

**HALLÁSKÁROSODÁSBAN RÉSZT VEVŐ GÉNEK
POLIMORFIZMUSAI ÉS MUTÁCIÓI ROMA ÉS MAGYAR
POPULÁCIÓKBAN**

PhD értekezés tézisei

Mátyás Petra

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Klinikai Központ, Orvosi Genetikai Intézet

Programvezető és témavezető: Prof. Dr. Melegh Béla

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Sümegi Balázs



Pécs, 2019

1. Bevezetés

Halláskárosodás genetikája

A halláskárosodás az egyik leggyakoribb érzékszervi megbetegedés, mely befolyásolja a normál kommunikációt és több mint 350 millió embert érint világszerte. Kialakulásának helye szerint 3 nagy csoportját különböztetjük meg. Vezetékes halláscsökkenésről akkor beszélünk, amikor a hangvezető rendszerben, azaz a hallójáratban, dobhártyában, hallócsontokban, vagy a labirintuszszervben jön létre megbetegedés. Másik nagy csoportja az idegi típusú vagy más néven perцепiós hallásvesztés, amikor a hangfelfogó rendszert, azaz a belső fület, a hallóideget, a hallópályákat vagy a hallókérget érinti a megbetegedés. Harmadik nagy csoportja pedig a kevert típusú halláskárosodás, amikor a vezetékes és az idegi hallás csökkenés kombinációja áll fent. A legtöbb esetben a halláskárosodás multifaktoriális betegség, amit genetikai és környezeti tényezők, illetve ezen faktorok kombinációja vált ki. Azonban egyetlen gén mutációja is képes lehet kialakítani a betegséget. Feltehetően 200 gén felelős a hallásért, melyből eddig 30-at ismerünk.

Az egyik legismertebb gén, aminek mutációja halláskárosodást okoz, a *GJB2* gén. A *GJB2* génnek csupán egy kódoló exonja van, ezért a kis gének csoportjába tartozik. Ma már több mint 6 autoszómális domináns és 70 autoszómális recesszív öröklődésű genetikai eltérés vált ismertté a *GJB2* génben. A W24X egy recesszív formában siketséget okozó nonsense mutáció, melyet eddig csak indiai populációban találtak meg.

A *NAT2* gén a reaktív oxigéngyökök (ROS) metabolizmusában játszik fontos szerepet, és összefüggést mutattak ki az rs1799930 polimorfizmusa, valamint az időskori halláskárosodás között. A *NAT2* gén rendkívül polimorf, acetilációja 3 fenotípusba sorolható: gyors, közepes és lassú, amelyek Mendeli öröklésmentet mutatnak, és mindegyik betegség megjelenéséhez vezet.

A *GRM7*-nek központi szerepe van az emlős cochleán belül a szőrsejtek és az afferens hallóidegrostok közötti szinapszisokban lévő homeosztázis és szinaptikus glutamát transzmisszió fenntartásában. A glutamát toxicitás többféleképpen játszik szerepet a halláskárosodás kialakulásában beleértve a zaj okozta, illetve az időskori halláskárosodást. Ha túl sok glutamát van jelen, akkor az neurotoxicitást okoz a halló-neuronokban, serkentő tulajdonsága miatt. Mivel a mGluR7 csökkenti a glutamát kibocsátását, előfordulhat, hogy a *GRM7* egy hibás allélja megváltoztatja a glutamát szinaptikus autoregulációját a halló neuronok és szőrsejtek szinaptikus részében, ami idővel glutamát felhalmozódáshoz vezet, aminek következtében pedig sejthalál következik be.

A *GRHL2* egy transzkripció faktor, mely különböző epiteliális sejtekben fejeződik ki . A *GRHL2* a hámsejtek működéséért felelős egy egész életen át. Biológiailag hozzájárul az epiteliális barrier kialakulásához és a sebgyógyuláshoz, valamint lezárja a neutrális tubust, karbantartja a mukociliáris légúti epitéliumot és a tumor szupressziót. Mutációit összefüggésbe hozták már autoszómális domináns öröklődésű hallásvesztéssel, illetve számos polimorfizmusát zaj indukálta és időskori halláskárosodással.

A *MARVELD2* gén a DFNB49-es lókuszhhoz kapcsolódik, és mutációi nem szindrómás, kétoldalú, prelingvális, mérsékelt vagy súlyos siketséget okoznak. Az *MARVELD2* által termelt fehérje a cochleáris sejtek tricelluláris tight junction-eiben (tTj) koncentrálnak és szerepet játszik az epiteliális barrier kialakításában, amin keresztül azok az ionok és molekulák áramolnak, amik nélkülözhetetlenek a belső fül ionösszetételének fenntartásához. A mai napig összesen 6 recesszív mutációt azonosítottak a *MARVELD2* génben, világszerte összesen 15 családban, ami siketséget okoz.

Különböző mitokondriális DNS mutációkat is hoztak már összefüggésbe a halláskárosodással. Néhány mtDNS mutáció a 12S rRNS és a tRNS Ser génekben vezethet nem szindrómás halláskárosodáshoz, amit okozhat az aminoglikoziddal való kitettség, de attól függetlenül is kialakulhat. Az aminoglikozid tartalmú antibiotikumok, mint például a gentamicin, streptomycin és a tobramicin klinikailag fontos gyógyszerek. Ezeknek a gyógyszereknek a használata gyakran vezet toxicitáshoz, érintve a vesét, valamint a halló és egyensúlyozó rendszert is. A vesekárosodás általában reverzibilis, de a halló és egyensúlyozó szervet ért károk irreverzibilisek. A mitokondriális 12S rRNS génben, az 1555-ös pozícióban G>A mutációt valamint a m.1494 T>C mutációt azonosítottak aminoglikozid indukálta halláscsökkenést betegekben. További 7 mutációt azonosítottak a 12S rRNS génben (m.827 A>G, m.961delTinsC, m.961 T>C, m.961 T>G, m.1005 T>C és m.1095 T>C, m.1116 A>G) mint mitokondriális nem szindrómás halláscsökkenést okozó mutációk. Ezek patogenitása azonban továbbra is ellentmondásos. A mitokondriális DNS okozta halláskárosodásra nagy fenotipikus variabilitás jellemző. A halláscsökkenés megjelenhet aminoglikozid nélkül is vagy csak aminoglikozidnak való kitettség után. Továbbá változik a halláskárosodás variabilitása még családon belül is. Sőt, néhány mitokondriális DNS mutáció nem vált ki halláskárosodást saját magától, csak akkor, ha jelen van más genetikai vagy környezeti faktor, ami megváltoztatja ezen halláskárosodással összefüggő mutációk változékonyságát és penetranciáját. Ezért ezek az eltérések inkább mondhatók alapvető kockázati tényezőknek, mint patogén mutációknak.

2. Célkitűzések

Kutatásaink során célunk volt meghatározni bizonyos a halláskárosodás hátterében álló hajlamosító polimorfizmusok és mutációk gyakoriságát és eloszlását roma és magyar populációban, valamint vizsgálni kívántuk, hogy a két népcsoport tekintetében mutatkoznak-e jelentős genetikai eltérések, melyek hajlamosítottabbá, vagy éppen védettebbé tehetik az adott populációt a halláskárosodásra nézve.

1. Vizsgálataink célja a *NAT2* rs1799930, a *GRM7* rs11928865 és a *GRHL2* rs10955255, rs13263539 és rs198161 valamint a *GJB2* rs104894396 variánsok gyakoriságának meghatározása volt a roma és magyar populációkban, továbbá, hogy következtetéseket vonjunk le arra vonatkozólag, hogy a *GRHL2* génben vizsgált variánsok különböző együttállásai milyen haplocsoportokat határoznak meg és milyen frekvenciával vannak jelen roma és magyar populációs mintákban.

2. Munkánk további célja volt megállapítani a *MARVELD2* c.1331 + 2 T>C mutációjának prevalenciáját és klinikai hatását Magyarországból és Szlovákiából származó roma siket betegekben, valamint elemezni kívántuk ezen eltérés lehetséges közös eredetét a mutációt hordozó roma és pakisztáni betegekben.

3. Célunk volt továbbá, hogy a mitokondriális DNS-ben előforduló hajlamosító polimorfizmusok (m.827 A>G, m.961 T>C, m.961 T>G, m.1005 T>C, m.1095 T>C, m.1116 A>G, m.1494 T>C és m.1555G>A) eloszlását meghatározzuk roma és magyar populációs mintákban.

3. Anyagok és módszerek

Vizsgált populációk

Nagyszámú magyar és roma DNS mintával dolgoztunk, valamennyi a Pécsi Tudományegyetem központi biobankjából származott, amely a Páneurópai Nemzetközi Biobankhálózatnak (BBMRI; Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure) részét képezi. A biobank vezetésében és fenntartásában az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság (ETT-TUKEB) által jóváhagyott elveket követtük, a minták gyűjtésében és tárolásában pedig az 1975-ben az Orvosvilágszövetség által megalkotott Helsinkai deklarációban megfogalmazott etikai alapelvek voltak irányadók. Továbbá a *MARVELD2* gén vizsgálata során alkalmazott DNS-ek egy része DIABGENE IEE SAS laboratóriumból, a Pozsonyi Egyetemi Kórház ORL osztályáról, valamint a Pozsonyi Egyetem Természettudományi karának Molekuláris Biológia tanszékéről (Szlovákia) származott. A *NAT2* gén rs1799930, a *GRM7* gén rs11928865, a *GRHL2* gén rs10955255, rs13263539 és rs1981631 SNP-k esetében 298 egészséges roma (118 férfi, 180 nő; átlag életkor $42,33 \pm 15,51$) és 298 egészséges magyar (168 férfi, 130 nő; átlag életkor $37,43 \pm 12,53$) személy DNS mintáját használtuk fel. Továbbá a *NAT2* gén rs1799930, *GRHL2* gén rs13263539 és rs1981631 SNP-k esetében 113 halláskárosodott roma (57 férfi, 56 nő) egyén DNS mintáját vizsgáltuk. A *GJB2* gén rs104894396 polimorfizmus esetében 493 egészséges roma (250 férfi, 243 nő; átlag életkor 50 ± 19) és 498 egészséges magyar (268 férfi, 230 nő; átlag életkor 36 ± 12) személy DNS mintáját vizsgáltuk. A *MARVELD2* gén c.1331+2 T>C variánsának vizsgálata során 85 halláskárosodott magyarországi roma és 502 egészséges roma személy DNS mintáját használtuk fel. Továbbá 143 halláskárosodott szlovák roma, 200 egészséges szlovák roma, valamint 375 halláskárosodott szlovák személy DNS-ét vizsgáltuk. Ezen kívül további 21 polimorfizmust (rs542778, rs4699896, rs4976108, rs67911569, rs10059317, rs56103849, rs4252228, rs1168405, rs1168402, rs299086, rs299093, rs2434507, rs299075, rs299078, rs28652974, rs28409706, rs468467, rs188123810, rs467880, rs466930, and rs2133729) genotipizáltunk 5,34 megabázissal a c313 + 2T> C mutáció körül, 5 szlovákiai, 7 magyarországi, 5 csehországi roma és 4 pakisztáni beteg esetében. A polimorfizmusokat a dbSNP adatbázisból választottuk kromoszóma pozíciójuk és kisebb allélfrekvencia (MAF) értékük alapján. A kontroll csoportban a c.1331+2 T>C mutációtól független 20 halláskárosult és 36 egészséges roma egyént genotipizáltunk a kiválasztott SNP markerek genetikai variabilitásának meghatározására. A mitokondriális hajlamosító SNP-k esetében 200 egészséges roma (72 férfi, 123 nő; átlag életkor $43,65 \pm 16,21$) és 200 (106 férfi, 94 nő; átlag életkor $37,15 \pm 11,93$) egészséges magyar személy DNS mintáját használtuk fel.

Molekuláris biológiai módszerek

A DNS-izolálást EDTA-val alvadásgátolt vérmintákból végeztük kisózásos technika segítségével. A DNS-analízis kiindulópontja a polimeráz láncreakcióval (PCR) végzett amplifikáció volt, mely standard módon az adott szekvenciára specifikus, szintetikus oligonukleotid primerek, dNTP, Taq polimeráz, puffer és DNS-templát alkalmazásával zajlott. Majd ezt követte a restrikciós fragmenthossz polimorfizmus (RFLP). A módszer tervezésekor és a restrikciós endonukleáz kiválasztásakor minden esetben fontos szempont volt, hogy az amplifikált target szekvencia tartalmazzon egy obligát hasító helyet is a keresett polimorfizmusokon kívül, a módszer hatékonyságának ellenőrzése szempontjából. A restrikciós enzimmel történő hasítás után az emésztett PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel választottuk szét. A genotípusok elkülönítése 3%-os agaróz gélben etídium-bromid festéssel, UV megvilágítással történt standard DNS létra mellett. Valamennyi, általunk tervezett PCR-RFLP módszer specificitását és eredményeink confirmálását, valamint a mitokondriális hajlamosító polimorfizmusok vizsgálatát Sanger-féle bidirekcionális szekvenálással végeztük, BigDye Terminator v.1.1 cycle sequencing kit alkalmazásával, ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems CA, USA) szekvenátor segítségével.

Statisztikai módszerek

A populációk és a vizsgált genetikai variánsok között fennálló összefüggések feltárására χ^2 -tesztet alkalmaztunk SPSS 20.0 programcsalád felhasználásával és a szignifikancia szintet $p < 0,05$ -nél húztuk meg. A haplotípus vizsgálatához Phase 2.1 programot, a kapcsoltsági vizsgálat elvégzéséhez pedig Haploview 3.3 szoftvert használtunk.

4. Eredmények

NAT2 rs1799930

A *NAT2* rs1799930 AA hajlamosító genotípus frekvenciája jelentős szignifikáns különbséget mutatott a roma és magyar populációk összehasonlítása során. A roma csoport esetében majdnem kétszer nagyobb a homozigóták aránya (14%) a magyarokhoz képest (7,7%). Az A minor allél frekvencia szintén szignifikánsan emelkedettebb volt a roma populációban a magyarokkal való összevetés során (38% vs. 26,7%, $p < 0,05$) (1. táblázat). Azonban az egészséges és halláskárosodott roma populációk összehasonlítása során szignifikáns különbséget nem találtunk.

1. Táblázat: Genotípus és minor allél frekvencia a *NAT2* gén rs1799930 polimorfizmus esetében

<i>NAT2</i> rs1799930	Roma (n=298)	Magyar (n=298)
GG	114 (38,20%)	162 (54,30%)
GA	142 (47,60%)	113 (38,00%)
AA	42 (14,00%)*	23 (7,70%)
A allél frekvencia	38,00%*	26,70%

* $p < 0,05$

***GRM7* rs11928865**

A *GRM7* rs11928865 TT hajlamosító genotípus frekvenciája nem mutatott szignifikáns különbséget a roma és a magyar csoportokban (6,7% vs. 7,0%), valamint a T minor allél frekvenciák szintjén sem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között (25,6% vs. 25,8%), a genotípus és allélfrekvencia eloszlása majdnem teljesen megegyezik a 2 populáció között.

***GRHL2* rs10955255 rs13263539 és rs1981361**

A *GRHL2* rs10955255 GG hajlamosító genotípus frekvenciája nem mutatott szignifikáns különbséget a roma és a magyar csoportokban (23,7% vs. 21,0%), valamint a G minor allél frekvenciák szintjén sem találtunk szignifikáns különbséget a két csoport között (50,8% vs. 47,0%). Azonban, az rs13263539 és a rs1981361 polimorfizmusok esetében mind a homozigóták, mind pedig az A allélfrekvenciák szintjén találtunk szignifikáns különbséget a 2 populáció között, a magyaroknál nagyobb arányban (2. táblázat). Vizsgáltuk az rs13263539 és a rs1981361 polimorfizmusokat egészséges és halláskárosodott romákban, ahol azonban szignifikáns különbséget nem találtunk. A 3 polimorfizmus haplotípus analízise során 8 haplotípust tudtunk megkülönböztetni, és megfigyelhettük, hogy a GGT, GAC és a GAT haplotípusok szignifikánsan emelkedettebb értéket mutatnak a magyar populációban a romákhoz képest (3. táblázat). A 3 polimorfizmus kapcsoltsági térképéről az olvasható le, hogy a roma populáció esetében a *GRHL2* gén 3 polimorfizmusa erősebben kapcsolt egymással, mint a magyar populáció esetében. Ezeket az adatok összevetve az európai illetve az ázsiai kapcsoltsági térképekkel azt láthatjuk, hogy minimálisan ugyan, de eltérnek az értékek egymástól a roma és ázsiai, valamint a magyar és európai kapcsoltsági térképeken. Ez alól

kivételt képez az rs10955255 és az rs13263539 polimorfizmusok kapcsoltsága mivel, ez az európai populációkban jóval erősebb, mint a vizsgált magyar populációban (1. ábra).

Továbbá mindhárom gén polimorfizmusait összevetettük különböző európai és ázsiai populációkkal, melynek során azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a *GRHL2* rs10955255 és a *GRM7* rs11928865 polimorfizmusok esetében a roma populáció allélfrekvenciái nagyjából megegyeznek az európai populációkban megfigyelt értékekkel. Azonban a másik 2 gén polimorfizmusai esetében *NAT2* 1799930, *GRHL2* rs13263539 és rs1981361 a roma populáció allélfrekvenciái inkább az ázsiai populációkhoz hasonlítanak. Ezekből a megfigyelésekből arra következtethetünk, hogy az Indiából származó roma populáció az évszázadok során bizonyos mértékig összekeveredett a magyar populációval (4. táblázat).

2. Táblázat: Genotípus és minor allél frekvencia a *GRHL2* gén rs13263539 és rs1981361 polimorfizmusok esetében

<i>GRHL2</i>	Roma (n=298)	Magyar (n=298)
rs13263539		
GG	102 (34,20%)	69 (23,20%)
GA	157 (52,30%)	153 (51,30%)
AA	39 (13,00%)	76 (25,30%)*
A allél frekvencia	37,90%	51,00%*
rs1981361		
GG	87 (29,00%)	59 (19,80%)
GA	162 (54,40%)	143 (48,00%)
AA	49 (16,50%)	96 (32,30%)*
A allél frekvencia	43,60%	56,20%*

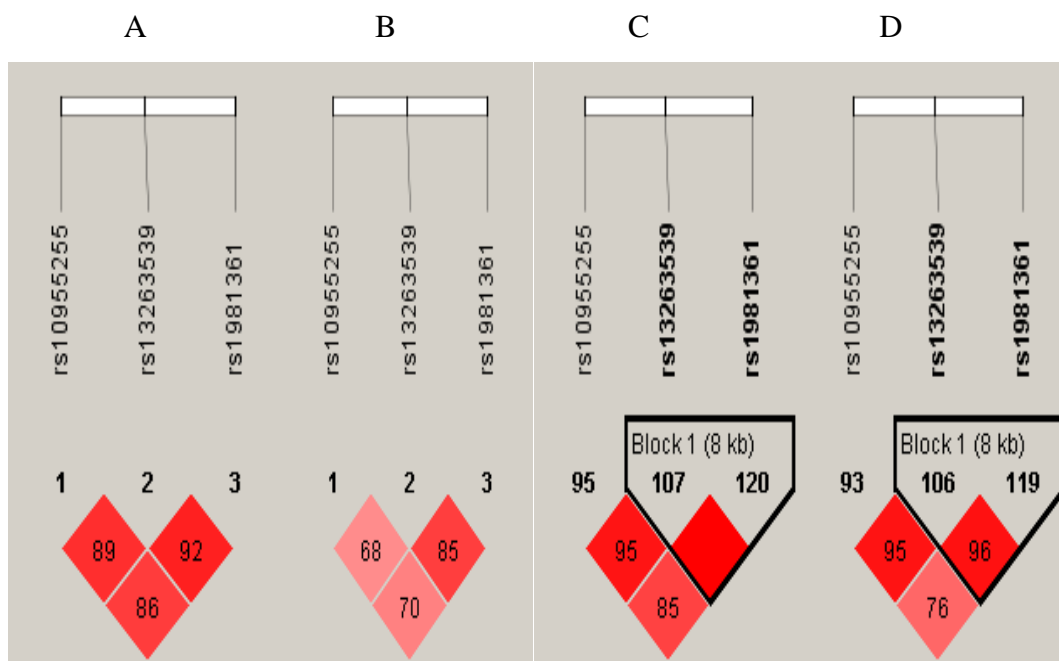
* p<0,05

3. Táblázat: A *GRHL2* gén rs1095525, rs13263539 és rs1981361 polimorfizmusok főbb haplotípusai és azok eloszlása magyar és roma populációk esetében.

rs10955255	rs13263539	rs1981361	Haplocsoportok	Roma (%)	Magyar (%)
A	G	C	ht1	7,66	5,80
A	G	T	ht2	3,17	3,97
A	A	C	ht3	0,69	0,99
A	A	T	ht4	37,60	44,20
G	G	C	ht5	46,90	34,90
G	G	T	ht6	1,87	4,47*
G	A	C	ht7	0,91	2,07*
G	A	T	ht8	1,15	5,51*

* p<0,05

1. **Ábra:** A *GRHL2* gén rs1095525, rs13263539 és rs1981361 polimorfizmusainak kapcsoltsági térképe roma (A) és magyar (B) valamint ázsiai (C) és európai (D) populációs mintákkal



4. **Táblázat:** A *NAT2* rs1799930, *GRM7* rs11928865 és *GRHL2* rs1095525, rs13263539 és rs1981361 polimorfizmusok allélfrekvencia értékeinek összehasonlítása a már korábban publikált európai és ázsiai populációs adatokkal, www.ensembl.org adatai alapján.

Populációk	n	<i>NAT2</i> rs1799930		<i>GRM7</i> rs11928865		<i>GRHL2</i> rs1095525		<i>GRHL2</i> rs13263539		<i>GRHL2</i> rs1981361	
		G af (%)	A af (%)	A af (%)	T af (%)	A af (%)	G af (%)	A af (%)	G af (%)	C af (%)	T af (%)
EUR	1006	71,80	28,20	72,20	27,80	41,20	58,80	47,10	53,00	40,30	59,70
HUN	298	73,30	26,70	74,20	25,80	53,00	47,00	49,00	51,00	43,80	56,20
Roma	298	62,00	38,00	74,40	25,60	49,20	50,80	62,10	37,90	56,40	43,60
CEU	198	70,20	29,80	70,70	29,30	42,90	57,10	49,00	51,00	43,90	56,10
FIN	198	73,70	26,30	65,70	34,30	31,80	68,20	37,40	62,20	34,80	65,20
GBR	182	72,50	27,50	70,90	29,10	42,30	57,70	47,80	52,20	39,00	61,00
IBS	214	70,60	29,40	73,80	26,20	64,30	53,70	51,90	48,10	43,50	56,50
TSI	214	72,00	28,00	79,00	21,00	73,00	57,90	49,10	50,90	39,70	60,30
SAS	978	64,00	36,00	78,00	22,00	73,00	27,00	74,90	25,10	74,10	25,90
BEB	172	73,30	26,70	76,70	23,30	72,10	27,90	72,10	27,90	69,80	30,20
GIH	176	61,20	38,80	74,80	25,20	69,90	30,10	71,80	28,20	72,30	27,70
ITU	204	65,70	34,30	80,90	19,10	79,40	20,60	82,80	17,20	82,40	17,60
PJL	192	63,50	36,50	80,20	19,80	69,30	30,70	70,30	29,70	69,30	30,70
STU	204	57,80	42,20	77,50	22,50	74,00	26,00	77,00	23,00	76,00	24,00

n= elemszám, af=allélfrekvencia

GJB2 W24X (rs104894396)

A *GJB2* gén rs104894396 polimorfizmus esetében a vizsgált minták között nem találtunk AA homozigóta egyéneket, ezért szignifikáns különbséget ebben az esetben nem tudtunk megfigyelni. Azonban az A alléfrekvencia esetében szignifikáns különbséget találtunk a 2 populáció között, a romákban nagyobb arányban (1,62%) a magyarokhoz képest (0,20%) (5. táblázat).

5. Táblázat: Genotípus és minor allél frekvencia a *GJB2* gén rs104894396 polimorfizmus esetében

GJB2 rs104894396	Roma (n=493)	Magyar (n=498)
GG	485 (98,40%)	497 (99,80%)
GA	8 (1,62%)	1 (0,20%)
AA	0 (0,00%)	0 (0,00%)
A allél frekvencia	0,008%*	0,001%

* $p < 0,05$

MARVELD2 c.1331+2 T>C

A 143 szlovákiai roma hallássérült egyén esetében 5 betegben találtuk meg homozigóta formában és 1 egyén esetében pedig heterozigóta formában a *MARVELD2* c.1331+2 T>C mutációt. A 200 normál hallású szlovákiai roma közül 9 heterozigóta egyént találtunk a mutációra nézve, homozigóta eltérés nem volt megfigyelhető. A szlovákiai roma hallássérültek esetében a C allélfrekvencia 3,85%, míg a normál hallású szlovákiai roma csoport esetében 2,25%. A 375 nem roma szlovákiai hallássérült esetében a mutációra nézve nem azonosítottunk sem homozigóta, sem pedig heterozigóta egyéneket. A 85 magyarországi roma hallássérült esetében 7 homozigóta és 3 heterozigóta egyént azonosítottunk. Az egészséges magyarországi romák esetében pedig 5 darab heterozigóta esetet találtunk, homozigótát azonban egyet sem. A két magyarországi populációt összehasonlítva azt tapasztaljuk, hogy szignifikáns különbség van a C allélfrekvencia szintjén. A magyarországi hallássérült roma populáció esetében a C allélfrekvencia 10,0%, ami közel háromszor annyi, mint a szlovákiai siket populációban megfigyelt érték (3,85%). Másrészt a magyarországi egészséges roma populációban talált 0,5%-os C allélfrekvencia mintegy négyszer kisebb, mint a szlovákiai egészséges roma populációban megfigyelt érték (2,25%) (6-8. táblázat). A vizsgálatban

résztevő betegek c.1331 + 2T> C mutáció közös eredetének meghatározásához (amit először pakisztáni betegekben fedeztek fel) 21 további polimorfizmust vizsgáltunk. 18 SNP megtalálható volt mind a magyarországi mind a szlovákiai roma betegekben homozigóta formában, ami a közép-európai roma betegek közös őst jelzi erre a mutációra nézve. Továbbá a kiválasztott polimorfizmusokat 56, a c.1331 + 2T> C mutációt nem hordozó egyénben vizsgáltuk. A 18 SNP-t lefedő haplotípus homozigóta állapotban nem volt kimutatható az elemzett kontroll mintákban, alátámasztva ezzel a mutáció közös eredetének hipotézisét e betegek között.

- 6. Táblázat:** Genotípus és minor allél frekvencia a *MARVELD2* c.1331+2 T>C eltérés esetében, halláskárosodott magyarországi roma és egészséges magyarországi roma populációk vizsgálatánál

<i>MARVELD2</i> c.1331+2 T>C	Halláskárosodott magyarországi roma (n=85)	Egészséges magyarországi roma (n=502)
TT	75 (88,23%)	497 (99,00%)
TC	3 (3,53%)	5 (0,99%)
CC	7 (8,23%)	0 (0,00%)
C allél frekvencia	10,00%*	0,50%

* p<0.05

- 7. Táblázat:** Genotípus és minor allél frekvencia a *MARVELD2* c.1331+2 T>C eltérés esetében, halláskárosodott magyarországi roma és halláskárosodott szlovákiai roma populációk vizsgálatánál

<i>MARVELD2</i> c.1331+2 T>C	Halláskárosodott magyarországi roma (n=85)	Halláskárosodott szlovákiai roma (n=143)
TT	75 (88,23%)	137 (95,80%)
TC	3 (3,53%)	1 (0,69%)
CC	7 (8,23%)*	5 (3,49%)*
C allél frekvencia	10,00%*	3,85%*

* p<0.05

8. Táblázat: Genotípus és minor allél frekvencia a *MARVELD2* c.1331+2 T>C eltérés esetében, egészséges magyarországi roma és egészséges szlovákiai roma populációk vizsgálatánál

<i>MARVELD2</i> c.1331+2 T>C	Egészséges magyarországi roma (n=502)	Egészséges szlovákiai roma (n=200)
TT	497 (99,0%)	191 (95,5%)
TC	5 (0,99%)	9 (4,5%)
CC	0 (0,00%)	0 (0,00%)
C allél frekvencia	0,50%*	2,25%

* $p < 0,05$

Mitokondriális polimorfizmusok

A mitokondriális hajlamosító polimorfizmusok vizsgálata során a vizsgált minták között nem találtunk szignifikáns különbséget egyik polimorfizmus esetében sem. Sőt azt is elmondhatjuk, hogy a 200 roma DNS minta mindegyike normál genotípusú volt. A magyar minták esetében 3 polimorfizmusnál találtunk homoplazmiás egyéneket, az m.961 T>G esetében 1 homoplazmiás, az m.961 T>C esetében 5 homoplazmiás valamint az m.1555 A>G esetében pedig 2 homoplazmiás eltérés volt megfigyelhető. Heteroplazmiát egyetlen esetben sem találtunk.

5. Eredmények megbeszélése és következtetések

A *NAT2*, *GRM7* és *GRHL2* gének polimorfizmusairól az irodalomból tudjuk, hogy részt vehetnek az időskori halláskárosodás kialakulásában. Számos tényező képes elősegíteni az öregedést, többek között, genetikai mutációk melyek környezeti kölcsönhatásokkal társulhatnak, vagy a reaktív oxigényökök nagymértékű felhalmozódása. Kimutatták, hogy az öregedés során a belső fül keringési rendszerében, ezen belül pedig a cochleában is csökkent a véráramlás. Jelen dolgozatban arra törekedtünk, hogy felfedjük az interetnikus genetikai különbségeket, az időskori halláskárosodásra hajlamosító *NAT2*, *GRM7* és *GRHL2* gének genotípusában és a variáns allélfrekvenciájában roma és magyar populációs mintákon. A vizsgált *NAT2* rs1799930 illetve *GRHL2* rs13263539, és rs1981361 polimorfizmusok esetében szignifikáns különbségeket tudtunk megfigyelni a két populáció között. Ezen polimorfizmusok jelenléte az időskori halláskárosodás kialakulásának megnövekedett kockázatával jár. A vizsgálat során ki tudtuk mutatni, hogy *NAT2* rs1799930 mutáns allél hordozása a roma populáció esetében szignifikánsan emelkedett értéket mutatott, mint a magyar populációban, mind a homozigóták mind pedig az allélfrekvencia esetében is. Ezzel szemben, a *GRHL2* rs13263539 és rs1981361 mutáns alléljainak jelenléte a magyar populációban volt emelkedettebb a roma populációhoz képest a homozigóták és az allélfrekvenciák szintjén is. Továbbá, a vizsgált *GRHL2* gén 3 polimorfizmusának adataiból kapcsoltsági térképet tudtunk készíteni, melyből azt az eredményt kaptuk, hogy a 3 polimorfizmus a roma populáció esetében erősebben kapcsolt, mint a magyar populációban. Ezen kívül, a *GRHL2* gén polimorfizmusait vizsgálva 8 haplotípust azonosítottunk, melyek közül GGT, GAC és GAT haplotípusok frekvenciája szignifikánsan magasabb volt a magyar populációban, mint a roma csoportban. A *GRM7* rs11928865 és a *GRHL2* rs10955255 polimorfizmusok esetében a magyar és roma populációban, továbbá az *NAT2* rs1799930 és *GRHL2* rs13263539, és rs1981361 polimorfizmusok esetében az egészséges és halláskárosodott roma csoportok között nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni. Következtetésként elmondható, ha etnikai különbségek állnak fent az allélfrekvenciában, a jövőben e variánsoknak fontos szerepe lehet a prevenció és terápiás kezelésekben, azonban további vizsgálatok szükségesek nagyobb populációs mintákon, hogy meghatározzuk a pontos szerepét ezeknek a hajlamosító polimorfizmusoknak.

A *GJB2* gén eltérései legtöbb esetben etnikai különbséget mutatnak. A legtöbb kaukázusi populációban a *GJB2* gén 35delG a leggyakoribb halláskárosodást kiváltó mutáció, azonban nem európai etnikai háttérrel rendelkező populációkban más *GJB2* génmutációk dominálnak a

hallássérülteknél, mint például Indiában a W24X. A 71G>A (W24X) variánst ugyan megfigyelték az európaiaknál, de ehhez képest az előfordulási gyakorisága körülbelül háromszorosa pakisztániakban és legalább 20-szor magasabb az indiaiaknál. Ez az eltérés viszonylag gyakori Indiában a halláskárosultak esetében, valamint az indiai szubkontinensről származó populációkban, mint például a romák. A magyar (0,10%) és roma (0,81%) populációkban talált *GJB2* W24X mutáns allélfrekvenciáról elmondható, hogy a magyarországi roma populációban vizsgált adatok hasonlítanak az indiai populációkban mért adatokhoz és szignifikánsan különböznek a magyar populációtól.

A *MARVELD2* génben a leggyakoribb halláskárosodást okozó mutáció a c.313 + 2T> C, melyet homozigóta formában találtunk meg tizenkét szlovákiai s magyarországi roma családban. A *MARVELD2* génhez tartozó halláskárosodás előfordulási gyakorisága a siket szlovákiai roma egyének csoportjában 3,5% volt, míg a siket magyarországi roma egyéneknél 8,23%. Hasonló ellentétet fedeztünk fel a c.313 + 2T>C mutáció C allélfrekvenciájában a szlovákiai (3,85%) és a magyarországi siket roma (10,0%) csoportok között. Ugyanakkor 4,5%-kal nagyobb eltérést figyeltünk meg a *MARVELD2* mutációt hordozó egészséges szlovákiai és a magyarországi roma egyének kontrollcsoportjai között. A 375 hallássérült szlovák kaukázusi kontroll csoportban végzett c.1331 + 2T> C eltérés elemzése azt mutatja, hogy ez a mutáció Európában valószínűleg csak a roma népességre korlátozódik, és még mindig nem ismert a szláv kaukázusi etnikumban. Munkánk során megvizsgáltuk, hogy a c.313 + 2T> C mutációval rendelkező betegek közös ősi haplotípussal rendelkeznek-e. Tizenhét roma betegben (5 szlovák, 5 cseh és 7 magyar) genotipizáltunk 21 biallelikus polimorfizmust a c.313 + 2T> C eltérés körül 5,34 Mb-al. A haplotípus-analízis során 18 polimorfizmus közös haplotípusát figyeltük meg, ami minden a c.313 + 2T> C eltérésre homozigóta roma egyénben megfigyelhető volt, de az 56 kontroll roma egyén közül egyikben sem. Ezek az adatok alátámasztják a közös ős eredetét az összes vizsgált c.1331+2T>C mutációval rendelkező szlovákiai, csehországi és magyarországi roma esetében.

Mitokondriális vizsgálataink során 200 egészséges magyar és 200 egészséges roma egyén mintáját vizsgáltuk Sanger-féle bidirekcionális szekvenálás módszerével, melynek eredményeképpen szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni a két populáció között. Feltételezhető, hogy sokkal nagyobb mintaszámmal kellene dolgozni ahhoz, hogy különbséget tudjunk kimutatni a populációk között.

6. Eredmények összefoglalása

1. Szignifikánsan emelkedett értéket mutat a *NAT2* rs1799930 mutáns allél hordozása a roma populáció esetében mind a homozigóták mind pedig az allélfrekvencia esetében is.
2. A *GRM7* rs11928865 és a *GRHL2* rs10955255 polimorfizmusok esetében nem tudunk szignifikáns különbséget kimutatni a két populáció között.
3. *GRHL2* rs13263539 és rs1981361 mutáns alléljainak jelenléte a magyar populációban emelkedettebb a homozigóták és az allélfrekvencia szintjén is.
4. *GRHL2* gén rs132635393, rs1981361 és rs10955255 polimorfizmusok kapcsoltsági térképéből kiderül, hogy a 3 polimorfizmus a roma populáció esetében erősebben kapcsolt.
5. *GRHL2* gén 3 polimorfizmusát vizsgálva 8 haplotípust azonosítottunk, melyek közül GGT, GAC és GAT haplotípusok frekvenciája szignifikánsan magasabb a magyar populációban.
6. *GJB2* gén rs104894396 polimorfizmus vizsgálatánál szignifikáns különbséget figyelhetünk meg a roma és magyar populációk között a mutáns A allél frekvencia szintjén. A romáknál nyolcszor nagyobb lehet az esélye a halláskárosodás kialakulásának.
7. A *MARVELD2* c.1331+2 T>C eltérés C allélfrekvencia szintjén nagyobb arányban fordul elő a halláskárosodott magyarországi roma populációban, mint az egészséges magyar romákban. A halláskárosodott magyar romákban a mutáns allél hordozása mind a homozigóta mind az allélfrekvencia szintjén szignifikánsan magasabb a siket szlovák romákhoz képest. Azonban az egészséges szlovák roma populációban a C allél frekvenciája szignifikánsan emelkedettebb az egészséges magyar roma populációhoz képest. Továbbá vizsgálataink kimutatták a közös őst eredetét az összes vizsgált c.1331+2T>C mutációval rendelkező szlovák, cseh és magyar roma esetében.
8. A mitokondriális polimorfizmusok esetében nem találtunk szignifikáns különbséget a két populáció között.

7. Köszönetnyilvánítás

A doktori disszertációm alapjául szolgáló kutatómunkát a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karán az Orvosi Genetikai Intézetben végeztem **Dr. Melegh Béla Professzor Úr** témavezetésével, aki lehetővé tette számomra, hogy részt vegyek a kutatásban, szakmai tevékenységemet mindvégig figyelemmel kísérte, kutató munkámat irányította és segítette. Hasznos útmutatásai, meglátásai tették lehetővé közleményeim megjelenését.

Köszönöm továbbá **Dr. Berenténé Dr. Bene Judit**nak a szakmai és emberi segítséget, valamint az Intézet összes dolgozójának azt a támogatást, amit munkám során kaptam.

Végül köszönöm családom megértő türelmét, szeretetét és bátorítását.

8. Közlemények jegyzéke

Értekezés alapjául szolgáló közlemények

Matyas P, Postyeni E, Komlosi K, Szalai R, Bene J, Magyarai L, Melegh B, Hadzsiev K. 2018. **Age-related hearing impairment associated *NAT2*, *GRM7* and *GRHL2* susceptibility gene polymorphisms and haplotypes in Roma and Hungarian populations.** *Pathology & Oncology Research*. **IF: 1.736**

Matyas P, Postyeni E, Komlosi K, Szalai R, Bene J, Magyarai L, Melegh B, Hadzsiev K. 2018. **Halláskárosodásban részt vevő *NAT2*, *GRM7* és *GRHL2* hajlamosító polimorfizmusok és haplotípusok Roma és Magyar populációban.***Népegészségügy* 96: (1) pp. 51-58.

Mašindová I, Šoltýsová A, Varga L, **Matyas P**, Ficek A, et al. 2015. ***MARVELD2 (DFNB49)* Mutations in the Hearing Impaired Central European Roma Population - Prevalence, Clinical Impact and the Common Origin.** *PLoS ONE* 10(4): e0124232. **IF: 3.234**

Sipeky C, **Matyas P**, Melegh M, Janicsek I, Szalai R, Szabo I, Varnai R, Tarlos G, Ganczer A, Melegh B 2014. **Lower carrier rate of *GJB2* W24X ancestral Indian mutation in Roma samples from Hungary: implication for public health intervention.** *Molecular Biology Reports* pp 6105-6110. **IF: 2.024**

Egyéb közlemények

Fekete A, Hadzsiev K, Bene J, Naszai A, **Matyas P**, Till A, Melegh B 2017. **A8344G mitochondrial DNA mutation observed in two generation.** *Orvosi Hetilap* 158(12):468-471 **IF: 0,349**

Bene J, Hadzsiev K, Komlosi K, Kovesdi E, **Matyas P**, Melegh B 2015. **De novo SCN1A gene deletion in therapy-resistant Dravet syndrome.** *Orvosi Hetilap* 6;156(49):2009-12

Szalai R, **Matyas P**, Varszegi D, Melegh M, Magyari L, Jaromi L, Sumegi K, Duga B, Kovesdi E, Hadzsiev K, Melegh B. **Admixture of beneficial and unfavourable variants of GLCCI1 and FCER2 in Roma samples can implicate different clinical response to corticosteroids.** *Molecular Biology Reports* 2014 Nov;41(11):7665-9. **IF: 1.958**

Weber A, Szalai R, Sipeky C, Magyari L, Melegh M, Jaromi L, **Matyas P**, Duga B, Kovesdi E, Hadzsiev K, Melegh B. Increased prevalence of functional minor allele variants of drug metabolizing CYP2B6 and CYP2D6 genes in Roma population samples. *Pharmacol Rep.* 2015 Jun; 67 (3):460-4. **IF: 2.165**

Magyari L, Varszegi D, Sarlos P, Jaromi L, Melegh BI, Duga B, Kisfali P, Kovesdi E, **Matyas P**, Szabo A, Szalai R, Melegh B. **Marked differences of haplotype tagging SNP distribution, linkage, and haplotype profile of IL23 receptor gene in Roma and Hungarian population samples.** *Cytokine.* 2014 Feb;65(2):148-52. **IF: 2.87**

Sumegi K, Jaromi L, Magyari L, Kovesdi E, Duga B, Szalai R, Maasz A, **Matyas P**, Janicsek I, Melegh B. **Functional Variants of Lipid Level Modifier MLXIPL, GCKR, GALNT2, CILP2, ANGPTL3 and TRIB1 Genes in Healthy Roma and Hungarian Populations.** *Pathol Oncol Res.* 2015 Jan 9. **IF: 1.81**

Nagy A, Sipeky C, Szalai R, Melegh B I, **Matyas P**, Ganczer A, Toth K, Melegh B **Marked differences in frequencies of statin therapy relevant SLCO1B1 variants and haplotypes between Roma and Hungarian populations.** *BMC Genetics* (2015). **IF: 2.40**

Szalai R, Magyar L, **Matyas P**, Duga B, Banfai Z, Szabo A, Kovesdi E, Melegh B. **Genetic polymorphisms in promoter and intronic regions of CYP1A2 gene in Roma and Hungarian population samples.** *Environ Toxicol Pharmacol.* 2014 Nov; 38(3):814-20.

IF: 1.862

Szalai R, Ganczer A, Magyar L, **Matyas P**, Bene J, Melegh B. Interethnic differences of cytochrome P450 gene polymorphisms may influence outcome of taxane therapy in Roma and Hungarian Population. *Drug metabolism and Pharmacokinetics.* 2015 Dec; 30(6):453-6.

IF: 2.558

Sipeky C, Weber A, Melegh BI, **Matyas P**, Janicsek I, Szalai R, Szabo I, Varnai R, Tarlos G, Ganczer A, Melegh B. Interethnic variability of CYP4F2 (V433M) in admixed population of Roma and Hungarians. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2015 Jul; 40(1):280-3. **IF: 2.084**

Safrany E, Szabo M, Szell M, Kemeny L, Sumegi K, Melegh BI, Magyar L, **Matyas P**, Figler M, Weber A, Tulassay Z, Melegh B. 10. Difference of interleukin-23 receptor gene haplotype variants in ulcerative colitis compared to Crohn's disease and psoriasis. *Inflamm Res.* 2013 Feb; 62(2):195-200. **IF: 2.143**

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: **6,994**

Egyéb közlemények összesített impakt faktora: **20.199**

Összesített impakt faktor: **27.193**