115. Waterworth DM, Jansen H, Nicaud V, Humphries SE, Talmud PJ. Interaction between insulin (VNTR) and hepatic lipase (LIPC-514C>T) variants on the response to an oral glucose tolerance test in the EARSII group of young healthy men. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1740:375-81.

116. Weinberg RB, Spector MS. Human apolipoprotein A-IV: displacement from the surface of triglyceride-rich particles by HDL2-associated C-apoproteins. *J Lipid Res* 1985; 26:26-37.
117. Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane WV, Taksali SE, Yeckel CW et al. Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N Engl J Med* 2004; 350:2362-74.
118. Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonnycastle LL, Clarke R et al. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Genet* 2008; 40:161-9.
119. Wong K, Ryan RO. Characterization of apolipoprotein A-V structure and mode of plasma triacylglycerol regulation. *Curr Opin Lipidol* 2007; 18:319-24.
120. Wright WT YIND. 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* 2006.
121. Yamada Y, Kato K, Hibino T, Yokoi K, Matsuo H, Segawa T et al. Prediction of genetic risk for metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 2007; 191:298-304.
122. Zimmet P, Alberti KG, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S et al. The metabolic syndrome in children and adolescents - an IDF consensus report. *Pediatr Diabetes* 2007; 8:299-306.
123. Agius L Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem J* 2008; **414**:1-18.
124. Brocklehurst KJ, Davies RA, Agius L Differences in regulatory properties between human and rat glucokinase regulatory protein. *Biochem J* 2004; **378**:693-697.
125. Cook S, Weitzman M, Auinger P, Nguyen M, Dietz WH. Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch.Pediatr.Adolesc.Med.* 1988-1994; 157: 821-827.
126. Cruz ML, Weigensberg MJ, Huang TT, Ball G, Shaibi GQ, Goran MI. The metabolic syndrome in overweight Hispanic youth and the role of insulin sensitivity. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2004; 89: 108-113.

127. de Ferranti S, Gauvreau K, Ludwig DS, Neufeld EJ, Newburger JW, Rifai N. Prevalence of the metabolic syndrome in American adolescents: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation* 2004; 110:2494-7.
128. Elston RC, Namboodiri KK, Nino HV, Pollitzer WS Studies on blood and urine glucose in Seminole Indians: indications for segregation of a major gene. *Am J Hum Genet* 1974; **26**:13-34.
129. Ford ES, Ajani UA, Mokdad AH. The metabolic syndrome and concentrations of C-reactive protein among U.S. youth. *Diabetes Care* 2005; 28: 878-881.
130. Garcia-Herrero CM, Galan M, Vincent O, Flandez B, Gargallo M, Delgado-Alvarez E et al. Functional analysis of human glucokinase gene mutations causing MODY2: exploring the regulatory mechanisms of glucokinase activity *Diabetologia* 2007; **50**:325-333.
131. Hanson RL, Elston RC, Pettitt DJ, Bennett PH, Knowler WC Segregation analysis of non-insulin-dependent diabetes mellitus in Pima Indians: evidence for a major-gene effect. *Am J Hum Genet* 1995; **57**:160-170.
132. Hayward BE, Dunlop N, Intody S, Leek JP, Markham AF, Warner JP et al. Organization of the human glucokinase regulator gene GCKR. *Genomics* 1998; 49:137-142.
133. Johansen CT, Wang J, Lanktree MB, Cao H, McIntyre AD, Ban MR et al. Excess of rare variants in genes identified by genome-wide association study of hypertriglyceridemia. *Nat Genet* 2010; **42**:684-687.
134. Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA* 1999; **282**:1523-1529.
135. Rich SS Mapping genes in diabetes. Genetic epidemiological perspective. *Diabetes* 1990; **39**:1315-1319.
136. Stern MP, Mitchell BD, Blangero J, Reinhart L, Krammerer CM, Harrison CR et al. Evidence for a major gene for type II diabetes and linkage analyses with selected candidate genes in Mexican-Americans. *Diabetes* 1996; **45**:563-568.

137. Steinberger J, Daniels SR. Obesity, insulin resistance, diabetes and cardiovascular risk in children: an American Heart Association scientific statement from the Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee (Council on Cardiovascular Disease in the Young) and the Diabetes Committee (Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism). *Circulation*. 2003; 107: 1448–1453
138. Steinberger J, Daniels SR, Eckel RH, et al. Progress and challenges in metabolic syndrome in children and adolescents. A scientific statement from the American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*; 2009 Feb 3;119(4):628-47.
139. Tam CH, Ma RC, So WY, Wang Y, Lam VK, Germer S et al. Interaction effect of genetic polymorphisms in glucokinase (GCK) and glucokinase regulatory protein (GCKR) on metabolic traits in healthy Chinese adults and adolescents. *Diabetes* 2009; **58**:765-769.
140. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 2010; **466**:707-713.
141. Guo S, Beckett L, Chumlea WC, Roche AF, Siervogel RM. Serial analysis of plasma lipids and lipoproteins from individuals 9-21 y of age. *Am J Clin Nutr*. 1993;58: 61-67.
142. Raitakari OT, Porkka KV, Rasanen L, Ronnema T, Viikari JS. Clustering and 6 year cluster-tracking of serum total cholesterol, HDL-cholesterol and diastolic blood pressure in children and young adults: the Cardiovascular Risk in Young Finn Study. *J Clin Epidemiol*. 1994;47:1085-1093.

10 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Melegh Béla Professor Úrnak, aki lehetővé tette, hogy csatlakozhassak a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Doktori Iskolájában a Multidiszciplináris Orvostudományok keretén belül zajló „Humán molekuláris genetika” PhD képzéséhez. Mindvégig figyelemmel kísérte szakmai tevékenységemet és irányította, segítette kutató munkámat. Hasznos tanácsai, útmutatásai, meglátásai lehetővé tették számomra, hogy közleményeim megjelenjenek, valamint számos kongresszuson részt vehessek.

Köszönettel tartozom Dr. Molnár Dénes Professor Úrnak, aki biztosította számomra a kutatásomhoz szükséges mintákat és ellátott szakmai tanácsaival, továbbá köszönetemet fejezem ki Dr. Bokor Szilviának és Dr. Répásy Juditnak, a minták gyűjtésében és betegadatok feldolgozásában való közreműködésükért és hálás vagyok hasznos szakmai tanácsaikért. Továbbá hálámat szeretném kifejezni dr. Baráth Ákosnak, a Szegedi Tudományegyetem dolgozójának, aki további minták gyűjtésével hozzájárult kutató munkám befejezéséhez

Köszönöm Dr. Polgár Noéminek, Kisfali Péternek, Dr. Magyar Lilinek és Dr. Czakó Mártának a munkám során nyújtott szakmai támogatást, tudományos segítséget. Köszönöm továbbá intézetünk PhD hallgatóinak szakmai és emberi segítségét, a támogatást, amit kutatásaim alkalmával kaptam. Hálával tartozom Papp Edit és Oksai Judit asszisztensnőknek, akik tanulmányaim során hozzáértő, lelkiismeretes munkájukkal és szakmai tapasztalatukkal segítettek.

Végül köszönöm családom és párom családjának megértő türelmét, szeretetét és bátorítását.