

Az apolipoprotein A5 gén természetes polimorfizmusainak szerepe ischémiás stroke kialakulásában

Ph.D. értekezés tézisei

Maász Anita

Témavezető: Prof. Dr. Melegh Béla

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Genetikai Intézet



Pécs, 2010

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

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

1. BEVEZETÉS

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

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

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

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

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A stroke és rizikófaktorai

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2. Az apolipoprotein A5 fehérje szerepe a lipid metabolizmusban

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

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

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

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

Az APOA5 gén felfedezésekor 4 gyakori polimorfizmust azonosítottak, amelyek mindegyike emelkedett trigliceridszinttel társult. Azóta ezek számtalan tanulmány vizsgálati tárgyát képezték: a T-1131C a promóter régióban; a T1259C a 3' nem transzlálódó régióban; a C56G a 3. exonban és az IVS3+G476A pedig a 3. intronban található. Elhelyezkedése miatt közvetlen funkcionális következménye csak a C56G variánsnak van, a 19-es kodonban szerin - triptofán aminosavcsere eredményez. Más apolipoproteinekhez hasonlóan az APOA5 is rendelkezik egy N-terminális export szignál szekvenciával, amelynek segítségével a fehérje a képződés helyéről a keringésbe jut. Az APOA5 esetében ez a szekvencia a 23 és 24-es aminosavakat érinti. A 19-es pozícióban bekövetkező aminosavcsere során egy nagyobb aminosav épül be, így az közvetlen hatással lehet az export folyamatra, az APOA5 plazmabeli koncentrációja csökkenhet, magasabb plazma trigliceridszintet eredményezve.

3. CÉLKITŰZÉSEK

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

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

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

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

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A vizsgálatban résztvevő személyek

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

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

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

4.2. Alkalmazott módszerek

4.2.1. Polimeráz láncreakció (PCR)

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

végterfogatra állítottuk össze, melyhez 200 μ M dNTP oldatot, 1 U Taq polimeráz enzimet (10 U/ μ l), 5 μ l puffer oldatot (500 mM KCl, 14 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl; pH 9,0), 0,2 mM megfelelő primerpárt és 1 μ g DNS templátot használtunk. A vizsgálatokhoz alkalmazott primerek szekvenciáit és a PCR reakciók körülményeit a 2. táblázat foglalja össze.

4.2.2. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) módszer

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

4.3. DNS szekvencia meghatározás és analízis

Eredményeink alátámasztása érdekében mindkét irányból történő direkt szekvenálással meghatároztuk néhány minta nukleotidsorrendjét. A vizsgálatot ABI Prism 3100 Avant típusú automata szekvenáló készüléken végeztük. A kapott szekvenciák referencia-szekvenciával történő összehasonlítását a Winstar genetikai programcsomaggal végeztük.

4.4. Statisztikai kiértékelés

A klinikai adatok minden esetben átlag \pm SEM értéként vannak feltüntetve. A változók eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk. Ha a változók normál eloszlást mutattak, akkor az úgynevezett paraméteres próbákat; nem normál eloszlású változók esetén nem paraméteres próbákat alkalmaztunk. Minden esetben Kruskal-Wallis-teszttel állapítottuk meg, hogy van-e különbség az egyes csoportok értékei között. A csoportok klinikai és laboratóriumi paramétereit közötti különbségek páronkénti összehasonlításához normál eloszlású, diszkrét változók esetében χ^2 tesztet alkalmaztunk. Normál eloszlású, folytonos változónál a két csoport paramétereit Student-féle páros t-teszttel vizsgáltuk. Nem normál eloszlású változók esetén pedig Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk. A szignifikancia határértékét (p) minden esetben 0,05-nél állapítottuk meg.

A korreláció elemzéséhez és az esélyhányadosok megadásához logisztikus regressziós modellt használtunk. A konfidencia intervallum minden esetben 95%-os volt. A statisztikai analíziseket MS Excel, SPSS 11.5 és SAS programok segítségével végeztük.

2. táblázat
Az általunk vizsgált polimorfizmusok PCR-RFLP körülményei

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

5. AZ EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. táblázat

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

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

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

4. táblázat

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

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

*p<0,05 vs. kontroll csoport

5. táblázat

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

T-1131C	Stroke-os betegcsoport n=302		Kontroll csoport n=289	
	TT n=237	TC+CC n=65	TT n=261	TC+CC n=28
Triglicerid (mmol/l)	1,81 ± 0,62	2,21 ± 0,61*	1,48 ± 0,05	2,00 ± 0,30*
Összkoleszterin (mmol/l)	6,61 ± 1,67	6,52 ± 1,89	5,03 ± 1,78	4,89 ± 1,56

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

6. táblázat

A -1131C allélvariáns vizsgálata logisztikus regressziós analízissel

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

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

5.2. Az APOA5 gén C56G variánsának szerepe

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*p<0.05 vs. kontroll csoport

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

C56G	Stroke-os betegcsoport						Kontroll csoport (n=171)	
	Nagyér (n=124)		Kisér (n=180)		Kevert (n=99)		CC (n=153)	CG+GG (n=18)
	CC (n=98)	CG+GG (n=26)	CC (n=163)	CG+GG (n=17)	CC (n=84)	CG+GG (n=15)		
Triglicerid (mmol/l)	1,70 ± 0,06	1,97 ± 0,15*	1,72 ± 0,05	2,21 ± 0,18*	1,73 ± 0,08	2,05 ± 0,23*	1,56 ± 0,05	1,71 ± 0,19*
Összkoleszterin (mmol/l)	5,79 ± 0,12	5,92 ± 0,28	5,79 ± 0,09	5,30 ± 0,26	5,65 ± 0,12	5,80 ± 0,25	5,18 ± 0,08	5,35 ± 0,22

*p<0,05 vs. nem hordozó egyének (CC)

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

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

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

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

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

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

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

5.4. Az APOA5 gén leggyakoribb haplotípusainak lehetséges szerepe

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

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

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

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

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

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

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

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

* p<0,05 vs. kontroll csoport

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

	Stroke-os betegcsoport								Kontroll csoport n=131	
	Nagyér n=122		Kisér n=176		Kevert n=80		Összes beteg n=378		TT	TC+CC
T1259C	TT	TC+CC	TT	TC+CC	TT	TC+CC	TT	TC+CC	TT	TC+CC
	n=95	n=27	n=137	n=39	n=60	n=20	n=292	n=86	n=103	n=28
Triglicerid	1,64 ± 0,06	2,01 ± 0,15*	1,67 ± 0,04	2,08 ± 0,14*	1,67 ± 0,07	2,33 ± 0,24*	1,66 ± 0,03	2,12 ± 0,10*	1,45 ± 0,05	1,86 ± 0,17*
Összkoleszterin	5,90 ± 0,13	5,86 ± 0,24	5,71 ± 0,11	5,90 ± 0,19	5,57 ± 0,12	5,95 ± 0,34	5,75 ± 0,07	5,90 ± 0,14	5,25 ± 0,09	4,95 ± 0,20
IVS3+G476A	GG	GA+AA	GG	GA+AA	GG	GA+AA	GG	GA+AA	GG	GA+AA
	n=105	n=17	n=147	n=29	n=89	n=12	n=342	n=57	n=123	n=10
Triglicerid	1,65 ± 0,06	2,17 ± 0,22*	1,67 ± 0,03	2,22 ± 0,18*	1,70 ± 0,07	2,63 ± 0,36*	1,67 ± 0,03	2,29 ± 0,13*	1,49 ± 0,05	2,08 ± 0,37*
Összkoleszterin	5,87 ± 0,12	6,04 ± 0,334	5,79 ± 0,10	5,60 ± 0,21	5,66 ± 0,13	5,73 ± 0,45	5,79 ± 0,07	5,75 ± 0,17	5,23 ± 0,09	4,54 ± 0,31

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

14. táblázat

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

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

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

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Tanulmányunkban a következő megfigyeléseket tettük:

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

7. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

A dolgozat alapjául szolgáló eredeti közlemények

1. Havasi V, Szolnoki Z, Talian GC, Bene J, Komlosi K, **Maasz A**, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, Bodor A, Melegh B. Apolipoprotein A5 gene promoter region T-1131C polymorphism associates with elevated circulating triglyceride levels and confers susceptibility for development of ischemic stroke. *J Mol Neurosci*. 2006;29(2):177-183.
2. Szolnoki Z, **Maasz A**, Magyar L, Horvatovich K, Farago B, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, Bodor A, Hadarits F, Melegh B. Coexistence of angiotensin II type 1 receptor A1166C and angiotensin-converting enzyme D/D polymorphism represents susceptibility for small vessel associated ischaemic stroke. *Neuromolecular Med*. 2006;8(3):353-360.
3. **Maasz A**, Kisfali P, Szolnoki Z, Hadarits F, Melegh B. Apolipoprotein A5 gene C56G variant confers risk for the development of large-vessel associated ischemic stroke. *J Neurol*. 2008;255(5):649-54.
4. **Maasz A**, Kisfali P, Horvatovich K, Szolnoki Z, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Sipeky C, Hadarits F, Melegh B. Apolipoprotein A5 gene IVS3+G476A allelic variant confers susceptibility for development of ischemic stroke. *Circ J*. 2008;72(7):1065-70.

Egyéb közlemények

1. Putnoky P, Deak V, Bekasi K, Palvolgyi A, **Maasz A**, Palagyi Z, Hoffmann G, Kerepesi I. H protein of bacteriophage 16-3 and RkpM protein of *Sinorhizobium meliloti* 41 are involved in phage adsorption. *J Bacteriol*. 2004;186(6):1591-1597.
2. Komlosi K, Kellermayer R, **Maasz A**, Havasi V, Hollody K, Vincze O, Merkli H, Pal E, Melegh B. Maternally inherited deafness and unusual phenotypic manifestations associated with A3243G mitochondrial DNA mutation. *Pathol Oncol Res*. 2005;11(2):82-86.
3. **Maász A**, Horvatovich K, Magyar L, Talián C G, Bokor S, Laczy B, Tamaskó M, Molnár D, Wittmann I, Melegh B. Search for mitochondrial DNA T4291C mutation in Hungarian patients with metabolic syndrome. *Orv Hetil*. 2006;147(15):693-696.
4. **Maász A**, Melegh B. A mitokondriális DNS és mutációi. *Gyermekorvos Továbbképzés*. 2006;5(5):324-330.
5. **Maasz A**, Kisfali P, Horvatovich K, Mohas M, Marko L, Csongei V, Farago B, Jaromi L, Magyar L, Safrany E, Sipeky C, Wittmann I, Melegh B. Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome. *Pathol Oncol Res*. 2007;13(3):243-247.
6. Szolnoki Z, **Maasz A**, Magyar L, Horvatovich K, Farago B, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Bodor A, Hadarits F, Melegh B. The combination of homozygous MTHFR 677T and angiotensin II type-1 receptor 1166C variants confers the risk of small-vessel-associated ischemic stroke. *J Mol Neurosci*. 2007;31(3):201-207.
7. Sáfrány E, Csöngéi V, Járomi L, **Maász A**, Magyar L, Sipeky C, Melegh B. Mitochondrial DNA and its mutations: new advances in a new field. *Orv Hetil*. 2007; 148(21):971-978.

8. Farago B, Talian GC, **Maasz A**, Magyar L, Horvatovich K, Kovacs B, Cserep V, Kisfali P, Kiss CG, Czirjak L, Melegh B. Prevalence of functional haplotypes of the peptidylarginine deiminase/citrullinating enzyme gene in patients with rheumatoid arthritis: no influence of the presence of anti-citrullinated peptide antibodies. *Clin Exp Rheumatol*. 2007;25(4):523-528.
9. Kisfali P, Mohas M, **Maasz A**, Hadarits F, Marko L, Horvatovich K, Oroszlan T, Bagosi Z, Bujtor Z, Gasztonyi B, Wittmann I, Melegh B. Apolipoprotein A5 IVS3+476A allele confers risk for metabolic syndrome. *Circ J*. 2008;72(1):40-43.
10. Farago B, Magyar L, Safrany E, Csongei V, Jaromi L, Horvatovich K, Sipeky C, **Maasz A**, Radics J, Gyetvai A, Szekanecz Z, Czirjak L, Melegh B. Functional variants of interleukin-23 receptor gene confer risk for rheumatoid arthritis but not for systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(2):248-250.
11. **Maasz A**, Komlosi K, Hadzsiev K, Szabo Z, Willems PJ, Gerlinger I, Kosztolanyi G, Mehes K, Melegh B. Phenotypic variants of the deafness-associated mitochondrial DNA A7445G mutation. *Curr Med Chem*. 2008;15(13):1257-62.
12. Szolnoki Z, **Maasz A**, Magyar L, Horvatovich K, Farago B, Kondacs A, Bodor A, Hadarits F, Orosz P, Ille A, Melegh B. Galectin-2 3279TT variant protects against the lymphotoxin-alpha 252GG genotype associated ischaemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg*. 2009;111(3):227-30.
13. Kisfali P, Mohás M, **Maász A**, Hadarits F, Markó L, Késői L, Horvatovich K, Oroszlán T, Bagosi Z, Bujtor Z, Rinfel J, Gasztonyi B, Wittmann I, Melegh B. Haplotype analysis of the apolipoprotein A5 gene in patients with metabolic syndrome. *Nutr Metab Card Dis*, 2009 közlés alatt
14. Mohás M, Kisfali P, Baricza E, Mérei A, **Maász A**, Cseh J, Mikolás E, Szijártó IA, Melegh B, Wittmann I. A Polymorphism within the Fructosamine-3-kinase Gene is Associated with HbA1c Levels and the Onset of Type 2 Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2009 közlés alatt
15. Járomi L, Csöngői V, Polgár N, Szolnoki Z, **Maász A**, Horvatovich K, Faragó B, Sipeky C, Sáfrány E, Magyar L, Kisfali P, Mohás M, Janicsek I, Lakner L, Melegh B. Functional Variants of Glucokinase Regulatory Protein and Apolipoprotein A5 Genes in Ischemic Stroke. *J Mol Neurosci*, 2009 közlés alatt
16. Polgar N, Jaromi L, Csongei V, **Maasz A**, Sipeky C, Safrany E, Szabo M, Melegh B. Triglyceride level modifying functional variants of GALTN2 and MLXIPL in patients with ischaemic stroke. *European Journal of Neurology*, 2010 közlés alatt

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

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

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

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

Az értekezést Édesapám emlékének ajánlom.

Role of the apolipoprotein A5 gene' natural variants in the development of ischemic stroke

Ph.D. thesis

Anita Maász

Supervisor: Béla Melegh MD, PhD, DSc

University of Pécs
Faculty of Medicine
Department of Medical Genetics



Pécs, 2009

LIST OF ABBREVIATIONS

ACE	angiotensin-converting-enzyme
APOA5	apolipoprotein A5
AT1R	angiotensin II receptor
BMI	body mass index
bp	basepair
CT	computed tomography
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
HDL	high density lipoprotein
IMT	intima media thickness
IRE	insulin responsive element
IVS	intronic variance sequence
LPL	lipoprotein lipase enzyme
LPL-HSPG	lipoprotein lipase - heparan sulfate proteoglycans complex
MELAS	mitochondrial encephalopathy, lactic-acidosis, stroke like episodes
MRI	magnetic resonance imaging
MTHFR	methylenetetrahydrofolate reductase
OR	odds ratio
PCR	polymerase chain reaction
PLA	platelet glycoprotein IIb/IIIa membrane receptor
RFLP	restriction fragment length polymorphism
PPRE	peroxisome proliferator responsive element
SEM	standard error of mean
SNP	single nucleotide polymorphism
TOAST	Trial of Org 10172 of Stroke Treatment
UTR	untranslated region
VLDL	very low density lipoprotein
WHO	World Health Organization

1. INTRODUCTION

During the past decade, remarkable progression occurred in the identification of natural genetic variants not only in the background of stroke but in cerebro- and cardiovascular disorders. Studies of these variants provide new perspectives to foster the discovery of pathogenesis of the disorders.

Present work summarizes my research on several genetic variants as possible risk factors in the development of ischemic stroke in cerebrovascular disorders. In my PhD work, the role of natural variants of apolipoprotein A5 gene (APOA5) were under investigation. The protein, encoded by APOA5 gene, is a newly identified member of the apolipoprotein family. Both the apolipoprotein gene and the protein became the center of interest since their discovery, due to their impact on lipid parameters. Changes in lipid parameters – increase in triglyceride and/or total cholesterol levels – are major crucial risk factors for cardio- and cerebrovascular disorders.

High incidence rate of cerebrovascular diseases explains the marked attention, as ischemic stroke is the third leading cause of death after cardiovascular occlusions and tumors in the developing countries. Moreover, number of stroke cases can increase in the future due to the demographic changes and the inadequate treatment of modifiable risk factors.

However, encouraging results could be achieved in the prevention of the disease by combining the efforts of numerous organizations and by the proper education of the general population. Additional risk factors could be discovered with similar analyses, thus, these studies could contribute to the primary (battle against risk factors) and secondary (screening and care of people at risk of developing stroke) stroke prevention.

The polymorphisms in the genes show a pattern specific for each individual. As different genetic variants have been associated with great variety of disorders and with variations in metabolism of certain drugs, thus examination of polymorphisms open up new dimensions in personalized medicine, drawing attention to the importance of population studies.

2. OVERVIEW OF THE LITERATURE

2.1. Stroke and its risk factors

Stroke is a suddenly developing temporary, or in unfavourable cases permanent damage of the brain according to the definition of the World Health Organization. This definition has been used for more than 20 years to describe this remarkably heterogenous condition in clinical practice. This condition can affect both males and females; it can manifest at any time of life; however, it is more prevalent in males and people over 45 years of age.

The disease can be classified into two subgroups according to the manner of development: haemorrhagic and ischemic stroke. Ischemic stroke comprises 80% of cases. The most common cause of its development is atherosclerosis.

The determination of subtypes of ischemic stroke is undoubtedly most problematic from the viewpoint of its etiology. Ischemic stroke can be divided into three subgroups depending on its mechanism of development: thrombotic, embolic and hemodynamic stroke. This classification is based on results received by imaging examinations. Nowadays, it is well known, that these groups overlap and are not necessarily specific enough. However, the exact determination of subgroups cannot be ignored from the view of prevention of subsequent stroke and its treatment. Bamford and colleagues found significant differences in the outcome of condition and probability of development of subsequent stroke between stroke subgroups. A new classification which was built up primarily on the basis of clinical aspect, was initiated in 1991 (Oxford Community Stroke Project). Another classification was introduced in 1993, which was based on the most common pathophysiological mechanisms taking part in the development of stroke (TOAST). The system comprises five subgroups: 1) large-vessel atherosclerotic, 2) small-vessel occlusion type, 3) cardioembolic, 4) stroke with other etiology, 5) stroke with unidentified etiology.

Several risk factors were identified in the development of ischemic stroke, which were categorized as modifiable and non-modifiable risk factors. Age and gender were enrolled into non-modifiable risk factors. Previous stroke in case history, which increases considerably the probability of subsequent cerebrovascular event, can also be enrolled into non-modifiable risk factors.

Hypertonia, diabetes mellitus, obesity, presence of cardiovascular events, elevated triglyceride- and cholesterol levels, smoking, exaggerated alcohol consumption are categorized as among modifiable risk factors in the classification. The factors mentioned above proved to be unambiguously risk factor for the development of disease. Besides, nowadays additional possible risk factors like several natural variants within the genome came into the focus of animal and epidemiological studies.

Ischemic stroke is a multifactorial disorder regarding its etiology, several monogenic disorders can stand in the background of stroke; on the other hand, stroke can be a component of multisystemic

disorders like MELAS-syndrome. The chance of developing ischemic stroke may be increased by a single polymorphism of a gene, as well. However, co-occurrence of more polymorphisms of a given gene or polymorphisms of several genes could multiply the risk of stroke development, which could also be influenced by interactions with environmental risk factors. Several genes and variants have been described in the literature in the background of ischemic stroke. Among these, several polymorphisms of genes encoding enzymes involved in the renin-angiotensin system and nitric-oxide production; and of genes influencing hemostasis, homocysteine- and lipid metabolism are shown in *Table 1*.

Table 1.
Genes and their polymorphisms identified in the background of ischemic stroke

Genes	Polymorphisms
<i>hemostasis</i>	
II. factor (prothrombin) (<i>OMIM+176930</i>)	G20210A
V. factor (Leiden) (<i>OMIM*612309</i>)	Arg506Gln
VII. factor (<i>OMIM+227500</i>)	Arg353Gln
XIII. factor (<i>OMIM+134570</i>)	Val34Leu
fibrinogen (<i>OMIM*134830</i>)	G-455A
<i>renin-angiotensin system</i>	
ACE (<i>OMIM+106180</i>)	I/D
AT1R (<i>OMIM*106165</i>)	A1166C
<i>nitric-oxide-synthase system</i>	
eNOS (<i>OMIM+163729</i>)	Glu298Asp
<i>homocysteine metabolism</i>	
MTHFR (<i>OMIM*607093</i>)	C677T A1298C
<i>lipidmetabolism</i>	
APOAI (<i>OMIM*107680</i>)	C-3031T 317-321ins
APOE (<i>OMIM +107741</i>)	ε4, ε3, ε2
APOCIII (<i>OMIM*107720</i>)	T-2854G, C-455T C-482T, C3238G
LPL (<i>OMIM*609708</i>)	Asn291Ser

Abbreviations: ACE: angiotensin-converting-enzyme encoding gene; APOAI; -E; CIII: apolipoprotein AI; -E; -CIII protein encoding genes; Arg: arginine; Asn: asparagine; AT1R: angiotensin-receptor encoding gene; eNOS: endothelial nitric-oxide synthase encoding gene; Gln: glutamine; Leu: leucine; LPL: lipoprotein-lipase encoding gene; MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase encoding gene; OMIM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM>

2.2. Role of apolipoprotein A5 in lipid metabolism

Lipids play a crucial role in constructing of cell membranes (cholesterol) and the energy storage (triglycerides). Delivery of lipids is carried out by lipoprotein compartments. Lipoproteins are assembled from phospholipids and proteins (apoproteins). The apoproteins on the surface of lipoproteins fulfill structural and catalitical functions. They can activate or inhibit enzymes involved in lipoprotein metabolism, or serve as signals for receptors of liver or other cells, respectively. The apoproteins that are known so far are as follows: AI, AII, AIV, B48, B100, CI-III, E. The newly identified member of the apoprotein family is apolipoprotein A5 (APOA5). The gene encoding APOA5 protein, a member of APOAI-CIII-AIV gene cluster is located at chromosome 11q23. Examination of the orthologous human genomic sequence indicated its 27% sequence homology with APOAIV, which is 27 kb upstream of APOA5. Numerous studies support the concept that members of the apolipoprotein gene family arose by gene duplications, although the exact evolutionary events leading to the present-day cluster are not understood. The APOA5 gene is composed of 366 amino acids, and two transcripts of about 1.3 and 1.9 (kb) in length were identified, which are the result of alternative polyadenylation. The mature human APOA5 is a 39 kDa protein, which is expressed exclusively in the liver. Structural analyses revealed that APOA5 contains 76% α -helical structure presuming high affinity for lipid interfaces, its coiled-coil elements form two domains, and its N-terminal region shows high homology to other apoprotein domains. Concentration of APOA5 is high in the liver, however, after secretion into the plasma, its concentration decreases extremely: to 0.1-0.4 $\mu\text{g/ml}$.

APOA5 is a complex regulator of triglyceride metabolism. The protein has been identified in VLDL and HDL particles, it is distributed between these particles. Certain studies revealed that APOA5 can facilitate the catabolism of chylomicron and VLDL particles, but it does not influence the production of chylomicrons in the intestine and that of VLDL in the liver. APOA5 contributes to the elimination of triglyceride-rich lipoprotein particles by hydrolysis of plasma triglycerides. The exact mechanism, by which APOA5 decreases triglyceride levels, is not known. Certain *in vitro* studies presumed that APOA5 directly activates proteoglycan-bound lipoprotein lipase (LPL) to enhance intravascular triglyceride hydrolysis. Others found that APOA5 protein indirectly affects LPL activity by promoting its association with cell surface heparan sulfate proteoglycans, and by stabilizing lipoprotein lipase - heparan sulfate proteoglycan complexes (LPL-HSPG). Nevertheless, it can not be excluded, that APOA5 decreases triglyceride levels by modifying function of other apoproteins such as APOCIII.

Around 40 polymorphisms of the APOA5 gene have been identified since its discovery of APOA5 gene. Among these, only a few SNPs are known to have pathological significance. Among the variants causing structural changes in the protein, the C442T (Q148X) alteration was detected in homozygous form in a 9-year-old male first in the literature. This mutation is predicted to result in a

truncated APOA5 of 144 amino acids devoid of key functional domains like hydrophob lipid-binding and heparan-binding domains. Another mutation (Q139X) was identified in heterozygous form in a 63-year-old male. Q139X is predicted to determine a truncation of APOA5 at residue 16 of the mature protein, generating a 15 kDa truncated peptide, which does not contain a lipid-binding domain, thereby the protein cannot ensure the stability of LPL-HSPG complex, triggering plasma triglyceride level increase.. Besides, the IVS3+G3C alteration was found in heterozygous form, which affects the donor splice site of intron 3. The mutation causes exon skipping leading to expression of a protein of only 18 amino acids.

In addition, four frequent naturally occurring polymorphisms were identified in the APOA5 gene. All of these variants have been investigated in relation to their possible modifying effect on lipid metabolism in several studies. The T-1131C, T1259C, C56G, and IVS3+G476A allelic variants are located in the promoter region, in the 3' untranslated region, in the 3rd exon, and in the 3rd intron of the gene, respectively. Only the C56G variant could have functional relevances due to its position. The C56G sequence variant results in a nonconservative change of serine to tryptophan at codon 19. Similarly to other polypeptides that function in plasma, APOA5 is known to contain N-terminal export signal sequences with a cleavage site between amino acids 23 and 24, aiding the transport from the site of production to circulation. The change of a serine to a bulky tryptophan residue at position 19 could therefore reduces the rate of APOA5 export from the liver and results in higher triglycerides in humans.

3. AIMS OF THE STUDY

1. Determination of the allelic distribution of common natural variants of APOA5 gene (T-1131C, C56G, IVS3+G476A and T1259C), associated with other disorders like metabolic syndrome, hypertriglyceridemia and ischemic heart disease, in a stroke population divided into three subgroups according to TOAST classification.
2. Study of the effect of APOA5 gene -1131C, 56G, IVS3+476A and 1259C allelic variants on triglyceride- and cholesterol profile in patients and control subjects.
3. Evaluation of a possible susceptibility role of four natural APOA5 gene variants in the development of ischemic stroke.

4. MATERIALS AND METHODS

4.1. Human subjects

The patients and control samples examined were selected for our study from the sample collection of our department's Biobank, which belongs to the Central National Biobank Network of Hungary (www.biobank.hu). During the collection and use of DNA samples, the clinical data guidelines and regulations of the local ethics committee and those of the Helsinki Declaration in 1975 were followed; at the time of blood collection patients gave informed consent for the deposition of their anonymous DNA into Biobank and future use of it. The collection of DNA samples has been in progress since 2001 in collaboration with the Department of Cerebrovascular Diseases at Pándy Kálmán County Hospital.

All of the examined patients suffered from acutely developing ischemic stroke or were referred to the outpatient clinic because of a previously diagnosed stroke. All of the patients underwent extended clinical assessment, including general physical and laboratory examinations, cardiological and neurological examinations, electrocardiography, extracranial and transcranial Doppler sonography of brain-supplying arteries, transthoracic and/or transesophageal echocardiography, where appropriate, and past medical and familial anamnesis and evaluation of possible risk factor. Precise mapping of affected areas was performed with magnetic resonance imaging (MRI) examinations within 2 days of the first observation of the symptoms. An experienced investigator without knowledge of the clinical and laboratory data read all scans. Subjects, whose MRIs could not be recorded or whose examined clinical parameters and risk factors could not be obtained with certainty as a consequence of some technical cause or death were excluded from the study groups. After receiving MRI and clinical neurological results the patients were allocated to one of three stroke subgroups, which basically correspond to TOAST classification. The patients categorized as first (small-vessel) group had small-vessel infarcts (one or more subcortical hemispheric or brainstem infarcts with a diameter <1.5 cm on MRI, with one of the features of the traditional clinical lacunar syndrome and without cerebral cortical dysfunction). The patients in large-vessel group had cortical or cerebellar lesions and/or brainstem infarcts or subcortical hemispheric infarcts greater than 1.5 cm in diameter on MRI, with or without cerebral cortical impairment or brainstem or cerebellar dysfunction. The third cohort, the mixed group, contains all the patients, who had stroke with cardioembolism, or other non-specified etiology according to TOAST classification; and one or more lacunar and large-vessel infarcts on MRI, respectively. Such ordering of the patients into the mixed group was required because of the small number of patients from statistical point of view.

The age- and sex-matched control subjects were selected randomly for the study. Only unrelated Caucasian individuals free from neuro-imaging alterations and clinical history of stroke events were enrolled into the control group. Other parameters, such as the high-density lipoprotein-cholesterol levels of the subjects were not available for the study.

4.2. Applied methods

4.2.1. Polymerase chain reaction (PCR)

The genomic DNA was obtained from peripheral blood leucocytes using a standard salting out method. The examined parts of the available DNAs were amplified with polymerase chain reactions. The

GenBank reference sequence signed by AY422949 accession number was applied for the study design. The amplifications in all molecular analyses were carried out in a final volume of 50 µl containing 200 µM of each dNTP, 0.2 mM of each primer, 5 µl of reaction buffer (containing 500 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 14 mmol/L MgCl₂, pH 9.0), 1U of Taq polymerase (10 U/µl) and 1 µg extracted DNA as template. The sequences of oligonucleotide primers applied and circumstances of PCR reactions were reviewed in *Table 1*.

4.2.2. Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

For RFLP assays 10-15 microlitres of PCR products were digested with 1U of appropriate restriction endonuclease with 10x enzyme buffer incubating on the appropriate temperature. The primers were designed to create obligatory cleavage sites of the proper restriction enzymes in the amplicons independently of the genotype to control the accuracy of the digestion. The applied restriction endonucleases and their recognition and cleavage sites were reviewed in *Table 2*. The bands received were electrophoresed through an ethidium-bromide-stained 3% agarose gel and were analysed with UVIdoc geldocumentation system.

4.3. Bidirectional DNA sequencing and analyses

To validate our genotyping results bidirectional sequencing was performed for some samples. The examinations were carried out using ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyser. The sequence alignments were made using Winstar genetic program.

4.4. Statistical evaluation

All clinical data are expressed as mean±SEM. The distributions of the variables were examined using the Kolmogorov-Smirnov test. If the variables showed Gaussian distribution, we applied parametric tests. For variables with no Gaussian distribution, we applied nonparametric tests. In all statistical analyses, we checked for possible differences among all groups and subgroups using the Kruskal-Wallis test. Pairwise analyses of differences between groups in discreet clinical and laboratory parameters with normal distribution χ^2 tests were used. Continuous variables with normal distribution were analysed with Student's t-tests. For comparison of differences between groups in continuous variables with skewed distribution Mann-Whitney U tests were applied. Correlations were analysed and crude/adjusted odds ratios (OR) were ascertained using multiple logistic regression model. The confidence intervals and p-values of significance were established 95% and 0.05 for all analyses. All statistical analyses were performed using MS Excel, SPSS 11.5 és SAS packages.

Table 2.
PCR-RFLP assays for polymorphisms investigated in the study

Polymorphism	Oligonucleotide primers	Length of amplicons (bp)	Restriction endonuclease		Length of received fragment according to genotypes (bp)
			Name	Recognition sequence	
APOA5					
T-1131C (<i>rs662799</i>)	f: 5'-CCCCAGGAACTGGAGCGACCTT-3' r: 5'-TTCAAGCAGAGGGAAGCCTGTA-3'	398	<i>MseI</i>	5'-T [^] TAA-3' 3'-AAT [^] T-5'	homozygous normal (TT): 22, 109, 267 heterozygous (TC): 22, 109, 267, 289 homozygous mutant (CC): 109, 289
T1259C (<i>rs2266788</i>)	f: 5'-TCAGTCCTTGAAAGTGGCCT-3' r: 5'-ATGTAGTGGCACAGGCTTCC-3'	287	<i>BseGI</i>	5'-GGATGNN [^] -3' 3'-CCTAC [^] NN-5'	homozygous normal (TT): 122, 165 heterozygous (TC): 35, 87, 122, 165 homozygous mutant (CC): 35, 87, 165
C56G (<i>rs3135506</i>)	f: 5'-AGAGCTAGCACCGCTCCTTT-3' r: 5'-TAGTCCCTCTCCACAGCGTT-3'	256	<i>Cfr13I</i>	5'-G [^] GNCC-3' 3'-CCNG [^] G-5'	homozygous normal (CC): 79, 177 heterozygous (CG): 26, 79, 151, 177 homozygous mutant (GG): 26, 79, 151
IVS3+G476A (<i>rs2072560</i>)	f: 5'-CTCAAGGCTGTCTTCAG-3' r: 5'-CCTTTGATTCTGGGGACTGG-3'	280	<i>MnII</i>	5'-CCTC(N) ₇ [^] -3' 3'-GGAG(N) ₆ [^] -5'	homozygous normal (GG): 25, 114, 141 heterozygous (GA): 25, 41, 73, 114, 141 homozygous mutant (AA): 25, 41, 73, 141

5. RESULTS AND DISCUSSION

5.1. The role of APOA5 gene T-1131C variant

The T-1131C variant of the promoter region is the most intensively studied among naturally occurring variants of APOA5 gene. The alteration was found in 6% of the healthy European population. The frequency of the variant is very different among other population: 35% of the Japanese, 29% the Chinese and 20% of the Indian population carried the mutant allele. Our examinations revealed a 5% allele frequency in the controls representing the healthy population (*Table 4.*). The results correspond to findings reported by others on allele frequencies of European population. Besides, we found that the -1131C allele was at least two-fold more frequent in all stroke subgroups than in the controls. The allele distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium in stroke subgroups and in controls.

Plasma lipid levels are considered to be important determining factors of cardio- and cerebrovascular disorders. One mmol/l elevation in the triglyceride level can increase risk of coronary artery disease with 14% in males and with 37% in females. The possible role of lipids is controversial. The contradictions could be explained by the heterogeneity of the study populations and by the fact that several genetic factors influence triglyceride levels. In our study, triglyceride and serum total cholesterol profiles were examined in stroke groups and in controls in relation to the APOA5 -1131 genotypes, our results are summarized in *Table 5.* The triglyceride levels were significantly elevated in subjects carrying the mutant -1131C allele in homo- or heterozygous form, compared with non-carriers both in the overall group of stroke patients and in the controls. The serum total cholesterol levels did not show allele specific divergence in any groups. The impact of -1131C allelic variant on lipid parameters was intensively studied in adult and pediatric samples. The results regarding its effect on triglyceride levels are consistent, and our results are in agreement with these. Therefore we can conclude that carrying the -1131C mutant allelic variant elevates triglyceride levels independently of the population. The mechanism of action, by which -1131C allele increases triglyceride levels, is not clarified. As a hypothesis, it was assumed that promoter region alteration can have an impact on the transcription of APOA5 gene. However, Talmud et al could not verify this assumption. Vu-Dac et al identified a peroxisome proliferator responsive element (PPRE) in the promoter region (-272, -260) using bioinformatic tools, which regulates APOA5 expression. Carriage of -1131C allele could change the affinity to the regulatory elements decreasing APOA5 expression and as a consequence increasing triglyceride levels.

Another explanation comes from the possible linkage between the T-1131C variant and other genes. APOA5 could exert its impact on triglyceride levels through such an association. Complete linkage was found between APOA5 T-1131C and A-3G variants. The APOA5 A-3G variant was found to be in the Kozak consensus sequence (GACACCATGG), 3 bp upstream from the start codon. The basepair substitution in this position leads to a decrease in APOA5 mRNA translational rate, lower plasma APOA5

level and as a result to an increase of triglyceride levels. Besides, strong linkage disequilibrium was observed not only between T-1131C and APOA5 polymorphisms but the variants of other genes in the apolipoprotein gene cluster like C-482T or T-455C polymorphisms in the insulin responsible element (IRE) of the APOCIII gene. This IRE element was identified in the promoter region of APOAIII, which is the key component in the regulation of APOCIII by insulin. Polymorphisms in the promoter region could alter the important regulatory element, therefore abolish *in vitro* insulin regulation of APOCIII gene expression, and increase the APOCIII as well as the triglyceride levels.

Since its discovery the APOA5 T-1131C variant has been intensively examined in the background of several conditions in different populations. The T-1131C natural variant was unambiguously identified as a susceptibility factor for familiar hyperlipidemia and hypertriglyceridemia in Dutch, British, Spanish and Irish populations. The possible susceptibility role of T-1131C variant in the development of metabolic syndrome has been investigated by Japanese and Hungarian researchers. The variants have been found to confer risk for this condition.

The carriage of -1131C mutant allele was considered as risk factor for cardiovascular disease according to genotypic and statistical data of community-based international cooperation (Framingham Heart Study), but at the same time the role of T-1131C variant in coronary diseases is controversial. Carrying the -1131C mutant allele was established to confer increased risk for coronary artery disease in Hungarian and in Chinese populations, on the contrary, this association could not be confirmed in Tunisian and Italian population. These results led us to evaluate the possible susceptibility role of T-1131C variant in stroke patients, especially as it has not been examined in ischemic stroke at all. Odds ratios (ORs) calculated using multivariate regression analyses are summarized in *Table 6*. In all statistical analyses, odds ratios were adjusted for differences in age, gender, BMI, serum total cholesterol, ischemic heart disease, hypertension, diabetes mellitus, smoking- and drinking habits between groups. We could confirm that carriage of -1131C mutant allele confers increased risk for the development of ischemic stroke. The presence of APOA5 T-1131C variant results in an increase in triglyceride levels leading to endothel dysfunctions, abnormal lipid deposition in the endothelial cells and formation of atherosclerotic plaques as well as development of occlusions in the cardiovascular system, which could cause ischemic stroke.

Table 3.
Major clinical data and laboratory results of patients with stroke event and control subjects

T-1131C	Patients with stroke			Controls (n=289)
	Large-vessel (n=149)	Small-vessel (n=85)	Mixed (n=68)	
Gender (male/female)	70/79	40/45	32/36	132/157
Age (years)	62.5 ± 10.1*	65.3 ± 11.6*	60.2 ± 15.1*	54.6 ± 13.3
BMI (kg/m ²)	25.8 ± 2.13*	26.7 ± 3.22*	25.9 ± 3.83*	23.0 ± 2.74
Total cholesterol (mmol/l)	6.43 ± 1.76*	6.64 ± 2.43*	6.89 ± 1.74*	4.89 ± 0.74
Triglycerides (mmol/l)	1.82 ± 0.53*	1.72 ± 0.63*	2.34 ± 0.79*	1.29 ± 0.64
Hypertension	47.0%*	55.3%*	55.9%*	13.8%
Diabetes mellitus	32.9%*	43.5%*	29.4%*	5.88%
Smokers	28.9%*	31.8%*	33.8%*	13.8%
Drinkers	20.1%*	21.2%*	17.6%*	4.84%
Ischemic heart disease	17.5%*	16.5%*	19.1%*	5.88%

Values are as mean ± SEM, *p<0.05

Table 4.
Distribution of APOA5 -1131 genotypes amongst the different stroke subtypes and the controls.

T-1131C	Patients with stroke				Controls n=289
	Large-vessel n=149	Small-vessel n=85	Mixed n=68	Overall n=302	
TT	117 (78.5%)	67 (78.8%)	53 (77.9%)	237 (78.5%)	261 (90.3%)
TC+CC	30+2 (21.5%)	16+2 (21.2%)	14+1 (22.1%)	60+5 (21.5%)	28 (9.7%)
C allele frequency	11%*	12%*	12%*	12%*	5%

*p<0.05 vs. controls

Table 5.
Serum triglyceride and total cholesterol levels in stroke patients and controls according to the APOA5 -1131 genotypes

T-1131C	Patients with stroke n=302		Controls n=289	
	TT n=237	TC+CC n=65	TT n=261	TC+CC n=28
Triglycerides (mmol/l)	1.81 ± 0.62	2.21 ± 0.61*	1.48 ± 0.05	2.00 ± 0.30*
Total cholesterol (mmol/l)	6.61 ± 1.67	6.52 ± 1.89	5.03 ± 1.78	4.89 ± 1.56

Values are as mean ± SEM, *p<0.05 vs. non-carriers (TT)

Table 6.
Logistic regression analysis for the association between -1131C allelic variant and risk for stroke

T-1131C	Large-vessel n=149	Small-vessel n=85	Mixed n=68	Overall stroke n=302
Adjusted ORs [#]	1.9* (1.1-5.9)	2.3* (1.3-4.9)	2.2* (1.2-5.1)	2.1* (1.3-4.7)

*p<0.05 vs. controls; [#]Adjusted for differences in age, gender, BMI, serum total cholesterol, ischemic heart disease, hypertension, diabetes mellitus, smoking-, and drinking habits

5.2. The role of C56G natural variant

The C56G variant in the third exon of APOA5 gene is one of the most intensively studied naturally occurring variants of the gene. The C56G alteration causes a hydrophilic serine to hydrophobic tryptophan amino acid change at codon 19 (S19W). Its prevalence was considered to be different among populations. The alteration was found in less than 0.1% of the Japanese and Chinese populations. Additionally, 3, 4.8, 4.8 and 15% of the Indian, Afro-American, French and Spanish population carry the C56G variants, respectively. Our data showed a 5.6% mutant allele frequency in the healthy control subjects, which corresponds to findings in European populations. The distribution of C56G alleles are demonstrated in *Table 8*. The allele distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium both in stroke subgroups and in controls. Significant accumulation of 56G mutant allele was observed within the group

with large-vessel infarcts compared to the controls. There were no significant differences observed in small-vessel and mixed groups compared to controls.

In this study we were able to examine the impact of C56G variant on lipid parameters. The triglyceride levels presented were elevated in patients carrying the G allele in homo- or heterozygous form compared to non-carriers in all stroke subgroups as well as in the controls. The serum total cholesterol levels did not differ considerably in the groups. The lipid parameters of the patients and controls in correlation to the C56G genotypes are shown in *Table 9*. Based on our results we can conclude that carriage of 56G mutant allele results in a 16-28% elevation in triglyceride levels, which is in agreement with the findings of other research groups. Talmud et al observed a 8-16% increase in triglyceride levels in a Caucasian population, while this increase was higher (18-26%) in a Turkish population. The impact of the variant on lipid parameters and its mechanism by which it can increase triglyceride levels became the focus of several studies. The C56G variant is the only functional variant, which causes increase in triglyceride levels directly, without association with other SNPs. The C to G alteration at nucleotide position 56 results in serine to tryptophan amino acid change in the hydrophil domain of APOA5 signal sequence. This change could influence the transportation through the endoplasmic reticulum negatively, which could decrease the amount of APOA5 protein secreted and increase triglyceride levels. However, synergistic effect of other polymorphisms on the development of diseases can not be excluded. Schaefer et al genotyped a total of 170 patients with elevated fasting triglyceride concentrations for APOE and APOA5 alteration. Almost all of the hypertriglyceridemic individuals with APOE 2/2 genotype had an additional 56G allele. However, they failed to identify APOE 2/2 in combination with APOA5 C56G polymorphism in normolipidemic patients. They therefore hypothesized that APOA5 C56G is an important cofactor for hyperlipidemia in individuals with APOE 2/2 phenotype. This association has not been confirmed in larger population samples yet. The C56G alteration has been examined in several studies because of its drastic impact on triglyceride levels. Carriage of this APOA5 variant confers elevated risk for development of myocardial infarcts, coronary artery disease and metabolic syndrome according to the results of population studies. Talmud et al showed faster atherogenesis in the presence of 56G mutant allele. The determination of the carotid intima-media thickness (IMT) is widely accepted for prediction of the degree of vascular occlusions. IMT was considered to be in direct proportion to the probability of the development of stroke or myocardial infarct.

In our study, odds ratios calculated by logistic regression analyses were adjusted for differences in age, gender, BMI, serum total cholesterol, ischemic heart disease, hypertension, diabetes mellitus, smoking- and drinking habits between groups (*Table 10*). A strong association was found between the presence of the 56G allele and the development of large-vessel associated ischemic stroke; however, carriage of the mutant allele does not confer risk for small-vessel and mixed etiology strokes.

These observations were confirmed by the results of Framingham Offspring Study, which showed that the 56G allele associates with increased common internal carotid artery IMT.

Table 7.
The major clinical and laboratory parameters of the stroke patients and controls

C56G	Patients with stroke			Controls (n=171)
	Large-vessel (n=124)	Small-vessel (n=180)	Mixed (n=99)	
Gender (male/female)	46/78	70/110	43/56	58/113
Age (years)	65.2 ± 1.28	66.7 ± 1.14	64.7 ± 1.44	57.7 ± 1.33
BMI (kg/m ²)	25.0 ± 0.22	25.5 ± 0.14	24.7 ± 0.16	24.5 ± 0.22
Triglycerides (mmol/l)	1.75 ± 0.06*	1.77 ± 0.05*	1.70 ± 0.07*	1.55 ± 0.04
Total cholesterol (mmol/l)	5.81 ± 0.11*	5.74 ± 0.09*	5.67 ± 0.11*	5.20 ± 0.08

#p<0.001 vs. controls; *p<0.05 vs. Controls

Table 8.
Distributions of the APOA5 C56G allele in each stroke group and in controls

C56G	Patients with stroke			Controls (n=171)
	Large-vessel (n=124)	Small-vessel (n=180)	Mixed (n=99)	
CC	98 (79.0%)	163 (90.6%)	84 (84.9%)	153 (89.5%)
CG+GG	25+1 (21.0%)*	16+1 (9.44%)	14+1 (15.1%)	17+1 (10.5%)
G allele frequency	10.9*	5	8.1	5.6

*p<0.05 vs. controls

Table 9.
The triglycerides and serum total cholesterol levels between carriers and non-carriers in each stroke subgroup and in controls

C56G	Patients with stroke						Controls (n=171)	
	Large-vessel (n=124)		Small-vessel (n=180)		Mixed (n=99)		CC (n=153)	CG+GG (n=18)
	CC (n=98)	CG+GG (n=26)	CC (n=163)	CG+GG (n=17)	CC (n=84)	CG+GG (n=15)		
Triglycerides (mmol/l)	1.70 ± 0.06	1.97 ± 0.15*	1.72 ± 0.05	2.21 ± 0.18*	1.73 ± 0.08	2.05 ± 0.23*	1.56 ± 0.05	1.71 ± 0.19*
Total cholesterol (mmol/l)	5.79 ± 0.12	5.92 ± 0.28	5.79 ± 0.09	5.30 ± 0.26	5.65 ± 0.12	5.80 ± 0.25	5.18 ± 0.08	5.35 ± 0.22

*p<0.05 vs. non-carriers (CC)

Table 10.
Multivariate logistic regression analyses of C56G variant

C56G	Patients with stroke		
	Large-vessel (n=124)	Small-vessel (n=180)	Mixed (n=99)
Crude OR	2.122* (1.258-3.580) p=0.005	0.615 (0.348-1.089) p=0.095	1.250 (0.678-2.304) p=0.474
#Adjusted OR	2.132* (1.184-3.840) p=0.012	0.650 (0.334-1.263) p=0.203	1.315 (0.676-2.558) p=0.421

*p<0.05 vs. controls; # Adjusted for differences in age, gender, BMI, serum total cholesterol, ischemic heart disease, hypertension, diabetes mellitus, smoking-, and drinking habits

5.3. The role of APOA5 gene T1259C and IVS3+G476A natural variants

Relatively small amount of knowledge is available about the variant in intronic and in 3'-untranslated (3'-UTR) region of APOA5 gene compared to the variants detailed above. Our research revealed that the IVS3+476A mutant allele was more frequent in all stroke subgroups compared to controls. By contrast, none of the 1259T or C allelic variants showed significant accumulation in any of the stroke subtypes or in controls (*Table 12.*). The allele distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium.

Examinations directed at the impact of APOA5 on lipid parameters revealed that the triglyceride levels were significantly elevated in subjects carrying 1259C and IVS3+476A alleles, compared to non-carriers in both overall stroke patients group and in the controls. (*Table 13.*), which results correspond with data of studies carried out on other European populations. However, in a Costa Rican population no elevation of triglyceride levels was detected in the groups carrying the mutant alleles. The exact mechanism, by which APOA5 variants can influence triglyceride levels, is unknown yet; presumably there is linkage disequilibrium between APOA5 polymorphisms and other variants, which can play a crucial role. In the European populations, a strong linkage disequilibrium was ascertained between APOA5 variants, however, the linkage of the variants in the Costa Rican population was only partial, which could explain why there were no association between carriership of the mutant alleles and triglyceride levels.

Analysing the odds ratios obtained by logistic regression analyses, we can conclude that, in spite of the triglyceride-raising effect of variant T1259C, carrying the mutant C allele does not confer independent risk for ischemic stroke. In contrary, carrying IVS3+476A mutant allele itself or together with other factors can increase the chance of the development of stroke 3-4-fold (*Table 14.*). To understand the exact mechanism, additional haplotype-analyses are needed, by which co-occurrence and impact of certain SNPs can be observed.

5.4. The possible role of the most common haplotypes of APOA5

Pennacchio et al confirmed that the most common alterations in the APOA5 gene are in strong linkage disequilibrium and constitute two major haplotype variant: APOA5*2 (-1131C, 1259C, IVS3+476A) and APOA5*3 (56G). These two haplotypes together with wild type haplotype (APOA5*1,*2,*3) account for approximately 98% of all haplotypes in average populations. The remaining 2% includes rare haplotype variants like APOA5*4 (-1131C) and APOA5*5 (1259C) belong. The number of patients and controls collected for the study is proved to be too small to examine and analyse statistically the role of APOA5 haplotype variants. Haplotype analyses is not the subject of this dissertation; however, it can be stated according to our preliminary results that carrying the APOA5*2

haplotype is strongly associated with increased triglyceride levels and confers susceptibility for ischemic stroke in all stroke subgroups. These findings are in agreement with observations of other research groups in this field. According to our future plans, distribution of all haplotypes determined by APOA5 naturally occurring variants, their impact on lipid parameters and their role in the development of ischemic stroke could be examined following the expansion of our sample pool.

Table 11.
Most relevant clinical and laboratory parameters in both patients with stroke and the controls

	Patients with stroke				Controls n=131
	Large-vessel n=122	Small-vessel n=176	Mixed n=80	Overall stroke n=378	
Gender (male/female)	50/72	67/109	33/47	150/228	41/90
Age (years)	67.6 ± 1.30	66.6 ± 1.17	63.0 ± 1.35	66.1 ± 0.74	58.1 ± 1.51
BMI (kg/m ²)	25.2 ± 0.16	25.5 ± 0.15	24.9 ± 0.18	25.2 ± 0.09	24.0 ± 0.17
Triglycerides (mmol/l)	1.71 ± 0.06*	1.76 ± 0.04 [#]	1.83 ± 0.08*	1.76 ± 0.03 [#]	1.53 ± 0.05
Total cholesterol (mmol/l)	5.90 ± 0.11 [#]	5.75 ± 0.09 [#]	5.67 ± 0.13 [#]	5.78 ± 0.06 [#]	5.18 ± 0.09

Values are as mean ± SEM *p<0.05 vs. controls; [#]p<0.001 vs. controls

Table 12.
Distribution of genotypes and allele frequencies for apolipoprotein A5 (APOA5) T1259C and IVS3+G476A in both patients with stroke and the controls

		Patients with stroke				Controls n=131
		Large-vessel n=122	Small-vessel n=176	Mixed n=80	Overall stroke n=378	
T1259C	TT	95 (77.9%)	137 (77.8%)	60 (75.0%)	292 (77.2%)	103 (78.6%)
	TC+CC	27 (22.1%)	39 (22.2%)	20 (25.0%)	86 (22.8%)	28 (21.4%)
	C allele frequency	11.5%	11.6%	13.1%	11.9%	11.1%
IVS3+G476A	GG	104 (85.2%)	147 (83.5%)	68 (85.0%)	319 (84.4%)	123 (93.9%)
	GA+AA	18 (14.8%)	29 (16.5%)	12 (15.0%)	59 (15.6%)	8 (6.10%)
	A allele frequency	7.40%*	8.52%*	7.50%*	7.94%*	3.05%

* p<0.05 vs. Controls

Table 13.
Triglyceride and serum total cholesterol profiles in certain stroke groups and in controls according to the APOA5 genotypes

	Patients with stroke								Controls n=131	
	Large-vessel n=122		Small-vessel n=176		Mixed n=80		Overall stroke n=378		TT	TC+CC
	TT	TC+CC	TT	TC+CC	TT	TC+CC	TT	TC+CC		
T1259C	n=95	n=27	n=137	n=39	n=60	n=20	n=292	n=86	n=103	n=28
Triglycerides (mmol/l)	1.64 ± 0.06	2.01 ± 0.15*	1.67 ± 0.04	2.08 ± 0.14*	1.67 ± 0.07	2.33 ± 0.24*	1.66 ± 0.03	2.12 ± 0.10*	1.45 ± 0.05	1.86 ± 0.17*
Total cholesterol (mmol/l)	5.90 ± 0.13	5.86 ± 0.24	5.71 ± 0.11	5.90 ± 0.19	5.57 ± 0.12	5.95 ± 0.34	5.75 ± 0.07	5.90 ± 0.14	5.25 ± 0.09	4.95 ± 0.20
IVS3+G476A	GG n=105	GA+AA n=17	GG n=147	GA+AA n=29	GG n=89	GA+AA n=12	GG n=342	GA+AA n=57	GG n=123	GA+AA n=10
Triglycerides (mmol/l)	1.65 ± 0.06	2.17 ± 0.22*	1.67 ± 0.03	2.22 ± 0.18*	1.70 ± 0.07	2.63 ± 0.36*	1.67 ± 0.03	2.29 ± 0.13*	1.49 ± 0.05	2.08 ± 0.37*
Total cholesterol (mmol/l)	5.87 ± 0.12	6.04 ± 0.334	5.79 ± 0.10	5.60 ± 0.21	5.66 ± 0.13	5.73 ± 0.45	5.79 ± 0.07	5.75 ± 0.17	5.23 ± 0.09	4.54 ± 0.31

Values are as mean ± SEM; *p<0.05 vs. non-carriers

Table 14.
Multiple logistic regression analysis for the association between carrying IVS3+476A and 1259C allelic variants and risk for stroke

		Patients with stroke			
		Large-vessel n=122	Small-vessel n=176	Mixed n=80	Overall stroke n=378
T1259C	Crude OR	1.045 (0.575 - 1.901)	1.047 (0.605 - 1.813)	1.226 (0.636 – 2.363)	1.083 (0.669 - 1.754)
	Adjusted OR [#]	1.054 (0.454 – 2.451)	1.477 (0.668 - 3.267)	1.391 (0.631 – 3.066)	1.400 (0.751 - 2.609)
IVS3+G476A	Crude OR	2.661* (1.112 – 6.369)	3.033* (1.338 – 6.877)	2.713* (1.057 – 6.962)	2.844* (1.320 – 6.124)
	Adjusted OR [#]	3.905* (1.355 – 11.253)	4.748* (1.540 - 14.640)	2.926* (1.021 – 8.384)	3.644* (1.452 – 9.144)

*p<0.05 vs. controls; [#]Adjusted for differences in age, gender, BMI, serum total cholesterol, ischemic heart disease, hypertension, diabetes mellitus, smoking-, and drinking habits

6. SUMMARY

The following observations were made in our study:

1. The examination of the impact of natural APOA5 variants on lipid parameters revealed that the presence of -1131C, 56G, IVS3+476A and 1259C allelic variants resulted in statistically significant elevation in the concentration of triglycerides in all stroke subgroups and control subjects.
2. Analysing the effect of carrying APOA5 variants on cholesterol levels, no significant difference was observed in cholesterol levels in either stroke patients or control subjects.
3. The molecular genetic analysis of allele distribution showed significant accumulation of -1131C, IVS3+476A alleles in all stroke subgroups compared to the controls. In contrary, the 56G allele showed significant accumulation only in large-vessel group in comparison with the controls.
4. No significant differences were found between the APOA5 T1259C allelic distributions in either stroke subgroups or controls, in spite of the fact that, there are significant increase in triglyceride levels caused by the carriage of 1259C allelic variant, similarly to the other three APOA5 variants.
5. Logistic regression analyses revealed that carriage of -1131C and IVS3+476A allelic variants confer independent risk factors for the development of ischemic stroke in all stroke subgroups (large-, small-vessel, mixed). In case of C56G variant, positive association was verifiable only between carrying 56G allelic variants and large-vessel stroke. After regression analyses it can be ascertained that presence of neither the normal nor the mutant allele of T1259C variant confer increased risk for the development of ischemic stroke.

8. LIST OF PUBLICATIONS

The thesis is based on the following publications

1. Havasi V, Szolnoki Z, Talian GC, Bene J, Komlosi K, **Maasz A**, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, Bodor A, Melegh B. Apolipoprotein A5 gene promoter region T-1131C polymorphism associates with elevated circulating triglyceride levels and confers susceptibility for development of ischemic stroke. *J Mol Neurosci.* 2006;29(2):177-183.
2. Szolnoki Z, **Maasz A**, Magyar L, Horvatovich K, Farago B, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, Bodor A, Hadarits F, Melegh B. Coexistence of angiotensin II type 1 receptor A1166C and angiotensin-converting enzyme D/D polymorphism represents susceptibility for small vessel associated ischaemic stroke. *Neuromolecular Med.* 2006;8(3):353-360.
3. **Maasz A**, Kisfali P, Szolnoki Z, Hadarits F, Melegh B. Apolipoprotein A5 gene C56G variant confers risk for the development of large-vessel associated ischemic stroke. *J Neurol.* 2008;255(5):649-54.
4. **Maasz A**, Kisfali P, Horvatovich K, Szolnoki Z, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Sipeky C, Hadarits F, Melegh B. Apolipoprotein A5 gene IVS3+G476A allelic variant confers susceptibility for development of ischemic stroke. *Circ J.* 2008;72(7):1065-70.

Other publications

1. Putnok P, Deak V, Bekasi K, Palvolgyi A, **Maasz A**, Palagyi Z, Hoffmann G, Kerepesi I. H protein of bacteriophage 16-3 and RkpM protein of *Sinorhizobium meliloti* 41 are involved in phage adsorption. *J Bacteriol.* 2004;186(6):1591-1597.
2. Komlosi K, Kellermayer R, **Maasz A**, Havasi V, Hollody K, Vincze O, Merkli H, Pal E, Melegh B. Maternally inherited deafness and unusual phenotypic manifestations associated with A3243G mitochondrial DNA mutation. *Pathol Oncol Res.* 2005;11(2):82-86.
3. **Maász A**, Horvatovich K, Magyar L, Talián C G, Bokor S, Laczy B, Tamaskó M, Molnár D, Wittmann I, Melegh B. Search for mitochondrial DNA T4291C mutation in Hungarian patients with metabolic syndrome. *Orv Hetil.* 2006;147(15):693-696.
4. **Maász A**, Melegh B. A mitokondriális DNS és mutációi. *Gyermekorvos Továbbképzés.* 2006;5(5):324-330.
5. **Maasz A**, Kisfali P, Horvatovich K, Mohas M, Marko L, Csongei V, Farago B, Jaromi L, Magyar L, Safrany E, Sipeky C, Wittmann I, Melegh B. Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome. *Pathol Oncol Res.* 2007;13(3):243-247.
6. Szolnoki Z, **Maasz A**, Magyar L, Horvatovich K, Farago B, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Bodor A, Hadarits F, Melegh B. The combination of homozygous MTHFR 677T and angiotensin II

type-1 receptor 1166C variants confers the risk of small-vessel-associated ischemic stroke. *J Mol Neurosci.* 2007;31(3):201-207.

7. Sáfrány E, Csöngéi V, Járomi L, **Maász A**, Magyar L, Sipeky C, Melegh B. Mitochondrial DNA and its mutations: new advances in a new field. *Orv Hetil.* 2007; 148(21):971-978.
8. Farago B, Talian GC, **Maasz A**, Magyar L, Horvatovich K, Kovacs B, Cserep V, Kisfali P, Kiss CG, Czirjak L, Melegh B. Prevalence of functional haplotypes of the peptidylarginine deiminase/citrullinating enzyme gene in patients with rheumatoid arthritis: no influence of the presence of anti-citrullinated peptide antibodies. *Clin Exp Rheumatol.* 2007;25(4):523-528.
9. Kisfali P, Mohas M, **Maasz A**, Hadarits F, Marko L, Horvatovich K, Oroszlan T, Bagosi Z, Bujtor Z, Gasztonyi B, Wittmann I, Melegh B. Apolipoprotein A5 IVS3+476A allele confers risk for metabolic syndrome. *Circ J.* 2008;72(1):40-43.
10. Farago B, Magyar L, Safrany E, Csongei V, Jaromi L, Horvatovich K, Sipeky C, **Maasz A**, Radics J, Gyetvai A, Szekanecz Z, Czirjak L, Melegh B. Functional variants of interleukin-23 receptor gene confer risk for rheumatoid arthritis but not for systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(2):248-250.
11. **Maasz A**, Komlosi K, Hadzsiev K, Szabo Z, Willems PJ, Gerlinger I, Kosztolanyi G, Mehes K, Melegh B. Phenotypic variants of the deafness-associated mitochondrial DNA A7445G mutation. *Curr Med Chem.* 2008;15(13):1257-62.
12. Szolnoki Z, **Maasz A**, Magyar L, Horvatovich K, Farago B, Kondacs A, Bodor A, Hadarits F, Orosz P, Ille A, Melegh B. Galectin-2 3279TT variant protects against the lymphotoxin-alpha 252GG genotype associated ischaemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg.* 2009;111(3):227-30.
13. Kisfali P, Mohás M, **Maász A**, Hadarits F, Markó L, Késői L, Horvatovich K, Oroszlán T, Bagosi Z, Bujtor Z, Rinfel J, Gasztonyi B, Wittmann I, Melegh B. Haplotype analysis of the apolipoprotein A5 gene in patients with metabolic syndrome. *Nutr Metab Card Dis*, 2009 in press
14. Mohás M, Kisfali P, Baricza E, Mérei A, **Maász A**, Cseh J, Mikolás E, Szijártó IA, Melegh B, Wittmann I. A Polymorphism within the Fructosamine-3-kinase Gene is Associated with HbA1c Levels and the Onset of Type 2 Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2009 in press
15. Járomi L, Csöngéi V, Polgár N, Szolnoki Z, **Maász A**, Horvatovich K, Faragó B, Sipeky C, Sáfrány E, Magyar L, Kisfali P, Mohás M, Janicsek I, Lakner L, Melegh B. Functional Variants of Glucokinase Regulatory Protein and Apolipoprotein A5 Genes in Ischemic Stroke. *J Mol Neurosci*, 2009 in press
16. Polgar N, Jaromi L, Csongei V, **Maasz A**, Sipeky C, Safrany E, Szabo M, Melegh B. Triglyceride level modifying functional variants of GALTN2 and MLXIPL in patients with ischaemic stroke. *European Journal of Neurology*, 2010 in press

Cumulative impact factor (without citable abstract): 45,112

ACKNOWLEDGEMENTS

The research, which serves as a basis of the doctoral dissertation, was carried out in the Department of Medical Genetics in the University of Pécs.

First of all, I would like to express my greatest thanks to my supervisor, Professor Béla Melegh for rendering it possible for me to join the Ph.D. program; for his continuous support, and confidence, his direction of my work and his sentences, motivation.

I am indebted to Dr. Zoltan Szolnoki and colleagues from the Department of Cerebrovascular Diseases in Pándy Kálmán County Hospital, for collecting voluminous stroke biobank and for the profitable collaboration.

I am very grateful to Ph.D. fellow workers of our department to help my research with their professional knowledge and useful advice; especially thanks to Peter Kisfali, who greatly contribute to successful execution of molecular genetic analyses with his experience.

I would like to thank for each colleague of mine in the laboratory. Special thanks should go to Edit Papp and Melinda Szegfűné Ózdi, who help me ironing out technical difficulties.

Last but not least I am much obliged to my husband, my parents and my brother, who helped me with their devoted provision and patience, who have encouraged me and have stood by me at all times creating a harmonious family life for my research.

I recommend the dissertation to the memory of my father.