

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Nyesténé Nagy Teréz

**Kataláz gén polimorfizmusok, DNS mutációk és kataláz
enzim aktivitás kapcsolatának vizsgálata.**

DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2017

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Kataláz gén polimorfizmusok, DNS mutációk és kataláz
enzim aktivitás kapcsolatának vizsgálata.**

Nyesténé Nagy Teréz

Témavezető: Prof. Dr. Góth László



DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2017.

Tartalom

1. BEVEZETÉS	3
1.1 IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
1.1.1 Oxidatív stressz.....	3
1.1.2. Hidrogén-peroxid (H ₂ O ₂)	4
1.1.3 A kataláz enzim (EC 1.11.1.6, hidrogén-peroxid-hidrogén-peroxid oxidoreduktáz)	5
1.1.4 A kataláz gén	8
1.1.5 A vér és a vörösvértest kataláz.....	8
1.1.6 Akatalazémia és hypokatalazémia	10
1.1.7 A csökkent kataláz enzim aktivitás és a diabetes mellitus kapcsolata	11
1.1.8. Kataláz aktivitás mikrociter anémiában és β-thalassemiában	13
1.1.9 A kataláz gén polimorfizmusa.....	15
2. CÉLKITŰZÉS.....	17
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	18
3.1. Betegek, kontrollok, vizsgálati munták	18
3.1.1. Kataláz gén exon 9 (rs769217) és 5'UTR (rs1001179) polimorfizmus vizsgálat és új akatalazémia mutáció vizsgálat, beteg és kontroll minták.....	19
3.2.1. Csökkent kataláz aktivitású minták mutáció analizise	19
3.2 Biokémiai paraméterek meghatározása.....	21
3.2.1. Kataláz enzim aktivitás mérés	21
3.2.2. Lipid paraméterek és a glükóz meghatározása	22
3.2.3. A hematológiai paraméterek meghatározása	23
3.3 Molekuláris biológiai vizsgálatok.....	23
3.3.1. DNS izolálás	23
3.3.2. PCR.....	23
3.3.3. Elektroforézis.....	24
3.3.4. SSCP analízis	25
3.3.5. PCR-RFLP analízis BsTXI enzimmal.....	25
3.3.6. DNS szekvencia analízis	26
3.3.7. Heteroduplex analízis	26
3.4. Statisztikai analízis.....	27
4. EREDMÉNYEK.....	28
4.1 Kataláz gén polimorfizmus vizsgálata Magyarországi mikrociter anémia és beta-thalassemia betegségben.....	28
4.2 A kataláz gén rs769217 (C111T) polimorfizmusának vizsgálata magyarországi mikrociter anemiás, β-thalassemiás betegeknél és kontroll egyéneknél	33
4.3. A vér kataláz rs769217 és rs1001179 polimorfizmusainak hatása szénhidrát és lipid biomarkerekre diabetes mellitusban	36
4.4. Új akatalazémia mutációk magyarországi diabetes mellitus és mikrociter anémia betegségben.....	43
5. MEGBESZÉLÉS.....	46

5.1 Kataláz gén exon 9 (rs769217) polimorfizmus vizsgálata egy egyszerű módszerrel, magyarországi mikrociter anemia és beta-thalassemia betegségben	46
5.1.1. Kataláz gén rs769217 polimorfizmus vizsgáló módszere [65].....	46
5.1.2 A kataláz gén rs769217 polimorfizmusának vizsgálata magyarországi mikrociter anemiás, β -thalasemiás betegeknel és kontroll egyéneknél.....	47
5.2 A vér kataláz rs769217 és rs1001179 polimorfizmusainak hatása szénhidrát és lipid biomarkerekre diabetes mellitusban	51
5.2.1. rs769217 (9. exon C111T/+22348C>T) polimorfizmus.....	51
5.2.2 rs1001179 (5'UTR régió -262C/T) polimorfizmus.....	52
5.3 Új akatalazémia mutáció magyarországi diabetes mellitus és mikrociter anemiás betegségben	54
5.3.1. Diabetes mellitus csoport vizsgálata	54
5.3.2 A mikrociter anemiás csoport vizsgálata.....	55
5.3.3 Az új akatalazémia mutációk	56
6. ÖSSZEFOGLALÁS	58
6.1. Új eljárás a 9.exon C111T polimorfizmus vizsgálatára.....	58
6.2. A C111T polimorfizmus vizsgálata mikrociter anemiában és β -thalassemiában, diabetes mellitusban.....	58
6.3. A -262C>T polimorfizmus vizsgálata	58
6.4. Új akatalazémia mutációk	59
7. SUMMARY	60
7.1A new procedure for examining 9.exon C111T polymorphism.....	60
7.2 Investigation of C111T polymorphism in microcytic anemia and β -thalassemia, diabetes mellitus.....	60
7.3 Research of -262C>T polymorphism	60
7.4 New acatalasemia mutations	61
8. AZ ÚJ EREDMÉNYEIM	62
9. IRODALOM.....	65
9.1 A dolgozat megírásához felhasznált irodalom	65
10. TÁRGYSZAVAK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	77
11. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	79
12. Függelék.....	80

1. BEVEZETÉS

1.1 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1.1 Oxidatív stressz

Az emberi szervezetben folyamatosan keletkeznek és alakulnak át szabad gyökök az oxidációs-redukciós biokémiai folyamatok során. Oxidatív stressz akkor alakul ki, amikor a keletkező reaktív oxigén vegyületek (ROS) koncentrációja meghaladja a szervezet antioxidáns kapacitását. A reaktív vegyületek, az oxidatív szempontból egyensúlyban lévő szervezetben olyan fontos feladatokat is ellátnak, mint a sejtciklus szabályozása, az apoptózis, a nekrozis egyes lépései, enzimek aktiválása és gátlás, stb.

Az oxidatív stressz megváltoztatja az oxidatív egyensúlyt, és számos betegség patomechanizmusában is szerepet játszhat [1,2,3]. A ROS károsító szerepe ismert olyan megbetegedésekben, mint a diabetes mellitus, az atherosclerosis, a krónikus májbetegségek, a veseelégtelenség, a tumoros megbetegedések, a rheumatoid arthritis, a neurodegeneratív betegségek, stb.

Fiziológias körülmények között a szervezetben keletkező ROS fő forrásai a mitokondriális elektron transzport lánc, a fagocita sejtek és az enzim rendszerek. Az enzim rendszerek közül a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADP) oxidáz, a peroxiszómális citokróm P450-oxidáz, a monoamin-oxidáz valamint a xantin oxidáz említhető. A leggyakrabban előforduló ROS a hidroxil gyök (OH), a nitrogénmonoxid gyök ($\cdot\text{NO}$), a szuperoxid anion ($\cdot\text{O}_2^-$), a lipidperoxil gyök ($\cdot\text{LOO}$) és a hidrogén peroxid (H_2O_2) [4,5].

Az oxigén speciestek képesek károsítani a fehérjéket, lipideket, és a sejtek örökítő anyagát a DNS-t. A toxikus folyamat eredményeként jelentkezhet az enzim aktivitások csökkenése, membrán működési defektusok, oxidált állapotú lipidek megjelenése és mutációk a DNS-ben. A hosszantartó oxidatív hatás a sejtek öregedéséhez, krónikus betegségek és tumorok kialakulásához vezethet [5].

Az emberi szervezetben a ROS általi károsodások csökkentésére védekező mechanizmusok alakultak ki. A védelmi rendszer elemei a kis molekulásúlyú antioxidánsok, mint például az aszkorbinsav, a glutation (GSH), az alfa-tokoferol, stb. Ezek a molekulák közvetlen reakcióban képesek metabolizálni a toxikus ágenseket. A második védelmi vonalat az antioxidáns enzimek a szuperoxid-dizmutáz, glutation-peroxidáz és a kataláz képezik, melyek a keletkező szabad gyököket részben vagy teljes mértékben eliminálják. A harmadik védelmi vonal molekuláris szinten fejti ki hatását, amikor már kialakult a toxicitás. Ekkor repair enzimek, lipázok, peptidázok, proteázok, DNS repair enzimek révén a károsodott szakasz eltávolítása, vagy a hiba korrigálása történik [6,7].

1.1.2. Hidrogén-peroxid (H₂O₂)

A hidrogén-peroxid kis molekula, a víz molekula méretét kis mértékben haladja meg, töltéssel nem rendelkezik, diffundál a sejtben és a sejtek között. Fiziológias és patológias folyamatok eredményeként egyaránt keletkezhethet [8]. A szervezetben, nagy koncentrációban toxikus, kis koncentrációban több élettani folyamatban is fontos szerepet tölt be [9]. Szerepe van az NFκB aktiválásában, a jelátvitelben, a szénhidrát metabolizmusban, az immunválaszban, a protein kináz C és a transzkripciós faktor aktiválásában. Gyulladásos szövetekben aktivált fagociták által generálódhat a hidrogén-peroxid, amely szerepet játszhat a gyulladásos folyamat modulálásában, és az adhézis molekulák expresszióját segíti elő [10]. Proliferációra, vagy apoptikus állapotba segítheti a sejtet és modulálja a trombociták aggregációját. Hidrogén-peroxidot termel a xantin-oxidáz és az aldehid-oxidáz a citoszolban, a citokróm P450 autooxidáció az endoplazmatikus retikulumban, a húgysav-oxidáz, a D-aminosav-oxidáz, a hidroxisav-oxidáz a peroxisomákban, a monoamin-oxidáz és piridoxamin-oxidáz a mitochondriumban, és termelik egyes mikrobák (tejsav baktériumok), valamint a

vizeletben lévő oxidáz enzimek is. Kimutatható továbbá a mitochondriális elektrontranszport során apoptózisban, a xantin-oxidáz közreműködésével [8,9].

A patológiás folyamatok közül legismertebb az oxigén gyökből szuperoxid dizmutáz hatására keletkező hidrogén-peroxid, amely ischaemiában és reperfüzióban, izomvesztéskor, immobilizáció folyamán és intenzív fizikai megterhelés alkalmával is generálódik, valamint mitochondrialis oxidatív stresszben, malignus folyamatokban, diabetesben és egyéb oxidatív körülmények között is képződnek [8,9].

A sejtek számára 20–50 $\mu\text{mol/l}$ hidrogén-peroxid koncentráció mérsékelten, míg az 50 $\mu\text{mol/l}$ feletti már erősen toxikus [8,9].

A kutatási eredmények megegyeznek abban, hogy a patológiás folyamatok következményeként megemelkedett koncentrációban jelen lévő hidrogén-peroxid képes gyorsan eliminálódni, amelyben főként a kataláz, de kisebb szereppel más vegyületek is közreműködnek. Napjainkban elfogadott tény, hogy a kataláz enzim a legnagyobb jelentőségű, az eliminációs folyamatban, ezt követik a glutation peroxidáz, a peroxiredoxin2, valamint a hemoglobin peroxidatikus hatása [10,11,12,13].

1.1.3 A kataláz enzim (EC 1.11.1.6, hidrogén-peroxid-hidrogén-peroxid oxidoreduktáz)

A szervezet H_2O_2 metabolizmusának fő szabályozója a kataláz enzim, amely a hidrogén-peroxid vízre és oxigénre való bontását végzi, igen nagy sebességgel. Egy kataláz molekula egy perc alatt több mint egy millió hidrogén peroxid molekula metabolizációját képes elvégezni.

A kataláz enzim (EC 1.11.1.6, hidrogén-peroxid-hidrogén-peroxid oxidoreduktáz) 4 egymással szimmetrikus alegységből épül fel, tetramer szerkezetű és 240 kDa nagyságú. Az alegységek 527 aminosavból állnak, tartalmaznak egy-egy hem csoportot, amelynek az aktív centrumában vas (III) ion található.

A három csatornás szerkezet az enzim optimális működését biztosítja. A főcsatorna képezi az utat a hidrogén-peroxid szubsztrát számára az enzim felszínéről az aktív centrumig. A csatorna szűk kiképzése biztosítja, hogy a hidrogén peroxidon és víz molekulán kívül mást nem képes átengedni. A centrális csatornán keresztül az oxigén molekulák, míg a laterális csatornán a víz távozik [14].

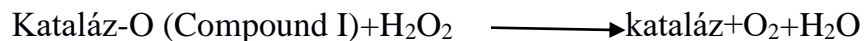
A szubsztrát bontási mechanizmus különlegessége abban rejlik, hogy a fiziológias koncentrációban jelenlévő H_2O_2 esetén az enzim nem lép működésbe. Ennek egyik oka az enzim szerkezeti felépítésében rejlik. A 3 csatornás rendszerben a főcsatorna, amely a szubsztrát bevezetéséért felel, 31 Å hosszúságú tölcser alakban végződik. A szerin198 és az arginin144 egy betüremkedést (gate) hoznak létre, amely megakadályozza a hidrogén-peroxidnál nagyobb molekulák bejutását az aktív centrumba. A „kapu” nem képes kinyílni a kis koncentrációban jelenlévő H_2O_2 molekulák jelenlétében.



Az enzimatis reakció kétlépeses katalitikus mechanizmus, amelynek első lépésében egy víz molekula és az enzim szubsztrát komplex I (Compound I) jön létre, ez a folyamat reverzibilis.



A második katalitikus lépés:



A második lépés során, amely irreverzibilis, egy újabb hidrogén-peroxid molekula érkezik a főcsatornán keresztül. A reakció végén a keletkező oxigén és a víz eltávozik a centrális és laterális csatornákon [14,15,16].

Emlős szervezetben jelenlévő kataláz és NADPH közötti kapcsolódásról is beszámoltak. A NADPH feltételezett szerepe az, hogy megakadályozza az

enzimatikusan inaktív komplex II (Compound II) kialakulását, és kis mértékben növeli az inaktív forma eltávolításának sebességét is [17,18].

A humán szervekben különböző koncentrációban/aktivitással található a kataláz enzim. A máj (peroxiszómák, mitokondrium) megközelítőleg 3.33×10^5 U/g a vörösvértestek (citoszol) $4,67 \times 10^5$ U/g igen nagy koncentrációban, míg a szív közepes, a pancreas és az agy alacsony $0,78$ - és $0,722 \times 10^5$ U/g kataláz aktivitással rendelkezik. A legkisebb kataláz aktivitás a szérumban $0,50 \times 10^2$ U/l [14]. Feltételezhető, hogy a kis koncentrációjú szövetek antioxidáns védelmét is az olyan nagy koncentrációjú szövetek végzik el, mint a máj és a vér. A máj és vörösvértestek nagy kataláz tartalma révén, a különböző patológiás elváltozásaikor a belőlük kijutó kataláz jelentősen megnöveli a szérumban kataláz aktivitást [19,20].

Érdekeséggé válhat, hogy mangán tartalmú kataláz molekulával találkozunk a mikrobiológiában, *L. plantarum* és a *T. thermophilus* baktériumokból is izolálták az enzimet. Ezekben az esetekben, az aktív centrumban két magvú mangán komplexet találhatunk szemben a már leírt hem típusúval. A vas alapvető szerves tápanyag számos organizmus számára. Ezzel szemben a mangán tartalmú kataláz tartalmú baktériumok a legtöbb esetben függetlenül is képesek védelmi funkciót ellátni. Ezek az organizmusok szerepet játszanak az emberek egészségében és megbetegedéseiben. Előnyük, hogy nagy hő stabilitással bírnak és extrém környezetben is képesek, aktívak maradni. A humán szervezetben betöltött feladatukat, esetleges előnyeiket napjainkban részletesen vizsgálják [21].

Bizonyos baktériumok (tejsavbaktériumok) hidrogén-peroxidot, míg mások (staphylococcusok) kataláz enzimet termelnek. A kataláz termelés, és az enzim jelenlétének kimutatása napjainkban is alkalmazott mikrobiológiai diagnosztikai teszt, amit alapvetően a staphylococcusok és a streptococcusok elkülönítésére alkalmaznak (kataláz próba). A próba során a baktérium telepre hidrogén-peroxid oldatot csepegtetnek. Amennyiben kataláz enzimet termel a baktérium, szabad

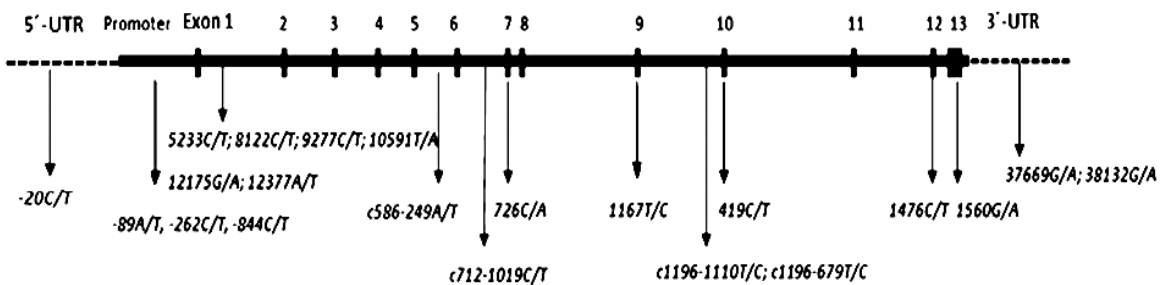
szemmel jól látható pezsgést, intenzív buborék képződést láthatunk, amely az oxigén keletkezését jelzi.

1.1.4 A kataláz gén

A kataláz fehérjét egyetlen gén a kataláz gén kódolja, amely a 11-es kromoszóma rövid karján a 13-as pozícióban található. 33 114kb hosszúságú génnek 13 exonja és 12 intronja van, amelyek a kromoszómán a 34 417 054 és a 34 450 176 nukleotidok között helyezkednek el.

A fehérje szintézise a riboszómákon történik, a szignál protein segítségével jut el az alegység a peroxiszómákba, és itt történik a hemek beépülése, valamint a dimerizáció és a tetramer képződés.

Az 1. ábrán a gén vázlatos rajza látható, a kódoló (fekete álló téglalap) és a nem kódoló régiók (fekete vastag vonalszakaszok) feltüntetésével. Bemutatásra kerül a 13 exonális régió, valamint a promóter, 5'-UTR és 3'-UTR szakaszok és az ezekben azonosított polimorfizmusok egy része.



1. ábra A kataláz gén sematikus rajza és a legismertebb polimorfizmusok

1.1.5 A vér és a vörösvértest kataláz

A hemoglobin molekula egy vas tartalmú oxigén transzporter, amely emlősökben a vörösvértestekben található. A keringés során, fiziológiás környezetben oxidációs és redukciós lépéseken megy keresztül. A redox folyamatok következményeként ROS-ok keletkezhetnek.

A teljes hemoglobin 3%-ából naponta autoxidáció során képződik methemoglobin és szuperoxid anion, amiből hidrogén-peroxid keletkezik, és ennek a detoxifikálásában a kataláz játszik szerepet. Ez magyarázhatja, hogy a vörösvértestek funkciójának fenntartásában jelentős szerep tulajdonítható az antioxidáns kataláz enzimnek [22,23].

A teljes vér alkotó elemei különböző koncentrációban tartalmazzák a kataláz enzimet. A limfociták, trombociták esetén a vérsejtekben, míg a monociták és a polimorfo nukleáris sejteknél a felszínen detektálható [24,25].

A vérkataláz 99%-a származik a vörösvértestekből, és a vér kataláz referens átlaga 113,3 MU 1 l vérré vonatkoztatva. Ha ezt a vörösvértestek 1 l-re vonatkoztatjuk, akkor 251,7 MU aktivitással kell számolnunk. A vérkataláz aktivitáson gyakorlatilag a vörösvértestekben mérhető kataláz enzim aktivitást értjük.

Feltételezhető, hogy a vérben, nagy koncentrációban jelen lévő kataláz, a kis kataláz koncentrációjú szöveteket károsítható hidrogén-peroxid elleni védelmét is szolgálja.

Kutató csoportunk a szubsztrát bontáson alapuló megbízható módszert dolgozott ki a vér kataláz aktivitás meghatározására, az 1990-es évek elején [26,27]. Ezt követően lehetőség nyílt széleskörű klinikai célú vizsgálatok elvégzésére, amelyek során meghatározásra került a vér kataláz aktivitás különböző megbetegedésekben. Egy három éves vizsgálati program keretében 28 252 beteg vérkataláz aktivitásának meghatározását végezték el. Az eredmények közül említendő, a vér kataláz csökkenése a következő megbetegedésekben: 130 különböző daganatos elváltozásban, (hematológiai: 30, gastrointestinalis: 29, tüdő: 17, urogenitális: 14, emésztőszervi:14, emlő:13, egyéb:13) és annak különböző fázisaiban vér kataláz aktivitást vizsgálva szignifikáns csökkenést tapasztaltak ($80,8 \pm 21,5$ MU/l, $p < 0,001$). Atherosclerosisban elsőként vizsgáltak nagyszámú ($n=1670$) beteget és a vér kataláz aktivitás szignifikáns csökkenését találták ($104,8 \pm 18,2$ MU/l, $p < 0,001$). Skizophreniában szintén elsőként végeztek

vizsgálatot, amely eredménye a vérkataláz aktivitások szignifikáns csökkenése volt ($105,6 \pm 20,5$ MU/l, $p < 0,001$) a referens átlaghoz képest [14,28].

A diabetes mellitus három típusában (1-es típus $n=92$, 2-es típus $n=60$, és gestációs $n=235$) elvégzett vér kataláz aktivitás mérések során csökkent enzim aktivitást mértek ($p < 0,001$) [29,30].

Vitiligo megbetegedésben a vér kataláz aktivitás csökkenését tapasztalták ($100,2 \pm 17,7$ MU/l, $p < 0,001$) [31].

A microciter anemia és β -thalassemia, valamint a diabetes mellitus megbetegedések és a csökkent vérkataláz aktivitással kapcsolatos vizsgálataink napjainkban is folytatódnak.

1.1.6 Akatalazémia és hypokatalazémia

Az akatalazémia a kataláz enzim veleszületett hiánya, genetikailag a mutáns homozigóta állapot. A hidrogén-peroxid bontást alkalmazó kataláz aktivitás meghatározásoknál a vér/szérum egyéb komponensei is fogyasztják a szubsztrátot. Ezért az akatalazémia elnevezés kissé félre vezető, mivel az ilyen esetekben szubsztrát meghatározási eljárásokkal 1-8 %-os aktivitás mérhető [32,33].

Az első akatalazémiás egyént Takahara professzor ismertette 1946-ban Japánban [34]. A hidrogén-peroxid bontás „teljes” hiányát tapasztalta 11 éves leány betegnél, majd a család tagjait és további két másik családot is bevont a vizsgálatokba. A három családban 9 esetben igazolta a kataláz enzim „teljes” hiányát a vérben. Azt tapasztalta, hogy fertőtlenítési céllal, a vérhez adott hidrogén-peroxid hatására oxigén buborék képződés nem volt detektálható. Feltételezte, hogy a betegek véréből hiányzik a hidrogén-peroxid bontásért felelős anyag, a kataláz enzim. A vér kataláz aktivitás mérésre a permanganometriás hidrogén-peroxid eljárást alkalmazta és 6 esetben a kataláz aktivitás teljes hiányát, 5 esetben $< 10\%$, míg 2 esetben 10% -os aktivitást mért [34].

Ezt követően további 12 országban detektáltak akatalazémiás állapotot, közöttük a legnagyobb számban Japánban (91 fő) és Svájcban (11 fő) [35].

A magyarországi kutatások során a vizsgált populáció (n=28252) alapján 0.05/1000 az akatalazémia gyakorisága [14]. Az első magyarországi akatalazémiát 1989-ben detektálta kutatócsoportunk (4,6 MU/l). Hypokatalazémia vonatkozásában ez az arány a magyarországi populációban 0,18/1000 [16,36].

Az enzim csökkent aktivitása hozzájárulhat különböző megbetegedések korai manifesztálódáshoz (tumorok, anemiák, vitiligo, diabetes mellitus) [37,38]. Kutatócsoportunk az elmúlt években a kataláz enzim aktivitás csökkenésének okaival foglalkozik részletesebben. Az enzim aktivitás csökkenés a kataláz gén polimorfizmusaira, illetve a fehérje expressziójának csökkenésére is visszavezethető.

Dolgozatomban olyan kutatási eredményekről számolok be, amelyek a kataláz enzim aktivitás csökkenés okát molekuláris szinten vizsgálják.

1.1.7 A csökkent kataláz enzim aktivitás és a diabetes mellitus kapcsolata

A diabetes mellitus az egyik legrégebben megismert betegség. Napjainkban a megbetegedések száma egyre nő. Egy 1994-es becslés szerint 600 000-700 000 diabeteses él Magyarországon, későbbi adatok hiányában ez a becslés ma is alkalmazható [39].

A 2-es típusú diabetes mellitus komplex betegségnek tekinthető, kialakulását környezeti tényezők és genetikai faktorok egyaránt befolyásolják.

McCarty 2010-ben ismertette összefoglaló közleményét, amelyben összegezte a betegségek és a genetikai variánsok, elsősorban a single nucleotid polymorphism (SNP) közötti összefüggéseket [40].

Hur és munkatársai [41] 2010-ben szakirodalmi kutatást végeztek, hogy olyan géneket keressenek, és mutassanak ki amelyek összefüggésbe hozhatók a diabetezzel és a reaktív oxigén-ágensekkel. A SciMiner program alkalmazásával

azt találták, hogy a ROS és a diabetes mellitus relációban első az inzulin, második a szuperoxid dizmutáz, harmadik a kataláz. A szerzők ezen következtetéseiket 1154 biológiai és orvosi folyóiratban publikált közlemények alapján vonták le [41].

Fuchsberger és munkatársai [42] a Nature-ben 2016-ban megjelent cikkükben beszámolnak egy átfogó, több országot érintő, összehasonlító elemzésről, amelynek célja a 2-es típusú diabetes mellitus kialakulását befolyásoló gének/mutációk/polimorfizmusok azonosítása.

A GOT2D és a T2D-GENES projektek együttes vizsgálatát végezték el. Vizsgálataik során az alacsony frekvenciájú és ritka allélok elemzése volt a cél. 2657 diabeteses és kontroll egyén teljes genom szekvenálása történt meg. (1326 beteg és 1331 kontroll). 26,7 millió genetikai variánst azonosítottak, 1,5 millió rövid inserciót-deléciót és 8876 nagyobb deléciót. A TCF7L2 (transzkripciós faktort kódoló gén a 10. kromoszómán) és az ADCY5 (3-as kromoszómán lévő membránhoz kötött G-fehérje aktivátort kódoló gén). Hasonlóan a CCND2 (12. kromoszómán található gén, amely CDK Kináz reguláló fehérjét kódol) valamint az EML4 (microtubulust assziciáló fehérjét kódoló gén), amely a 2q21 pozícióban megtalálható, (rs76895963 G/T csere) új, gén variáns.

A kódoló régiók részletes vizsgálatára is sor került, ahol 12 940 egyénből (6504 beteg és 6436 kontroll) 3 synonyme, 7636 missense, 250 trunkált protein allélt találtak. Egyetlen ismert genom variáns felelt meg az elvárásoknak a PAX4 Arg192His, rs2233580, amely egy transzkripciós faktort kódol (paired boks).

Az elemzés nagyon nagy munka volt, sok ráfordítással, és lényeges, új eredmény nélkül.

Összegezve a közlemény 44 414 egyén (11 645 2-es típusú diabeteses és 32 769 kontroll) mutáció vizsgálati eredményeit mutatja be. A betegek Dél Kelet Ázsiából, USA-ból, spanyol nyelvterületről, Európából származtak. A vizsgálatban résztvevő Európai országok: Finnország, Svédország, Németország,

Spanyolország, Franciaország, Dánia, Egyesült Királyság, Hollandia, és Észtország.

A vizsgálatokban Magyarország nem szerepelt. A kataláz génben, a 2-es típusú diabetes mellitusban fokozottan előforduló mutációk szinte kizárólagosan magyar betegeknél fordultak elő. Ez magyarázza, hogy a kataláz mutációk nem szerepelnek az összeállításban [42].

Az eddigi vizsgálatok szerint nem azonosítható 2-es típusú diabetes mellitust okozó egy vagy több kataláz gén variáns. A veleszületett kataláz hiányban a diabetes gyakoribb előfordulása annak tulajdonítható, hogy a kataláz hiány révén a hidrogén-peroxid koncentráció tartósan növekszik, és károsító hatást fejthet ki az oxidációra igen érzékeny pancreas beta-sejtekben [42,43]. 1992-ben kutatócsoportunk 13 kataláz hiányos magyar családban 63 kataláz hiányos családtagról és 66 normokatalazémiás családtag vizsgálatáról számolt be. Két akatalazémiás betegből mindkettő 100% (2/2), a csökkent kataláz aktivitású egyének között 12,1 % (8/66) volt cukorbeteg [44].

A veleszületett kataláz hiány és a 2-es típusú diabetes közötti kapcsolatról több tanulmányban is beszámoltunk [29,30,44,45,53,58,74]. A 2-es típusú diabetes és a veleszületett kataláz hiány kapcsolatának vizsgálata során 16 különböző típusú kataláz gén mutáció azonosítása történt meg és valamennyi variáns csökkent vérkataláz aktivitást eredményez (homozigótáknál 5%, heterozigóták esetén 49,1%). Kataláz hiányos egyéneknél a diabetesre való hajlam fokozódása egyre inkább bizonyossá válik. A kataláz hiány indirekt módon, a megnövekedett hidrogén-peroxid koncentráción keresztül járulhat hozzá a megbetegedés kialakulásához [45].

1.1.8. Kataláz aktivitás mikrociter anémiában és β -thalassemiaiban

Mikrociter anémiában a vörösvértestek száma és nagysága csökken. Ennek okai lehetnek: a vas elégtelen bevitele, csökkent felszívódása és gyors kiürülése a

szervezetből. Ilyen esetekben a vörösvértestek kisebbek az átlagosnál és alacsonyabb a hemoglobin tartalmuk, hipokrómok. Genetikai rendellenességek is vezethetnek kisméretű, hipokróm vörösvértestek képződéséhez.

Genetikai eltérés okozza a thalassemiákat, amelynek két nagy csoportját különböztetjük meg. A 11. kromoszóma génje (két allél) a β -láncot, míg a 16. kromoszóma két génje (négy allél) az α -láncot kódolja. Thalassemiában a hemoglobin valamelyik globin láncát (α , β) kódoló gén mutációja következik be. Az α -thalassemiában a hemoglobin α -lánc elégtelen működésű. A gyakoribb β -thalassemiában a β -lánc nem tölti be megfelelően szerepét, csökkent szintézise vagy hiánya okozza a megbetegedést. Ezekben az esetekben a vörösvértestek szintézise is csökkenhet, ami anémiát okoz. Legsúlyosabb esetben mindkét β -láncból kevesebb, vagy egyáltalán nem szintetizálódik, ilyenkor beszélünk β -thalassemia major vagy Cooley anémiáról. Az egyik allél hiányakor mikrocitózis, enyhe fokú anémia alakul ki, amikor tünetmentességet tapasztalnak (β -thalassemia minor). A harmadik csoportba a β -thalassemia intermedia sorolható, amely súlyosabb a minor típusnál, de kevésbé súlyos, mint a Cooley anémia. Az intermedia típust a β -láncot kódoló gén mutációjának homozigóta formája okozza [46]. Thalassemiában több mint 1000 különböző genetikai eltérés azonosítása történt meg. A β -thalassemia mutációk nagymértékben mutatnak regionálisan eltérést. A korábban mediterrán betegségnek tartott thalassemia, egyre gyakoribb az északi, és nyugati országokban. Kutató csoportunk 2011-ben prezentált tanulmányában 43 beteget vizsgálva 13 különböző gén mutációt detektált, amelyből 6 esetet elsőként mutatott be. Vizsgálataikban alacsony vérkataláz aktivitást találtak β -thalassemias betegeknél a kontroll csoporthoz viszonyítva ($p < 0,001$) [47,48].

Bertoldi és munkatársai [49] a β -thalassemia és az oxidatív stressz kapcsolatát vizsgálták 2013-ban megjelent cikkükben. Feltételezésük szerint a sérült, vagy hiányzó β -láncok miatt szabad vas molekulák jelennek meg a vörösvértest membránhoz kapcsolódva, amelyek oxidálódhatnak (Fenton reakció). Az oxidáció

során ROS-ok keletkezhetnek ($\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$). A csökkent vér kataláz aktivitás ezekben a vörösvértestekben az oxidatív folyamatok fokozódásához vezet. A kórosan aktív H_2O_2 eltávolítása nem megoldott a vörösvértesteken belül. A csökkent vér kataláz aktivitások és a β -thalassémia közötti kapcsolat vizsgálata hozzásegíthet a betegség könnyebb megértéséhez [49].

1.1.9 A kataláz gén polimorfizmusa

Az NCBI adatbázisban található információkat felhasználva 2012-ig a kataláz génben 245 olyan nukleotid pozíció volt azonosítható, amely a konszenzusostól eltérő [50,51].

A polimorfizmusok nagy része olyan benignus elváltozást eredményez, amely nincs hatással az enzim aktivitására, nem befolyásolja a kataláz fehérje expresszióját, és nincsenek patológiai vonatkozásai, vagy azokat jelenleg nem ismerjük. Herbert-Schustert összefoglaló közleményében 11 különböző a kataláz génen azonosított polimorfizmust említ [52]. Ezeket a polimorfizmusokat anyagcsere betegségekkel hozták kapcsolatba. Négy nukleotid eltérés az 5'-UTR, egy a 3'-UTR, kettő az 1. exonban, kettő a 9. exonban, egy a 10. exonban található. Az ismertetett betegségek nagy része a szénhidrát anyagcsere (1-es és 2-es típusú diabetes mellitus) és a csontképző rendszer (osteoporosis) megbetegedései közül került ki [52].

Kutatócsoportunk is több évtizede foglalkozik különböző megbetegedések és a kataláz génben fellelhető mutációk, polimorfizmusok, SNP kapcsolatával. Összefüggés volt kimutatható a 9. exon C111T polimorfizmusa és a diabetes mellitus betegség között. A T mutáns allél jelenlétében a kataláz aktivitás szignifikáns csökkenése volt detektálható [53].

Az általunk vizsgált magyarországi populációban vitiligó megbetegedésben hajlamosító tényezőnek találtuk a C111T missense mutációt [54]. Hasonló

eredményre jutottak Gavalas és munkatársai angliai populáció vizsgálatakor [55]. Az enzimet kódoló gén exonális és intronális régióinak feltérképezése napjainkban is folyamatos. A molekuláris biológiai módszerek elterjedésével számos, a konszenzusostól eltérő nukleotidot sikerült azonosítani a magyarországi populációban [56-58]. Csoportosításra kerültek az azonosított mutációk, amelyek alapján genetikai típusokat lehetett kialakítani (magyarországi A, B, C, D, E típusok) [59-61].

Az akatalazémia és hypokatalazémia genetikai okainak feltárásához segítséget nyújtott a kódoló régiók vizsgálata mellett a szabályozó régió feltérképezése. A kataláz gén 5'-UTR, promóter szakaszain több polimorfizmus is azonosításra került a magyarországi populációban [61]. Forsberg és munkatársai [62] kulcsfontosságúnak tartották az 5'-UTR régióban azonosítható -262C/T polimorfizmust, amely jelentős szerepet tölt be, mint transzkripció pont. Svéd populációt vizsgálva azt találták, hogy a „T” allél jelenléte szignifikánsan magasabb kataláz aktivitást eredményezett [62].

A genetikai eltérésekre visszavezethető kataláz enzim aktivitás csökkenés következményeként megnövekedhet a hidrogén-peroxid koncentráció a sejtekben és a szövetekben, és az így kialakuló oxidatív stressz révén károsodhatnak az arra érzékeny szervek, szövetek. Ezért a kataláz gén mutációinak megismerése közelebb vezethet egyes patológias folyamatok megértéséhez, és azok esetleges kezeléséhez.

2. CÉLKITŰZÉS

A kataláz gén kódoló és szabályozó régiójának vizsgálata különböző betegségekben

- Egyszerűen kivitelezhető mutáció szűrő módszer alkalmazásával a 9. exonban azonosított rs769217 polimorfizmus hatásának vizsgálata mikrociter anemiás és β -thalassemias betegeknél.
- Az 9. exonban található rs769217 polimorfizmus és a promóter (nem kódoló) régióban található rs1001179 polimorfizmus hatásainak vizsgálata a vér kataláz aktivitásra, valamint lipid és szénhidrát biomarkerekre (triglicerid, koleszterin, HDL, LDL, ApoA-I, ApoB, glükóz, HbA_{1c}).
- Kialakítani egy olyan csoportot, amelynek tagjainál csökkent (<50%) a vér kataláz aktivitás, és feltehetően gyakoribbak a polimorfizmusok, mint a normokatalazémiás egyéneknél. Az így kiválasztott egyéneknél vizsgálni a 13 exonális és a 12 intronális régiót, további mutációk, polimorfizmusok, SNP-k detektálásának reményében. Az újonnan azonosított DNS eltérések, mutációk hatásának vizsgálata különböző megbetegedésekben.
- Céлом továbbá, jelen dolgozat kereteit túl egy kontroll csoport létrehozása, olyan mintákból amelyek vér kataláz aktivitása referens tartományban van. Ezen minták vizsgálata a kataláz gén összehasonlító elemzéseit tenné lehetővé.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Betegek, kontrollok, vizsgálati munták

A kísérletes munkám során felhasznált vizsgálati vérmintákat (EDTA-val alvadásgátolt teljes vér) az akkori Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum klinikáiról (Belgyógyászat, Gyermekgyógyászati, Fül-orr-gégészet) gyűjtöttük, amelyek a Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézetbe, ma Laboratóriumi Medicina Intézetbe küldtek laboratóriumi vizsgálati kérésekkel. A vizsgálatokban csak azon betegek adatai szerepelnek, akiknek a vér hemoglobin koncentrációi a referens tartományban voltak (nők: 115-150 g/l, férfiak: 130-165g/l).

Kontroll mintaként szolgáltak azok a vérminták, amelyek a fenti intézetbe munka alkalmassági, egészségügyi alkalmassági vizsgálatra érkeztek és a DE-Klinikai Központ (korábban Orvos és Egészségtudományi Centrum) klinikáin dolgozóktól származtak. A teljes vér kataláz aktivitását mértük, és ha az alábbi kritériumoknak megfeleltek, akkor a fehérvérsejtekből DNS-t izoláltunk.

A kontroll csoportba azon egyéneket soroltuk, akiknek a vér kataláz aktivitás (80,3-146,3 MU/l) és a hemoglobin koncentráció is a referens tartományon belül volt. (nők: 115-150 g/l, férfiak: 130-165g/l). A referencia tartományok a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Laboratóriumi Medicina Intézetben alkalmazott referencia tartományoknak felelnek meg.

A konkrét kísérleteknél részletesen bemutatom a mintákra vonatkozó speciális paramétereket, kritériumokat. A minták számból és betűből álló kódot kaptak, így biztosítottuk az anonimitást.

A vizsgálataink végzéséhez etikai engedéllyel rendelkezünk, amely az OTKA K71902 mint megbízónál a 2734-2008 (DEOEC RKEB/IKEB) számú.

A különböző vizsgálatoknál a betegek és a kontrollok adatainak részletezése a következő részekben található.

3.1.1. Kataláz gén exon 9 (rs769217) és 5'UTR (rs1001179) polimorfizmus vizsgálat és új akatalazémia mutáció vizsgálat, beteg és kontroll minták

Kataláz gén exon 9 rs769217(C111T) polimorfizmus vizsgálatánál, 98 beteg (microciter anemias és β -thalassemias) és 50 kontroll mintát vizsgáltunk.

A kataláz rs769217 és rs1001179(-262C>) polimorfizmusainak vizsgálatánál a beteg és kontroll minták a következők voltak.

A vérmintákat a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Klinika Diabetes szakrendelésén 2007 és 2010 között megjelent betegektől kaptuk.

Az 1-es típusú diabetes mellitusban szenvedő 115 beteg kezelése inzulinnal történt. Ebben a csoportban 69 férfi (21-78 év közötti), és 46 nő (21-70 év közötti) volt. A 225 nem inzulin függő (2. típusú) diabeteszes beteg, kezelése orális antidiabetikummal (n=31), sulphonil-urea-val (n=31), inzulinnal (n=154) történt, míg 9 betegnél szénhidrát csökkent diétát alkalmaztak. Ebben a csoportban 133 férfi (37-86 év között) és 92 nő (37-86 év között) volt.

Az 1-es és 2-es típusú diabetes mellitusos csoportban a terápia ellenőrzésére szérumban glükóz és hemoglobin A1c mérések történtek.

A kontroll csoportba olyan egyéneket válogattunk be, akik a Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum alkalmazottai voltak és alkalmassági vizsgálaton vettek részt 2006 és 2010 között. A kontrollok hemoglobin, szénhidrát és lipid paraméterei referens tartományban voltak. A 295 kontroll között 155 nő (18-60 év között) és 140 férfi (18-62 év között) volt.

3.2.1. Csökkent kataláz aktivitású minták mutáció analízise

a. Az új akatalazémia mutációk vizsgálatához nagyszámú beteg (n=617) és kontroll (n=295) szűrése a vér kataláz aktivitásának mérésével történt.

A betegek, a Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum szakrendelésein jelentek meg, a betegségeik a következők voltak: 1. típusú

diabetes mellitus (n=115), 2. típusú diabetes mellitus (n=205), gestációs diabetes mellitus (n=60), mikrociter anémia (n=58), β -thalassemia (n=43), időskori halláskárosodás (n=136).

b. A mikrociter anémiás betegeknél (átlag \pm SD) az MCV=71 \pm 10 fl, a vérhemoglobinn =124 \pm 14 g/l, és a Mentzer index=17,3 \pm 3,3.

β -thalassemiasoknál az MCV=70 \pm 9 fl, hemoglobinn=103 \pm 9 g/l, Mentzer index=11,6 \pm 1,8, HbF=2,8 \pm 1,3%, HbA2=5,6 \pm 0,8%. A β -thalassemias betegeknél a diagnózis megállapítása komplex vizsgálat eredménye volt, a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetben alkalmazott protokoll szerint. A kivizsgálás részei a teljes vérkép, reticulocytá analízis, Mentzer index számítás, „vas panel” vizsgálata, hemoglobinn F% és A2% meghatározása, valamint DNS izolálása és a globinn gén szekvencia analízise.

c. 295 kontroll egyént is bevontunk a vizsgálatba.

d. A referencia tartományok a következők: MCV=89 \pm 9 fl, vérhemoglobinn =134 \pm 20 g/l.

A kontroll egyének vér kataláz aktivitásaiból számított referencia tartomány: 104 \pm 15 MU/l.

e. A csökkent kataláz aktivitású betegek (n=51) között két esetben a IVS-II-1G, egy esetben a CD6-A(HbS) és egy esetben a CD39C>T mutációt azonosították.

f. Családfa elemzés egy, új akatalazémiás család esetében történt. A Diabetológia szakrendelésen a betegek megfelelő tájékoztatás után írásbeli hozzájárulásukat adták.

g. A vizsgálatba bevont (n=295) mintákból 51 betegnél (17,3%) mértünk a referens átlag (104 MU/l) 50 %-ánál alacsonyabb (<52 MU/l) vérkataláz aktivitást.

3.2 Biokémiai paraméterek meghatározása

3.2.1. Kataláz enzim aktivitás mérés

A dolgozatomban szerepeltetett vér kataláz aktivitások meghatározáshoz az irodalomban széleskörűen használt módszert alkalmaztam [26].

A spektrofotometriás kataláz aktivitás mérési módszer az enzim által elbontott hidrogén-peroxid szubsztrát koncentráció csökkenését méri.

A hidrogén-peroxid szubsztrát bontását 60 másodperc után ammónium-molibdenáttal leállítottuk. Az ammónium-molibdenát az enzimátikus szubsztrát bontás után maradt hidrogén-peroxiddal komplexet képez és így állítja le az enzimátikus reakciót. A kialakult komplex (hidrogén-peroxid és ammónium-molibdenát) sárga színű, amelynek 405 nm-nél mérhető abszorbanciája a hidrogén-peroxid koncentrációval arányos.

A vérben lévő kataláz aktivitás méréshez EDTA alvadás gátlóval nyert vérmintákat hígítottuk foszfát pufferrel (60 mmol/l, pH: 7,4), 20 µl vért belemostuk 4000 µl pufferbe. Ezt követően a vörösvértesteket 100 µl saponin oldattal (20 g/l) hemolizáltattuk (minimum 5 percig).

Minta: a hemolizátumból 30 µl-t mértünk ki és inkubáltattuk 37°C-on 1000 µl szubsztráttal (65 µmol/l hidrogén-peroxid foszfát-pufferben /60 mmol/l, pH: 7,4/) pontosan 60 sec-ig. Az enzimátikus reakciót 1000 µl ammónium-molibdenát (32,4 mmol/l) adásával leállítottuk. Az utóbbi reagens színeképzőként is szolgál. A keletkezett sárga szín intenzitását 405 nm-en mértük.

A vérkataláz aktivitás az alábbi képlettel számolható:

$$426 \times [A (\text{vak}_1) - A (\text{minta})] / [A (\text{vak}_2) - (A \text{ vak}_3)]$$

vak₁: 1000 µl szubsztrát, 1000 µl ammónium-molibdenát, 30 µl hemolizátum

vak₂: 1000 µl szubsztrát, 1000 µl ammónium-molibdenát, 30 µl puffer

vak₃: 1000 µl puffer, 1000 µl ammónium-molibdenát, 30 µl puffer

A számítási faktor: $65 \times 200 \times 30 / 1000 \times 4000 / 4100$, ahol 65 µmol/l a szubsztrát hidrogén-peroxid koncentrációja, 200-szoros a vérminta hígítása, a méréshez 30 µl-t használtunk, és a 100 µl saponin hozzáadásával tovább hígult [26].

A vérben lévő nagy kataláz koncentráció miatt az aktivitást M (10⁶) U/l (vér) egységben adjuk meg.

A mérési eredmények azt mutatták, hogy a nők vérkataláz aktivitása szignifikánsan alacsonyabb a férfiakénál, így a kutatócsoportunk által meghatározott referens tartományok: nők: 107,7±14,4 MU/l, n=880, férfiak: 117,9±16,9 MU/l, n=876 [27].

3.2.2. Lipid paraméterek és a glükóz meghatározása

Lipid anyagcsere paramétereinek (triglicerid, összkoleszterin, HDL koleszterin, LDL koleszterin, ApoAI, ApoB) és glükóz koncentrációjának meghatározása szérumból történt, Roche Integra tesztekkel, Roche Integra 700, Modular P800 műszerekkel (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). A referencia tartományok a következők : triglicerid <1,7 mmol/l, összkoleszterin <5,2 mmol/L, HDL koleszterin férfiaknál >1,0 mmol/l, nőknél > 1,3 mmol/l, LDL koleszterin < 3,4 mmol/l, ApoAI > 1,15 g/l, ApoB < 1,0 g/l, glükóz 3,6-6,0 mmol/l. A meghatározásokat Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézet Kémia részlegén végezték.

A hemoglobin A1c meghatározás HPLC módszerrel, Variant II (Haemoglobin Testing System, BioRad, Hercules, CA, USA) készülékekkel történt, a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézet Elválasztástechnika részlegén. A HbA1c referens tartománya: 4,1-6,5 %, vagy 20-42 mmol/mol.

3.2.3. A hematológiai paraméterek meghatározása

EDTA-val alvadásgátolt vérből a vér hemoglobin, a vörösvértestek sejt átlagos térfogat (MCV) meghatározása Sysmex XE 2011D hematológiai automatával (Sysmex, Japán) történt a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében.

A hemoglobin A2, hemoglobin F meghatározás HPLC módszerrel, Variant II (Haemoglobin Testing System, BioRad, Hercules, CA, USA) készülékkel történt, a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézet Elválasztástechnika részlegén.

A vizsgálathoz a következő referens tartományokat alkalmaztuk: Hgb :134±20 g/l, MCV: 89±9 fl, HbF: >1,0%, HbA2: 3,7-6,5 %.

3.3 Molekuláris biológiai vizsgálatok

3.3.1. DNS izolálás

A genomiális DNS-t EDTA-val alvadásgátolt vérből nyert leukocitákban gazdag vér frakcióból (buffy coat) QIAmp Kittel (DNA Blood Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Germany) izoláltuk. A DNS minták koncentrációja 50-70 ng/ul között, a tisztaság 1,7-1,9 közötti volt.

A betegek és kontrollok a vizsgélat előtt 3 hónapig sem vérkészítményeket sem transzplantációt nem kaptak. Ez alapján feltételezhetjük, hogy nincs mozaik képződés vagyis a vörösvértest katalázt és fehérvérsejt katalázt ugyanazon gén kódolta.

3.3.2. PCR

A PCR reakcióhoz Wen és Kishimoto által javasolt primereket alkalmaztuk, a 2. 3. 7. 9.exonk és a promóter régió vizsgálatához használt primer szekvenciák az alábbi táblázatban láthatók [63,64].

A primerek a Sigma-Aldrich termékei voltak (St. Louis, MO, USA).

Az izolált DNS koncentrációja 50-70 ng/ul, tisztasága 1,7-1,9 között.

1. Táblázat. Kataláz gén amplifikáláshoz alkalmazott primerek szekvenciái

Exon2	forward	5'TGCAAAGCTATGACCCGTG3'	reverse	5'ACACAGCACTTACCTGCTCC3'
Exon3	forward	5'GTCTGAGTAATGGTCTCATG3'	reverse	5'CCCCAAAAGGTGAAGTTGAG3'
Exon7	forward	5'GTAGACTGACCAGGGCATCA3'	reverse	5'ACACTCTGAAGTGGTACCCT3'
Exon9	forward	5'TGTTACTGCCCTAGTCAG3'	reverse	5'ATCTGCTCCACGTGCCCTCT3'
- 262C>T	forward	5'TAAGAGCTGAGAAAGCATAGCT 3'	reverse	5'AGAGCCTCGCCCCGCCGACCG 3'

400 ng genomiális DNS és 10 µmol/l primer elegyből (primer végső koncentrációja 0,71 µmol/l), 7 µl-t denaturáltunk 95°C-on 5 percig. Ezt követően 0,4 mmol/l dNTP mixet, MgCl₂-ot tartalmazó ReadyMix REDTaq-ot (20 mmol/l Tris-HCl pH: 8,3, 100 mmol/l KCl, 3 mmol/l MgCl₂, 0,002% gelatin, 60 U TaqDNA) mértünk össze, 14 µl végső térfogatot alkalmazva.

A PCR végső koncentrációk : 0,71 umol/l (10 µmol-os forward és reverse primerek 1:1 keverékéből 1ul-t adtunk 14 ul végső térfogatú elegyhez).

A PCR reagensek Sigma-Aldrich termékei voltak (St. Louis, MO, USA).

Az amplifikáció 30 cikluson keresztül történt 94°C, 30 másodperc, 55°C, 30 másodperc, és 72°C, 60 másodperc, az elongáció 72°C-on 5 percig tartott.

A Perkin Elmer-Cetus készülékével (Norwalk, CT, USA), és a VWR 19732-1210-el (VWR International, Belgium) történt az amplifikáció.

3.3.3. Elektroforézis

A keletkezett PCR terméket 6 %-os poliakril-amid gélben vizsgáltuk. A DNS szakaszokat molekulatömeg markerhez hasonlítottuk.

100x110x1,5 mm üveglapok között 6 %-os poliakrilamid gélben történt a szeparálás. A gél elkészítéséhez alkalmazott vegyszerek: akrilamid, bis-akrilamid, ammónium-perszulfát (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A szeparálás paraméterei: 90 V, szobahőmérséklet, mintegy 90 perc.

A DNS szakaszok vizualizálására ezüstözési technikát alkalmaztuk.

A sávok mennyiségi elemzése Gel Doc 1000 rendszerrel történt (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

A kísérletes munkánk során leggyakrabban az ezüstözési technikát alkalmaztuk a DNS sávok láthatóvá tételére. Az eljárás lényege, hogy a szétválasztott DNS szakaszokat tartalmazó gélt 20% triklór-ecetsavat és 10% metanolt tartalmazó oldatban fixáltuk. Többszöri mosási lépések után, salétromsavval savanyított kálium dikromát oldattal oxidációs reakciót végeztünk a gélen. A feleslegben alkalmazott kromát eltávolítása után 0,1%-os ezüst-nitrát oldattal kezeltük a gélt. A pozitív töltésű ezüst molekulák a DNS foszfát csoportjához kötődtek, amelyek formamidot tartalmazó nátrium-karbonát oldattal láthatóvá váltak. A képeken sárgás háttérben sötét (fekete) sávokban láthatók a DNS sávok. Az ezüst impregnációs eljárás az egy és a kétszálú DNS szakaszokat egyaránt képes megjeleníteni.

Az egyszálú és duplaszálú termékek elkülönítéséhez a detektálási eljárásokhoz a következő festékeket használtuk: etidium-bromid, SYBR Green I és SYBR Green II (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

3.3.4. SSCP analízis

Az eljárás során denaturáló közegben a dsDNS-t egyszálúsítjuk, majd a létrejött ssDNS-t jégben való gyors hűtéssel konzerváljuk.

5 µl PCR termékhez 5 µl denaturáló oldatot adtunk (99 %-os formamid és 20 mM/l EDTA), majd 4 µl festéket (0,05% brómfenol-kék, 0,05% xilén-cianol, 20 % glicerolban). A PCR és a denaturáló oldat keverékét 96°C-on 6 percig inkubáltuk, majd jégen hűtöttük. Ezt követően elektroforézissel szétválasztottuk az egyszálú DNS szakaszokat.

3.3.5. PCR-RFLP analízis BsTXI enzimmel

Restrikciós fragmenthossz eljárást (RFLP) alkalmaztunk BsTXI restrikciós enzimmel (Amersham Pharmacia Biotech UK, Buckinghamshire, England) mutáció szűrésre. Az enzim a CCANNNNN*NT**GG szekvenciát ismeri fel és

hasítja a 238 bp hosszúságú PCR terméket 153bp és egy 85bp nagyságú szakaszokra. A vad típus C** jelenlétében a hasítás nem jön létre, 238bp hosszúságú DNS szakasz detektálható. A restriktós hasítást követően kialakult DNS fragmenteket 6%-os poliakrilamid gélben szétválasztottuk és ezüst festéssel tettük láthatóvá.

3.3.6. DNS szekvencia analízis

A szekvencia analízis tisztított PCR termékből készült, (QIAquick PCR purification Kit QIAGEN, Hilden, Germany) Taq Dye-Deoxy Termination Cycle Kit alkalmazásával, 50 µl végső térfogattal (BigDye Term v.1.1 Cycle Sequencia, Applied Biosystems, Foster City, CA USA). A DNS szekvenáló kapillár elektroforézist alkalmaz a fargmentek elválasztására (3100-Avant, Genetic Analyzer, ABIPRISM, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A vizsgálatot a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézet Molekuláris Genetika részlegén végezték el.

3.3.7. Heteroduplex analízis

A heterozigóta állapot vizsgálatára alkalmas mutáció szűrő módszer a heteroduplex analízis. Az amplifikált DNS szakaszokat SURVEYOR Mutation Detection Kit-el (Transgenomic Ltd., Elancourt, France) vizsgáltuk.

Magas hőmérsékleten (96°C) a kettős szálú DNS szétválk. A keletkező ssDNS lassú, fokozatos hűtés hatására ismét duplaszálúvá képes alakulni. Ha mutáció, nukleotid eltérés van jelen, az újonnan keletkező dsDNS-ek között biztosan létrejönnek nem illeszkedő (vad-mutáns) DNS párok. A nem illeszkedő szakaszok restriktós (nukleáz) enzimmel hasíthatók.

A hőkezelést követően nukleáz enzimet adva a PCR termékekhez, az enzim a heterozigóta genotípusú dsDNS-t képes hasítani. A hasítás következtében két

rövidebb dsDNS szakasz jön létre, és az így kialakult fragmentek poliakrilamid gélelektroforézissel azonosíthatók. A kettőben lévő enhancer feladata a kettős szál védelme.

A vizsgálat kivitelezése a következő volt. A PCR terméket 95°C-on inkubáltuk 2 percig, majd 2 °C/sec sebességgel 85 °C-ra hűtöttük. Második lépésben tovább hűtöttük a reakció elegyet 0,1°C/sec sebességgel 25 °C-ra.

A keletkezett termék 4 °C-on tárolható.

20 µl hőkezelt PCR termékhez 1µl surveyor nukleáz enzim keveréket (1µl surveyor nukleáz enhancer +1µl surveyor nukleáz) adtunk és 20 percig 42 °C-on inkubáltuk, majd 2 µl enzim blokkolóval leállítottuk az emésztést. Ebben a fázisban a minta -20°C-on tárolható volt.

A kezelést követően a PCR terméket elektroforézissel, 6 %-os poliakrilamid gélben választottuk szét, a sávokat ezüst festéssel tettük láthatóvá. 10 µl „natív” PCR terméket és 10 µl csupán hő kezelt terméket kontrollként, vittünk fel a 10 µl hő és enzim kezelt minta mellé.

3.4. Statisztikai analízis

A mérési eredmények kiértékeléséhez Student's féle t -próbát alkalmaztunk. A genotípus frekvencia meghatározását 3 x 2 kontingencia táblázat, az allél frekvenciák és az odds ratio (ráta) (OR) meghatározásához 2 x 2 kontingencia táblázatot használtunk.

A Hardy-Weinberg (H-W) eloszlást χ^2 próbával ellenőriztük, ha ez $<5,991$, akkor egyensúly van.

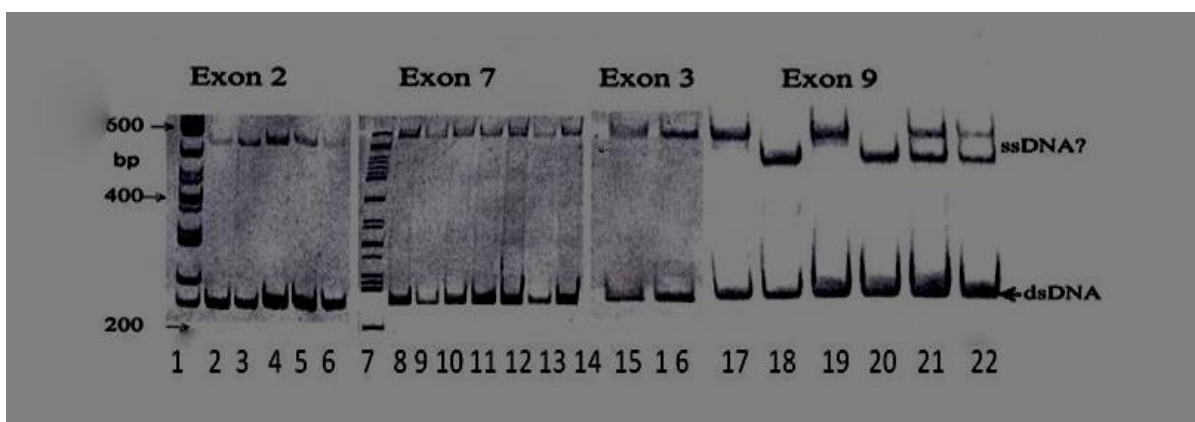
A szignifikancia meghatározásához a két mintás t próbát használtuk.

A p értékét 0,05 alatt tekintettük szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Kataláz gén polimorfizmus vizsgálata Magyarországi mikrocyter anémia és beta-thalassemia betegségben

Polimorfizmus analízis kezdeti lépéseként a kataláz gén 2. 3. 7. és 9. exon PCR termékeit vizsgáltuk poliakrilamid gélelektroforézissel, és a 2. ábrán látható mintázatokat kaptuk. A DNS szakaszokat ezüstkészítéssel tettük láthatóvá, az exon 2: 268 bp, exon 3: 222 bp, exon 7: 328 bp, exon 9: 238 bp méretű.



2. ábra Gél elektroforetikus mintázat az exon 2, 7, 3, és 9 PCR termékeiből. bp: bázispár, ss: egyszálú DNS, ds: dupla szálú DNS, az 1. és a 7. helyeken molekulatömeg marker, az egyéb helyeken a betegek mintáiból készült PCR termékek elektroforetikus képe látható

A 2., 3., és 7. exonok elektroforetikus mintázata a szokásos, azaz a 200 és 400 bázispárnak megfelelő régióban láthatók a kétszálú PCR termékek, míg a 400-600 bp régióban a kisebb intenzitással az egyszálú DNS sávok fedezhetők fel (2. ábra). A 9. exon vizsgálatakor a szokásostól eltérő képet kaptunk. A duplaszálú DNS (238 bp hosszúságú) sávok kisebb intenzitásúak és a 400-600 bp régióban (17-22 sáv) erősen festődők. Gél értékelő rendszer segítségével meghatároztuk az egyes sávok százalékos arányát 74 különböző minta esetében, és a következő eredményt kaptuk. A kétszálú DNS termék az amplifikált szakaszoknak megfelelő mérettartományban $63 \pm 15\%$ -nak, míg a 400-600 bp-nál megjelenő szakaszok

37±13%-nak adódtak.

Feltételeztük azt, hogy a kérdéses sávok egyszálú DNS-ek lehetnek, és ennek igazolására a következő vizsgálatokat végeztük.

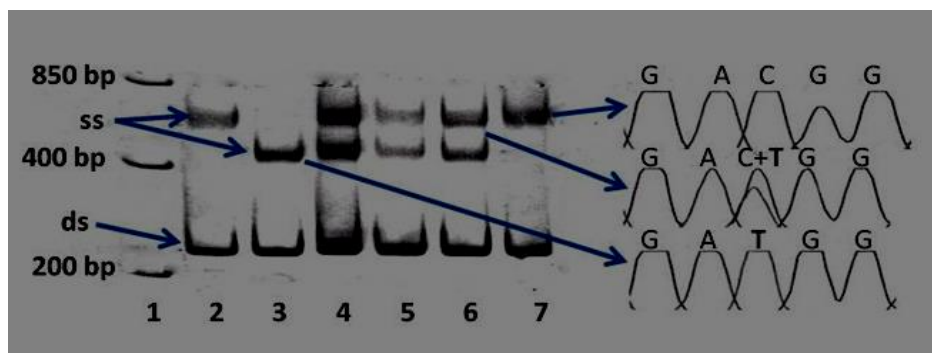
a. Különböző érzékenységű festési eljárások alkalmazása

Az ezüst impregnáció mellett, amely a kettős és az egyszálú DNS-t is detektálja, egyszálú DNS festékekkel (SYBR Green II) és kétszálú DNS festékekkel (SYBR Green I) is elvégeztük a kimutatást. A kettős szálú DNS kimutatására specifikus festékekkel a 200-400 bp közötti sávok jelentek meg. Az egyszálú DNS-t detektáló SYBR Green II a 400-800 bp régióban detektált DNS termékeket.

b. A különböző mintázatú minták DNS szekvencia analízise

A 2. és a 3. ábrán 3 különböző mintázat figyelhető meg a kérdéses régióban. A 3. ábrán ezek a következők: a 2-es és 7-es mintáknál egy sáv a nagyobb (~600) bp régióban, a 3-as mintánál egy sáv a kisebb (~600) bp-nál és 4-6-os mintáknál az előbbi két sáv együttesen látható.

A szekvencia a 3-as mintánál az exon +22348 pozíciójában C nukleotidot (vad típus), a 2-es és a 7-es mintáknál T nukleotidot (homozigóta mutáns) és a 4-6-os mintáknál C és T nukleotidokat (heterozigóta) mutatott (3. ábra).

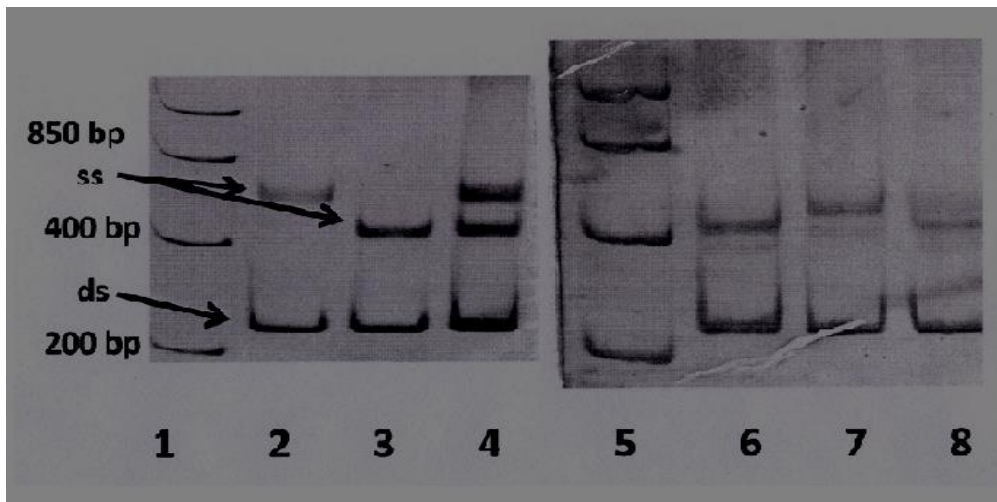


3. ábra. A kataláz gén 9. exon PCR termékei gél elektroforetikus képe (balra) és nukleotid szekvenciák (jobbra). Az 1. helyen molekulatömeg marker, a 2-7 sávokban a 9. exonális szakasz különböző mintázatot mutató mintái láthatók, jobb oldalon elektroferogram részleteken a +22348C/T polimorfizmus jelenik meg.

Az elektroforetikus mintázatot és a DNS szekvencia analízist további 74 minta esetében hasonlítottuk össze. A minták DNS szekvencia analízise megegyezett az elektroforetikus mintázattal.

c. A hagyományos SSCP eljárással történő összehasonlítás

A hagyományos SSCP analízis során denaturáló közeget alkalmaztunk (formamid /nátrium-hidroxid 94°C 6 percig) a dupla szálú DNS egyszálúsításához.



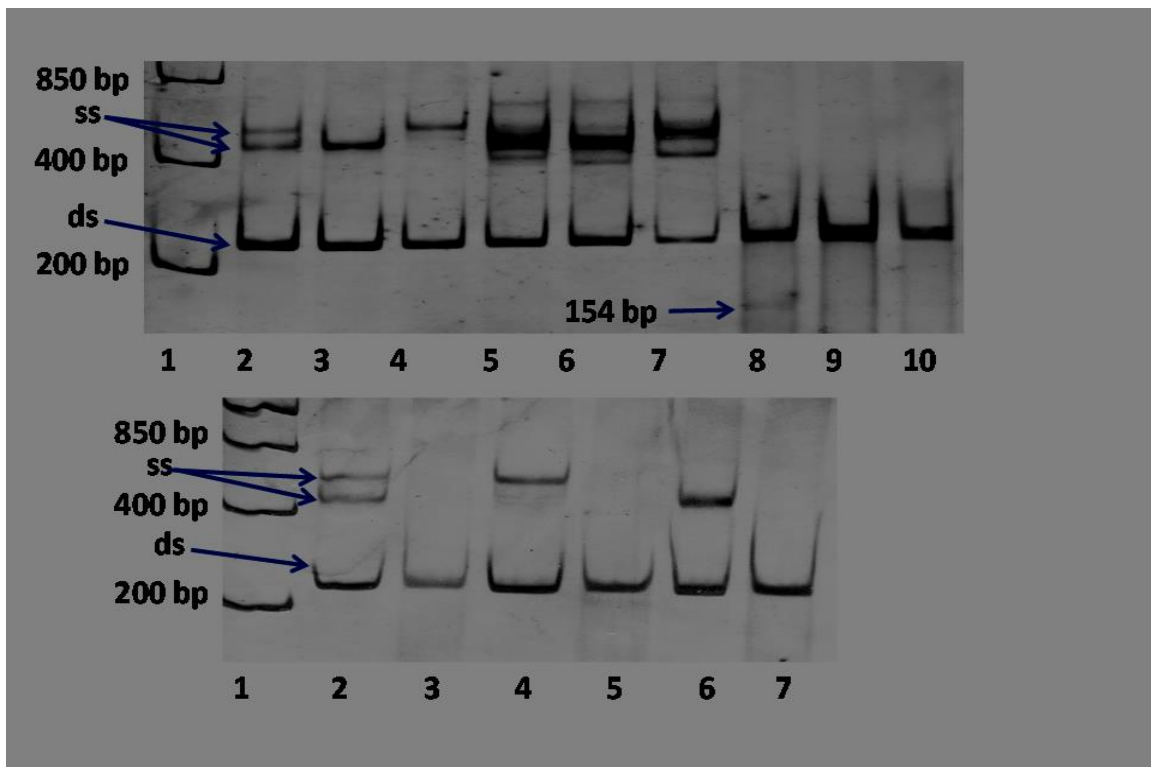
4. ábra. Denaturáció mentes (balra) és denaturált PCR termékek (jobbra) elektroforetikus képe, az 1. és 5. helyen a molekulatömeg markerek láthatóak.

A 4. ábra bal oldalán denaturáció nélküli (2-4 sávok), míg a jobb oldalán a hagyományos denaturáció alkalmazásával (6-8 sávok) készült PCR termékek elektroforetikus mintázatai láthatók. A három minta DNS szekvencia analízise a következő 2. és 6. CC (vad), 3. és 7. TT (homozigóta mutáns), 4. és 8. CT (heterozigóta). A denaturáció mentes és a denaturált minták mintázata azonos fő sávokat mutat. A denaturáció mentes mintázat nem tartalmaz további konformereket, mint azok a hagyományosan denaturált minták esetében láthatók.

d. Nukleázos emésztése alkalmazása (SURVEYOR Mutation Detection Kit) heteroduplex és egyszálú DNS vizsgálatára

További vizsgálatként egy hőkezeléssel kombinált nukleázos emésztést alkalmaztunk, amely eljárás alkalmas a heterozigóta DNS szakaszok azonosítására.

Az alkalmazott nukleáz enzim (SURVEYOR Mutation Detection Kit) felismeri a nem illeszkedő pontokat és hasítja a dupla szálát, valamint az egyszálú DNS-t. Az így képződött hasítási termékek a gél elektroforetikus képen azonosíthatók. A kísérletet mindhárom genotípus esetén elvégeztük (5. ábra).



5. ábra. A kataláz gén 9. exon PCR termékek mintázatai hő és nukleáz kezelés előtt és után. A felső gélen 1. helyen a molekulatömeg marker, a DNS-ek (CT, TT, CC) a kezelés előtt (2-4 sáv), ezek hőkezelés után (5-7 sáv) és hőkezelt mintáknukleázos emésztése után (8-10 sáv). Az alsó gélen 1. helyen molekulatömeg marker, a 2., 4., 6. helyeken a különböző genotípusú PCR termékek, a 3., 5., 7. helyeken a vizsgálati minták emésztést követően láthatók.

A három genotípusú minta (5. ábra, 2-4) a hőkezelés után (fent 5-7) az egyszálú DNS régióban számos sávot mutat, amelyek a nukleázos kezelés határa

eliminálódtak (8-10), de az enzim csak a heterozigóta mutánst vágta (8), mivel csak ennél látható a kisebb (154 bp) molekulatömegű vágási termék.

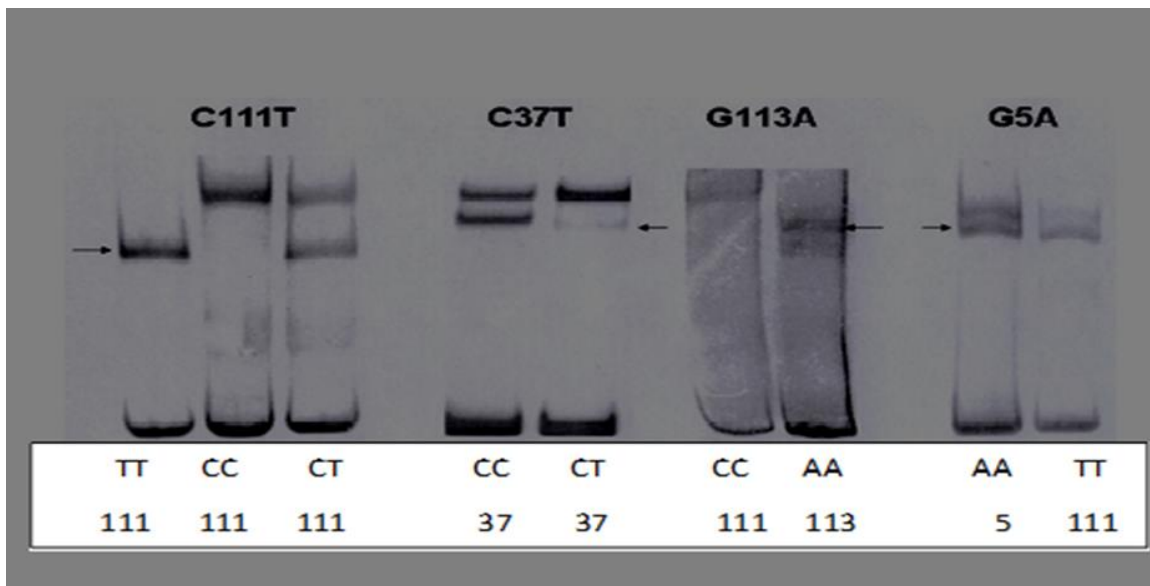
e. PCR-RFLP analízis alkalmazása

A vad típusú mintákban C** nem hasít BstXI enzim. A keletkező DNS fragmentek 6%-os poliakrilamid gél segítségével szétválaszthatók. A vizualizálást ezüst impregnációval végeztük.

72 minta PCR-RFLP vizsgálatát végeztük el. CC genotípust 33, CT genotípust 31, TT genotípust 8 esetben azonosítottunk, amely eredmények 100%-ban egyeztek a szekvencia analízis eredményeivel.

f. A C111T (egyszerű) polimorfizmus kimutatási módszer vizsgálata a kataláz gén 9. exon további polimorfizmusaiban

A módszer alkalmazásának lehetőségét megvizsgáltuk a 9. exonban megtalálható további ismert kataláz polimorfizmusok (C37T, G113A, G5) esetén is (6. ábra).



6. ábra. A kataláz gén 9. exonális szakaszában a 4 ismert polimorfizmus (C111T, C37T, G113A, G5A) elektroforetikus képe.

A nyilak C111T polimorfizmus mutáns T sávjának helyét mutatják

A 6. ábra baloldalán a C111T polimorfizmus három (mutáns: TT, vad: CC, és heterozigóta: CT) genotípus mintázata látható, mint viszonyítási alap.

A C37T mutáció esetén a vad (CC) típusnál két sáv, a heterozigótánál csak egy sáv (CT) látható.

A G113A polimorfizmusnál a mutáns (AA) genotípusnál két sáv látható, a fő sáv a C111T mutáns sávjával hasonló pozícióban.

A G5A mutációnál a homozigóta mutáns AA-nál két sáv, és vad (GG) hasonlóan két sáv, de eltérő intenzitással figyelhető meg.

A C37T, G113A és G5A mutációknál az elektroferogramon a sávok száma, azok intenzitása, helyzete nem teszi alkalmassá a módszert a genotípus meghatározásra.

A C37T, G113A és a G5A polimorfizmusok esetén a módszer nem nyújt segítséget a genotípusok azonosításához.

Összefoglalva az a-f kísérletek eredményeit elmondható, hogy a denaturáció nélküli egyszálú DNS mintázat jól alkalmazható a kataláz gén 9. exon C111T (rs769217, +22348) polimorfizmus vizsgálatára.

4.2 A kataláz gén rs769217 (C111T) polimorfizmusának vizsgálata magyarországi mikrociter anemiás, β -thalasemiás betegeknél és kontroll egyéneknél

A 4.1 fejezetben bemutatott módszert alkalmaztuk a kataláz gén 9. exonja C111T polimorfizmusának vizsgálatára, a vizsgálatban 55 mikrociter anemiás, 43 β -thalasemiás beteg és 50 kontroll egyén genotípusait vizsgáltam és ezeket az európai adatokhoz hasonlítottam.

Az 2. táblázatban a betegek és kontrollok életkora (átlag és tartomány) hematológiai paramétereik és vér kataláz aktivitásuk (átlag \pm SD) láthatók.

2. Táblázat. A kontroll és a beteg csoportok vizsgálati paramétereit

	n (db)	Kor (év)	MCV (fl)	Hemoglobin (g/l)	Nő/Férfi	Vér kataláz (MU/l)	Hemoglobin A2 (%)
Mikrociter anemia	55	40 (20-57,5)	71,9±9,7	104,9±1,09	24/31	87±29*	2,6±1,0
β- thalassemia	43	43,5 (18-45)	70,6±8,7	102,9±8,9	18/25	85±23*	5,56±0,84
Kontroll	50	40 (18-62)	89±9	134±20	23/27	102±20	2,5±1,1

* p<0,05 a magyarországi kontrollokhoz viszonyítva

A 3. táblázat a genotípus megoszlást, a vér kataláz aktivitást, a 4. táblázat az allél gyakoriságot és a 4. táblázat az európaiakkal történő összehasonlítást mutatja. [53,54,55,56,65]

3. Táblázat. Genotípusok a 9. exon 111C>T polimorfizmus vizsgálatokor mikrociter anemia, β-thalassemia betegségben és a magyar kontroll csoportban

Vizsgált csoport	n	Genotípusok		
		CC (%)	CT (%)	TT (%)
Mikrociter anemia	55	26 (47)	22 (40)	7 (17)
Kataláz (MU/l)		89±25 ^a	82±27 ^a	64±31 ^{a,b}
β-thalassemia	43	23 (52)	15 (36)	5 (12)
Kataláz (MU/l)		92±19 ^d	78±28 ^d	75±3 ^{c,d}
Magyar kontroll	50	24 (48)	23 (46)	3 (6)
Kataláz (MU/l)		104±19	101±20	102±18

a: Magyarországi mikrociter anemiás és a magyarországi kontroll csoport összehasonlításakor p<0,025

b: Mikrociter anemiás CC genotípusú hasonlítva ugyanezen csoport TT genotípusú mintáival p=0,005,

c: β-thalassemiás CC genotípusú minták összehasonlítva a TT genotípusúakkal p=0,044,

d: β-thalassemiás csoport összehasonlítva a magyarországi kontroll csoporttal p<0,01.

A magyarországi kontroll csoporthoz hasonlítva szignifikánsan csökkent vér

kataláz aktivitást találtunk a mikrociter anemiás és β -thalasemiás TT és CT genotípusú csoportok között ($p < 0,05$, $p < 0,05$).

Az összehasonlító elemzéseink az mutatták, hogy mindkét betegcsoport TT homozigóta mutáns genotípusú mintáiban szignifikánsan csökkent a vér kataláz aktivitás a CC vad genotípusú mintákhoz képest.

4. táblázat. Allél gyakoriságok a 9. exon 111C>T polimorfizmus vizsgálatokor mikrociter anémia, β -thalassemia betegségben és kontroll csoportban

Vizsgált csoport	n	Allél gyakoriságok					
		C (%)	T (%)	OR	CI _{95%}	p	H-W
Mikrociter anémia	55	74 (67)	36 (33)	1,193	0,67-2,14	0,559	0,461
β -thalassemia	43	61 (65)	35 (35)	1,407	0,77-2,56	0,559	1,021
Mikrociter/ β -thalassemia				1,171	0,66-2,09	0,571	
Magyar kontroll	50	71 (71)	29 (29)				0,685

Megvizsgáltuk az allélok előfordulását a mikrociter anemiás és β -thalasemiás betegcsoportban és összehasonlító elemzést végeztünk a magyarországi kontroll csoportban előforduló allél gyakoriságokkal. Nem találtunk szignifikáns különbséget ($p > 0,05$).

A 5. táblázatban együttesen szerepelnek a mikrociter anemiás, β -thalasemiás betegcsoport, a magyarországi és az európai kontroll csoport genotípus és allél megoszlásai.

5. Táblázat. A 9. exon 111C>T polimorfizmusnak az európai adatokkal történő összehasonlítása mikrociter anémia, β -thalassemia betegségben és a kontroll csoportban

Vizsgált csoportok	n	Genotípusok				Allél gyakoriságok				
		CC (%)	CT (%)	TT (%)	p	C (%)	T (%)	OR	CI _{95%}	p
Mikrociter anémia	55	26 (47)	22 (40)	7 (13)	0,0059 ^e	74 (67)	36 (33)	1,081	0,69-1,69	0,718
β -thalassemia	43	23 (52)	15 (36)	5 (12)	0,049 ^e	61 (65)	35 (35)	1,171	0,66-2,09	0,434
Magyar kontroll	50	24 (48)	23 (46)	3 (6)	0,83	71 (71)	29 (29)	1,41	0,70-2,85	0,324
Európai kontroll	226	146 (65)	72 (32)	8 (3)		312 (80)	140 (20)			

e: β -thalasemiás és mikrociter anemiás csoportok genotípus gyakorisága összehasonlítva az európai kontroll csoport adataival.

A magyarországi kontroll csoportban (n=50), az európaival közel azonos a C vad allél aránya $p=0,324$. Mikrociter anemiában (67%), és beta-thalassemiában (65%) a vad allél gyakorisága közel azonos, nem mutat szignifikáns eltérést az európai kontroll csoporthoz képest $p>0,265$.

Megfigyelhető a kataláz aktivitás jelentős csökkenése a TT homozigóta mutáns genotípusú mikrociter anemiás és beta-thalassemiás mintákban. Az allél és a genotípus gyakoriságokazonban nem mutatnak eltérést.

4.3. A vér kataláz rs769217 és rs1001179 polimorfizmusainak hatása szénhidrát és lipid biomarkerekre diabetes mellitusban

Forsberg és munkatársai 2001-ben publikálták vizsgálataikat, amelyben az 5' nem kódoló régióra fókuszáltak, ezen belül is a -262. pozícióra (rs1001179) [62]. Ezt egy lehetséges transzkripció helynek vélték, amely hatással lehet az enzim aktivitásra. 54 fős populáción végezték vizsgálataikat.

Kutatásaink során mi nagyobb számú beteg (n=340) és kontroll (n=295) esetén vizsgáltuk a C111T polimorfizmust, és egy kisebb vizsgálati csoportban (n=162 kontroll, n=155 1-es és 2-es típusú diabetes mellitus) a -262C>T (rs1001179) polimorfizmust.

Lehetőségünk adódott, hogy egy nagyszámú populációban (kontroll és diabetes mellitus 1-es és 2-es típusban) részletesen elemezhessük a vérkataláz aktivitások, az rs769217, rs1001179 polimorfizmusok, valamint a szénhidrát metabolizmus néhány markerének (glükóz, HgbA1c), és a lipid (triglicerid, koleszterin, HDL, LDL, Apo-A1, ApoB) metabolizmus néhány markerének kapcsolatát.

6. Táblázat. Vér kataláz aktivitások, 111C>T (rs769217, exon 9) genotípus és allél gyakoriságok az 1-es és 2-es típusú diabetes mellitus és kontroll csoportokban

Vizsgált csoportok	Genotípusok							
	CC		CT		TT		összes	
	Vérkataláz (MU/l)	n (%)	Vérkataláz (MU/l)	n (%)	Vérkataláz (MU/l)	n (%)	Vérkataláz (MU/l)	n:
1. típus	104±26	55 (48)	97±23	46 (40)	101±25	14 (12) ^{a,b}	101±24	115
2. típus	91±24 ^{a,b}	120 (53)	90±24 ^a	85 (38)	95±11	20 (9)	91±22 ^{a,b}	225
Kontroll	108±25	157 (53)	104±24	114 (38)	102±23	24 (9)	104±15	295
	Allélok							
	C (n/%)	T (n/%)	összes	H-W	OR	95%CI	p	
1. típus	156 (68)	74 (32)	230	0,801	1,25	0,90-1,75	0,18 ^a	
2. típus	325 (72)	125 (28)	450	0,769	1,02	0,77-1,34	0,92 ^a	
Kontroll	428 (72)	162 (28)	590	0,064				
1. /2. típus					1,23	0,87-1,74	0,23 ^b	

a: kontrollokhoz történő viszonyítás,

b: 1-es típusú diabetes mellitus csoporthoz történő viszonyítás

A vér kataláz aktivitások csökkentek ($p < 0,001$) 2-es típusú diabetes mellitusban (91 ± 22 MU/l), az 1-es típusban (101 ± 24 MU/l) a kontroll csoporthoz képest (104 ± 15 MU/l).

A genotípusokat vizsgálva a 2-es típusú diabeteses betegeknél a CC (91 ± 24 MU/l) és a CT (90 ± 24 MU/l) genotípusúaknál a kontroll CC (108 ± 25 MU/l), CT (104 ± 24 MU/l) csoportokhoz képest enzim aktivitás csökkenés látható ($p < 0,04$). Hasonlóan az 1-es típusú CC (104 ± 26 MU/l, $p < 0,002$) genotípusához hasonlóan is csökkenés mutatkozott a 2-es típusú csoportban.

A TT genotípus előfordulása az 1-es típusú diabetesben magasabb (12%), mint a 2-es típusban (9%, $p < 0,02$), valamint a kontroll csoportban (9%, $p < 0,02$).

Az allélok arányát vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a C allél gyakoribb, mint a T allél mindhárom vizsgálati csoportban. Az előfordulási gyakoriságok eltérése azonban nem szignifikáns ($p > 0,18$) különbség.

7. Táblázat. A C111T (rs769217) polimorfizmus genotípusai, vér kataláz aktivitások, szénhidrát és lipid paraméterek 1-es típusú, 2-es típusú diabetes mellitusos betegeknél és kontrolloknál

		1. típusú diabetes mellitus (93)			
		CC (55)	CT (46)	TT (14)	Referens tartomány
Vér kataláz	(MU/l)	104±26	97±23	101±25	81-146
Kor	(év)	45±13	39±14 ^{*a}	36±10	
Glükóz	(mmol/l)	10,1±4,6	10,1±5,7	8,8±2,9	3,6-6,0
HbA1c	(%)	8,2±1,6	8,2±1,8	8,9±0,8	4,0-6,1
Triglicerid medián		1,0	1,0	1,7	<1,7
Tartomány	(mmol/l)	0,4-6,1	0,4-8,5	0,6-2,3	
Koleszterin	(mmol/l)	5,0±1,1	4,7±0,8	4,2±1,1	<5,2
HDL	(mmol/l)	1,64±0,57	1,48±0,50	1,40±0,59	>1,1
LDL	(mmol/l)	2,88±0,90	2,72±0,18	2,18±1,14	<3,4
ApoA-I	(g/l)	1,72±0,36	1,56±0,38	1,52±0,31	>1,15
ApoB	(g/l)	0,82±0,23	0,78±0,22	0,57±0,29	<1,0
		2. típusú diabetes mellitus (215)			
		CC (120)	CT (85)	TT (20)	Referens tartomány
Vér kataláz	(MU/l)	91±24 ^{*d,e}	90±24 ^{*d}	95±11	81-146
Kor	(év)	55±12	54,7±12	52±12	
Glükóz	(mmol/l)	10,2±4,5	10,1±4,4	12,3±5,6 ^{*c}	3,6-6,0
HbA1c	(%)	7,8±1,7	8,2±1,6	9,0±1,7 ^{*b}	4,0-6,1
Triglicerid medián		2,3	1,8	1,6	<1,7
Tartomány	(mmol/l)	0,7-25,3	0,8-18,2	0,9-5,4	
Koleszterin	(mmol/l)	5,0±1,2	5,2±1,5	5,2±1,5	<5,2
HDL	(mmol/l)	1,26±0,49	1,22±0,36	1,14±0,47	>1,1
LDL	(mmol/l)	2,99±1,18	2,84±1,01	3,17±1,09	<3,4
ApoA-I	(g/l)	1,46±0,25	1,52±0,27	1,51±0,34	>1,15
ApoB	(g/l)	0,95±0,26	0,92±0,24	1,16±0,50 ^{*b,c}	<1,0

a: CC és CT genotípusok összehasonlítása

b: CC és TT genotípusok összehasonlítása

c: CT és TT genotípusok összehasonlítása

d: jelöli azokat az eseteket, amikor a kontrollal

e: amikor az 1-es típusú diabeteses minták eredményeivel történt az összehasonlítás.

*p<0,05.

Az 1-es típusú diabetes csoportban az életkor és a genotípusok tekintetében szignifikáns eltérést találtunk (CC:45±13 év, CT:39±14 év, $p < 0,04$), míg a lipid és szénhidrát paraméterek esetén, összehasonlítva nem adódott szignifikáns eltérés ($p > 0,08$).

A 2-es típusú diabetes mellitusos csoport genotípus szerinti elemzésekor azt találtuk, hogy az átlagos glükóz koncentráció (TT: 12,3±5,6 mmol/l vs CT: 10,1±4,4 mmol/l, $p < 0,02$), a HbA1c (TT: 9,0±1,7 % vs CT: 8,2±1,6 %, $p < 0,03$) és az ApoB (TT:1,16±0,50 g/l, vs CT:0,94±0,24 g/l, $p < 0,04$) a TT genotípusúaknál szignifikánsan magasabb, a CT genotípusúakéhoz hasonlítva.

8. Táblázat. -262C>T (rs1001179) polimorfizmus genotípus, allél és vér kataláz az 1-es típusú, 2-es típusú diabetes mellitusos betegeknél és kontrolloknál

Vizsgált csoportok	Genotípusok							
	CC		CT		TT		összes	
	Vér kataláz (MU/l)	n (%)	Vér kataláz (MU/l)	n (%)	Vér kataláz (MU/l)	n (%)	Vér kataláz (MU/l)	n :
1. típus	96±26*	15 (30)	94±30*	21 (42)	97±18	14 (0,20)	95±25*	50
2. típus	98±30*	44 (41)	88±34*	39 (36)	84±23*	23 (23)	91±20*	105
Kontroll	109±25	58 (36)	102±16	76 (47)	103±17	28 (17)	105±17	162
Allélok								
	C	T	összes	H-W	OR	CI _{95%}	p	
1. típus	51 (51)	49 (49)	100	1,27	1,39	0,89-2,19	0,144	
2. típus	128 (60)	86 (40)	214	5,81	1,00	0,71-1,43	1,00	
Kontroll	192 (59)	132 (41)	324	1,13				
1./2. típus					1,4	0,71-2,26	0,233	

* $p < 0,05$ a kontrollokhoz viszonyítva

A vér kataláz aktivitások vizsgálata a következő eredményeket (a-e) szolgáltatta.

a. A vér kataláz aktivitás 2-es típusú (91 ± 20 MU/l, $p < 0,001$) és 1-es típusú diabetesben (95 ± 25 MU/l, $p < 0,001$) alacsonyabb, mint a kontroll csoportban (105 ± 17 MU/l).

b. Az 1-es típus CC genotípusú csoportban (96 ± 26 MU/l, $p < 0,04$) és a CT genotípusú csoportban (94 ± 30 MU/l, $p < 0,03$) alacsonyabb a vér kataláz aktivitás, mint a kontroll csoportban (CC 109 ± 25 MU/l, CT 102 ± 16 MU/l).

c. Az 1-es és a 2-es típusú csoportok összehasonlító vizsgálatakor nem találtunk szignifikáns eltérést ($p < 0,2$).

d. A három különböző genotípus összehasonlításakor a kataláz aktivitásban (CC 96 ± 26 MU/l, CT 94 ± 30 MU/l, TT 97 ± 18 MU/l) nem találtunk szignifikáns ($p > 0,6$) különbséget 1-es típusú diabetes csoportban.

e. A kataláz aktivitásban a 2. típusú diabetes mellitus különböző genotípusainak (CC: 98 ± 30 MU/l, CT: 88 ± 34 MU/l, TT: 84 ± 23 MU/l) összehasonlításakor szignifikáns különbséget találtunk ($p < 0,05$) a kontroll csoporthoz képest (CC: 109 ± 25 MU/l, CT: 102 ± 16 MU/l, TT: 103 ± 17 MU/l).

Az allélok és genotípusok vizsgálatakor sem a genotípusok ($p > 0,1$), sem az allélok frekvenciájában ($p > 0,1$) nem találtunk különbséget az 1-es és 2-es típusú diabetes és a kontroll csoportban.

9. Táblázat. A -262C>T (rs1001179) polimorfizmus genotípusainak összehasonlító elemzése 1-es típusú, 2-es típusú diabetes mellitusos betegek és a kontrollok, vér kataláz aktivitásai, szénhidrát és lipid paramétereik esetén

		1. típus (50)			Referens tartomány
		CC (15)	CT (21)	TT (14)	
Vér kataláz	(MU/l)	96±26* ^d	94±30* ^d	97±18	81-146
Kor	(év)	47±14	50±15	52±13	
Glükóz	(mmol/l)	10,3±4,4	11,7±5,4	9,6±3,8	3,6-6,0
HbA1c	(%)	8,4±2,3	8,0±1,7	8,7±2,4	4,0-6,1
Triglicerid medián		1,27	0,9	1,06	<1,7
Tartomány	(mmol/l)	0,37-2,21	0,6-8,5	0,54-1,29	
Koleszterin	(mmol/l)	4,62±1,55	4,91±1,03	5,1±0,65	<5,2
HDL	(mmol/l)	1,37±0,55	1,54±0,51	1,48±0,52	>1,1
LDL	(mmol/l)	2,91±1,23	2,80±0,93	2,91±0,86	<3,4
ApoA-I	(g/l)	1,44±0,53	1,59±0,38	1,50±0,50	>1,15
ApoB	(g/l)	0,74±0,23	0,81±0,28	0,92±0,11	<1,0
		2. típus (106)			Referens tartomány
		CC (44)	CT (39)	TT (23)	
Vér kataláz	(MU/l)	98±30* ^d	88±34* ^d	84±23* ^{bd}	81-146
Kor	(év)	62±10	58±14* ^a	54±9* ^b	
Glükóz	(mmol/l)	8,1±3,4	6,4±4,4	10,6±3,5* ^c	3,6-6,0
HbA1c	(%)	6,1±1,4	7,5±1,4	7,6±1,8* ^c	4,0-6,1
Triglicerid medián		2,2	1,7	2,2	<1,7
Tartomány	(mmol/l)	0,7-10,2	0,7-25,3	1,1-18,2	
Koleszterin	(mmol/l)	5,7±1,1	5,9±1,5* ^a	6,0±1,2* ^b	<5,2
HDL	(mmol/l)	1,68±0,63	1,30±0,62	1,37±0,22* ^b	>1,1
LDL	(mmol/l)	3,43±0,82	3,6±0,81	3,8±1,01	<3,4
ApoA-I	(g/l)	1,46±0,25	1,52±0,27	1,51±0,34	>1,15
ApoB	(g/l)	0,95±0,26	0,92±0,24	1,16±0,50* ^{b,c}	<1,0

a: CC vs CT

b: CC vs TT

c: CT vs TT A

d: viszonyítva a kontrollokhoz

e: viszonyítva az 1-es típusú diabetesesekhez

*p<0.05

A -262C>T polimorfizmust vizsgálva, az 1-es típusú diabetes mellitus és kontroll csoportban szignifikáns különbséget nem találtunk sem a szénhidrát ($p>0,34$) sem a lipid ($p>0,1$) paraméterek vizsgálatakor.

2-es típusú diabetes mellitusban szignifikáns különbség van az életkor esetében a TT és CC genotípusok között ($p=0,006$), és a glükóz a HbA1c koncentrációk összehasonlításakor ($p<0,05$), a koleszterin, HDL, ApoB koncentrációkban ($p<0,05$).

A genotípusok között szignifikáns különbség ($p>0,1$) nem található.

További eredményeink is hasonló eredményt mutattak. Nincs szignifikáns eltérés a betegség manifesztálódásában (CC: 43 ± 9 év, CT: $44\pm 8,6$ év, TT: 46 ± 9 év, $p>0,1$), a betegség időtartamában (CC: $8,6\pm 4,2$ év, CT: $9,1\pm 5,0$ év, TT: $9,8\pm 5,6$ év, $p>0,3$), a genotípusok frekvenciájában ($p=0,82$), és az allélok frekvenciájában ($p>0,8$).

Vizsgáltuk a 2-es típusú diabeteseseknél a genotípus és a terápia kapcsolatát, az eredmények a 10. táblázatban láthatók.

10. táblázat. A -262 C>T polimorfizmus (rs 100179) CC és TT genotípusainak és terápiáknak a kapcsolata

Terápia	Diéta	Inzulin érzékenyítő	Sulfonilurea	Inzulin	n
TT genotípus (n/%)	2 (9)	4 (18)	2 (9)	15 (64)	23
CC genotípus (n/%)	3 (7)	12 (27)	10 (23)	19 (43)	44
OR	1,54	1,78	6,18	2,46	
0,95CI	0,67-3,50	0,78-4,04	2,39-15,9	0,87-7,01	
p	0,30	0,16	<0,001	0,09	
TT genotípus (n/%)	2 (9)	4 (18)	2 (9)	15 (64)	23
2. típusú diabetes (n/%)	9 (4)	31 (14)	31 (14)	154 (68)	225
OR	0,261	1,32	3,36	1,191	
0,95CI	0,84-6,06	0,56-3,09	1,61-7,03	0,48-2,94	
p	0,09	0,53	<0,001	0,71	

A különböző terápiaiban részesülő 2-es típusú diabeteses betegeknek a mutáns TT genotípus a legkisebb gyakoriságú, ha a CC genotípushoz hasonlítunk ($p<0,001$,

OR:6.18) és ha az összes 2-es típusú beteghez történik aviszonyítás ($p < 0.001$, OR:3,36).

4.4. Új akatalazémia mutációk magyarországi diabetes mellitus és mikrociter anémia betegségekben.

A polimorfizmus kutatás következő lépéseként a rendelkezésünkre álló korábban már részletesen vizsgált 617 beteg mintájából választottuk ki a csökkent kataláz aktivitásúakat. Kialakítottunk egy csoportot, amelyben a vérkataláz aktivitás a referencia átlag 50%-a alatti (< 52 MU/l). 51 minta (8,3%) felelt meg ennek a kritériumnak. A csoport nem és kor szerinti megoszlás a következő: 19 férfi (54 ± 20 év; 8-77 év), 32 nő (47 ± 18 év; 5-85 év). A betegség szerinti csoportok: 6 (11,8%) 1-es típusú, 14 (27,4%) 2-es típusú, 3 (5,9%) gesztációs diabeteses, 14 (27,4%) mikrociter anémiás, 4 (7,8%) β -thalassemias és 10 (19,7%) időskori halláskárosodásban szenvedő. Nagy gyakoriságú volt a mikrociter anémiás (24,1%) csoport. A kontroll csoportra jellemző volt, hogy a vér kataláz aktivitások magasabbak voltak, mint a 75MU/L (átlag-2SD: 104-30).

11. táblázat. Vér kataláz aktivitások, akatalazémia mutációk, OR, betegségek, ha a kataláz aktivitás kisebb, mint a referens átlag 50%-a

Betegségek	Vér kataláz (MU/l) átlag \pm SD (n)	Vér kataláz (<50%MU/l) átlag \pm SD,n(%)	<50%Vér kataláz (akatalazémia) aktivitású betegek		
			n (%)	OR (95%CI)	p
1. típusú diabetes mellitus	101 \pm 21 (115)	48 \pm 3,6 (5,2)	0 (0)		
2. típusú diabetes mellitus	90 \pm 24*(205)	42 \pm 9,9 (4,4)	3 (33,3)	144,8 (21,5-974,1)	<0,0001
Gesztációs diabetes	74 \pm 14*(60)	39 \pm 10,3 (5,0)	1 (33,3)	144,8 (10,2-2059,6)	0,0002
Mikrociter anémia	90 \pm 31*(58)	41 \pm 5,1 (24,1)	3 (21,4)	93,1 (14,4-601,4)	<0,0001
β -thalassemia	85 \pm 13*(43)	38 \pm 10,4 (9,3)	0 (0)		
Presbycusis	78 \pm 31*(136)	38 \pm 7,1 (7,3)	0 (0)		
Összes beteg	88 \pm 23*(617)	41 \pm 7,5 (8,3)	7 (13,7)	59,6 (12,1-294,4)	<0,0001
Kontroll	104 \pm 15 (295)	0 (0)	0 (0)		

* $p < 0,0$, a kontrollhoz viszonyítva

A 51 mintából PCR-SSCP és PCR heteroduplex analízist végeztünk mutáció szűrés céljából, és a kataláz gén mind a 13 exonjára kiterjesztettük a vizsgálatainkat.

A polimorfizmus azonosításra DNS szekvencia analízist végeztünk (n:51).

Nem találtunk nukleotid eltéréseket az 1-es típusú diabetes mellitus (n=6), a halláskárosodásos (n=10) és a β -thalassemias (n=4) betegcsoportokban.

39 esetben nem találtunk a nukleotid szekvenciában eltérést.

A szekvencia elemzéseket követően kilenc ismert polimorfizmust azonosítottunk, a promóter régióban található rs1049982 5 betegnél, a 9. exonban az rs769212 pedig négy betegnél volt kimutatható.

4 korábban még nem publikált kataláz polimorfizmusokat azonosítottunk. A négy új mutációt 7 csökkent kataláz aktivitású beteg mintájában találtuk. Három minta mikrociter anemiás, további három 2-es típusú diabetes mellitus, és egy minta gesztációs diabeteses betegről származott.

A hét betegnél az új mutációk heterozigóta formában voltak jelen.

Az általunk elsőként azonosított polimorfizmusok a 12. táblázatban láthatók.

12. táblázat. Új akatalazémia mutációk a kataláz gén 2. és 4. exonjában

Exon	Nukleotid csere	Aminosav csere	Betegség	Kor (év)	Nem	Magyarországi típus
2	c.106_107insC	p.Gly34Alaafs*5	mikrociter anémia	73	férfi	G1
2	c.106_107insC	p.Gly34Alaafs*5	mikrociter anémia	5	nő	G1
2	c.106_107insC	p.Gly34Alaafs*5	2. típusú diabetes	68	nő	G1
4	c.379C>T	p.Arg127Tyr	mikrociter anémia	35	nő	H1
4	c.379C>T	p.Arg127Tyr	gesztációs diabetes	35	nő	H1
4	c.390T>C	p.Arg129Leu	2. típusú diabetes	50	férfi	H2
4	c.431A>T	p.Asp143Val	2. típusú diabetes	27	férfi	H3

A 2. exonban jelenlévő C inserció (c.106_107incC) egy frameshift mutáció, amelynek eredményeként Gly35 pozíciótól egy STOP kodon jön létre a 70. aminosav pozícióban (p.G36Afs*5). Ezt a mutációt 2 mikrociter anemiás (egy nő, egy férfi), és egy 2-es típusú diabeteses férfi beteg mintájában azonosítottuk és a magyar G1 típus nevet kapta.

A 4. exonban talált 3 mutációt találtunk.

A c.379C>T missense mutáció következtében CGG tripletből TGG lesz (p.R127Y), amely aminosav cserét eredményez (p.Arg127Tyr). Ez a mutáció egy mikrociter anemiás és egy gesztációs diabetes mellitusos nőbetegnél volt azonosítható, és a Magyar H1 típusnak neveztük el.

A missense c.390T>C mutáció (nukleotid csere CGT-ből CGC) eredménye a p.Arg129Leu (p.R129L), amelyet egy 2-es típusú diabeteses férfi betegben azonosítottunk, és a Magyar H2 típusnak neveztük el.

A c.431A>T missense mutáció (GAT-ből GTT) eredménye a p.Asp143Val (p.N143V). Ezt a mutációt egy 2-es típusú diabetes mellitusos férfi beteg mintájában azonosítottam, és a Magyar H3 elnevezést kapta. A vizsgált személy családjában az apánál és két fiánál volt csökkent a vérkataláz aktivitás és ez a mutáció heterozigóta formában.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1 Kataláz gén exon 9 (rs769217) polimorfizmus vizsgálata egy egyszerű módszerrel, magyarországi mikrociter anémia és beta-thalassémia betegségben

5.1.1. Kataláz gén rs769217 polimorfizmus vizsgáló módszere [65]

A kataláz gén exonjainak vizsgálata során, az ezüstözési festési technika alkalmazásakor azt találtuk, hogy a várt duplaszálú termék mellett (200-400 bp) további sávok is megjelentek a gélen (400-850 bp). A kataláz exonok közül a szabályosan ismétlődő mintázat, új jelenségként a 9. exonnál volt a legmarkánsabb.

Az új mintázat értékelésénél (n=74) a releváns sávok (kettős szálú DNS) aránya $63\pm 15\%$, míg a nagyobb molekula tömegnél megjelenő sávok $37\pm 13\%$ -ot képviseltek. Ezen sávok azonosítása céljából a következő vizsgálatokat végeztük.

a. A különböző festési eljárások közül az egyszálú DNS-t detektáló ezüstözés, és Sybr Green II alkalmazásával, a kérdéses sávok detektálhatók. Ezzel szemben csak a kétszálú DNS-t festő Sybr Green I-el és etidium-bromiddal a kérdéses sávok nem voltak detektálhatók.

b. A három különböző sebességgel (dupla szálú és a két kérdéses) vándorló sávok DNS nukleotid szekvencia analízisekor a kérdéses sávok mintázata az rs769217 polimorfizmus három genotípusát mutatta. C111T polimorfizmus esetén (Asp389Asp), a lassabban vándorló DNS a CC vad, a gyorsabban vándorló a TT mutáns, mindkettő megjelenése pedig a heterozigóta genotípusra egyértelműen utaló kép. A nukleotid szekvencia analízis és az új eljárásunk azonos genotípust (CC:28, CT:15, TT:17) mutatott (n=60).

c. A hagyományos SSCP-vel történő összehasonlítás azonos mintázatot, de hatékonyabb felodást mutatott.

d. Az egyszálú DNS-t emésztő nukleázos kezelés után a C111T polimorfizmusra utaló sávok már nem voltak detektálhatók.

e. PCR-RFLP vizsgálatot végeztünk BstXI emésztő enzimmal. Az elektroforetikus mintázatok eredményei és az PCR-RFLP eredményei azonosak voltak 72 minta vizsgálatakor.

A vizsgálataink alapján feltételeztük, hogy a PCR reakcióban képződött termékek mintegy harmadánál a spontán, többszörös belső hurok (internal loop) képződés miatt nem tud kialakulni a kétszálú DNS, és ezek az egyszálú DNS-ek lassabban vándorolnak, mint a kétszálúak. Vizsgálati eredményeink több oldalról is a kérdéses DNS-ek egyszálú voltára engednek következtetni, mint ezt a 4. és az 5. ábrán bemutattam.

A továbbiakban a 9. exon ismert mutációit (G113A, C37T, G5A) vizsgáltuk meg ezzel a módszerrel. Ezeknél a mutációknál a módszer nem volt olyan érzékeny, mint a C111T polimorfizmus esetén, de szűrési módszerként alkalmazható az eljárás az ismert mutációk esetén is.

Az egyszerű, gyors és nem költséges módszerünk alkalmas a C111T polimorfizmus különböző genotípusainak azonosítására, költséges nukleotid szekvencia analízis alkalmazása nélkül.

5.1.2 A kataláz gén rs769217 polimorfizmusának vizsgálata magyarországi mikrociter anemiás, β -thalasemiás betegeknél és kontroll egyéneknél

A C111T polimorfizmust a kataláz gén 9. exonjában elsőként Wen és munkatársai [63] azonosították, és a későbbiekben, több populációban és megbetegedésben vizsgálták [54,55,66,67,68].

Mi elsőként vizsgáltuk mikrociter anemiás és β -thalasemiás betegeknél és kontroll egyéneknél (n=50) Magyarországon, az új, egyszerű módszerünkkel, és az európai kontroll csoportokhoz történő összehasonlítással [70].

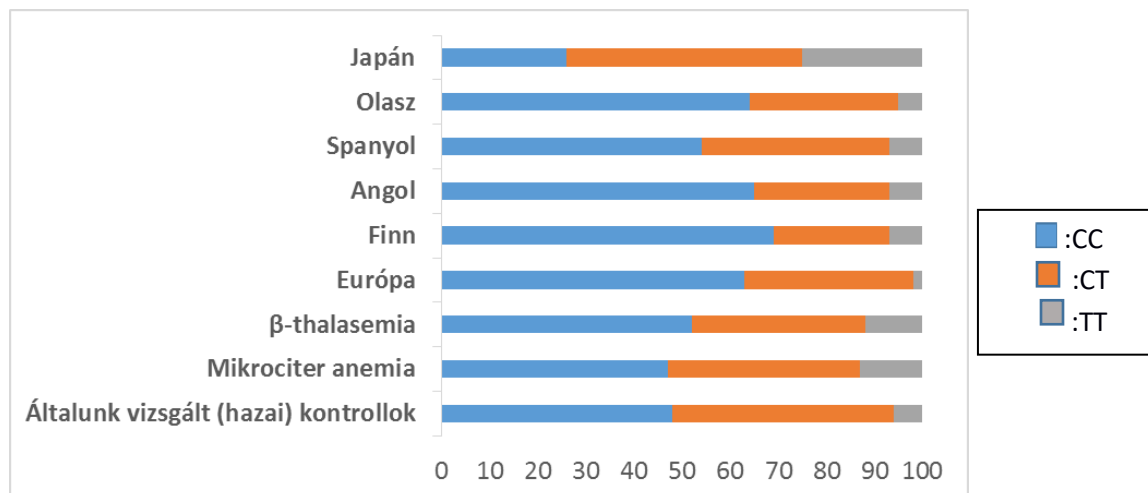
A C vad allél (71%) közel azonos arányban jelent meg a magyar kontroll csoportban, mint az európaiban (80%). Az NCBI adatbázisban megtalálható további populációk (kanadai, angol, koreai, indiai) szekvenálási adataival

összehasonlítva a C vad allél előfordulását, nem találtunk jelentős eltérést (58-87%, $p > 0,327$).

Nem találtunk szignifikáns eltérést a C allélok gyakoriságában mikrociter anemiában (67%, $p = 0,559$) és β -thalassemiaiban (65%, $p = 0,265$), ha az európai kontroll csoporthoz történt a hasonlítás.

Jelentős különbség adódik, ha az allél gyakoriságokat hasonlítjuk össze az európai, amerikai, afrikai, afro-amerikai populáció (C:70-80%, T:20-30%) és Japán valamint Kína különböző területeiről származó (C:46-52%, T:42-54%) szekvenálási adatokkal.

Az európai kontroll csoportban előforduló genotípus megoszlások szignifikáns eltérést mutattak a hazai mikrociter anemiás ($p = 0,0059$) és a β -thalassemias ($p = 0,049$) csoporthoz hasonlítva.



7. ábra Az NCBI adatbázisban kontrolloknál [71] megtalálható 9. exon C111T polimorfizmus genotípusai európai, Japán populációban, és Magyarországi beta-thalassemiás, mikrociter anemiás betegeknél és kontrolloknál

A táblázatban bemutatott országokban a genotípus megoszlásokat összehasonlítva az általunk vizsgált (hazai) kontrollokkal nincs szignifikáns különbség az angol, spanyol, olasz populációkban ($p > 0,05$), de különbség adódott a finn és japán

populáció genotípus eloszlásában ($p < 0,05$).

A vér kataláz aktivitás adatok elemzése során a következő szignifikáns eltéréseket találtuk a vizsgált beteg és kontroll csoportokban.

a. A mikrociter anemiás csoport vérkataláz aktivitása alacsonyabb, mint a magyarországi kontroll csoporté ($p < 0,025$), hasonlóan a β -thalassemias csoport és a kontroll csoport kataláz aktivitás adatainak összehasonlításakor ($p < 0,016$).

b. A mikrociter anemiás CC genotípusú betegek kataláz aktivitás eredményeit összehasonlítva a csoport TT genotípusú mintáival szignifikáns különbség adódott ($p = 0,005$), a TT genotípusú mintákban csökkent a kataláz aktivitás.

c. A beta-thalassemiás CC genotípusú mintákat összehasonlítva a TT genotípusúakkal, szignifikáns csökkenést detektáltunk ($p = 0,044$).

Az általunk vizsgált polimorfizmus és a kataláz enzim aktivitás csökkenés közötti kapcsolatot mi vizsgáltuk előként.

Számos további szerző [54,55,63,66,67,68] vizsgálta a polimorfizmust vitiligóban, csontritkulásban. Ezekben a tanulmányokban azonban nem található meg a kataláz enzim aktivitás eredmények.

Gavallas és munkatársai [55] angol vitiligós ($n = 166$) és kontroll ($n = 169$) egyéneket vizsgáltak. A genotípus elemzések eredményeként szignifikáns különbséget találtak a kontroll és betegcsoport között ($p = 0,030$). A betegcsoportban (39,8%) nagy arányban jelent meg a CT genotípus a kontroll (26,6%) csoporthoz képest. A T mutáns allél a betegcsoportban szignifikánsan magasabb arányban volt jelen, mint a kontrollokban ($p = 0,02$).

Casp és munkatársai [66] dél-kelet amerikai és kanadai vitiligós betegeket ($n = 235$) és kontroll egyéneket ($n = 177$) mintáit vizsgálták. Azt tapasztalták, hogy a genotípusok és allél megoszlások nem térnek el szignifikánsan a kontroll és a betegcsoportban ($p = 0,54$). A betegek mintáiban, nagyobb arányban ($p = 0,0024$), fordult elő a heterozigóta genotípus (37,9%), mint a kontroll csoportban (26%).

Park és munkatársai [67] koreai populációt vizsgáltak vitiligó betegségben ($n = 118$), és kontroll egyéneknél ($n = 200$). Sem a genotípusok, sem az allélok

megoszlásának vizsgálata nem mutatott szignifikáns eltérést.

Egy másik tanulmányban, szintén koreai postmenopausa állapotában lévő női betegek vizsgálatát végezték [68]. A kataláz génben jelenlévő SNP-ket (n=18) elemezték. A 9. exon általunk is vizsgált (+22348C> T, rs769217) pozíciójával kapcsolatban megállapították, hogy a TT homozigóta mutáns genotípus megjelenése, a lumbális gerinc és femurnyak BMD (bone mineral density) – értékei és a szérum oszteokalcin között összefüggés van. Haplotípus elemzés eredménye azt mutatta, hogy ez a polimorfizmus magasabb BMD és alacsonyabb oszteokalcin koncentrációkkal párosul.

Kutatócsoportunk közreműködésével Vitai és munkatársai [69] magyar populációt elemeztek, ahol az rs769217 polimorfizmus hatását vizsgálták a csont denzitására és az inzulinérzékenységre. A magyarországi populáció vizsgálatának eredménye eltért a koreai nők vizsgálati eredményeitől. Az inzulinérzékenység tekintetében, TT homozigóta mutáns genotípusú nők esetében jobb teljesest-glükózfelhasználás volt mérhető ($13,23 \pm 1,6$ mg/kg/min, $p < 0,05$), mint CC homozigóta vad típusúaknál ($9,43 \pm 4,46$ mg/kg/min).

A 9. exonban a C111T, (rs769217,+22348) polimorfizmus esetén elsőként mutattuk be, magyarországi mikrociter anemiás és β -thalassemias betegeknel, hogy a TT genotípus esetén a vér kataláz aktivitás alacsonyabb, mint a CC genotípusúakban. A C nukleotid T-re történő változása (GAC-GAT) nem okoz aminosav cserét (Asp389Asp). A mutáns allél jelenléte azonban lassíthatja a transzkripciót, ami a vér kataláz aktivitás csökkenését eredményezheti. Irodalmi adatok szerint [72,73] egyes csendes mutációk is hatást gyakorolhatnak a splicingra vagy a mRNS stabilitására.

5.2 A vér kataláz rs769217 és rs1001179 polimorfizmusainak hatása szénhidrát és lipid biomarkerekre diabetes mellitusban

5.2.1. rs769217 (9. exon C111T/+22348C>T) polimorfizmus

A magyarországi diabetes mellitusos, és kontroll csoportban a C vad allél előfordulása (68%-72%) nagyobb arányú, mint a T mutáns allélé (28%-32%).

Más populációkban az alábbi szerzők a C allél gyakoriságát magasabbnak találták. Gavallas és munkatársai angliai populációt vizsgáltak (n=169), ahol a kontroll csoportban a C allél 83,1% a T allél 16,9 %-ban volt jelen [55]. Caps és munkatársai amerikai kontroll csoportban (n=177) a C allélt 82 %-ban, a T allét 18 %-ban azonosították [66]. Park és kutatócsoportja koreai kontroll csoportban a C allélt 95 %-nak, a T allélt 46 %-nak találta [67].

Az 1-es típusú diabetes mellitusos csoportban nagyobb arányban azonosítottuk a TT homozigóta mutáns genotípust (12%), mint a 2-es típusnál (9%, $p<0,02$), valamint a kontroll csoportban (9%, $p<0,02$). Ennek ellenére a kataláz enzim aktivitások nem mutattak szignifikáns csökkenést.

A különböző genotípusú egyének vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a mutáns CT és TT jelenlétével az életkor szignifikáns csökken (CC: 45 ± 13 év, CT: 39 ± 14 év, TT: 36 ± 10 év, $p<0,04$).

A genotípusokat és a lipid, illetve szénhidrát paramétereket összehasonlítva nem találtunk jelentős különbséget az 1-es típusú diabetesben ($p>0,08$).

A 2-es típusú diabetes mellitusban szignifikáns csökkenést értékeltünk ($p<0,001$) a kataláz aktivitások elemzésekor a CC és CT genotípusú mintákban, a kontroll és az 1-es típusú diabetes mellitushoz viszonyítva.

Hasonló eredményre jutott kutatócsoportunk egy korábbi tanulmányban, ahol a kataláz enzim aktivitások alakulását vizsgáltuk a diabetes mellitus különböző típusaiban. A kontroll csoporthoz képest ($104\pm 18,5$ MU/l) szignifikánsan alacsonyabb aktivitást mértek 2-es típusú diabetes mellitusban ($71,2\pm 14,6$ MU/l, $p<0,001$) és gesztációs diabetesben ($68\pm 12,2$ MU/l, $p<0,001$). Az 1-es típusú

diabetes mellitusban kisebb mértékű volt a kataláz aktivitás csökkenés ($102,5 \pm 26,9$ MU/l, $p > 0,063$) [74].

A 2-es típusú diabetes mellitusban a TT mutáns (rs769217) genotípusú mintákban emelkedettnek találtuk az átlagos glükóz koncentrációt ($p < 0,02$) a CT genotípushoz képest, a hemoglobin A1c-t ($p < 0,03$) a CC genotípushoz, valamint az ApoB koncentrációt CC és a CT genotípusokhoz képest ($p < 0,05$) [84].

5.2.2 rs1001179 (5'UTR régió -262C/T) polimorfizmus

Az irodalomban csak néhány olyan közlemény van, amely foglalkozik az rs1001179 polimorfizmus és a vér kataláz aktivitás kapcsolatával [62].

Az általunk végzett részletes elemzés eredménye alapján vér kataláz aktivitás csökkenést találtunk 2-es típusú (91 ± 20 MU/l, $p < 0,001$) és 1-es típusú diabetes mellitusban (95 ± 20 MU/l, $p < 0,048$) a kontroll csoporthoz képest (105 ± 17 MU/l). Ezek az eredmények egyezést mutatnak a korábban vizsgált magyar populáció eredményeivel [29,30,74], az indiai vizsgálatok eredményeivel [75], de eltérnek egy cseh tanulmányban foglaltaktól [76].

A kataláz gén mutációja révén az enzim inaktívvá válhat, amely a reaktív oxigén molekulák, és a hidrogén peroxid koncentráció növekedéséhez vezethet.

A fenti eredményeink összhangban vannak Hurt és munkatársainak [41] eredményeivel, amelyben hangsúlyozzák az egyes gének, és a ROS szerepét diabetesben. Minni és munkatársai [77] pedig a hidrogén peroxid koncentráció emelkedéséről is számoltak be acut hyperglükémiában.

Az 1-es típusú diabetes mellitusban a genotípus szerinti elemzés során a vér kataláz aktivitások CC (96 ± 26 MU/l) és CT (94 ± 30 MU/l) csoportokban a kontrollhoz képest (CC: 109 ± 25 MU/l, CT: 102 ± 16 MU/l, $p < 0,05$) szignifikáns eltérést mutattak.

A 2-es típusnál mindhárom genotípus vizsgálata során (CC: 98 ± 30 MU/l, CT: 88 ± 34 MU/l, TT: 84 ± 23 MU/l) szignifikáns csökkenést ($p < 0,05$) találtunk, a kontroll csoporthoz képest (105 ± 17 MU/l). Az enzim aktivitás csökkenés a

legnagyobb mértékű az eltérés a TT genotípusú csoportban volt ($p < 0,03$), a kontroll csoporthoz képes

A T allél hatását az enzim aktivitásra egy svéd kutatócsoport vizsgálta [62]. A CC és TT genotípusú kataláz promóter szakaszokat alkalmazták és különböző sejtvonalakon tesztelték a transzkripciós faktor aktivitását. Vizsgálataik során azt tapasztalták, hogy a T allél jelenléte fokozott transzkripciót eredményez.

Eltérő eredményekről más kutatók is beszámoltak más populációk, betegségek esetén.

Amerikai kutató csoport emlő tumoros nőbetegek vizsgálatakor (CT: $n=9$), CC: $n=7$, TT: $n=2$) a CC genotípusúaknál szignifikánsan ($p=0,028$) magasabb vér kataláz aktivitást mért [78]. Egy bostoni kutatócsoport [79] hospitalizált nephrológiai betegeknél végzett vizsgálatokat, amelyek kiterjedtek többek között a kataláz gén -262C/T polimorfizmus vizsgálatára is. 200 beteg vizsgálata során 112 esetben CC, 74 esetben CT, 14 esetben TT genotípust azonosítottak. CC genotípusú mintákban magasabb kataláz aktivitást mértek, mint CT és TT genotípusban ($p < 0,01$) [79].

A mi vizsgálataink szerint a vér kataláz aktivitás és a -262C/T polimorfizmus vonatkozásában a T allél jelenlétében szignifikánsan alacsonyabb aktivitás detektálható. Ezen eredményünkhöz hasonlókról a fenti kutatók is beszámoltak [78,79].

Az általunk vizsgált csoportban sem a genotípusok, sem az allélok frekvenciája tekintetében nem találtunk szignifikáns eltérést ($p > 0,1$) az 1-es és 2-es típusú diabetes mellitus és a kontroll csoport között. Hasonló eredményről számoltak be cseh [76] és brazil szerzők [80].

A szénhidrát markerek vizsgálata során a 2-es típusú diabetes mellitus csoportban (glükóz: CC és TT, $p < 0,02$, HbA1c: CC és TT, $p < 0,05$) szignifikáns különbséget detektáltunk. A lipid paraméterek (koleszterin: CC és TT, $p < 0,01$, HDL: CC és TT, $p < 0,05$, ApoB: CC és TT, $p < 0,05$) koncentrációi, vizsgálataink szerint függenek a -262C>T polimorfizmus genotípusaitól.

Korábban dél-nyugat magyarországi diabetes mellitus populációt vizsgáltak (koleszterin, HDL) ahol az általunk tapasztaltaktól eltérő eredményt kaptak [81]. Görög populációban is vizsgáltak dyslipidémias és ($p>0,03$) normolipidémias csoportokat ($p>0,05$) és kontroll csoporttal történt a koleszterin, LDL, HDL összehasonlítás [82]. Szlovén kutatók 2-es típusú diabetes mellitusban végeztek elemzések elemzéseket glükóz/koleszterin vonatkozásában és egyik esetben sem találtak összefüggést a mért paraméterek és a polimorfizmus között ($p>0,2$) [83]. Mi elsőként végeztünk olyan átfogó elemzést, amelyben a kataláz gén két ismert polimorfizmusának hatását vizsgáltuk. Vizsgálatainkat 1-es típusú, 2-es típusú diabetes mellitusos betegek mintáiban és kontroll csoportban 10 diagnosztikai szempontból meghatározó paraméter figyelembevételével végeztük.

5.3 Új akatalazémia mutáció magyarországi diabetes mellitus és mikrocyter anemiás betegségben

617 beteg mintájának vizsgálata során 51 esetben regisztráltunk a referens átlagos kataláz enzim aktivitás 50%-a alatti aktivitásokat, 18 esetben (35%) diabetes mellitus, 14 esetben (27%) mikrociter anémia, 10 esetben (19,7 %) presbycusis, 4 esetben 7.8 % beta-thalassaemia megbetegedésben.

Az új mutációkat a diabeteses és mikrociter anemiás betegek vizsgálata során találtuk.

5.3.1. Diabetes mellitus csoport vizsgálata

Kutatócsoportunk több közleményben is beszámolt a kataláz enzim aktivitás csökkenéséről 1-es típusú, 2-es típusú, és gesztációs diabetesben [44,84,85,86]. A tanulmányunkban bemutatott 7 új mutációnak több mint a fele (57%, $n=4$) tartozik a diabetes csoportba. A 4 betegből három a 2-es típusú, és 1 a gesztációs diabetes csoportba tartozik. Feltételezhető, hogy a csökkent enzim aktivitás következtében megnő a hidrogén-peroxid koncentráció, amely károsítja az oxidációra érzékeny

hasnyálmirigy β -sejteket [87]. Erre utalnak azon korábbi közleményeink, amelyek a diabetes fokozott előfordulásáról számoltak be az akatalazémiás egyének között [44, 84,85]. Ezt támasztja alá az újabb akatalazémia mutációk előfordulása diabeteses egyéneknél. Ezek alapján mondható, hogy a veleszületett kataláz deficiencia rizikó faktorként lehet a 2-es típusú diabetes mellitus kialakulásában [44,85,86]. Silwinska-Kowalska és munkatársai egy újabb összefoglaló közleményükben más tényezők mellett, a kataláz enzim hiányát nevezik meg, mint a diabetes egyik lehetséges rizikófaktora [88].

5.3.2 A mikrociter anemiás csoport vizsgálata

Ebbe a csoportba 14 beteg tartozott, akiknél a csökkent kataláz aktivitás mellett csökkent MCV-t (71 ± 10 fl, referens 89 ± 9 fl, $p < 0,0001$), és nem szignifikáns értékű vér hemoglobin koncentráció csökkenést detektáltunk (129 ± 14 g/l, referens 134 ± 20 g/l, $p > 0,05$). A betegek DNS mintáiban 3, eddig még nem azonosított kataláz gén mutációt találtunk. Két beteg esetében a G1 típust (c.106_107insC, pG36Afs*5), egy esetben pedig misszensz mutációt a 4. exonális régióban (magyar H1 típus, c.3379C>T, p.R127Y).

A kutatócsoportunk korábban már beszámolt különböző anemiák vizsgálata során tapasztalt vér kataláz enzim aktivitás csökkenésről. Egy nagyszabású vizsgálatban 28 252 hospitalizált beteg vizsgálata történt meg, egy 3 éves program keretében. 2 884 különböző típusú anemiás beteg kataláz enzim aktivitását mérték, amelyek szignifikáns csökkenést mutattak ($83,7 \pm 16,4$ MU/l) a kontroll csoporthoz képest ($113,3$ MU/l) [28], de ezeket nem követte molekuláris biológiai elemzés.

A közreműködéssel végzett munkában egy jól ismert polimorfizmus a kataláz gén 9. exonjának vizsgálata történt meg mikrociter anemiás és β -thalassemiás magyarországi betegeknél. Ezen vizsgálatok részletes eredményeit az 5.2.1 fejezetben már korábban bemutattam [65].

A kataláz gén mutációk révén a csökkent kataláz aktivitás az oxidatív stress elleni védelem gyengítését jelentheti. A veleszületett kataláz hiányos betegek így

nagyobb érzékenységet tanúsíthatnak a megemelkedett hidrogén-peroxid koncentrációval szemben. Ezek a kataláz hiányos sejtek, különösen a vörösvértettek és így az oxidatív stressz folyamataira fokozottan érzékenyek.

Tanulmányunkban elsőként mutatunk rá a kataláz gén 2. exon, 4. exon mutációk lehetséges hatására mikrociter anemiában.

5.3.3 Az új akatalazémia mutációk

Tanulmányunkban négy új kataláz mutációt mutattunk be, amelyeket 7 betegnél azonosítottunk. Az új akatalazémia mutációk megváltoztathatják az enzim struktúráját, így csökkenthetik az aktivitást. Az akatalazémiák előfordulása gesztációs és 2-es típusú diabetes mellitusban valamint mikrociter anemiában szignifikánsan csökkent vérkataláz aktivitást eredményezett.

Ezzel a magyarországi akatalazémia mutációk száma 11-ről 15-re nőtt, és az újonnan felderített mutációk Magyarországi akatalazémia G1, H1, H2 és H3 típusa nevet kapták.

G1 típus. Az új G1 típus egy C inszerció a 2. exonban (c.106_107insC), aminek eredményeként a 35. aminosav változik (35Gly) és TGA stop kodon jön létre. Az így kialakult trunkált kataláz fehérje nem képes ellátni a feladatát

A további típusok és lehetséges hatásaik a kataláz fehérjére és az enzim működésére.

A kataláz fehérje struktúrájában a legfontosabb az a három csatorna, amelyből egy felelős a hidrogén-peroxid bejutásáért az aktív centrumhoz, majd két további, amely a szubsztrát bontás során keletkezett víz és az oxigén elvezetését biztosítja. A csatornák felépítésében résztvevő aminosavak között vannak, amelyek kulcs szerepet töltenek be a csatorna működése szempontjából. A kataláz mutációk befolyásolhatják a csatorna működését, elégtelen enzim aktivitást eredményezve.

A His90-Ala354 aminosavak alkotják a nyolc antiparalel béta szálát és az egy lapot, amely a hem zseb része. Az Arg 127 és Arg 129 a hem csatorna kulcs aminosavai. A hem propionsava só hidat képez a konzervált aminosav az Arg89

$\alpha 2$, Arg129 $\beta 2$, és az Arg386 $\alpha 9$ között. A His92 katalitikus konformációjának stabilitását az Arg129 biztosítja, amely egy hidrogén híd kötést kapcsol a szubsztráthoz és a Tyr132-höz. [89,90,91]

H1 típus. Az Arg127Tyr szubsztitúció (Magyar H1 típus) csökkentheti a kataláz aktivitását azáltal, hogy megváltoztatja a csatorna alakját és csökkentheti a szubsztrát hozzáférését az aktív centrumhoz. Ezt a missense c.379C>T mutációt detektáltuk egy mikrociter anemiás nőbetegnél, és egy másik gesztációs diabeteses nőbetegnél

H2 típus. A c.390T>C missense mutáció révén a 129 arginin változik leucinná. A 129 Arg. szintén a csatorna alakját változtatva csökkenti az enzim aktivitást.

A H3 típus. A Ser198 és Arg144 aminosavak egyfajta kapu szerepet töltenek be a főcsatornában. Az Arg114 szomszédos aminosava az Asp143. Az Asp143-nak valinná való szubsztitúciója a „kapu” megváltozásához vezet, ami csökkentheti a kataláz aktivitását [89,90,91]. Ez a magyar H3 típus (c.431A>T), amelyet egy hipokatalazémiás, 2-es típusú diabetes mellitusos férfi betegnél azonosítottunk megvizsgálva a szülőket, valamint a két fiútestvért is.

A családfa kutatás során az apánál és a két fiánál azonosítható volt a mutáció. Anyai ágon nem volt azonosítható gén eltérés és náluk a kataláz enzim referens tartományú aktivitását mértük.

Csökkent kataláz aktivitásokat mértünk 51 beteg mintájában. Ezeknél 13,5%-ban mutattunk ki valamilyen mutációt, polimorfizmust, de a minták 86,5%-ban nem tudtunk exonális mutációt azonosítani. Feltételezésünk az, hogy előfordulhatnak polimorfizmusok az intronális régióban az 5'UTR és 3'UTR régióban, amelyek további molekuláris genetikai vizsgálatokat igényelnek. Ilyen vizsgálatok lehetnek az epigenetikai vizsgálatok (mRNS, metiláltság vizsgálat) valamint a regulációs mechanizmusok részletes vizsgálata, amelyek segítségével kideríthető lenne a csökkent aktivitást oka.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

6.1. Új eljárás a 9.exon C111T polimorfizmus vizsgálatára

A kataláz gén 9. exon PCR termékek poliakrilamid gélelektroforézis vizsgálata során extra sávo(k)at azonosítottunk a 400-800 bázispár közötti régióban. Vizsgálataink során alkalmazott PCR-SSCP denaturációval, és specifikus festési eljárással (SybrGreen II) igazoltuk, hogy a kérdéses sávok egyszálú DNS lehetnek. Ezek a 400-800 bp között megjelenő sávok alkalmazhatók a 9. exon polimorfizmusok vizsgálatára. A legnagyobb érzékenységet a C111T polimorfizmus (rs769217) vizsgálatokor tapasztaltuk.

Az általunk leírt módszer egyszerű, gyors, költséghatékony módon képes a genotípus meghatározására.

6.2. A C111T polimorfizmus vizsgálata mikrociter anemiában és β -thalassemiaiban, diabetes mellitusban

A C111T polimorfizmust detektáló módszerünkkel mikrociter anemiás és β -thalassemias betegeknel csökkent vér kataláz aktivitást találtunk a C111T polimorfizmus TT genotípusánál.

A C111T polimorfizmus TT genotípust nagy frekvenciával (12%) azonosítottuk 1-es típusú diabetes mellitusban, de szignifikáns változást nem tapasztaltunk a vér kataláz aktivitásokban, sem a glükóz, a hemoglobin A1c, a triglicerid, a koleszterin, a HDL, az LDL, az ApoA-I és az ApoB koncentrációkban.

Ettől eltérően a 2-es típusú diabetes mellitusban szignifikánsan csökkent vér kataláz aktivitást mértünk a CC és CT genotípusú mintáknál valamint emelkedett glükóz, hemoglobin A1c és ApoB koncentrációkat.

6.3. A -262C>T polimorfizmus vizsgálata

Vizsgáltuk az 5' régió -262C>T nukleotid polimorfizmusát (rs1001179) amely a transzkripció szabályozásban játszhat szerepet. Csökkent vér kataláz aktivitást

találtunk 1-es típusú diabetes mellitusban a CC és CT genotípusoknál, valamint 2-es típusú diabetes mellitusban a CC, CT, TT genotípusoknál.

A 2-es típusú diabetes mellitusban a -262C>T polimorfizmus esetén szignifikánsan csökken a vér kataláz aktivitás, életkor, HDL és emelkedik a a glükóz, hemoglobin A1c, koleszterin, ApoB koncentráció.

6.4. Új akatalazémia mutációk

Kialakítottunk egy 51 mintából álló beteg csoportot, amelyben a betegek vér kataláz aktivitása a referens átlag 50%-a alatti volt.

Négy új akatalazémia mutációt azonosítottunk, amelyekkel az eddigi 11 akatalazémiás eset 15-re emelkedett Magyarországon.

A 7 betegnél négy új mutációt mutattunk ki, amelyeket négy 2-es típusú diabetes mellitus és három mikrociter anemiás betegnél találtunk.

Ezek az új eredmények újabb bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy az akatalazémia egy kockázati faktor lehet bizonyos életkorral is összefüggő rendellenességekben.

7. SUMMARY

7.1A new procedure for examining 9.exon C111T polymorphism

Examination of PCR products of catalase exon 9 with polyacrylamide gel electrophoresis revealed extra band(s) in the 400-800 bp range. The use of PCR-SSCP denaturation and specific staining technique with SybrGreen II, and nucleotide sequencing confirmed that the bands in question may be single-stranded DNAs. These bands located in the 400-800 bp range can be used to examine exon 9 polymorphisms. The highest level of sensitivity was detectable for the C111T polymorphism of exon 9 (rs769217). The method described by us is a simple, fast and cost-effective technique for genotype determination of C111T polymorphism in exon 9.

7.2 Investigation of C111T polymorphism in microcytic anemia and β -thalassemia, diabetes mellitus

This method was used to examine the genotypes of C111T polymorphism in microcytic anemia and beta-thalassemia patients.

Decreased blood catalase activity was observed in the case of the TT genotype of C111T polymorphism.

The TT genotype of polymorphism C111T could be frequently detected (12%) in type 1 diabetes. However, no significant changes were detected in blood catalase activity, glucose, hemoglobin A1c, triglyceride, cholesterol, HDL, LDL, ApoA-I and APOB concentrations.

On the other hand, in type 2 diabetes significantly decreased blood catalase was measured in the samples of CC and CT genotypes, accompanied by increased glucose, hemoglobin A1c and ApoB concentrations.

7.3 Research of -262C>T polymorphism

We examined the nucleotide polymorphism -262C>T (rs1001179) in the 5' region which may play a role in regulatory processes. Decreased blood catalase activity could be detected in type 1 diabetics with CC and CT genotypes, as well as in type

2 diabetics with CC, CT, TT genotypes. The samples of type 2 diabetics with this polymorphism showed significant decreases when blood catalase activity, age and HDL concentration were measured. Furthermore, they showed an increase in glucose, hemoglobin A1c, cholesterol, and ApoB concentrations.

7.4 New acatalasemia mutations

We set up a cohort comprising 51 patient samples for which patients' blood catalase activity was below 50% of the reference mean.

Four novel acatalasemia mutations were detected, which increased the number of so-far known types of Hungarian acatalasemia from 11 to 15. Seven out of the 51 samples revealed four novel mutations belonging to samples in the type 2 diabetes and microcytic anemia cohorts. These results provide a new evidence for acatalasemia being a potential risk factor in several age-related diseases.

8. AZ ÚJ EREDMÉNYEIM

1. A kataláz gén 9. exon elektroforetikus mintázat értékelő módszer részletes elemzését készítettük el. Mutáció szűrő módszerek (PCR-SSCP, egy és kétszálú DNS festés, nukleázos emésztés, PCR-RFLP) segítségével egyértelműen igazoltuk, hogy konformáció változás következtében egyszálú DNS szakaszok keletkeznek, amelyek az elektroforetikus képen, 400-800 bp helyeken detektálhatók.
2. Az elektroforetogramon a sávok a kataláz gén 9. exon polimorfizmus azonosítására alkalmasak. Ezzel a módszerrel egyszerűen, gyorsan és költséghatékonyan, szekvencia analízis nélkül határozhatók meg polimorfizmusok.
3. Módszerünk a C111T (rs769217) polimorfizmus azonosítására, a genotípusok meghatározására nagy hatékonysággal alkalmazható.
4. A további 9. exon polimorfizmusok (C37T, G113A, G5A) szintén azonosíthatók az általunk alkalmazott módszerrel, de kisebb hatékonysággal. Ezen nukleotid eltérések esetén a genotípusok nem határozhatók meg egyértelműen.
5. Elsőként alkalmaztuk az általunk leírt módszert magyarországi mikrocyter anemiás, β -thalassemias és magyarországi kontroll csoport vizsgálatára. Mikrocyter anémia és β -thalassemia megbetegedésben egyaránt a TT homozigóta mutáns genotípusú mintákban szignifikánsan alacsonyabb vér kataláz aktivitást találtunk.
6. A mikrocyter anémia és β -thalassemia betegcsoportban kapott eredményeket a magyar kontrollokon túl európai kutatási eredmények

- adataival és az NCBI nemzetközi adatbázis adataival is összehasonlítottuk. Csökkent vér kataláz aktivitást detektáltunk mindkét betegcsoportban a kontroll csoporthoz képest.
7. Mi vizsgáltuk először a C111T polimorfizmus és a csökkent vércataláz közötti kapcsolatot.
 8. Elsőként végeztünk átfogó elemzést, amelyben két ismert kataláz gén polimorfizmus (rs769217 és rs1001179) hatását vizsgáltuk 1-es és 2-es típusú diabetes mellitus betegcsoportban.
 9. Részletes összehasonlító elemzést készítettünk az rs769217 és a rs1001179 polimorfizmus hatásáról magyarországi kontroll csoportban és 1-es, 2-es típusú diabetes mellitusban.
 10. A 10 diagnosztikailag fontos paraméter (életkor, vér kataláz, glükóz, HgbA1c, triglicerid, koleszterin, HDL, LDL, ApoA-I, ApoB) koncentrációk változását követtük nyomon 1-es és 2-es típusú diabetes és kontroll csoportban. A mutáns (rs1001179 TT) genotípusú betegek mintáiban csökkent vércataláz aktivitást, emelkedett glükóz, HbA1c koleszterin, HDL és ApoB koncentrációkat kaptunk. Összefüggést mutattunk ki 2-es típusú diabetes mellitus és a rs1001179 polimorfizmus TT mutáns genotípusa között.
 11. Elsőként hoztunk létre olyan csoportot, 617 beteg mintájából, amelyben csökkent vércataláz aktivitású (referens átlag 50%-a alatti) betegektől származó DNS mintákat gyűjtöttünk össze (n=51).

12. Az általunk létrehozott csökkent kataláz aktivitású betegcsoportban vizsgáltuk a kataláz enzimet kódoló gén teljes kódoló 13 exonális szakaszát.
13. Négy új akatalazémia mutációt 7 betegnél azonosítottunk.
Ezek a következők:
2. exonban egy mikrociter anemiás férfi, egy mikrociter anemiás kislány és egy 2-es típusú diabetes mellitusos nőbetegnél a c.106_107insC polimorfizmust detektáltunk, 4. exonban egy mikrociter anemiás nő és egy gesztációs diabeteses nőbetegnél a c.379C>T nukleotid cserét, valamint két 2-es típusú diabetes mellitusos férfi beteg esetében a c.390T>C, és a c.431A>T új mutációkat találtuk.
14. Ezekkel az újonnan kimutatott akatalazémia mutációkkal az ismert magyarországi akatalazémia mutációk számát 11-ről 15-re növeltük.
15. Három mikrociter anémiás betegben a 2. és a 4. exonális régióban regisztráltunk új akatalazémia mutációkat, ezzel elsőként mutattunk rá, a kataláz gén mutációk lehetséges hatására mikrociter anémiában.
16. A négy diabeteses betegnél detektált 3 különböző mutáció további bizonyíték lehet, hogy a 2-es típusú diabetes mellitusban nem a mutáció típusa a meghatározó. Feltehetően a mutáció eredményként az egész életen át ható, csökkent kataláz aktivitás révén megnövekedett hidrogén-peroxid koncentráció hatása az oxidációra érzékeny pankreasz β -sejtekre játszhat szerepet a 2-es típusú diabetes mellitus patomechanizmusában.

9. IRODALOM

9.1 A dolgozat megírásához felhasznált irodalom

- [1] West I.C. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabetic Medicine* 2000;17:171-180.
- [2] Houstis N. Rosen E. D. Lander E. S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*. 2006;440:944-948.
- [3] Turnes J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*. 2003;552:335-344.
- [4] Veal E. Day A. Hydrogen peroxide as a signaling molecule. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2011;15:147-151.
- [5] Rajendran P. Nandakumar N. Rengarajan T. Planiswami R. Gnanabhas N. E. Lakshminarasiah U. Gopas J. Nishigaki I. Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*. 2014;436:332–347.
- [6] Kocsis I. Blázovics A. Pallai Zs. Fehér J. Szervezet redoxegyensúlyának vizsgálati módszerei, lehetséges szerepük a diagnosztikában. *Orvosi Hetilap*. 2004;145:761-767.
- [7] Dröge W. Free radicals in the physiological controls of cell function. *Physiological Review*. 2002;82(1):47-95.
- [8] Halliwell B. Veroruque H. Clement M. V. Long L.H. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Letters*. 2000;486:10-13.
- [9] Góth L. A hidrogénperoxid-paradoxon. *Orvosi Hetilap*. 2006;147: 887-893.
- [10] Chance B. Sies H. Bovearis A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Review*. 1979;59:527-605.
- [11] Góth L. A kataláz enzim szerepe a hidrogénperoxid metabolizmusban, az enzim csökkent működése vagy veleszületett hiánya. *Orvosképzés*. 1997;72: 59-63.

- [12] Wakimoto M. Masuoka N. Nakano T. Ubuka T. Determination of glutation peroxidase activity and its contribution to hydrogen peroxide removal in erythrocytes. *Acta Medica Okayama*. 1998;52:233-37.
- [13] Rhee S. Kim H. Peroxiredoxins: a historical overviews and speculative preview of novel mechanism and emerging concepts in cell signalling. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 200;38(12):1543-1552.
- [14] Góth L. Kataláz, egy régi enzim új arculatai. Akadémia Kiadó. Budapest 2008.
- [15] Chance B. Intermediate compound in the catalase-hydrogen peroxid reaction. *Acta Chemica Scandinavica*. 1947;1:236.
- [16] Chance B. The primary and secondary compounds of catalase and methyl or ethylhydrogen peroxide II. Kinetics and activity. *Journal of Biological Chemistry*. 1949;179:1341-1369.
- [17] Kirkman H.N. Gaetani G.F. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984;81(14):4343-4347.
- [18] Kirkman H.N. Galiano S. Gaetani G.F. The function of catalase-bound NADPH. *The Journal of Biological Chemistry*. 1987;262:660-666.
- [19] Góth L. Determination of catalase enzyme activity in human tissues by programmable polarograph. *Hungarian Scientific Instruments*. 1982;53:43-46.
- [20] Góth L. Az enzimdiagnosztika egyik legkorábbi enzime, a kataláz. *Orvosi Hetilap*. 1992;133:499-501.
- [21] Allgod G.S. Perry J.J. Characterization of a manganese-containing catalase from the obligate thermophile *Thermoleophilum album*. *Journal of Bacteriology*. 1986;168(2):563-567.
- [22] Khaket T.P. Ahmad R. Biochemical studies on hemoglobin modified with reactive oxygen species (ROS). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2011;164:1422–1430.

- [23] Nagababu E. Chrest F.J. Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. *Biochemica et Biophysica Acta*. 2003:1620:211-217.
- [24] Olafsson T. Olofsson I. Purification of human granulocyte catalase in chronic myeloid leukemia. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1977:482:301-308.
- [25] Seghieri G. Di Simplicio P. Aninchini R. Alviggi L. De Bellis A. Bennardini F. Franconi F. Platelet antioxidant enzymes in insulin-dependent diabetes mellitus. *Clinica Chimica Acta*. 2001:309:19-23.
- [26] Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and reversion of reference range. *Clinica Chimica Acta*. 1991:196:143-152.
- [27] Vitai M. Góth L. Reference ranges of normal blood catalase activity and levels in familial hypocatalasemia in Hungary. *Clinica Chimica Acta*. 1997:261(1):35-42.
- [28] Góth L. Vitai M. Hypocatalasemia in hospital patients. *Clinical Chemistry*. 1996:42:341-342.
- [29] Góth L. Lenkey A. Bigler N. W. Blood catalase and diabetes in Hungary. *Diabetes Care*. 2010:24:1839-1840.
- [30] Góth L. Tóth Z. Tarnai I. Bérces M. Török P. Bigler W.N. Blood catalase activity in gestational diabetes is decreased but not associated with pregnancy complications. *Clinical Chemistry*. 2005:51:2401-2404.
- [31] Góth L. Rass P. Páy A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. *Molecular Diagnosis*. 2004:8:141-9.
- [32] Chang J. Y. Schroeder W. A. Reaction of 3-amino-1:2:4-triazole with bovine liver catalase and human erythrocyte catalase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1972:148:505-508.
- [33] Wagner B.A. Witmer J. R. van't Erve T. J. Buettner G. R. An assay for the rate of removal of extracellular hydrogen peroxide by cells. *Redox Biology*. 2013:31(1):210-217.
- [34] Takahara S. Progressive oral gangrene probably due to lack of catalase in

- the blood (acatalasemia) : report of nine cases. **Lancet**. 1952:260:1101-1104.
- [35] Hirono A. Sasaya-Hamada F. Kanno H. Fujii H. Tomoyuki Yoshida T. Miwa S. A novel human catalase mutation (358 T6del) causing Japanese-type acatalasemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 1995:21(23):232-234
- [36] Góth L. Öröklődő kataláz-enzimhiányos állapotok Magyarországon. *Orvosi Hetilap*. 2000:141:443-447.
- [37] Góth L. Vitai M. Hungarian hereditary acatalasemia and hypocatalasemia are not associated with chronic hemolysis. *Clinical Chimica Acta*. 1995:233:75-79.
- [38] Góth L. Lipid and carbohydrate metabolism in acatalasemia. *Clinical Chemistry*. 2000:46:564-566.
- [39] Jermendy G. Diabetes registers in general practice. Hungarian registers new and improved. *British Medical Journal*. 1994:308(6921):134-135.
- [40] McCarthy M.I. Genomics, type 2 diabetes, and obesity. *New England Medical Journal*. 2010:363(24):2339-2350.
- [41] Hur J. Sullivan K.A. Schuyler A.D. Hong Y. Pande M. States D.J. Jagadish H.V. Fledman E.L. Literature based discovery of diabetes- and ROS-related targets. *BMC Medical Genomics*. 2010:3:49-60.
- [42] Fuchsberger C. Flannick J. Teslovich M.T. Mahajan A. Agarwala V. et al. The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature*. 2016:536:41-47.
- [43] Takemoto K. Wakana D. Katao K. Ishihara K. Wang D.H. Subiyama H. Masuoka N. Insulin release from the beta cells in acatalasemic mice in highly susceptible to alloxan-induced oxidative stress. *Journal of Diabetes Mellitus*. 2015:5:81-89.
- [44] Góth L. Eaton J.W. Hereditary catalase deficiency and increased risk of diabetes. *Lancet*. 2000:356:11820-1821.
- [45] Góth L. Nagy T. Káplár M. A veleszületett katalázhiány (akatalazemia) és a 2-es típusú diabetes mellitus (acatalasemia and type diabetes mellitus). *Orvosi Hetilap*. 2015:156:393-398.

- [46] Muncie H. Campbell J.S. Udvardy M. Alfa és β -thalassemia. *Orvostovábbképző Szemle*. 2010;13(3): 63-71.
- [47] Ringelhann B. Szelenyi J.G. Horányi M. Svoboda M. Divoky V. Indrak K. Hollan K. Marosi A. Laub M. Huisman T. H. J. Molecular characterization of beta-thalassemia in Hungary. *Human Genetics*. 1992;92:385-387.
- [48] Kósa Z. Nagy T. Nagy E. Fazakas F. Góth L. Decreased blood catalase activity is not related to specific beta-thalassemia mutations in Hungary. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2011;34(2):172-178.
- [49] De Franceschi L. Bertoldi M. Matte A. Santos. Franco S. S. Pantaleo A. Ferru E. Turrini F. Oxidative stress and beta-thalassemic erythroid cells behind the molecular defect. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013;985210:1-10.
- [50] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/40048>
- [51] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=catalase>
- [52] Herbert-Schuster M. Fabre E.E. Antoinet N.V. Catalase polymorphisms and metabolic disases. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2012;15(4):397-402.
- [53] Tarnai I. Csordás M. Sükei E. Shemirani A.H. Káplár M. Góth L. Effect of C111T polymorphism in exon 9 of the catalase gene on blood catalase activity in defferent types of diabetes mellitus. *Free Radical Research*. 2006;41:806-811.
- [54] Góth L. Csordás M. Kósa Zs. Simics E. A weak association of blood catalase activity and +22348C→T polymorphism of the catalase gene in Hungarian female vitiligo patients. *Clinical and Experimental Medical Journal(Budapest)*. 2010;10:1-7.
- [55] Gavalas N.G. Akhtar S. Gawkrodger D.J. Watson P.F. Weetman A.P. Kemp E.H. Analysis of allelic variants in the catalase gene in patients with the skin depigmenting disorder vitiligo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;345:1586–1591.

- [56] Góth L. A kataláz enzim klinikai vonatkozásai és mutációi Magyarországon. *Lege Artis Medicine*. 2005;15:274–278.
- [57] Rass P. Vitai M. Tarnai I. Sükei E. Páy A. A humán kataláz gén mutációi Magyarországon. *Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina*. 2005;31:129-135.
- [58] Góth L. Vitai M. Rass P. Sükei E. Páy A. Detection of a novel famailial catalase mutation (Hungarian type D) and the possible risk of inherited catalase deficiency for diabetes mellitus. *Electrophoresis*. 2005;26(9):1646-1649.
- [59] Góth L. A novel catalase mutation (a G insertion in exon 2) causes the type B of the Hungarian acatalasemia. *Clinica Chimica Acta*. 2001;311:161-3.
- [60] Góth L. Shemirani A.H. Kalmár T. A novel catalase mutation (a GA insertion) causes the Hunagrian type of acatalasemia. *Blood Cells, Molecules and Diseases*. 2000;26(2):151-154.
- [61] Góth L. Genetic heterogeneity of the 5' uncoding region of the catalase gene in Hungarian acatalasemic and hypocatalasemic subjects. *Clinica Chimica Acta*. 1998;271:73-78.
- [62] Forsberg L. Lyrenas L. de Faire U. Morgenstern R. A common funcional C-T substitution polymorphism in promoter region of the human catalase gene influences transcription and is correlated to blood catalase levels. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001;30:500-505.
- [63] Wen J.K. Osumi T. Hashimoto T. Ogata M. Molecular analysis of human acatalasemia. *Journal of Molecular Biology*. 1990;211:383-393.
- [64] Kishimoto Y. Muracami Y. Hayashi K. Takahara S. Sekiya T. Detection of a common mutation of catalase gene in Japanese acatalasemia patients. *Human Genetics*. 1992;86:487-490.
- [65] Nagy T. Csordás M. Kósa Zs. Góth L. Simple method for examination of polymorphisms of catalase exon9: rs769217 in Hungarian microcytic anemia

and beta-thalassemia patients. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2012;525:201-206.

[66] Casp C.B. She J.X. McCormack W.T. Genetic association of the catalase gene (CAT) with vitiligo susceptibility. *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2002;15:62-66.

[67] Park H.H. Ha E. Uhm Y.K. Jin S.Y. Chung J.H. Lee M.H. Association study between catalase gene polymorphisms and the susceptibility to vitiligo in Korean population. *Experimental Dermatology*. 2006;15:377-380.

[68] Oh. B. Kim S.Y. Lee Y.J. Lee J. K. Kimm K. Park B.L. Shin H.D. Kim T.H. Park E.K. Koh J.M. Kim G.S.J. Associations of catalase gene polymorphisms with bone mineral density and bone turnover markers in postmenopausal women. *Journal of Medical Genetics*. 2007;44(1):e62.

[69] Vitai M. Kocsordi K. Buday B. Literáti NB. Kulcsár E. Nettegh K. Péterfai É. Koltay L. Korányi L. Nemhez kötött a katalázgén polimorfizmus (RS769217) hatása az energia-háztartás és a csontok állapotára. *Orvosi Hetilap*. 2010;151(21):923-931.

[70] www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=769217

[71] www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/?q=rs769217

[72] Chamary J.V. Hurst L.D. Evidence for selection on synonymous mutations affecting stability of mRNA secondary structure in mammals. *Genome Biology*. 2005;6(9):R75.

[73] Parmley J.L. Hurst L.D. How do synonymous mutations affect fitness? *Bioessays*. 2007;29(6):515-519.

[74] Tarnai I. Csodás M. Sükei E. Shemirani A. H. Káplár M. Góth L. Effect of C111T polymorphisms in exon 9 of the catalase gene on blood catalase activity in different types of diabetes mellitus. *Free Radical Research*. 2007;41:806-811.

[75] Ramamrishna V. Jailkhani R. Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. *Acta Diabetologica*. 2008;45:41-46.

- [76] Flekac M. Skrha J. Hilgertova J. Lacinova Z. Jaromlimkova M. Gene polymorphisms of superoxide dismutases and catalase in diabetes mellitus. *BMC Medical Genetics*. 2008;9:30.
- [77] Minni M. Chen Q. Bertol K. Perkin P.K.A. Reuter B. Young L. The real-time measurement of blood nitric oxid (NO) and hydrogen peroxide (H₂O₂) levels under acute hyperlycemia. *FASEB Journal*. 2011;17:824.21.
- [78] Ahn J. Gammon M.D. Santella R.M. Gaudet M.M. Britton J.A. Teitelbaum S.L. Terry M.B. Nowell S. Davis W. Garza C. Neugut A. I. Ambrosone C. B. Associations between breast cancer risk and the catalase genotype, fruit and vegetable consumption, and supplement use. *American Journal of Epidemiology*. 2005;162(10):943-952.
- [79] Perianayagam M.C. Liangos O. Kolyada A.Y. Wald R. MacKinnon R.W. Li L. Rao M. Balakrishnan V.S. Bonventre J.V. Pereira B.J. Jaber B.L. NADPH oxidase p22phox and catalase gene variants are associated with biomarkers of oxidative stress and adverse outcomes in acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2007;1:255-263.
- [80] dos Santos K.G. Canani L.H. Gross J.L. Tschiedel B. Souto K.E. Roisenberg I. The catalase-262C/T promoter polymorphism and diabetic complications in Caucasians with type 2 diabetes. *Disease Markers*. 2006;22:355-359.
- [81] Szelestei T. Böhring S. Wagner Z. Aydin A. Molnár G. A. Kocsis B. Nagy J. Wittmann I. Serum levels of L-arginine analogues and glutathion peroxidase and catalase gene variants in type 2 diabetes mellitus patients. *Diabetic Medicine*. 2005;22(3):356-357.
- [82] Kosmidou M. Hatzitolios A.I. Molyva D. Raikos N. Savopoulos C. Daferera N. Kokkas V. Goulas A. An association study between catalase-262C> T gene polymorphism, sodium-lithium countertransport activity, insulin resistance, blood lipid parameters and their response to atorvastatin, in Greek dyslipidaemic patients and normolipidaemic controls. *Free Radical Research*.

2009:43(4):385-389.

[83] Letonja M. Nikolajević-Starčević J. Letonja M.Š. Petrovič D. Association of the -262C/T polymorphism in the catalase gene promoter with carotid atherosclerosis in Slovenian patients with type 2 diabetes. *Central European Journal of Medicine*. 2011:6(4):463-469.

[84] Góth L. Nagy T. Kósa Z. Fejes Z. Bhattoa H.P. Paragh G. Káplár M. Effects of rs769217 and rs1001179 polymorphisms of catalase gene on blood catalase, carbohydrate and lipid biomarkers in diabetes mellitus. *Free Radical Research*. 2012:46(10):1249-1257.

[85] Góth L. Catalase deficiency and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2008:31(12):e93.

[86] Góth L. Nagy T. Acatlasemia and diabetes mellitus. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2012:525(2):195-200.

[87] Heales S.J.R. Catalase deficiency, diabetes, and mitochondrial function. *Lancet*. 2001:357:314.

[88] Silwinska-Kowalska M. Pawelczyk M. Contribution of genetic factor to noise-induced hearing loss: a human studies review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2013:31(1):61-65.

[89] Fita I. Rossmann M.G. The active center of catalase. *Journal of Molecular Biology*. 1985:185(1):21-37.

[90] Putnam C.D. Arvai A.S. Bourne Y. Tailne J. A. Active and inhibited catalase structures: ligand and NADPH binding and catalase mechanism. *Journal of Molecular Biology*. 2000:269(1):295-309.

[91] Diaz A. Horjales E. Rudino-Pinera E. Arreola R. Hansberg W. Unusual Cys-Tyr covalent binding in a large catalase. *Journal of Molecular Biology*. 2004:342(3):971-985.

[92] Nagy T. Paszti E. Káplár M. Bhattoa H.P. Góth L. Further acatalasemia mutations in human patients from Hungary with diabetes and microcytic anemia. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2015:772:10-14.



Nyilvántartási szám: DEENK/36/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Nagy Teréz
Neptun kód: DTZCRO
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10044847

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Nagy, T.**, Pászti, E., Káplár, M., Bhattoa, H. P., Góth, L.: Further acatalasemia mutations in human patients from Hungary with diabetes and microcytic anemia.
Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 772, 10-14, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.12.008>
IF: 2.581
2. **Nagy, T.**, Csordás, M., Kósa, Z., Góth, L.: A simple method for examination of polymorphisms of catalase exon 9: rs769217 in Hungarian microcytic anemia and beta-thalassemia patients.
Arch. Biochem. Biophys. 525 (2), 201-206, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2012.01.004>
IF: 3.37
3. Góth, L., **Nagy, T.**, Kósa, Z., Fejes, Z., Bhattoa, H. P., Paragh, G., Káplár, M.: Effects of rs769217 and rs1001179 polymorphisms of catalase gene on blood catalase, carbohydrate and lipid biomarkers in diabetes mellitus.
Free Radic. Res. 46 (10), 1249-1257, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2012.702899>
IF: 3.279





További közlemények

4. Góth, L., **Nagy, T.**, Káplár, M.: A veleszületett katalázihiány (acatalasaemia) és a 2-es típusú diabetes mellitus.
Orvosi Hetilap. 156 (10), 393-398, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2015.30095>
IF: 0.291
5. Góth, L., **Nagy, T.**: Are the catalase Gene mutations Responsible for the Decreased Blood catalase Activity?
Int. J. Clin. Chem. Labor. Med. 1 (1), 15-17, 2015.
6. Góth, L., **Nagy, T.**, Paragh, G., Káplár, M.: Blood Catalase Activities, Catalase Gene Polymorphisms and Acatalasemia Mutations in Hungarian Patients with Diabetes Mellitus.
Glob. J. Obes. Diabetes. Metab. Syndr. 3 (1), 001-005, 2016.
7. Góth, L., **Nagy, T.**: Inherited catalase deficiency: is it benign or a factor in various age related disorders?
Mutat. Res.-Rev. Mutat. Res. 753 (2), 147-154, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.08.002>
IF: 7.326
8. Góth, L., **Nagy, T.**: Acatalasemia and diabetes mellitus.
Arch. Biochem. Biophys. 525 (2), 195-200, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jabb.2012.02.005>
IF: 3.37
9. Kósa, Z., Fejes, Z., **Nagy, T.**, Csordás, M., Simics, E., Remenyik, É., Góth, L.: Catalase - 262C>T polymorphisms in Hungarian vitiligo patients and in controls: further acatalasemia mutations in Hungary.
Mol. Biol. Rep. 39 (4), 4787-4795, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-011-1272-6>
IF: 2.506





10. Kósa, Z., **Nagy, T.**, Nagy, E., Fazakas, F., Góth, L.: Decreased blood catalase activity is not related to specific beta-thalassemia mutations in Hungary.
Int. J. Lab. Hematol. 34 (2), 172-178, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-533X.2011.01377.x>
IF: 1.293

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 24,016

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az érkekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9,23

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.02.27.



10. TÁRGYSZAVAK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Tárgyszavak:

hidrogén peroxid, oxidatív stressz, kataláz enzim, akatalazémia, hipokatalazémia, mikrociter anémia, β -thalassemia, diabetes mellitus, mutáció, polimorfizmus,

Hydrogen peroxide, oxidative stress, catalase enzyme, acatalazemia, hypocatalazemia, microcytic anemia, β -thalassemia, diabetes mellitus, mutation, polymorphism

Rövidítések:

ApoA : apolipoprotein A

ApoB : apolipoprotein B

DNS : deoxiribonukleinsav

dNTP : deoxinukleozid trifoszfát

ds : dupla szál

EDTA : etilén-diamin-tetra-ecetsav

H₂O₂ : hidrogén peroxid

HPLC : nagy nyomású folyadék kromatográfia

HDL : magas sűrűségű koleszterin

kb : kilobázis

KCl : kálium klorid

LDL : alacsony sűrűségű koleszterin

MCV : mean cellular volume

MgCl₂ : magnézium klorid

NADPH : nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NF κ B : B sejt aktiváló nukleáz kappa-könnyű-lánc

PCR : polimeráz láncreakció

ROS : reaktív oxigén species

RFLP : restriction fragment length polymorphism

SNP : single nucleotid polimorphisms

SSCP : Single-strand conformation polymorphism

ss : szimpla(egy) szálú

11. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Elsősorban köszönetemet fejezem ki Prof. Dr Góth Lászlónak, aki 2008-ban munkatársának választott és fokozatosan, lépésről lépésre vezetett be a tudomány világába. Hálásan köszönöm Neki azt, hogy támogatott a tanulmányaimban, és lehetőséget biztosított olyan álmaim megvalósításához, amelyeket néha még magam se hittem el. Köszönöm, hogy módszeresen számon kért és mindig újabb és újabb feladatokat adott. Köszönöm, hogy tanulhattam Tőle, mint kutatótól, oktatótól és mint sokat tapasztalt Embertől.

Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Dr Berényi Ervin intézetvezetőnek, aki biztosított eszközöket, anyagi forrásokat a kísérletes munka végzéséhez.

Nagyon nagy köszönet jár azoknak a hallgatóknak, akikkel együtt dolgoztunk a laboratóriumban, akik mellett témavezetőként dolgozva számos sikernek (diplomadolgozat, TDK dolgozat, poszter, előadás) voltam aktív részese.

Köszönet Prof. Dr. Muszbek László akadémikus Úrnak, aki az első főnököm volt a Debreceni Egyetemen. Az általa vezetett intézetben sajátítottam el a klinikai kémiai módszereket, ahol dolgozni, büszkeséget és megtiszteltetést jelentett és jelent ma is. Köszönettel tartozom az egykori kollégáknak, munkatársaknak.

Köszönöm a Laboratóriumi Medicina Intézet vezetőjének Prof. Dr. Kappelmayer Jánosnak, hogy figyelemmel kísérte munkámat a PhD képzés alatt. Köszönettel tartozom az általa vezetett intézet munkatársainak, akik önzetlenül segítettek minta gyűjtésben, laboratóriumi paraméterek mérésében.

Hálásan köszönök mindent a családomnak. A férjemnek, aki mindig minden körülmények között biztos volt abban, hogy végig csinálom, amibe belefogtam. A mára már csaknem felnőtt gyermekeimnek, akik hol könnyebben, hol nehezebben viselték, hogy Anya folyton tanul valamit.

12. Függelék

A Ph.D. értekezés alapjául szolgáló közleményeim másolata:

1. Nagy T. Csordás M. Kósa Zs. Góth L. Simple method for examination of polymorphisms of catalase exon9: rs769217 in Hungarian microcytic anemia and beta-thalassemia patients. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2012;525:201-206.
2. Góth L. Nagy T. Kósa Z. Fejes Z. Bhattoa H.P. Paragh G. Káplár M. Effects of rs769217 and rs1001179 polymorphisms of catalase gene on blood catalase, carbohydrate and lipid biomarkers in diabetes mellitus. *Free Radical Research*. 2012;46(10):1249-1257.
3. Nagy T. Paszti E. Kaplar M. Bhattoa H.P. Góth L. Further acatalasemia mutations in human patients from Hungary with diabetes and microcytic anemia. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2015;772:10-14.