

**Hajlamosító gének vizsgálata magyar morbus Crohnos és colitis ulcerosás
betegpopulációban**

PhD értekezés tézisei

Magyari Lili

PTE ÁOK Orvosi Genetikai és Gyermekfejlődéstani Intézet

Témavezető: Dr. Melegh Béla

2007

1. BEVEZETÉS

1.1. Gyulladásos bélbetegségek jellemzői

A gyulladásos bélbetegségek, angolszász nomenklatúra szerint IBD (Inflammatory bowel disease) közé soroljuk a Crohn-betegséget (Crohn's disease, CD) és a colitis ulcerosát (ulcerative colitis, UC). Hazánkban a betegek száma 20-25 ezerre tehető, a tünetek 20-40 éves kor között jelentkeznek. Mindkét nemben előfordul, nőkben gyakoribb. Környezeti és genetikai faktorok is befolyásolhatják a betegség kifejlődését. Kiváltó okok között szerepelnek külső tényezők, fertőzések, gyógyszerek, mérgek, mérgező anyagok, dohányzás, drogok, alkohol, bélbaktériumok. Nagy jelentőséget tulajdonítanak a genetikai háttérnek, ugyanis fennáll bizonyos genetikai hajlam, mely megnyilvánulhat a bélnyálkahártya csökkent ellenálló képességében és az immunrendszer működési zavarában. Mindez környezeti tényezőkkel társulva gyulladásos folyamatot indít be. A normál bélflórának is szerepe lehet a gyulladás kifejlődésében. A mikrobiális flórát kb. 300-400 különböző baktériumtörzs alkotja. Ezek egyensúlyban vannak a nyálkahártya immunrendszerével. Ez az arány krónikus bélgyulladás esetén felborul, megnövekszik a gyulladásképző baktériumok pl. *Bacteroides* törzsek koncentrációja. Különböző kívülről a szervezetbe bekerült baktériumoknak és vírusoknak is szerepe lehet az IBD kialakulásában (*Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Yersinia enterocolitica*, *cytomegalovírus*, *rotavírus*). Gyakran szövődmények lépnek fel, mint szemtünetek, szájgyulladás, bőrtünetek, epeúti gyulladás, epekő, vesekő, hasnyálmirigy gyulladás, ízületi problémák.

1.1.1. Crohn betegség

Ismeretlen eredetű, idült gyulladásos gasztrointestinális kórkép, mely nevét Burill Crohn amerikai belgyógyásztól kapta. Leggyakrabban a vékony- és a vastagbelet, ritkábban a tápcsatorna felsőbb szakaszait (nyelőcső, gyomor) érintheti. A betegség korlátozódhat csak a vékonybélre (ileitis), érintett lehet a vékonybél és a vastagbél egy része (ileocolitis), előfordul, hogy csupán a vastagbelet érinti (granulomatosis colitis). Az esetek nagy részében a terminális vékonybélre lokalizálódik a gyulladás (terminális ileitis). Esetenként a vékonybél több szakasza (regionális enteritis), illetve a vastagbél több szakasza (Crohn-colitis) vesz részt a betegség kialakulásában. Tünetei: hasi fájdalom, haspuffadás, hasmenés, véres széklet, sipolyképződés, fisztulák, láz, étvágytalanság, hányás, fogyás, növekedésbeli elmaradás, rossz közérzet, pubertás késése.

1.1.2. Colitis ulcerosa

A fekélyes vastagbélgyulladás a vastagbél ismeretlen eredetű, krónikus, gyulladásos betegsége, mely kizárólag a vastagbélre lokalizálódik. A gyulladás a bélfal rétegei közül csak a nyálkahártyát érinti. A gyulladás a végbél felől indul, és fokozatosan terjed proximális irányba. A betegség korlátozódhat a végbélre (proctitis) vagy a teljes vastagbélre (pancolitis). A szigmabél és a végbél együttes érintettsége (proctosigmoiditis), illetve a leszálló vastagbél, a szigmabél és a végbél egyidejű gyulladása (bal oldali colitis) is jellemző. Tünetei: hasi fájdalom, görcsök, véres hasmenés, székrekedés, láz, víz- és sóvesztés, vérszegénység, fehérjehiány, vashiány.

1.1.3. A két betegség összehasonlítása

Lényeges különbség, hogy a betegség a tápcsatorna mely szakaszán jelentkezik. Colitis ulcerosában kizárólag a vastagbél érintett, míg a Crohn-betegség a vékonybélre és a vastagbéltre is kiterjedhet, gyakran érintett lehet a tápcsatorna felsőbb szakasza is, mint nyelőcső, gyomor. A colitis ulcerosa mivel csak a vastagbélben fordul elő, így ha szükségessé válik a vastagbél eltávolítása, végleges gyógyulás következik be. Ezzel szemben a Crohn betegség az emésztőrendszer egészét érintheti a szájtól a végbélig, ezért a gyulladt szakasz eltávolítása nem hoz gyógyulást, a betegség bárhol visszatérhet. A másik fontos különbség a bélfal érintettségén alapul. Colitis ulcerosában a gyulladásos jelenségek csak a bél nyálkahártyájára és a submucosára korlátozódnak, míg Crohn-betegség esetén a bélfal minden rétege érintett a mucosától a serosáig. Míg a colitis ulcerosa összefüggő gyulladást hoz létre, a Crohn betegség szegmentális, gyulladt és ép bélszakaszok váltakoznak egymással. Crohn-betegség esetén tehát a gyulladás mélyebb rétegekbe terjed, olyannyira, hogy elérve a bél külső felszínét összetapadhat a szomszédos vékony- vagy vastagbélszakaszokkal, hasi szervekkel (hólyag, méh, hüvely). Ilyenkor az összetapadt szervek között rendellenes járat, ún. belső sipoly alakul ki. A baktériumokat tartalmazó béltartalom a sipolyon átjuthat a steril szervekbe, vagy kikerülhet a szabad hasüregbe és további betegségeket okozhat (pl. tályog). Jellemző az ún. külső sipoly is, mely a végbél körüli bőrfelületen alakul ki. Colitis ulcerosában ezek a szövődmények nem fordulnak elő. Amikor a bél gyulladt, beteg, a bélfal nem képes megfelelően működni, felszívni a tápanyagokat. Ez az egyik oka, hogy a gyulladásos bélbetegek gyakran alultápláltak, étvágytalanok. A Crohn-betegség jellemző tünete a fogyás. Ha a betegség a vékonybelet érinti, felszívódási zavar, tápanyaghiány tünetei alakulhatnak ki. Ezzel ellentétben colitis ulcerosára, mivel a vastagbelet érinti sem fogyás, sem felszívódási zavar nem jellemző.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Genetikai variánsok keresése, melyek összefüggésbe hozhatók a gyulladásos bélbetegségekkel.

2.1. CARD15 gén R702W, G908R, 1007finsC

Elsőként azonosították CD génként, mely a monocytákban a murmaril-dipeptidet (MDP) és a bakteriális lipopoliszacharidokat érzékelő citoszolreceptorban lévő NOD2 fehérjét kódolja. A 16-os kromoszóma pericentromerikus régiójában helyezkedik el. Kaukázusi populációban elvégzett vizsgálatok kimutatták, hogy ennek a génnek 3 kódoló variánsa független rizikó faktort jelent CD kialakulására, ezek a 4-exonban elhelyezkedő Arg702Trp és a 8-as exonban található Gly908Arg misszensz mutációk, illetve a 11-es exonban lévő 1007finsC inszerció. Ázsiai populáción elvégzett egyes vizsgálatok viszont arra irányították a figyelmet, hogy ennek a három variánsnak a hordozása nem minden népcsoport esetén jelent kockázati tényezőt Crohn betegségre. A célunk az volt, hogy ezt az összefüggést megvizsgáljuk magyar felnőtt Crohnos betegmintáinkon a jobb karakterizálás érdekében. Vizsgálatokat végeztek amerikai, német, izraeli zsidó, és olasz gyerek Crohnos mintákon, az eredmények megerősítették a CARD15 gén 3 variánsának hajlamosító voltát Crohn betegségre.

Kíváncsiak voltunk, hogy magyar gyerek Crohnos populációban hajlamosító tényezőnek bizonyul-e e három variáns.

2.2. SLC22A4 gén C1672T, SLC22A5 gén G-207C

A karnitin és más organikus kationok kétirányú membrántranszportjáért felelős OCTN kation transzporter két variánsa, az SLC22A4 gén 9-es exonjában elhelyezkedő C1672T szubsztitúció és az SLC22A5 gén promóter régiójában található G-207C transzverzió együttesen hajlamosítanak Crohn betegség kialakulására, meghatározva az ún. TC haplotípust. Ezt Peltekova írta le, majd számos kutató megerősítette, különböző populációk vizsgálata esetén - német, görög, kanadai, olasz, skót, spanyol, svéd. Ez a haplotípus azonban nem jelent minden esetben szuszceptibilitási ágenst egyes népcsoportok esetén. Vermeire és munkatársai flamandokat vizsgálva azt tapasztalták, hogy az OCTN kation transzporter nem játszik szerepet a gyulladásoos bélbetegségek kialakításában. Kevés publikációban vizsgálták a TC haplotípus UC-re való hajlamosítottságát. Palmieri és munkatársai azt találták, hogy a haplotípus frekvencia emelkedett mind CD, mind UC esetén, és a TC haplotípus a gyulladásoos bélbetegségek számos klinikai tünetét befolyásolja. Waller és munkatársai szerint az OCTN variánsok mindkét betegséggel kapcsolatban vannak. Tosa és munkatársai japán Crohnos és colitis ulcerosás betegeket vizsgálva azt tapasztalták, hogy a TC haplotípus nem hajlamosít egyik betegség kialakulására sem. Számos cikket tanulmányozva elmondható, hogy különböző populációktól függ, hogy a TC haplotípus hajlamosító tényező-e az adott népcsoportokban előforduló gyulladásoos bélbetegségekre. Felmerül a kérdés, hogy magyar felnőtt IBD-s és gyerek Crohnos populációban hajlamosít-e e két eltérés a két betegség valamelyikére, vizsgálataink ennek kiderítésére irányultak.

2.3. CTLA4 gén A+49G

A T sejt receptorként funkcionáló CTLA4 gén 1-es exonjában lévő A+49G eltérés Thr Ala szubsztitúciót okoz a fehérjeszekvencia 17-es pozíciójában, melyet Nistico fedezett fel. Ez összefüggésbe hozható IBD-vel, celiaciával, I-es típusú diabétesszel, Graves-betegséggel, rheumatoid arthritisszel, sclerosis multiplexszel. Machida és mts. japán populációban hajlamosító tényezőként determinálták ezt a variánst CD-re és UC-re, ugyanakkor Xia és mts. nem találtak összefüggést IBD-vel. Vizsgálataink arra irányultak, hogy kiderítsük, magyar populációban hajlamosít-e ez az eltérés IBD-re.

2.4. IL23R gén rs10889677 C/A, rs2201841 T/C, rs1884444 G/T

Az érdeklődés középpontjába került Oppmann által felfedezett IL-23 citokin és annak receptora. Az IL-23 fontos szerepet játszik a veleszületett és T-sejt mediálta béllal kapcsolatos gyulladásoos folyamatokban. Duerr és mts. az IL23R-t mint IBD gént azonosították, 12 SNP-t vizsgálva a gén régiójában, melyek közül egyesek hajlamosítanak IBD-re (rs10889677, rs2201841, rs1004819, rs11209032, rs1495965), mások védenek ellene (rs11209026, rs10489629, rs11465804, rs7517847, rs1343151), míg egyesek közömbösnek bizonyultak (rs7530511, rs1884444). Mi 3 eltérést emeltünk ki, az egyik a gén 3'UTR régiójában elhelyezkedő rs10889677 C/A és az rs2201841 T/C, melyek hajlamosítanak a betegség kialakulására, a másik az

rs1884444 G/T, mely nem mutat összefüggést IBD-vel az általuk vizsgált zsidó és nem zsidó populációkban.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Vizsgált betegpopuláció

A minták gyűjtése 2003 óta zajlik az ország különböző területeiről (Békéscsaba, Budapest, Pécs, Szombathely, Zalaegerszeg). Biobankunk az országos biobank része (www.biobank.hu), mely részére eddig 201 felnőtt Crohnos, 241 felnőtt colitis ulcerosás, valamint 19 gyerek Crohnos beteg vérmintáját gyűjtöttük össze, ez a szám azóta is folyamatosan növekszik. Vizsgálatainkhoz 235 felnőtt kontroll és 49 gyerek kontroll személytől vettünk vért, ők korban, nemből különböző, klinikailag egészséges egyének.

3.2. Genotípus elemzés

A DNS-izolálást EDTA-val alvadásgátolt vérmintákból végeztük kisózásos módszerrel. A DNS-analízis kiindulópontja a polimeráz láncreakció (PCR) útján végzett amplifikáció, mely standard módon az adott szekvenciára specifikus, szintetikus oligonukleotid primerek, Taq polimeráz, dNTP, puffer és genomiális DNS-templát jelenlétében zajlott. A PCR termék analizálása gélelektroforézissel, etidium bromidos festéssel és UV-megvilágítással történt. A különböző géneknél (CARD15, SLC22A4, SLC22A5, CTLA4, IL23R) lévő eltérések esetén a mutációk/polimorfizmusok meghatározására RFLP módszert vagy direkt szekvenálást alkalmaztunk. Az analízisekre etikai bizottsági engedély birtokában került sor. A vizsgálatok a Pécsi Orvostudományi és Egészségtudományi Központ Regionális Kutatásetikai Bizottsága 2000. július 10-én, 2003. február 4-én és az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományi és Kutatásetikai Bizottsága 2004. március 9-én kiadott engedélyei alapján történtek.

3.2.1. CARD15 gén R702W, G908R, 1007finsC

A PCR amplifikáció után szekvenálást alkalmaztunk a következő primerpárokkal: R702W esetén a forward primer: 5'-GAG CCG CAC AAC CTT CAG ATC-3', a reverse primer: 5'-ACT TGA GGT GCC CAA CAT TCA G-3'; G908R esetén a forward primer: 5'-GTT CAT GTC TAG AAC ACA TAT CAG G-3', a reverse primer: 5'-GTT CAA AGA CCT TCA GAA CTG G-3'; míg 1007finsC esetén a forward primer: 5'-CCT TGA AGC TCA CCA TTG TAT C-3', a reverse primer: 5'-GAT CCT CAA AAT TCT GCC ATT C-3'. A DNS szekvenálás kivitelezése ABI 3100 automata szekvenálóval történt.

3.2.2. SLC22A4 gén C1672T, SLC22A5 gén G-207C

Genotipizálásra PCR/RFLP módszert és direkt szekvenálást alkalmaztunk. Szekvenálás esetén a következő primereket terveztük: SLC22A4 C1672T esetén a forward primer 5'-AGA GAG TCC TCC TAT CTG ATT G-3', míg a reverse primer 5'-TCC TAG CTA TTC TTC CAT GC-3'; SLC22A5 G-207C esetén a forward primer 5'-AGT CCC GCT GCC TTC CTA AG-3', míg a reverse primer 5'-GTC ACC TCG TCG TAG TCC CG-3'. PCR/RFLP módszernél az amplifikálásra a következő primereket terveztük: SLC22A4 C1672T esetén a forward primer 5'-TGA CAG GAA

AGA ATG AAA AGC C-3', a reverse primer 5'-TTT CAC TTT CTG CAT CTG CTC T-3'. SLC22A5 G-207C esetén a forward primer 5'-GCC GCT CTG CCT GCC AGC-3', a reverse primer 5'-GGT CGC TAT CAG GAA CAC GGA GGA-3'. A felsokszorozott DNS szakaszok allélspecifikus restrikciós endonukleázzal lettek megemésztve, SLC22A4 C1672T *MnII*-gyel, SLC22A5 G-207C *HpaII*-vel. A restrikciós fragmenteket 3%-os agaróz gélen futtattuk és UV-val világítottuk.

3.2.3. CTLA4 gén A+49G

A CTLA4 A+49G eltérés detektálásához PCR/RFLP módszert alkalmaztunk. A PCR reakcióhoz a következő primereket használtuk: forward primer 5'-CTT GAG GTT GTC TTT TCG AG-3', reverse primer 5'-TAC TAA ATA CCT GGC GCT CT-3'. Az amplifikátum emésztése *BseXI* allélspecifikus restrikciós endonukleázzal történt.

3.2.4. IL23R gén rs10889677 C/A, rs2201841 T/C, rs1884444 G/T

A célszekvencia amplifikálására a következő primereket terveztük: rs10889677 SNP esetén 5'-ATC GTG AAT GAG GAG TTG CC-3' forward primer 5'-TGT GCC TGT ATG TGT GAC CA-3' reverse primer; rs2201841 variáns esetén 5'-GGC AAA AGG GAA TTG AGA GG-3' forward primer, 5'-GGC CTA TGA TTA TGC TTT TTC CTG-3', reverse primer; rs1884444 variáns esetén 5'-CAG TCT TTT CCT GCT TCC AGA CAT GAA TC-3' forward primer és 5'-AAT AAA ATC ATA CTC TTG CCA ATG GCC C-3' reverse primer. A PCR termékek emésztése allélspecifikus restrikciós endonukleázzal történt, *MnII* alkalmazása rs10889677 SNP-nél, *HpyF3I* rs2201841 variánsnál, *PscI* 1884444 eltérésnél. A restrikciós fargmenteket 2.5%-os agaróz gélen futtatuk és UV-transzilluminációval tettük láthatóvá.

3.3. Statisztikai analízis

SPSS 11.5 programcsalád segítségével, χ^2 -tesztet és regressziós analízist alkalmaztunk a betegség és a vizsgált genetikai variáns között fenálló összefüggés feltárására.

4. EREDMÉNYEK

4.1. CARD15 gén R702W, G908R, 1007finsC

Megvizsgáltunk 100 felnőtt Crohnos beteget (47 férfi, 53 nő, átlag életkor: 37.3 év) és 94 klinikailag egészséges kontrollt (47 férfi, 47 nő, átlag életkor: 45.6 év). CARD15 gén 1007finsC esetén a mutáns allélfrekvencia szignifikánsan emelkedett volt összehasonlítva a felnőtt Crohnos betegpopulációt a felnőtt kontrollokkal, mely megmutatkozik a heterozigóták és homozigóták szintjén is, a felnőtt Crohnos betegpopuláció 17%-a hordozza mindkettő vagy egyik mutáns allélt, szemben a kontrollokkal 4.3% (1. táblázat). CARD15 gén R702W és G908R mutációit vizsgálva felnőtt Crohnos populációban nem tapasztaltunk eltérést a felnőtt kontrollokhöz képest sem a homozigóták szintjén, sem az allélfrekvenciát tekintve (1. táblázat).

Megvizsgáltunk 19 gyerek Crohnos beteget (14 fiú, 5 lány, átlag életkor: 13.4 év), és 49 gyerek kontroll mintát (28 fiú, 21 lány, átlag életkor: 14.4 év). G908R variáns során a CC homozigóta és C allél frekvencia szignifikánsan emelkedett volt a gyerek Crohnos populációban a gyerek kontrollokhöz képest (2. táblázat). Ugyanez

mondható el az 1007finsC variáns esetén is, ahol szintén szignifikánsan emelkedett insCinsC homozigóta és Cins allél frekvenciát találtunk a gyerek Crohnos mintákat tekintve (2. táblázat). Az allélfrekvenciákat összehasonlítva elmondható, hogy az R702W mutáció esetén nem volt szignifikáns különbség a T allél frekvenciáját tekintve a gyerek Crohnos minták és a gyerek kontrollok között (2. táblázat).

4.2. SLC22A4 gén C1672T, SLC22A5 gén G-207C

Vizsgálatunk tárgya 100 felnőtt Crohnos beteg (47 férfi, 53 nő, átlag életkor: 37.3 év) és 94 klinikailag egészséges kontroll (47 férfi, 47 nő, átlag életkor: 45.6 év) volt. SLC22A4 C1672T nem mutatott szignifikáns eltérést TT homozigóták és T allél frekvencia szinten, összehasonlítva a felnőtt Crohnos betegcsoportot a felnőtt kontrollal (3. táblázat). SLC22A5 G-207C esetén sem a CC homozigóták, sem a C allél frekvencia nem különbözött szignifikánsan a két csoport között (3. táblázat). A TC haplotípus gyakorisága sem mutatott összefüggést a felnőtt Crohnos betegcsoport és a felnőtt kontrollok között (3. táblázat).

E két eltérést megvizsgáltuk 121 colitis ulcerosás betegben (47 férfi, 74 nő, átlag életkor: 47.8 év) és 110 kontrollban (59 férfi, 51 nő, átlag életkor: 46.7 év). SLC22A4 C1672T esetén a T allél frekvencia és az SLC22A5 G-207C esetén a C allél frekvencia nem különbözött szignifikánsan a kontrolloktól (4. táblázat). A TC haplotípus frekvenciában sem találtunk szignifikáns különbséget összehasonlítva a két csoportot (4. táblázat).

Megvizsgáltunk 19 gyerek Crohnos beteget (14 fiú, 5 lány, átlag életkor: 13.4 év), és 49 kontroll gyerek mintát (28 fiú, 21 lány, átlag életkor: 14.4 év). Nem tudtunk kimutatni különbséget sem C1672T, sem G-207C variáns allélfrekvenciáit, sem a haplotípust tekintve a gyerek Crohnos betegpopuláció és a gyerek kontrollok között (5. táblázat).

4.3. CTLA4 gén A+49G

Az allélfrekvenciák Hardy-Weinberg szabály szerint alakultak mind a betegpopulációban, mind a kontrollokban. 130 Crohnos (55 férfi, 75 nő, átlag életkor: 43.0 év) és 150 colitis ulcerosás beteget (63 férfi, 87 nő, átlag életkor: 46.1 év) vizsgáltunk. A vizsgálatához 170 kontroll mintát gyűjtöttünk (49 férfi, 121 nő, átlag életkor: 57.7 év). A G allél jelenléte önmagában nem jelent rizikótényezőt Crohn betegségekre és colitis ulcerosára, sem GG homozigóta, sem AG heterozigóta genotípus esetén, sem a G allél frekvencia szintjén a kontrollokhoz viszonyítva (6. táblázat).

4.4. IL23R gén rs10889677 C/A, rs2201841 T/C, rs1884444 G/T

Az IL23 gén vizsgálatát végeztük 190 Crohnos betegben (88 férfi, 102 nő, átlag életkor: 39.6 év) és 220 kontrollban (115 férfi, 105 nő, átlag életkor: 41.7 év). Rs10889677 AA genotípus szignifikánsan emelkedett volt Crohn betegekben összehasonlítva az egészséges kontrollokkal (7. táblázat). Logisztikus regressziós analízis kimutatta, hogy ennek a genotípusnak a hordozása 2.19-szer hajlamosít jobban Crohn betegség kialakulására. A másik hajlamosító variáns (rs2201840) esetén is szignifikánsan emelkedett CC homozigóta, illetve C allél frekvenciát találtunk (7. táblázat). Logisztikus regressziós analízis kimutatta, hogy aki hordozza a CC genotípust, annak 2.41-szer nagyobb a rizikófaktora Crohn betegség kialakulására. Ugyanakkor a közömbös variáns (rs1884444) nálunk is annak bizonyult (7. táblázat).

1. táblázat: CARD15 gén variánsainak allélfrekvencia eloszlása felnőtt Crohn betegekben és felnőtt kontrollokban.

		Felnőtt Crohn betegek n=100	Felnőtt kontrollok n=94
CARD15 genotípus			
R702W	CC	87 (87.0%)	87 (92.6%)
	CT	12 (12.0%)	5 (5.3%)
	TT	1 (1.0%)	2 (2.1%)
	T allél frekvencia	7.00%	4.79%
G908R	GG	94 (94.0%)	93 (98.9%)
	GC	6 (6.0%)	1 (1.16%)
	CC	-	-
	C allél frekvencia	3.00%	0.53%
1007finsC	--	83 (83.0%)	90 (95.7%)
	- insC	15 (15.0%)	4 (4.3%)
	insC insC	2 (2.0%)	-
	Cins allél frekvencia	9.50%*	2.13%

*P<0.05

2. táblázat: CARD15 gén variánsainak allélfrekvencia eloszlása gyerek Crohn betegekben és gyerek kontrollokban.

		Gyerek Crohn betegek n=19	Gyerek kontrollok n=49
CARD15 genotípus			
R702W	CC	18 (94.7 %)	46 (93.9 %)
	CT	1 (5.3 %)	2 (4.1 %)
	TT	-	1 (2.0 %)
	T allél frekvencia	2.63 %	4.08 %
G908R	GG	14 (73.7 %)	48 (98.0 %)
	GC	3 (15.8 %)	1 (2.0 %)
	CC	2 (10.5 %)*	-
	C allél frekvencia	18.4 %*	1.02 %
1007finsC	--	13 (68.5 %)	46 (93.9 %)
	- insC	4 (21.0 %)	3 (6.1 %)
	insC insC	2 (10.5 %)*	-
	Cins allél frekvencia	21.1 %*	3.06 %

*P<0.05

3. táblázat: SLC22A4 és SLC22A5 gének eltérései által meghatározott TC haplotípus és az allélok megoszlási gyakorisága felnőtt Crohnos betegcsoport és felnőtt kontroll populáció esetén.

		Felnőtt Crohn betegek n=100	Felnőtt kontrollok n=94
SLC22A4 genotípus			
C1672T	CC	37 (37.0%)	28 (29.8%)
	CT	54 (54.0%)	45 (47.9%)
	TT	9 (9.0%)	21 (22.3%)
	T allél frekvencia	36.0%	46.3%
SLC22A5 genotípus			
G-207C	GG	31 (31.0%)	19 (20.2%)
	GC	54 (54.0%)	51 (54.3%)
	CC	15 (15.0%)	24 (25.5%)
	C allél frekvencia	42.0%	52.7%
	TC haplotípus	9 (9.0%)	19 (20.2%)

*P<0.05

4. táblázat: SLC22A4 és SLC22A5 gének eltérései által meghatározott TC haplotípus és az allélok megoszlási gyakorisága felnőtt colitis ulcerosás betegcsoport és felnőtt kontroll populáció esetén.

		Felnőtt colitis ulcerosás betegek n=121	Felnőtt kontrollok n=110
SLC22A4 genotípus			
C1672T	CC	38 (31.4%)	35 (31.8%)
	CT	53 (43.8%)	48 (43.6%)
	TT	30 (24.8%)	27 (24.5%)
	T allél frekvencia	46.7%	46.4%
SLC22A5 genotípus			
G-207C	GG	33 (27.3%)	25 (22.7%)
	GC	58 (47.9%)	57 (51.8%)
	CC	30 (24.8%)	28 (25.5%)
	C allél frekvencia	48.8%	51.4%
	TC haplotípus	23 (19.0%)	25 (22.7%)

*P<0.05

5. táblázat: SLC22A4 és SLC22A5 gén variánsainak allélfrekvencia gyakorisága gyerek Crohnos betegcsoport és gyerek kontroll populáció esetén.

		Gyerek Crohn betegek n=19	Gyerek kontrollok n=49
SLC22A4 genotípus			
C1672T	CC	4 (21.0 %)	12 (24.5 %)
	CT	11 (58.0 %)	25 (51.0 %)
	TT	4 (21.0 %)	12 (24.5 %)
	T allél frekvencia	50.0 %	50.0 %
SLC22A5 genotípus			
G-207C	GG	3 (15.8 %)	10 (20.4 %)
	GC	7 (36.8 %)	26 (53.1 %)
	CC	9 (47.4%)	13 (26.5 %)
	C allél frekvencia	65.8 %	53.1 %

*P<0.05

6. táblázat: CTLA4 A+49G allélfrekvencia eloszlása Crohn betegekben és kontrollokban.

		Crohn betegek n=130	Colitis ulcerosás betegek n=150	Kontrollok n=170
CTLA4 genotípus				
+49A/G	AA	47 (36.2 %)	56 (37.3 %)	70 (41.2 %)
	AG	67 (51.5 %)	66 (44.0 %)	73 (42.9 %)
	GG	16 (12.3 %)	28 (18.6 %)	27 (15.9 %)
G allél frekvencia		38.1 %	40.6 %	37.4 %

*P<0.05

7. táblázat: Az IL23R gén eltérései és azok által meghatározott allélfrekvenciák Crohn betegekben és kontrollokban.

		Crohn betegek n=190	Kontrollok n=220
IL23R genotípus			
rs10889677	CC	75 (39.5%)	96 (43.6%)
	CA	92 (48.4%)	111 (50.5%)
	AA	23 (12.1%)*	13 (5.91%)
	A allél frekvencia	36.3%	31.1%
rs2201841	TT	75 (39.5%)	101 (45.9%)
	CT	90 (47.4%)	106 (48.2%)
	CC	25 (13.2%)*	13 (5.91%)
	C allél frekvencia	36.8%*	30.0%
rs1884444	GG	57 (30.0%)	55 (25.0%)
	GT	132 (69.5%)	162 (73.6%)
	TT	1 (0.53%)	3 (1.36%)
	T allél frekvencia	35.3%	38.2%

*P<0.05

5. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

A gyulladássos bélbetegségek ismeretlen eredetű, visszatérő, sajátos krónikus lefolyást mutató, változatos intesztinális és extraintesztinális tünetekkel járó kórképek, melyek az emésztőrendszer nem-specifikus gyulladásához vezetnek, genetikai, környezeti és immunológiai tényezők komplex együtthatása eredményeként alakulnak ki. A kutatómunka célja annak megállapítása volt, hogy magyarországi felnőtt- és gyermek populációkban az 5. és 9. locusának eltérései hajlamosítanak-e IBD kialakulására magyar populációban. A genetikai eredmények meghatározására PCR-t, majd ezt követően RFLP-t vagy direkt szekvenálást alkalmaztunk.

Ismert CARD15 mutációkat vizsgáltunk magyar felnőtt és elsőként magyar gyermek Crohnos populációban. A CARD15 gén mutációi közül az 1007finsC emelkedett mutáns allélfrekvenciát mutatott a felnőtt Crohnos betegcsoportban a felnőtt kontrollokhoz képest, mely megmutatkozott az egy vagy két mutáns allélt hordozó heterozigóták, illetve homozigóták esetén is, míg az R702W és a G908R nem mutatott szignifikáns eltérést a felnőtt Crohnos és a felnőtt kontroll csoport összehasonlítása során. Megerősítettük, hogy magyar felnőtt Crohnos populációban az 1007finsC kockázati tényezőt jelent Crohn betegség kialakulására. Gyermek Crohnos mintákat vizsgálva a G908R és az 1007finsC esetén szignifikáns mutáns homozigóta és mutáns allélfrekvencia szintet kaptunk a gyermek kontrollokkal való összevetés során, ezen variánsok hajlamosítanak a betegségre, míg az R702W esetén nem találtunk összefüggést összehasonlítva a két csoportot. Megállapíthatjuk, hogy magyaroknál a gyermek Crohnos profil különbözik a felnőtt Crohnos profiltól. Különböző populációktól függ, hogy a három variáns közül mindhárom, vagy csak egyesek, vagy egyik sem jelent rizikótényezőt a betegség kialakulása szempontjából.

Az SLC22A4 gén C1672T és az SLC22A5 gén G-207C eltérései által meghatározott TC haplotípus vizsgálatát végeztük először magyar felnőtt Crohn, colitis ulcerosás és az irodalomban először gyermek Crohn mintákon. Azt tapasztaltuk, hogy ez a haplotípus nem jelent rizikótényezőt gyulladássos bélbetegségre sem felnőtt IBD-s, sem gyermek Crohnos betegpopulációban. Bizonyos populációk esetén a TC haplotípus hajlamosít gyulladássos bélbetegség kialakulására, míg más populációkban nem. A mi eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a magyarok a flamand és japán populációkhoz állnak közel.

Megvizsgáltuk a CTLA4 A+49G eltérést magyar IBD populációban, és azt tapasztaltuk, hogy ez a variáns nem hajlamosít erre a betegségre magyaroknál. Az eredmények azt mutatják, hogy a CTLA4 A+49G SNP heterozigóta vagy homozigóta formája nem jelent kockázati tényezőt magyar IBD populációban. Itt is elmondható, hogy különböző populációk esetén rizikótényező ez a variáns gyulladássos bélbetegségre, például japán populációban hajlamosít, míg kínai és holland populációkban nincs összefüggés ezen variáns és a kialakult betegség között. A magyar populációban az általunk kapott eredmények a negatív hatást támasztják alá.

Elsőként vizsgáltuk magyar populációban az IL23R eltéréseit, melyet Duerr és mts. írtak le 2006-ban. Az IL23R esetén a legszembetűnőbb a rizikótényező rs10889677 és rs2201841 esetén, ugyanis ott mind a homozigóták, mind az allélfrekvencia szintjén szignifikáns eltérést találtunk, így magyar populáció esetén ezeknek a variánsoknak a hordozása jelentős kockázatot jelent Crohn betegség

kialakulására, míg az rs1884444 variáns közömbösnek bizonyult. Az IL23R 2 hajlamosító variánsa (rs10889677 és rs2201841) magyar populációban hajlamosítónak bizonyult a zsidó és nem zsidó populációkhoz hasonlóan.

Az értekezésben bemutatott eredményeknek elsősorban a gyulladáshoz vezető bélbetegségek genetikai hátterének megismerésében és megértésében van jelentősége. Az újabb genetikai variánsok felderítése, genotípus-fenotípus összefüggések megállapítása elősegítheti a kockázati tényezők pontosabb megismerését, a korai diagnózist, a hatékonyabb megelőzést és kezelést.

6. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

I. Megállapíthatjuk, hogy az általunk vizsgált magyar felnőtt Crohnos populációban a CARD15 gén mutációi közül az 1007finsC hajlamosítónak bizonyult.

II. Gyerek Crohn betegeket vizsgálva kijelenthetjük, hogy magyar populációban a CARD15 gén eltérései közül a G908R és az 1007finsC is szuszceptibilitási ágenst jelentenek.

III. SLC22A4 gén C1672T és az SLC22A5 gén G-207C által meghatározott TC haplotípus nem mutat összefüggést magyar felnőtt populációban kialakult IBD-vel.

IV. Ugyanezt megvizsgálva gyerekekben felismertük, hogy a TC haplotípus szintén nem jelent hajlamosító tényezőt magyar gyermek Crohnos populációban.

V. CTLA4 A+49G eltérést analizálva magyar felnőtt Crohn és colitis ulcerosás betegpopulációban, megállapíthatjuk, hogy nincs konkrét összefüggés a vizsgált genetikai eltérés és az IBD között.

VI. IL23R gén variánsai tekintve az rs10889677 és az rs2201841 hajlamosítónak bizonyult magyar felnőtt Crohnos betegpopulációban.

7. PUBLIKÁCIÓS JEGYZÉK

7.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Magyari L**, Bene J, Komlosi K, Talian G, Farago B, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Sipeky C, Lakner L, Varga M, Gasztonyi B, Melegh B. Prevalence of SLC22A4 1672T and SLC22A5 -207C Combination Defined TC Haplotype in Hungarian Ulcerative Colitis Patients. *Pathol Oncol Res.* 2007;13(1):53-6. IF:1.241

2. **Magyari L**, Farago B, Bene J, Horvatovich K, Lakner L, Varga M, Figler M, Gasztonyi B, Mozsik G, Melegh B. No association of the cytotoxic T-lymphocyte associated gene CTLA4 +49A/G polymorphisms with Crohn's disease and ulcerative colitis in Hungarian population samples. *World J Gastroenterol.* 2007;13(15):2205-8.

3. Bene J, **Magyari L**, Talian G, Komlosi K, Gasztonyi B, Tari B, Varkonyi A, Mozsik G, Melegh B. Prevalence of SLC22A4, SLC22A5 and CARD15 gene

mutations in Hungarian pediatric patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2006;12(34):5550-3.

4. Bene J, Komlosi K, **Magyari L**, Talian G, Horvath K, Gasztonyi B, Miheller P, Figler M, Mozsik G, Tulassay Z, Melegh B. Plasma carnitine ester profiles in Crohn's disease patients characterized for SLC22A4 C1672T and SLC22A5 G-207C genotypes. *Br J Nutr.* 2007;98(2):345-50. IF:2.708

5. Farago B, **Magyari 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 Feb;67(2):248-50. Epub 2007 Jul 2. IF:5.767

7.2. Csatlakozó közlemények

1. Illes Z, Safrany E, Peterfalvi A, **Magyari L**, Farago B, Pozsonyi E, Rozsa C, Komoly S, Melegh B. 3'UTR C2370A allele of the IL-23 receptor gene is associated with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurosci Lett.* 2007 Nov 17; (Epub ahead of print) IF:2.092

2. Maasz A, Kisfali P, Horvatovich K, Mohas M, Marko L, Csongei V, Farago B, Jaromi L, **Magyari L**, Safrany E, Sipeky C, Wittmann I, Melegh B. Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome. *Pathol Oncol Res.* IF:1.241

3. Farago B, Talian G, Maasz A, **Magyari L**, Horvatovich K, Kovacs B, Cserep V, Kisfali P, Kiss G C, Czirjak L, Melegh B Prevalence of functional haplotypes of the peptidylarginine deiminase citrullinating enzyme gene in patients with rheumatoid arthritis: no influence of the presence of anti-citrullinated peptide antibodies. *Clin Exp Rheumatol.* 2007;25(4):523-8. IF:2.189

4. Szolnoki Z, Maasz A, **Magyari L**, Horvatovich K, Farago B, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Bodor A, Hadarits F, Melegh B. The combination of homozygous MTHFR 677T and angiotensin II type-1 receptor 1166C variants confers the risk of small-vessel-associated ischemic stroke. *J Mol Neurosci.* 2007;31(3):201-7. IF:2.965

5. Safrany E, Csongei V, Jaromi L, Maasz A, **Magyari L**, Sipeky C, Melegh B. Mitochondrial DNA and its mutations: novel fields in a new era. *Orv Hetil.* 2007;27;148(21):971-8. Hungarian.

6. Banyai K, Jiang B, Bogdan A, Horvath B, Jakab F, Meleg E, Martella V, **Magyari L**, Melegh B, Szucs G. Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. *J Clin Virol.* 2006 Dec;37(4):317-22. Epub 2006 Sep 25. IF:2.630

7. Szolnoki Z, Maasz A, **Magyari L**, Horvatovich K, Farago B, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, Bodor A, Hadarits F, Melegh B. Coexistence of

angiotensin II type-1 receptor A1166C and angiotensin-converting enzyme D/D polymorphism suggests susceptibility for small-vessel-associated ischemic stroke. *Neuromolecular Med.* 2006;8(3):353-60. IF:3.396

8. Maasz A, Horvatovich K, **Magyari L**, Talian Csaba G, Bokor S, Laczy B, Tamasko M, Molnar D, Wittmann I, Melegh B. Search for mitochondrial DNA T4291C mutation in Hungarian patients with metabolic syndrome. *Orv Hetil.* 2006;16;147(15):693-6. Hungarian.

9. Komlosi K, Talian C G, Farago B, **Magyari L**, Cserep V, Kovacs B, Bene J, Havasi V, Kiss G C, Czirjak L, Melegh B. No influence of SLC22A4 C6607T and RUNX1 G24658C genotypic variants on the circulating carnitine ester profile in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2008;26; (elfogadva, közlés alatt) IF:2.189

7.3. Idézhető absztraktok

1. Horvatovich K, **Magyari L**, Maasz A, Talian C G, Tamasko M, Laczy B, Wittmann I, Melegh B. Search for mitochondrial DNA T4,291C mutation in Hungarian metabolic syndrome patients. *Eur J Hum Genet.* 2005;13 Suppl. 1, 279.

2. **Magyari L**, Horvatovich K, Bene J, Komlosi K, Nemes E, Melegh B. Novel phenotypic variant of the OCTN2 V295X mutation. *Eur J Hum Genet.* 2006;14 Suppl. 1, 268

3. Horvatovich K, **Magyari L**, Maasz A, Farago B, Laczy B, Marko L, Wittmann I, Melegh B. Association between APOA5-T1131C mutation and triglyceride level in Hungarian patients with metabolic syndrome and diabetes mellitus. *Eur J Hum Genet.* 2006;14 Suppl. 1, 236.

4. Farago B, Talian G, Maasz A, **Magyari L**, Horvatovich K, Kovacs B, Cserep V, Kisfali P, Kiss C, Melegh B. Padi4_89*G/A, padi4_90*T/C and padi4_92*G/C SNPs in the gene of the peptidylarginine deiminase citrullinating enzyme type 4 (PADI4) are not associated with rheumatoid arthritis in Hungarian patients. *Eur J Hum Genet.* 2006;14 Suppl. 1, 326.

5. Talian C G, Horvatovich K, Maasz A, **Magyari L**, Illes T, Melegh B. New polymorphisms in the filaminB gene: novel candidates for causing disease? *Eur J Hum Genet.* 2006;14 Suppl. 1, 250.

6. **Magyari L**, Farago B, Safrany E, Csongei V, Horvatovich K, Jaromi L, Sipeky C, Melegh B. IL-23 receptor 3'UTR C2370A variant in inflammatory bowel disease: differential profile in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 255.

7. Farago B, **Magyari L**, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Horvatovich K, Sipeky C, Maasz A, Radics J, Czirjak L, Melegh B. Interleukin 23 receptor 3'-UTR C2370A SNP confers risk for rheumatoid arthritis. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 256.

8. Horvatovich K, **Magyari L**, Maasz A, Kisfali P, Farago B, Bokor S, Mohas M, Molnar D, Melegh B. Apolipoprotein A5 T-1131C alleles in pediatric patients with obesity and metabolic syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 178.
9. Talian C G, Komlosi K, **Magyari L**, Nemes E, Kaposzta R, Mogyorosy G, Mehes K, Melegh B. Investigation of plasma carnitine ester profiles in a family with homozygous and heterozygous OCTN2 deficiency. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 216.
10. Safrany E, Farago B, Csongei V, **Magyari L**, Maasz A, Sipeky C, Jaromi L, Horvatovich K, Czirjak L, Radics J, Melegh B. Interleukin-23 receptor (IL23R) gene C2370A polymorphism in scleroderma patients. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 256.
11. Maasz A, Horvatovich K, Kisfali P, Mohas M, Marko L, Csongei V, Farago B, Jaromi L, **Magyari L**, Safrany E, Sipeky C, Wittman I, Melegh B. Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 178.
12. Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Sipeky C, Maasz A, **Magyari L**, Horvatovich K, Farago B, Takacs I, Melegh B. Polymorphisms of the MDR1 gene in Hungarian Roma population samples. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 260.
13. Kisfali P, Mohas M, Horvatovich K, Maasz A, Marko L, Csongei V, Farago B, Jaromi L, **Magyari L**, Safrany E, Sipeky C, Wittman I, Melegh B. Common allelic variants of APOA5 gene in the metabolic syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 210.
14. Sipeky C, Csongei V, Farago B, Horvatovich K, Jaromi L, **Magyari L**, Safrany E, Takacs I, Melegh B. Polymorphisms of CYP2C9 and VKORC1 genes associated with the warfarin metabolism in Hungarian Roma population. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 282.
15. Jaromi L, Maasz A, Szolnoki Z, Kisfali P, Horvatovich K, Csongei V, **Magyari L**, Safrany E, Sipeky C, Melegh B. Apolipoprotein A5 gene T1259C polymorphism associated with elevated circulating triglyceride levels but does not confer susceptibility for ischaemic stroke. *Eur J Hum Genet.* 2007;15 Suppl. 1, 235.
16. Illes Z, Farago B, Peterfalvi A, **Magyari L**, Pozsonyi E, Rozsa C, Komoly S, Melegh B. 3'UTR C2370A allele of the IL-23 receptor gene is associated with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2007;13 Suppl. 2, S202.

Összesített impakt faktor (cítálható absztraktok nélkül): 26.418