

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**LIPIDANYAGCSERE ZAVAROK FOKOZOTT
ATHEROSCLEROSISSAL JÁRÓ BETEGSÉGEKBEN, KLINIKAI
ÉS MOLEKULÁRIS GENETIKAI VIZSGÁLATOK**

Dr. Katona Evelin

Témavezetők:

Prof. Dr. Paragh György

Dr. Remenyik Éva

DEBRECENI EGYETEM

ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM

I.sz. BELGYÓGYÁSZATI KLINIKA

DEBRECEN

2005

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Irodalmi áttekintés	6
1.1 Bevezetés	6
1.2 Az LDL partikula és az oxidált LDL szerepe az atherosclerosisban	7
1.2.1 Az LDL partikula felépítése és az LDL oxidáció	7
1.2.2 Az oxidált LDL szerepe az atherogenezisben	7
1.3 A HDL partikula és a HDL antiatherosclerotikus hatása	8
1.3.1 A HDL partikula protektív szerepe	9
1.3.2 A reverz koleszterol transzport	9
1.3.3 A HDL érfalra kifejtett hatásai	10
1.3.4 A HDL antioxidáns hatásai	10
1.4 Az antiatherogen hatású paraoxonáz	11
1.4.1 A humán PON1	11
1.4.2 A PON1 hatásai	12
1.4.3 A PON2 és PON3	12
1.4.4 A PON1 polimorfizmusai és az aktivitását befolyásoló tényezők	13
1.5 Az Alzheimer kór és a vaszkuláris demencia	16
1.5.1 Az AD patomechanizmusa	17
1.5.2 Az oxidatív folyamatok szerepe az AD és VD kialakulásában	17
1.5.3 A PON szerepe az AD és VD kialakulásában	18
1.6 Az ABC transzporter fehérjecsald	19
1.6.1 Az ABCA1 protein	19
1.6.2 Az ABCC6 protein	20
1.7 Pseudoxanthoma elasticum	21
1.7.1 A PXE tünetei	22
2. Célkitűzések	24
3. Betegek és módszerek	25
3.1 AD, VD Betegcsoportok	25
3.2 Laboratóriumi vizsgálatok	26
3.3 Szérum paraoxonáz aktivitás meghatározása	26
3.4 ApoE polimorfizmus meghatározása	27
3.5 Statisztikai módszerek	27
3.6 Pseudoxanthoma elasticumban szenvedő betegek adatai	28
3.7 Genetikai analízis	28
3.7.1 Genomiális DNS preparálás	28
3.7.2 A PCR-hoz felhasznált primerek	28
3.7.3 Polimeráz láncreakció, szekvenálás	29

3.7.4	SNP és pontmutáció detektálása az ABCC6 génen	30
3.8	Fibroblaszt tenyésztés és stimulálás	31
3.9.	Elasztáz aktivitás meghatározása	32
3.10	Fehérje meghatározás	32
4.	Eredmények	33
4.1	A PON aktivitása AD és VD betegekben	33
4.1.1	Lipid eltérések	33
4.1.2	A szérum PON aktivitás	34
4.1.3	ApoE isoformok eloszlása	35
4.2	PXE-ban szenvedő betegek klinikai jellemzői	36
4.3	PXE-ban szenvedő betegek genotípusa, családfa elemzése	39
4.3.1	A del24-25 törési pontjának azonosítása	42
4.4	Elasztáz aktivitás	45
4.5	Új eredmények	47
5.	Megbeszélés	49
5.1	Lipideltérések és a PON1 aktivitása AD és VD betegcsoportokban	49
5.2	A PXE-ben szenvedő betegek klinikai manifesztációja és genetikai eltérései	51
5.3.	A PXE fibroblasztok megnövekedett elasztáz aktivitása	53
6.	Összefoglalás	55
7.	Irodalomjegyzék, saját közlemények, absztraktok, poszterek, előadások	57
8.	Köszönetnyilvánítás	72
9.	Függelék	73

Rövidítések jegyzéke

ABCA1: ATP binding cassette transporter A1
ABCC6: ATP binding cassette transporter C6
AD: Alzheimer's disease
ApoA-I: apolipoprotein A-I
ApoA-II: apolipoprotein A-II
ApoB-100: apolipoprotein B
ApoE: apolipoprotein E
ApoJ: apolipoprotein J
ATP: adenozil trifoszfát
BAC: bacterial artificial chromosome (mesterséges bakteriális kromoszóma)
BNO-10: Betegségek Nemzetközi Osztályozása 10. revízió
Brij 35: polietilén-glikol-dodeciléter
BSA: bovine serum albumin
CETP: koleszterin észter transzfer protein
CHO: chinese hamster ovary (kínai hörsög petefészek sejt)
COP-I: coat protein I
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
DSM-IV: Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders 4th ed.
EDTA: etiléndiamintetraecetsav
EEG: electroencephalographia
F: forward
FCS: fetal calf serum (embrionális borjúsérum)
GPX: glutation peroxidáz
HDL: high-density lipoprotein
HL: hepatikus lipáz
HuH-7: human hepatoma cells
ICAM-1: intracellular adhesion molecule 1
IDL: intermediate density lipoprotein
IL-1 β : interleukin-1 β
IL-6: interleukin 6
IL-8: interleukin 8
LCAT: lecitin koleszterin aciltranszferáz
LDL: low-density lipoprotein
LPC: lizofoszfátidilkolin
MEM: modified Eagle's Medium
MM-LDL: minimally modified LDL
MMP1: mátrix metalloproteináz 1
MMSE: mini mental state examination
mRNS: messenger RNS
MRP6: multidrug resistance protein 6
NBD: nucleotide binding domain
NF κ β : nukleáris faktor κ β
NFQ: non-fluorescent quencher
NO: nitrogén monoxid
NOS: NO szintetáz
OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man
oxLDL: oxidált LDL
oxPAPC: oxidált 1-palmitoil-2-arachidonil-sn-glycero-3-foszfórikolin
PAFAH: platelet-activating factor acetyl hidroláz
PBS: phosphate buffer saline, (foszfát puffer sóoldat)
PCR: polimeráz láncreakció
PCR-RFLP: PCR- restrikciós fragmenthossz polimorfizmus
PLTP: foszfolipid transzfer protein
PON: paraoxonáz
PUFA: többszörösen telítetlen zsírsav
PXE: pseudoxanthoma elasticum
R: reverse
SNP: single nucleotide polymorphism

SPECT: Single Photon Emission Computed Tomography
SR-A: scavenger receptor A
SR-BI: scavenger receptor B I
Suc(Ala)₃pNA: szukcinil-trialanin paranitroanilid
TNF: tumor nekrosis faktor
Tris-HCl: trisz-(hidroximetil)-amino-metan-hidroklorid
VCAM-1: vascular adhesion molecule 1
VD: Vascularis dementia
VLDL: very low-density lipoprotein

1. Irodalmi áttekintés

1.1. Bevezetés

Az atherosclerosis összetett patomechanizmusában a „response to injury” (1) elmélet alapján az érfal endothel sérülését követi a gyulladós folyamat, melynek progresszióját a sejtes (endothel, simaizomsejt, fibroblaszt, monocyta, lymphocyta, thrombocyta, dendritikus sejtek) és a nem sejtes elemek (citokinek, akut fázis proteinek, alvadási faktorok) közötti kölcsönhatás határozza meg. Az érfal szerkezeti eltérések kialakulásában lokálisan a subendotheliális területben jelen lévő extracelluláris mátrix elemei (kollagének, elasztin, glükóz-aminoglikánok) játszanak kulcsszerepet. Az életkor előrehaladtával és az atherosclerotikus plakkok progressziójával az érfal rugalmasságát biztosító elasztikus rostok mennyisége csökken, az elasztint hasító elasztáz aktivitás nő (összefoglalva: Robert L és mtsai) (2), ennek következtében az elasztin degradációs produktumok mennyisége nő, melyek jelenléte befolyásolja az NO dependens vazodilatációt, a cholesterol szintézist, az extracelluláris mátrix bioszintézist (2) .

Az utóbbi évtizedekben számos tanulmány igazolta, hogy az emelkedett LDL koleszterin és más ApoB tartalmú lipoproteinek jelentősen megnövelik az atherosclerosis kialakulásának valószínűségét (3). Epidemiológiai tanulmányok szerint az alacsony HDL koleszterin szint szintén független rizikófaktora a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának (4).

Vizsgálatainkban olyan különböző etiológiájú betegségben szenvedő betegcsoportokat vizsgáltunk, ahol az eltérő eredet ellenére hasonló, az atherosclerosis patomechanizmusával rokon lipid metabolizmus-, oxidatív környezet- és extracelluláris

mátrix változások észlelhetőek. Az általunk vizsgált betegek közül az Alzheimer kórban és vaszkuláris dementiában szenvedő betegek gyakrabban előforduló kórállapotokat képviselnek, a Pseudoxanthoma elasticum (PXE) jóval ritkábban fordul elő, patomechanizmusa és genetikai háttere jelenleg még nem ismert részleteiben.

1.2. Az LDL partikula és az oxidált LDL szerepe az atherosclerosisban

1.2.1 Az LDL partikula felépítése és az LDL oxidáció

Az LDL lipidfrakciója koleszterin-észtert és trigliceridet tartalmaz a magban, míg a külső köpenyben foszfolipidek, elsősorban lecitin, szfingomyelin és lizolecitin, valamint koleszterin található. A fehérje frakció legfontosabb eleme az ApoB-100. Az LDL zsírsav- tartalmának több mint fele többszörösen telítetlen zsírsav (PUFA), főként linolénsav, valamint arachidonsav. Ezen PUFA-k szabadgyökök általi oxidatív károsodása ellen az LDL partikulumhoz asszociált alfa-tokoferol, karotinoid, ubiquinol, stb. védő hatást fejt ki. Az LDL oxidációjában fémionok (Fe^{2+} , Cu^{2+}), lipoxigenázok, myeloperoxidázok és reaktív nitrogén gyökök játszanak szerepet, az endogén antioxidánsok kimerülését követően a telítetlen zsírsavak gyors oxidációja következtében lipid hidroperoxidok, majd reaktív aldehidek képződnek (5).

1.2.2. Az oxidált LDL szerepe az atherogenezisben

Az oxidált LDL (oxLDL) központi szerepet játszik az atherosclerosis folyamatában: a módosult LDL atherogen választ vált ki és fokozza a gyulladós folyamatokat. Az oxLDL kisebb része a makrofágok SR-A receptorain, nagyobb része a B típusú CD36 scavenger receptorokon keresztül kerül felvételre kontrollálatlanul,

melynek következtében a makrofágokból habos-sejtek (foam sejt) képződnek (6) a subendothelialis térben. Ezen kívül az oxLDL számos egyéb proatherogen tulajdonsággal rendelkezik: kemotaktikus hatású a monocytákra és T sejtekre, cytotoxikus hatású az endothel sejtekre, fokozza a VCAM-1 (vascular adhesion molecule 1), ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1), az IL-1 (interleukin-1), az IL-8 (interleukin-8), és a MMP1 (metalloproteináz 1) expresszióját, aktiválja a nukleáris faktor $\kappa\beta$ -t (NF $\kappa\beta$), gátolja az NO felszabadulását és hatását, fokozza a thrombocyták aggregációját és prokoaguláns hatással is bír (7).

A képződő oxLDL mennyiségét jelentősen befolyásolja a natív LDL mennyisége, ennek meghatározója pedig a plazma LDL szintje.

1.3. A HDL partikula és a HDL antiatherosclerotikus hatása

A HDL lipoprotein osztályt heterogén makromolekuláris komplexek alkotják, melyeket 50%-ban lipidek, 50%-ban fehérjék alkotnak. A HDL alosztályok lipidösszetételükben, apolipoproteinekben, enzimekben, lipid transzfer proteinekben térnek el egymástól, ezen eltérések alakjukban, méretben, denzitásban, töltésben és antigenitásban eredményeznek különbséget (8).

Ultracentrifugálással a HDL legalább két további frakcióra bontható a denzitás alapján. A “könnyebb” HDL2 relatíve gazdag lipidekben, és kevesebb fehérjét tartalmaz a “nehezebb” HDL3-hoz képest.

A fehérje-frakciót 70%-ban ApoA-I, 20%-ban ApoA-II, 10%-ban egyéb fehérjék alkotják. Az apolipoprotein-tartalom alapján megkülönböztetünk kizárólag 4 db ApoA-I-et (HDL2), 2 ApoA-I-et és 2 ApoA-II-t tartalmazó (HDL3), valamint ApoE-ben gazdag HDL-t. Ez utóbbi HDL frakció “könnyebb”, mint a HDL2. A plazma HDL

frakciója poliakril-amid grádiens gélen futtatva elektroforetikus mobilitás alapján további alcsoportokra osztható. (9). A HDL alcsoportok átmérőjét az elektroforézis során észlelt mobilitás és lokalizáció alapján meghatározták: a HDL_{2a}: 8,8-9,7 nm, HDL_{2b}: 9,7-12 nm, HDL_{3a}: 8,2-8,8 nm, HDL_{3b}: 7,8-8,2 nm, HDL_{3c}: 7,2-7,8 nm (9). A két fő apolipoprotein, az ApoA-I és az ApoA-II a májban szintetizálódik. Az ApoA-I-et a vékonybél is szintetizálja kisebb mennyiségben az ApoA-IV-el együtt (10).

1.3.1. A HDL partikula protektív szerepe

Epidemiológiai tanulmányok igazolták, hogy a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában a HDL-koleszterin alacsony szintje az egyik legjelentősebb rizikófaktorként szerepel (4). Ezen megállapítást követően a HDL partikula számos antiatherogen tulajdonságát azonosították. A HDL komplexhez asszociált fehérjék lényegesen meghatározzák a HDL antiatherosclerotikus hatékonyságát.

1.3.2. A reverz koleszterol transzport

A HDL antiatherogen funkciója összetett, ezek közül az egyik legfontosabb a reverz koleszterol transzportban betöltött lipid transzporter szerepe: a nascens HDL kapcsolatba kerül a perifériás sejtekkel, ahonnan felveszi a szabad koleszterint és foszfolipideket, majd a májba juttatja.

A lipidszegény, túlnyomóan ApoA-I-et tartalmazó, a májban vagy a bélben termelődő HDL partikula a lipolízis során megtelődik trigliceridben gazdag lipoproteinekkal és foszfolipidekkel, és a PLTP szabad koleszterint szállít a sejtmembránok felől a HDL-be. Ezekben a diszkoidális HDL partikulákban a koleszterin észterifikálódik a lecitin koleszterol aciltranszferáz (LCAT) hatására. Az így keletkezett koleszterin észter a HDL partikula magjába transzferálódik, ezáltal képessé

válí további szabad koleszterin felvételére a perifériás donor sejtekből. Így kialakul a még mindig korong alakú HDL3. Ez további koleszterin észter felvételével gömb alakú HDL2-vé alakul, miközben az ApoE tartalma ApoA-I-re cserélődik. A HDL2 egy kisebb része ismét HDL3-má alakul a hepatikus lipáz (HL) hatására, nagyobb része a koleszterin észter transzfer protein (CETP) segítségével a koleszterin észter tartalmát a VLDL és IDL részecskének adja át, vagy koleszterin észter tartalmát közvetlenül a májba juttatja az SR-BI receptorokon keresztül (11).

A reverz koleszterol transzportban résztvevő fehérjék, lipoproteinek, transzfer proteinek cirkulációban vesznek részt újra és újra regenerálódva, hogy az akceptor funkciójukat folyamatosan fenntarthassák. A reverz koleszterol transzportban szerepet játszik az ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) transzportfehérje is (12).

1.3.3. A HDL érfalra kifejtett hatásai

A HDL antiatherogen szerepében hatást fejt ki az érfalra, gátolja a monocyták a VCAM-1 és ICAM-1 által mediált endotheliális adhézióját (13). A HDL in vitro fokozza az NO szintetáz (NOS) aktivitását és Nitrogén-monoxid (NO) kiáramlást okoz (14). Elősegíti az endothel sejtek által termelt posztaglandin I₂ (prostacyclin) képzését, csökkentve ezzel a thrombocytá aggregációt, így az atherosclerotikus plakk progresszióját (10).

1.3.4. A HDL antioxidáns hatásai

A HDL antioxidáns hatásáért jelentős részben a HDL-hez kötött enzimek felelősek. Közülük legjelentősebb a humán paraoxonáz-1 (PON1), de jóval kisebb mértékben néhány egyéb HDL-hez kötött enzim pld. thrombocytá aktiváló faktor acetil hidroláz (platelet-activating factor acetil hidroláz, PAFAH), lecitin-koleszterol

aciltranszferáz (LCAT), glutation peroxidáz (GPX) és az ApoA-I is hozzájárul a HDL lipid peroxidációt gátló hatásához. A HDL antioxidáns hatásához továbbá hozzájárul a lipid hidroperoxidok eltávolítása az LDL-ből, azok elszállítása a májba a reverz transzportmechanizmus részeként, valamint egyes prooxidáns hatású átmeneti fémek megkötése (15).

1.4. Az antiatherogen hatású paraoxonáz

1.4.1. A humán PON1

In vitro tanulmányokban kimutatták, hogy a HDL gátolja az LDL oxidációt és csökkenti az oxLDL biológiai aktivitását (16,17).

A paraoxonáz (PON) 1 egyike a HDL asszociált fehérjéknek, melyek hozzájárulnak a HDL antiatherogen tulajdonságaihoz. A PON1 HDL-hez kapcsolódó, 45 kDa méretű Ca^{++} dependens arilészteráz, mely szorosan asszociált az ApoA-I-hez és a clusterinhez (ApoJ) (18,19). A PON1 több támadásponton fejti ki antioxidáns hatását: in vitro gátolja az LDL-partikulumok oxidálódását (20), melynek következtében hatékonyan csökkenti a szérumban az oxidált lipidek mennyiségét, melyeknek jelentős szerepe van az atherosclerosis kialakulásában. Ezen kívül gátolja az oxidált LDL által indukált proinflammatorikus folyamatokat, melyek szintén hozzájárulnak az atherosclerosis progressziójához. Kimutatták, hogy a tisztított PON1 meggátolta az oxidált LDL endothel aktiváló hatását (21). A PON1 továbbá gátolja a HDL lipoproteinjeinek oxidációját is, így segíti a HDL fiziológiás antiatherosclerotikus funkciójának megőrzését is (22).

A PON1 leginkább a nagyobb méretű, trigliceridben gazdag HDL2 partikulához asszociált (23). A PON1 a májban szintetizálódik és a szérumba szekretálódik.

1.4.2. A PON1 hatásai

Rosenblat és mtsai kimutatták, hogy a PON1 a direkt LDL oxidáció gátláson kívül megváltoztatja a makrofágok foszfolipid összetételét, lizofoszfátidilkolin (LPC) tartalmuk megnő, így stimulálja a HDL kötődést és a makrofágok HDL mediálta, ABCA1 transzporterén át történő koleszterol effluxát (24), tehát így a reverz koleszterol transzport fokozása is hozzájárul a PON1 komplex, több támadáspontú antiatherogén hatásához.

A PON1 képes a HDL és foszfolipidben gazdag képletek között transzferálódni, mint pl. a sejtmembrán. Immunfluoreszcens vizsgálatok a transzfektált CHO sejtek és HuH-7 hepatocyták membránjának külső felszínére lokalizálták az enzimet (25). A HDL képes a membrán-kötött PON1 felvételére, ez receptor-mediált mechanizmussal történik, háttérében valószínűleg az SR-BI scavenger receptor áll (25), mely ApoA-I-, ApoA-II- tartalmú HDL és foszfolipid micellák megkötésére képes (26).

A PON1 „knockout” egérből származó HDL-ről kimutatták, hogy képtelen meggátolni az LDL oxidációt, érfaluk és makrofágjaik oxidált lipid tartalma és LDL oxidáló kapacitása szignifikánsan növekedett a „vad” típusú testvéreikhez képest, atherosclerotikus plakkjai kiterjedtebbek mint a kontroll társaiké (27).

1.4.3. A PON2 és PON3

A PON géncsalád 3 tagja a *PON1*, *PON2* és a *PON3* szorosan egymás mellett helyezkednek el a 7-es kromoszóma q21.3 és q22.1 közötti régiójában (28). A paraoxonáz elnevezés arra utal, hogy a PON1 képes szerves foszfátok, így az inszekticid

parathion hidrolízisére, elsőként ezt az aktivitását fedezték fel. Ám az elnevezés pontatlan annyiban, hogy a PON2 és PON3 nem rendelkezik paraoxonáz aktivitással (29). Mindhárom forma képes hidrolizálni aromás és hosszú láncú laktonokat (30), ezt a PON család laktonáz aktivitásának nevezik.

A PON2 számos szövetben expresszálódó 44kDa molekulatömegű intracelluláris protein, mely valószínűleg szintén antioxidáns szereppel bír (31), képes gátolni in vitro az LDL oxidációt, melynek pontos mechanizmusa jelenleg tisztázatlan.

A PON3 a májban szintetizálódik, a szérumban megtalálható, HDL-hez asszociált 40 kDa molekulatömegű antioxidáns protein (32).

1.4.4. A PON1 polimorfizmusai és az aktivitást befolyásoló tényezők

A PON1 két ismert gyakori polimorfizmusa: a metionin-leucin (M55L) szubsztitúció az 55-ös pozícióban, és a 192-es aminosav glutamin-arginin (Q192R) szubsztitúciója. Az M/L55 polimorfizmus összefüggését kimutatták stroke, koronáriabetegség, Parkinson kór, dyslipidaemia (LDL-koleszterin szint) esetében, továbbá a PON fehérje mennyiségével, a PON1 mRNS szintjével és a paraoxonnal szembeni aktivitásával (összefoglalva: CJ Ng és mtsai., 2005) (33). A Q/R192 polimorfizmus az enzimaktivitást befolyásolja: a különböző szubsztrátok, így a paraoxon, diazoxon, soman és sarin hidrolízisét (összefoglalva: CJ Ng és mtsai., 2005) (33). Számos klinikai vizsgálat készült az utóbbi időben arra vonatkozóan, hogy az egyes polimorfizmusok által kódolt fehérjék genotípusa és az LDL oxidációt gátló képesség közötti összefüggést felderítsék, továbbá hogy az egyes formák különböző kardiovaszkuláris rizikót determinálnak-e. A vizsgálatok eredménye nem egybehangzó: számos esetben találtak a PON1 192R és PON1 55M genotípusok és a fokozott kardiovaszkuláris rizikó között összefüggést, míg más tanulmányokban nem (34).

Valószínűleg az enzim funkciójában és a kardiovaszkuláris mortalitásra gyakorolt hatásában nem kizárólagosan a genotípusnak van szerepe. Az utóbbi időben néhány tanulmányban azt találták hogy a PON1 szintje szignifikánsan csökkent ISZB-s esetekben a genotípustól függetlenül (34,35,36,37). A PON1 vizsgálatok a genotípus együtt értékelendő az enzim kvalitatív és kvantitatív jellemzőivel (37). A PON1 aktivitása pontosabban jellemzi a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának valószínűségét, mint a PON1 genotípusa (36,37).

Egy 2004-ben publikált, 43 korábbi vizsgálat eredményeit összegző metaanalízisben nem találtak összefüggést a 192 és 55-ös pozíciójú polimorfizmusok és a kardiovaszkuláris rizikó között (38). A PON1 gén promoter régiójában 5 polimorfizmust azonosítottak a közelmúltban, melyek korrelációt mutattak a PON1 aktivitásával és koncentrációjával (összefoglalva: SP Deakin és mtsai, 2004) (34), ezek szerepe a patológiás állapotokban jelenleg tisztázatlan.

A gyulladás folyamata az atherosclerosis progressziójának fontos része. Akut fázis folyamatában a HDL azon képessége gyengül, hogy részt vegyen a reverz koleszterol transzportban, és csökken az LDL oxidáció elleni protektív szerepe is. A PON1 aktivitását befolyásoló tényezők közé tartoznak a gyulladásos citokinek, in vitro kísérletekben a TNF (tumor nekrosis faktor), IL-1, IL-6 csökkentette a PON1 aktivitását és a PON1 mRNS expresszióját (39,40). A fokozott oxidatív stressz állapotában oxPAPC (oxidált 1-palmitoil-2-arachidonil-sn-glycero-3-foszfotilkolin) és mmLDL (minimally modified LDL) hatására szintén a PON1 downregulációját tapasztalták IL-6 mediálta útvonalon (40).

Az azonos genotípusú egyének PON1 szérumszintje és aktivitása között jelentős, akár tizenháromszoros különbségek is észlelhetők. A PON1 szérumszintjét a genetikai polimorfizmusokon kívül egyéb tényezők befolyásolhatják: diéta, életmód,

különböző kórállapotok (34). Mivel a HDL szerepel a PON1 vektoraként, ennek megfelelően a HDL deficiens állapotokban csökkent PON1 szintet detektáltak (41). A PON legnagyobb affinitással a nagyobb méretű HDL-hez asszociált, így azokban az állapotokban, amelyek a HDL méretének csökkenésével járnak, pl. diabetesben, szintén csökken a PON1 mennyisége (42).

Kimutatták, hogy a környezeti tényezők közül a diéta is hatással bír a PON1 aktivitásra: az atherogen diéta szignifikánsan csökkenti a PON1 aktivitást (43), a főzés során hevített, jelentős mennyiségű oxidált lipideket tartalmazó zsírok fogyasztása szintén aktivitáscsökkenést okozott (44), ezzel szemben az olívaolaj fogyasztása növelte az enzim aktivitását (45). Az antioxidáns polifenol tartalmú ételek és a vörösborból kivont polifenol extraktum szintén emeli az enzim aktivitását (46). A mérsékelt alkoholfogyasztás (<40 g/nap) szintén emeli az enzimaktivitást (47), ehhez hozzájárul az alkohol HDL- és ApoA-I szintet emelő hatása is (47). A szérum PON1 aktivitása és koncentrációja dohányzás esetén is szignifikánsan csökken (48). A PON1 aktivitása az életkor előrehaladtával csökken (49).

Számos vizsgálat bizonyította, hogy szekunder dyslipidaemiával, továbbá fokozott oxidatív stresszel járó állapotokban a PON1 aktivitása szignifikánsan csökken: akut myocardialis történésben (50), inzulin rezisztenciában (51), veleszületett HDL hiányban (52), I-es és II-es típusú diabetes mellitusban (54), hyperlipidaemiában, uraemiában és vesetranszplantált betegekben (55,56).

Összefoglalva elmondható, hogy a PON1 aktivitása, genotípusa (hisz a 192-es pozícióban lévő polimorfizmus) az enzim aktivitását befolyásolja ezen adatok alapján meghatározza az egyéneknél a PON1 detoxifikáló képességét, a káros oxidált lipidek elleni protektív szerepet. Így jelentőséggel bírhat minden olyan tényező és állapot,

melyről sikerül kimutatni, hogy megváltoztatja az antiatherosclerotikus enzim viselkedését.

Munkacsoportunk korábban több betegcsoportban vizsgálta a PON1 jellemzőit. Uraemiás betegcsoportban és vesetranszplantált betegekben szignifikánsan alacsonyabb HDL-re standardizált PON1 aktivitás értéket találtunk (56). A 2-es típusú diabeteses betegek esetében a szignifikánsan alacsonyabb PON1 aktivitást a 3 hónapon át alkalmazott gemfibrozil terápia szignifikánsan növelte (57), a hyperlipidaemiás betegek körében a gemfibrozil hasonló hatását detektáltuk (58).

1.5. Az Alzheimer kór és a vaszkuláris demencia

A populáció előregedésével egyre nagyobb jelentősége van a különböző eredetű demenciáknak. A gyakoriságot tekintve nagy jelentőségű az Alzheimer típusú (AD) és a vaszkuláris (VD) eredetű demencia.

A központi idegrendszerben jelentős mennyiségű nem észterifikált koleszterol található, főként a gliasejtek és a neuronok plazmamembránjában, és a myelin membránjában. A lipid metabolizmus eltéréseit összefüggésbe hozták számos neurodegeneratív betegség kialakulásával (59). Az emelkedett szérum LDL-koleszterol szint, oxidatív stressz, lipid peroxidáció és az Alzheimer betegség patomechanizmusa közötti összefüggést mutattak ki korábban (60). A pontos mechanizmus mellyel a lipid eltérések az AD patomechanizmusához hozzájárulnak még nem ismertek teljes egészében.

1.5.1. Az AD patomechanizmusa

Az Alzheimer kór fő patológiai jellemzői: β -amyloid extracelluláris depozíciója a szenilis plakkokban, neurofibrilláris csomók képződése (akkumulálódott τ -proteinekből) és az inflammatorikus folyamatok felerősödése (61). A szenilis plakkok β -amyloid protein aggregátumból állnak, amely amyloid prekursor proteinből képződik (61). Az Alzheimer betegségben az oxidált LDL lerakódik a szenilis plakkokban, a neuronok strukturális változását és pusztulását okozva. Az AD kialakulásában a lipoproteinek jelentősége jól ismert, hiszen az ApoE-2 és ApoE-3 jelenléte véd, míg az ApoE-4 elősegíti az AD kialakulását (62). Az ApoE-HDL a cerebrospinális folyadékban a sejtek és a parenchyma legfőbb lipid forrása, ill. a β -amyloid protein transzportjáért és disztribúciójáért is felelős az agyban és a plazmában (63). Az ApoE-2 és ApoE-3 a τ -proteinekhez kötődve stabil kötést hoz létre, ezáltal gátolja annak foszforilációját, így a sejt microtubuláris és citoskeletális struktúráját stabilizálja. Az ApoE-4 a τ -proteinnel instabil kötést hoz létre és így nem védi meg azt a foszforilációtól, melynek következtében neurofibrillum képződés indul meg a sejt károsodásával együtt (64).

1.5.2. Az oxidatív folyamatok szerepe az AD és VD kialakulásában

Az utóbbi évek vizsgálatai egyre inkább hangsúlyozzák az oxidatív folyamatok jelentőségét (65) mind Alzheimer kórban, valamint a vaszkuláris eredetű dementiákban egyaránt. Vaszkuláris dementiában az atherosclerosis következtében elzáródnak az agyi erek, ez okoz következményes cerebrális károsodást (65), az oxidatív folyamatok szerepe ebben, pedig jól ismert. Behl és mtsai kimutatták, hogy az amyloid szabadgyököket termel, ami károsítja a neuront (66). Dyrks és mtsai azt találták, hogy az oxidatív stressz hozzájárul a szolubilis amyloid inszolubilis plakká történő alakításához (67). A β -amyloid depozitumokban, a neurofibrilláris csomókban és a

károsodott neuronok citoplazmájában aktív Fe^{2+} ionokat mutattak ki, mely a kontroll, ép neuronokban alig található (68). Troncoso és mtsai a τ fehérjék polimerizációja és az oxidatív stressz között észleltek lineáris kapcsolatot (69). Az AD betegek vizeletéből az oxidatív stressz markereit, lipidperoxidokat mutattak ki (70), a familiáris AD-ben szenvedő betegek fibroblasztjai, lymphoblasztjai szintén szignifikánsan több lipidperoxidot (malondialdehid, 4-hidroxinonenal) tartalmaznak a vizsgálatok szerint, mint a kontrolloké (71).

A szérumban ApoA-I koncentráció és az Alzheimer betegség súlyossága között összefüggést találtak (72), továbbá a HDL in vitro gátolja a β -amyloid képződését (73).

1.5.3. A PON szerepe az AD és VD kialakulásában

A fentiek alapján az atherosclerosis és az AD patomechanizmusa között hasonlóságok fedezhetők fel, hisz mindkét esetben fontos a progresszió szempontjából a lipid-, és az oxidatív homeosztázis. Felvetődik továbbá annak a lehetősége is, hogy a patomechanizmus szempontjából fenti betegségekben nem csak a fokozott oxidatív folyamatok és lipid eltérések játszhatnak szerepet, hanem ezek kivédését szolgáló antioxidatív rendszer működésének hiányosságai, mint pl. a HDL-hez kötött PON1 aktivitásának változása is.

Pola és mtsai azt vizsgálták, hogy a PON1 genotípusa, a Q192R polimorfizmus és az Alzheimer betegség kialakulása között kimutatható-e összefüggés, mivel ezen variáció befolyással van az enzimaktivitásra bizonyos szubsztrátok esetében, és az R allélt tartalmazó HDL forma kevésbé effektív a lipid peroxidáció elleni védelemben (74). Tanulmányukban a QQ, QR, RR genotípusok eloszlása nem mutatott asszociációt a sporadikus Alzheimer betegség előfordulásával (75). Sodeyama és mtsai szintén nem találtak összefüggést az Alzheimer betegség kialakulása és a PON1 polimorfizmusa között (76). Scacchi és mtsai AD betegeket vizsgálva azt találták, hogy a 192R allél

ritkábban fordult elő mint a kontroll csoportban, míg a 75 évesnél fiatalabb koronária-betegekben gyakrabban fordult elő (77).

1.6. ABC transzporter fehérjecsald

Az ABC transzporter fehérjecsald tagjai konzervatív membrán transzporterek, melyek ATP hidrolízisével különböző molekulákat szállítanak a sejtmembránon (78). Jelenleg 48 képviselőjük ismert, melyet 7 alcsoportba soroltak. Szerkezetükről általánosságban elmondható, hogy két transzmembrán domént és két intracelluláris nukleotid kötő régiót (Nucleotide binding domains, NBD) tartalmaznak (79). A fehérjecsald egyes tagjainak a fiziológiai funkciója, a szubsztrátjai még nem pontosan ismertek, több képviselőjüknek a celluláris lipid transzportban van szerepe. Az ABCB1 és az ABCB4 foszfolipidek transzportját képes lebonyolítani a sejtmembránon át (80), az ABCA1 foszfolipid/koleszterol ko-transzporter (81). A fehérjék génjeinek defektusa különböző hereditár betegségeket okozhat: ABCA1 (Tangier betegség), ABCA4 (Stargardt betegség, retinitis pigmentosa), ABCC2 (Dubin-Johnson szindróma), ABCC6 (pseudoxanthoma elasticum), ABCC7 (cisztikus fibrózis) (82). A makrofág differenciációra, a lipid homeosztázisra kifejtett hatás következtében az ABC transzportereknek potenciális szerepük van az atherogenesisben (81).

1.6.1. Az ABCA1 protein

A májsejtekben és a bélhámsejtekben az ATP binding cassette transzporter ABCA1 képes megkötni a szabad apolipoproteineket, pl. az ApoA-I-et (83), továbbá képes lipidek transzportjára a sejtmembránon át ATP hidrolízisével (84). Az ABCA1 fő foszfolipid szubsztrátjai a foszfatidil-szerin és foszfatidil-kolin (84). Továbbá az

ABCA1 hatással bír az intracelluláris vezikuláris transzport folyamatok komponenseire mint pl: cdc42, G proteinek, „coat protein I” (COP-I) (85,86).

A reverz koleszterol transzportban szerepet játszó ABCA1 „knockout” egérmodelljében a HDL-C és az ApoA-I hiányát írták le, a lipiddel telt makrofágok a tüdőben akkumulálódnak (87). Az ABCA1-et kifejezettebben expresszáló „transzgén” egerekben emelkedett HDL-C és ApoA-I szintet észleltek, szignifikánsan kisebb mértékű aorta atherosclerotikus lézióval (88,89). Az ABCA1 fehérje génjének defektusa a Tangier betegséget (familiáris HDL deficiencia, familiáris analphalipoproteinaemia) okozza (90).

1.6.2. Az ABCC6 protein

Az ABCC6 (más néven: multidrug resistance associated protein 6, MRP6) fehérje defektusát a közelmúltban azonosították a Pseudoxanthoma elasticum (PXE) háttérében (91,92). Az ABCC6 fehérje a bazolaterális plazmamembránra lokalizálódik polarizált sejtekben (93), a sejtmembránon keresztül történő, Mg^{++} és ATP dependens efflux transzport funkcióval rendelkezik. In vitro körülmények között kimutatták hogy szubsztrátja a glutation S-konjugált leukotrién C_4 , a S-(2,4-dinitrofenil) glutation és az anionos ciklopentapeptid BQ123 (94).

Az ABCC6 fehérje pontos funkciója, természetes szubsztrátja jelenleg is ismeretlen, továbbá nem ismert a fehérje defektus és a klinikai tünetek kialakulása közötti kapcsolat sem.

1.7. A Pseudoxanthoma elasticum

A PXE monogénes, öröklődő betegség, melyre bőr-, szemtünetek és korai kardiovaszkuláris történések jellemzőek, fokozott atherosclerosissal kísérvé. A fő patológiai jellegzetessége a morfológiailag kóros, mineralizált, különböző szövetekben akkumulálódó töredezett elasztikus rostok (95). A betegség prevalenciája 1/25000 (96).

A PXE (OMIM 264800) háttérében 2000-ben azonosították az ATP binding cassette transporter C6 (ABCC6) (MIM #603234) fehérje génjének (kromoszóma lokusz: 16p13.1) a mutációját mint oki tényezőt (91,92). Ezidáig közel 80 mutációt azonosítottak a 31 exont tartalmazó *ABCC6* génben, ezek közül 3 nagyobb deléció írtak le (15 exon, 23-29 exon, 1-31 exon delécióit) (97,98,99,100,101). A mutációk többsége a 24. és 30. exon között helyezkedik el, ez a régió kódolja a fehérje konzervatív nukleotid kötő doménjét (NBD), melynek épsége a fehérje működéséhez elengedhetetlen. In vitro kísérletekben PXE-t okozó mutációt tartalmazó *ABCC6* fehérjéről kimutatták, hogy a transzportfunkciója károsodott (102). A leggyakoribb mutáció az R1141X, a második leggyakrabban előforduló mutáció a 23-29. exonig terjedő deléció (97,101,103).

Az *ABCC6* legnagyobb mértékben a májban és a vesében expresszálódik, a tünetek által érintett szövetekben (bőr, retina, erek kötőszöve) kismértékű expressziót igazoltak (104). Az *ABCC6* fehérje által transzportált eddig még ismeretlen anyagnak valószínűleg fontos szerepe van az extracelluláris mátrixban az elasztikus rostok képződésében és stabilitásában, hiszen a tünetek kialakulásának az alapja az elasztikus rostok károsodása a különböző szervekben. Az elasztikus rostok károsodásán kívül az extracelluláris mátrix egyéb komponenseinek károsodását is leírták PXE-ben mint pld.: kollagének, proteoglikánok (105,106). A PXE tehát egy olyan örökletes

anyagcserebetegség, melyben a metabolikus eltérések az extracelluláris mártix homeosztázisát károsítják.

1.7.1. A PXE tünetei

A Pseudoxanthoma elasticumra jellemző tünetek kialakulása az elasztikus rostok kóros elváltozásaival és kalcifikációjával van kapcsolatban. Hisztológiai jellemzője a bőrben az akkumulálódott pleiomorf elasztikus anyag és a töredezett kalcifikálódott elasztikus rostok (95). A különböző szervekben kialakuló tünetek szintén a kötőszövetben felhalmozódó töredezett, kalcifikálódott kóros elasztikus rostok felhalmozódásával összefüggésben alakulnak ki (95,107).

A betegség legkorábbi manifesztációja a bőrtünetek megjelenése: sárga összefolyó papulák, rugalmatlan, laza bőr, elasztin-szerű akkumulálódott amorf anyag, melyek leginkább a nyakon az axillában, a könyök és a térd hajlító felszínén, ill. a periumbilikális régióban találhatók meg (95).

A szemben a legfőbb elváltozás az „angioid streak” léziók megjelenése, mely a retina elasztinban gazdag rétegének, a Bruch membrán patológiás feltöredezésének az eredménye (107). A choroidea és a retina ereinek a károsodása további neovaszkularizációt, vérzést, hegesedést okoz, melyek komoly látáskárosodáshoz, akár vaksághoz is vezethetnek (108).

A kardiovaszkuláris rendszerben az erek károsodása következtében a PXE korai szívinfarktushoz, klaudikációhoz vezethet. Az erek rupturája következtében gasztrointesztinális vérzés léphet fel (109). Mitrális prolapszus gyakran észlelhető a PXE-s betegnél és heterozigóta rokonaik esetében (110).

A PXE klinikai megjelenése nagyfokú változatosságot mutat a PXE-ben szenvedő betegek között abban, hogy az első tünetek milyen életkorban alakulnak ki, a betegség lefolyása során mely szervrendszer károsodása kerül előtérbe, és az egyes

esetek genetikai heterogenitást is mutatnak. A heterozigóta hordozókban a betegségre jellemző tünetek megjelenhetnek enyhébb formában (111). A diagnózis felállításához a precíz hisztopatológiai vizsgálat elengedhetetlen (112).

A 6 klinikailag jól karakterizált és a diagnosztikus kritériumoknak megfelelő PXE-s betegünk genetikai háttérének vizsgálatával az eddig ismert genetikai eltéréseket igyekeztünk bővíteni. A klinikai megjelenés és a genetikai defektus között próbáltunk kapcsolatot találni, valamint fel szeretnénk hívni a figyelmet a genomiális deléciók jelentőségére ebben a betegségben. Végül a betegek bőrbioptziás mintáiból származó fibroblasztokon végzett funkcionális vizsgálatokkal próbáltunk közelebb jutni ahhoz, hogy az ABCC6 defektusa következtében hogyan alakulnak ki az atherosclerosisral rokon extracelluláris mátrix eltérései.

2. Célkitűzések:

A fentiek azt mutatják, hogy a különböző betegségekben hasonlóképpen módosulhat a lipidanyagcsere, az antioxidatív rendszer, az extracelluláris mátrix, ezáltal elősegíthetik ezen betegségekben az atherosclerosis kialakulását, progresszióját, ill. az alapbetegség patomechanizmusában is szerepet játszhatnak az atherosclerosis-sal rokon folyamatok.

A PhD értekezés gyakori elbutulással járó betegségekben, valamint egy ritka genodermatózis vizsgálatával azok patomechanizmusának megértéséhez kíván adatokat szolgáltatni.

Részletes célkitűzések:

I. Alzheimer betegségben (AD) és vaszkuláris dementiában (VD) vizsgálni

1. a lipid paramétereket
2. a szérum paraoxonáz aktivitást
3. az ApoE polimorfizmust
4. összefüggést keresni a fenti paraméterek és a betegségek kialakulásával,

valamint súlyosságával

II. Pseudoxanthoma elasticumban

1. szenvedő családok klinikai vizsgálata, családfa elemzése, az öröklődés menet azonosítása

2. a családtagok genetikai analízisével mutációk detektálása

3. az eddig még nem közölt új mutációk oki szerepének bizonyítása, jelentőségének értékelése

4. PXE fibroblasztok tenyésztése, funkcionális vizsgálata, az elasztáz aktivitás és

IL-1 szerepének tisztázása az extracelluláris mátrix eltérései hátterében.

3. Betegek és módszerek

3.1. AD, VD Betegcsoportok

A vizsgálatban 30 (20 nő, 10 férfi) Alzheimer kórban szenvedő, 40 (27 nő, 13 férfi) vaszkuláris demens beteg és 40 (26 nő, 14 férfi) korban illeszkedő egészséges önkéntes vett részt. Az AD betegek átlagéletkora 64.3, a VD betegeké 76.1, a kontroll csoporté 72.3 év volt. A beválasztáskor a BNO-10 (és DSM-IV) diagnosztikus rendszert használtuk (klinikai kép, 24 pont alatti MMSE, 60%-nál rosszabb Ranschburg-Ziehen próba, a szekunder demenciák kizárása). A részletes klinikai vizsgálatokon kívül szérumbiológiai vizsgálatokat végeztünk: ion, enzim, máj-, vese- és pajzsmirigy funkció, lipidpanel, rutin vizelet, vércélpengő meghatározás, We, szérumbiológiai B12 és folsav meghatározás, haemostasis, mellkas röntgen, VDRL, ApoE genotípus meghatározás, EEG, koponya CT/MRI vizsgálat és szükség esetén agyi SPECT illetve Carotis Doppler történt. Az MMSE minden beteg esetében 24 pont alatti volt, a két betegcsoport közötti differenciál diagnózis a Hachinski Ischaemiás Skála, a fenti vizsgálatok, az anamnesztikus adatok és a társbetegségek figyelembe vételével történtek.

A korban és a nemek megoszlásában illeszkedő kontroll csoport negatív belgyógyászati fizikális vizsgálat, a rutin laboratóriumi vizsgálatok, negatív neurológiai és pszichiátriai anamnézis, és 27-30 pont közötti MMSE teljesítése esetén kerültek be a vizsgálatba.

Mindhárom vizsgálati csoportban kizáró ok volt, ha a beteg antioxidáns hatású vagy lipidcsökkentő gyógyszert szedett.

3.2 Laboratóriumi vizsgálatok

A demens betegek és kontrollok vérvétele 12 órás éhezést követően reggel éhgyomorra történt, melyekből hemoglobin, hematokrit, fehérvérsejt-szám, májenzimek, urea, kreatinin, CK, fibrinogén, C-reaktív protein, bilirubin, húgysav, vércukor, összkoleszterin, HDL-C, triglicerid, ApoA-I és ApoB-100, lipoprotein(a), szérum paraoxonáz aktivitást határoztunk meg.

A szérum koleszterin és triglicerid szintet Boehringer Mannheim enzim kittel, a HDL-koleszterint foszforvolframát-magnézium kicsapásos módszerrel határoztuk meg. Az LDL-C értékét a Friedewald formula alapján számítottuk ki (4,5 mmol/l szérum triglicerid szint alatt). Az apolipoproteinek mérése immun-nefelometriás módszerrel történt (Orion Diagnostica kit) a DEOEC Központi Klinikai Kémia Laboratórium rutin diagnosztikus laboratóriumában.

3.3 Szérum paraoxonáz aktivitás meghatározása

A szérum paraoxonáz aktivitás mérésekor paraoxont (O,O-dietil-O-p-nitrofenilfoszfát Sigma) alkalmaztunk szubsztrátként, amely a szérumban levő paraoxonáz enzim hatására 4-nitrofenollá alakul át, abszorpciónövekedést okozva 412 nm-en. Méréskor 50 µl szérumhoz 1 ml Tris/HCl puffert (100 mmol/l, pH: 8.0) adtunk, mely 2 mmol/l CaCl₂-t és 5,5 mmol/l paraoxont tartalmazott. A 4-nitrofenol keletkezését 412 nm-en, 25°C-on követtük Hewlett-Packard 8453 UV-Visible spektrofotométerrel. Az enzimaktivitás számítása a moláris extinkciós koefficiens (17100 M⁻¹cm⁻¹) segítségével történt. Az enzimaktivitást U/ml egységben adtuk meg. 1 U az enzimaktivitás ha 1 perc alatt 1 nmol 4-nitrofenol keletkezik. 1M NaCl jelenlétében az enzim aktív helyének konformációs állapota megváltozik, amely a

paraoxon könnyebb kötődését és gyorsabb átalakulását eredményezi (113). Az egységnyi HDL-re jutó paraoxonáz aktivitást a PON/HDL hányados képzésével határoztuk meg.

Arilészteráz aktivitás mérését fenilacetát szubsztrát hidrolízisével spektrofotometriásan végeztük. 1 mM fenilacetátot 20 mM Tris/HCl (pH: 8,0) pufferhez adva szérummintát, 270 nm-en mértük az abszorpciónövekedést. Az enzimaktivitás számítása a moláris extinkciós koefficiens ($17100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) segítségével történt. Az enzimaktivitást U/ml egységben adtuk meg. 1 U az enzimaktivitás ha 1 perc alatt 1 μmol fenilacetátot hidrolizál.

3.4 ApoE polimorfizmus meghatározása

ApoE polimorfizmus meghatározása PCR-RFLP módszerrel: A vizsgálatokat perifériás vér leukocytaiból, sóextrakciós módszerrel nyert genomiális DNS-n PCR technikával, illetve az azt követően HhaI restriktív enzimemésztéssel nyert fragmentek polyacrilamid elektroforézisével végeztük el (114).

3.5 Statisztikai módszerek

A statisztikai analízishez a PC SAS rendszert (6.12 verzió) használtuk (SAS Institute, Cary NC 275313 USA), leíró statisztikát alkalmaztunk a vizsgált paraméterekre (átlag \pm SD), míg a paraméterek időbeli változását ANOVA teszttel, illetve kétmintás t-próbával vizsgáltuk. A $p < 0,05$ valószínűségi szintet tekintettük szignifikánsnak. Az egyes paraméterek között korrelációs számítást végeztünk.

3.6 Pseudoxanthoma elasticumban szenvedő betegek adatai

Tanulmányunkban 6 PXE-ban szenvedő beteg vizsgálatát végeztük. A betegek közül ketten Németországból származtak (Regensburgi Egyetem), és négyen Magyarországról (DEOEC Bőrklínika). A betegek megfeleltek a Lebwohl és mtsai által 1994-ben ajánlott PXE klasszifikációs rendszernek (112). A diagnózist bőrgyógyászati-, szemészeti-, kardiológiai vizsgálat és a bőr szövettani vizsgálata megerősítette. Az elérhető tünetmentes hozzátartozókat szintén bevontuk a vizsgálatunkba.

A genetikai vizsgálatokhoz szükséges EDTA-val alvadásgátolt vért, az elasztáz aktivitás méréséhez szükséges szérum mintát felvilágosítás és beleegyezést követően vettük le. 4 beteg (P2, P3, P4) esetén a PXE által nem érintett bőrterületből biopsziás mintavétel történt, kontrollként plasztikai műtéten átesett betegekből (n=6) műtét során nyert szövetmintát használtunk.

A tanulmány a helyi etikai bizottság szabályzata alapján és jóváhagyásával készült.

3.7 Genetikai analízis

3.7.1. Genomiális DNS preparálás

A genomiális DNS preparálását a betegek EDTA-val alvadásgátolt perifériás vénás véréből végeztük Qiagen Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével.

3.7.2. A PCR-hoz felhasznált primerek

Az *ABCC6* gén 31. exonjának nukleotid szekvenciáját a korábban publikált cDNS szekvenciához (GenBank accession number AF076622) és BAC (Bacterial

artificial chromosome) klónhoz CIT987SK-A-962B4 (GenBank accession number U91318) hasonlítottuk.

A polimeráz láncreakcióhoz felhasznált primerek az *ABCC6* exonjaihoz Charles D. Boyd-tól származtak (Pacific Biomedical Research Center, University of Hawaii, Honolulu).

A deléció detektálásához használt primereket a 1. Táblázatban tüntettük fel.

3.7.3. Polimeráz láncreakció, szekvenálás

A 31 exon amplifikációjához Qiagen Taq PCR Core Kit-et használtunk (Qiagen, Hilden, Germany), reakcióelegyünk a gyártó utasításainak megfelelő volt. A PCR-t Perkin Elmer Thermocycler-ben végeztük a következő paraméterekkel: 2 min 94 °C, 35 cikluson át 40 sec 94 °C, 1 min 55 °C 10-31 exonok esetén, (1 min 60 °C 1-9 exonok esetében), 1 min 72 °C, majd végül 5 min 72 °C. A PCR termékeket QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével tisztítottuk, etídium-bromiddal jelölve 2%-os agaróz gélen vizualizáltuk. A ciklus-szekvenálást ABI Prism Genetic Analyzer 3100 capillary automata fluoreszcens szekvenátoron (PE Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) végeztük, Big-Dye Terminator (DNA sequencing kit, PE Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) ciklus szekvenálás reakció után az amplifikált genomikus szakaszokat DyeEx 96 kit segítségével tisztítottuk, majd mindkét szálát szekvenáltuk az ABI szekvenátoron, a gyártó utasításainak megfelelően.

A deléció detektálása során a PCR reakció a fentiekkel megegyező paraméterekkel történt.

A PXE-t okozó mutáció azonosítása érdekében az *ABCC6* gén mind a 31 exonját szekvenáltuk a betegek genomiális DNS mintájából.

ABCC6ex22F	5'-CAT CTG CCA TGG GCA TGT TT-3'	Boyd CD
ABCC6ex23F	5'-GGG TGG CCA AGC CAT AAG AT-3'	Boyd CD
ABCC6ex23FR	5'-TAG AAT TCC CAG GGA CAG GG-3'	Boyd CD
ABCC6ex26FR	5'-AAC CTT TTC TGG GAG GCC AG-3'	Boyd CD
ABCC6ex26R	5'-GCC TGT AGC AGA TGT CAA CA-3'	Boyd CD
ABCC6ex31a	5'-CGT GTG GAG CTA TCG ATG AC-3'	Boyd CD
23int1F	5'-CAA GTA GCT GGG ACT ACA GG-3'	-
23int2F	5'-AAT TCC TGG CCC AAG TGA T-3'	-
25int1R	5'-TCA CAC CTA TAA TCT CAG CA-3'	-
25int2R	5'-TCC TTA AGC TTA GCA GCC TT-3'	-
25int3R	5'-TAG CAG CTC TAG CCC TGC CA-3'	-
IVS22F	5'-TCC CCT AAA GAT GGA GAG AT-3'	Le Saux 2001 (103)
IVS29R	5'-CTG TAG GCA GGT CAT TCA AA-3'	Le Saux 2001 (103)

1. Táblázat A deléció azonosításához használt primerek

3.7.4. SNP és pontmutáció detektálása az ABCC6 génben

Egyedi nukleotid polimorfizmus (single nucleotide polymorphisms) (SNP), és pont mutáció detektálást végeztünk az *ABCC6* génben TaqMan real-time PCR assay-használatával. A TaqMan assay a két hagyományos primeren kívül két hibridizáló primert tartalmaz, melyek a kérdéses két előforduló specifikus allélt ismerik fel. A két hibridizáló primer fluorokrómmal jelölt az 5' végén (VIC vagy 6-FAM) és egy nem fluoreszcens kioltó (quencher, NFQ) van a 3' végére kapcsolva, mely elnyeli a fluorokrómok jelét. A PCR reakció során az egyszálú DNS-hez illeszkedő fluorokrómmal és quencher-el jelölt hibridizáló primert a Taq polimeráz az 5'-3' exonukleáz aktivitása révén nukleotidokra bontja, így a fluorokróm fluoreszcenciás jele detektálhatóvá válik, melynek mértékéből következtetni lehet a specifikus allélek előfordulására a mintában. A PCR reakciót standard thermocycler-ben (MWG Primus) végeztük, 5 µl-es reakció eleggyel, végpont fluoreszcenciát detektáltunk ABI Prism 6700HT Analyser (TaqMan) készülékkel. A TaqMan primereket és hibridizációs primereket az ABI assay-by-design szolgálata tervezte:

Leu 495 His :L495H-f: 5'-GCA AAT GAG GCA GAA GGA CTC A-3', L495H-r: 5'-CCC AGC CAT GGA ACT TGA TG-3', L495H-VIC: 5'-VIC-CTA TCC TCA GGA ACT C-MGB-NFQ-3', L495H-FAM: 5'-FAM-CTA TCC ACA GGA ACT C-MGB-NFQ-3');

Arg 1064 Trp : R1064W-f: 5'-ACG GTT GAC GTG GAC ATT CC-3', R1064W-r: 5'-GGA GTC CAA AGG CGT ACA TCA-3', R1064W-VIC: 5'-VIC-AAC TCC GGT CCC TG-MGB-NFQ-3', R1064W-FAM: 5'-AAA CTC TGG TCC CTG C-MGB-NFQ-3').

(A szekvenciákat 5' - 3' irányban tüntettük fel, a polimorfizmusok helyét aláhúzással jelöltük).

A reakcióelegy térfogata 5 µl volt, 5 ng DNS-t tartalmazott, a primerek koncentrációja 0,9 µM, a hibridizációs primereké 0.2µM volt. Standard PCR paramétereiket alkalmaztunk: 10 perc kezdeti denaturációt követően 40 cikluson át: 15 sec 92°C-on és 1 min 60°C-on. Kontrollként előzetesen megszekvenált, ismert nukleotidszekvenciájú mintákat használtunk.

3.8. Fibroblaszt tenyésztés és stimulálás

A P2, P3, P4- es betegeink bőrbioptiás mintájából fibroblaszt tenyésztést végeztünk 5% CO₂, 95% O₂ mellett 37°C-on, Dulbecco's modified Eagle's mediumban (DMEM) (Biochrom AG, Berlin), mely 10% fetal calf serum-ot (FCS) és 5% MEM-et tartalmazott (GIBCO). A sejteket az 5-10. passzázs között használtuk. A fibroblasztokat 6 lyukú polisztirol tartályokban helyeztük el (40000 sejt/lyuk) és a további vizsgálatainkhoz szubkonfluens állapotban használtuk fel a sejttenyészeteket. In vitro stimulációhoz a mediumot 0,2% BSA-t (bovine serum albumin) és rekombináns humán IL-1β-t (100 I.U./mL) (R&D Systems) tartalmazó DMEM-ra, vagy a kontroll esetén phosphate buffer saline-ra (PBS) cseréltük, és további 48 ill. 72 órán át inkubáltuk a sejteket. Az inkubálás befejezése után jéghideg PBS-el lemostuk a sejteket, és 1 ml

PBS-ben vettük fel őket. A sejteket ultracentrifugálással homogenizáltuk 5000 g mellett 10 percen át, és a felülúszót használtuk az elasztáz aktivitás meghatározására (115).

3.9. Elasztáz aktivitás meghatározása

Az elasztáz aktivitás meghatározást Szendrői és mtsai (116) által korábban leírt módon végeztük, kis módosítással. Szukcinil-trialanin paranitroanilidot (Suc(Ala)₃pNA, SIGMA) használtunk szintetikus szubsztrátként. N-etil-pirrolidonban (Fluka), 125 mM-os koncentrációban oldottuk fel a Suc(Ala)₃NA-t, ezt az oldatot 1:10 arányban hígítottuk 0,1% Brij 35-t (Calbiochem) tartalmazó 100 mM koncentrációjú Tris-HCl pufferben, a pH:8,0 volt. A szubsztrát oldatából 20 µl-t adtunk 30 µl sertés pancreas elasztáz oldatához (Sigma) (0,286 mU/mL sertés pancreas elasztázt oldottunk fel 1:100 arányban 0,1% Brij 35-t tartalmazó 100 mM koncentrációjú Tris-HCl pufferben, pH:8,0) és 220 µL 0,1% Brij 35-t tartalmazó 100 mM-os Tris-HCl puffert adtunk hozzá. Ezt a reakcióelegyet 37°C-on inkubáltuk és a spektrofotometriásan követtük a reakciót 405 nm-en Sunrise, Tecan spektrofotométerrel (Crailsheim, Németország). 1 U elasztáz aktivitás definíciója: 1 nmol nitroanilin felszabadulása óránként (a moláris koefficiens $\epsilon_M=8800$) (115).

3.10. Fehérje meghatározás

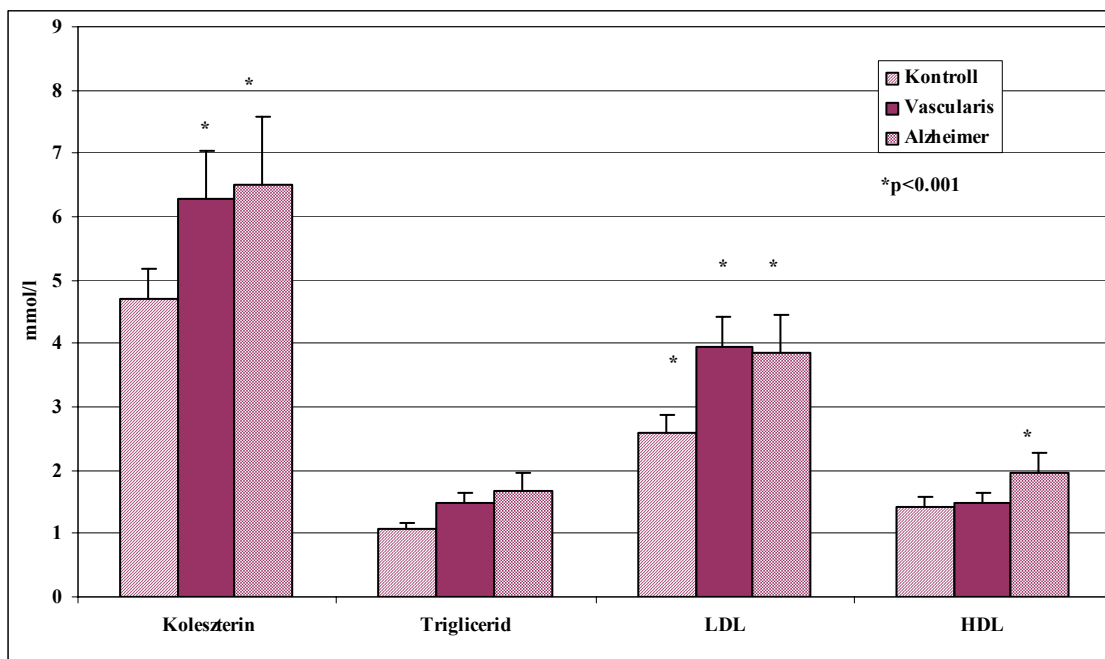
A fehérjetartalom meghatározása a Smith és mtsai (117) által leírt módon történt.

4. Eredmények

4.1. A PON aktivitása és lipid eltérések AD és VD betegeknél

4.1.1. Lipid eltérések

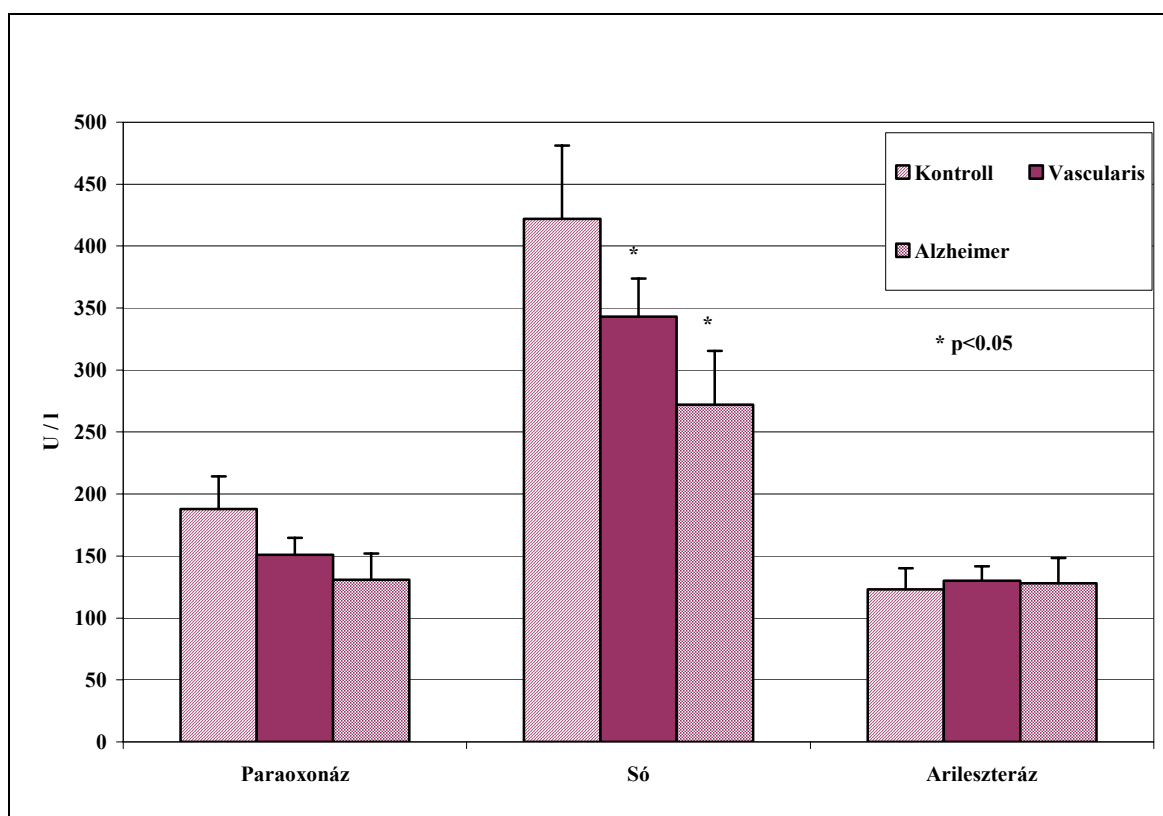
Mind az VD, mind az AD betegek koleszterin szintje szignifikánsan magasabb volt (K: 4.71 ± 0.89 , VD: 6.3 ± 0.8 , AD: 6.52 ± 0.7 mmol/l; $p < 0.001$) a kontroll csoporttal összehasonlítva. Hasonló eltérést találtunk az LDL koleszterin értékekben (K: 2.6 ± 0.6 , VD: 3.96 ± 0.8 , AD: 3.84 ± 0.6 mmol/l; $p < 0.001$). A triglicerid szint átlagértéke mindkét betegcsoportban magasabb volt, de ez nem volt szignifikáns (K: 1.06 ± 0.52 , VD: 1.47 ± 0.8 , AD: 1.68 ± 0.1 mmol/l). A védő lipoprotein frakció, a HDL szint az AD betegeknél szignifikánsan magasabb volt, mint a K és a VD csoportban (K: 1.47 ± 0.1 , VD: 1.43 ± 0.31 , AD: 1.95 ± 0.1 , mmol/l; $p < 0.001$) (1. ábra).



1. Ábra Szérum lipidértékek a vizsgált betegcsoportokban

4.1.2. A szérumban PON aktivitás

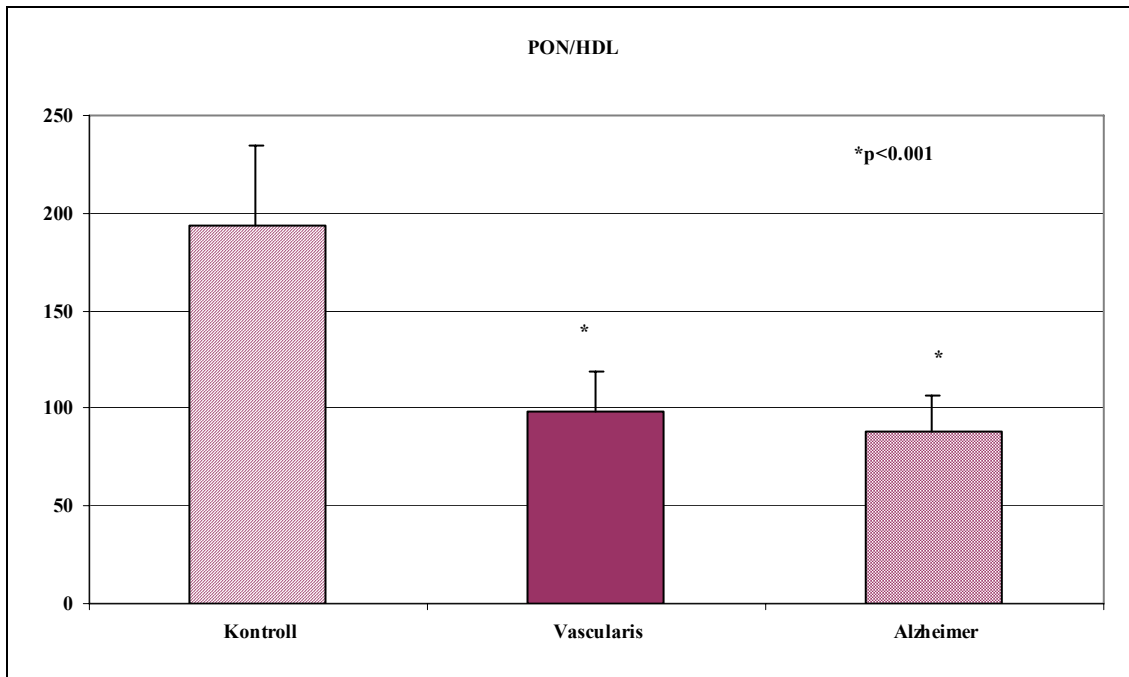
A HDL-hez kötött paraoxonáz aktivitás szignifikánsan csökkent az Alzheimer és vaszkuláris demenciában szenvedőknél az egészséges kontrollhoz képest (K: 188 ± 55 , VD: 151 ± 47 , AD: 131 ± 40 U/l; $p < 0.05$). A só stimulálta paraoxonáz aktivitás szignifikánsan alacsonyabb volt mind az AD, mind a VD csoportban (K: 422 ± 120 , VD: 343 ± 89 , AD: 272 ± 100 U/l; $p < 0.05$), míg az arilészteráz aktivitás szignifikánsan nem változott (K: 130 ± 35 , VD: 128 ± 40 , AD: 123 ± 34 U/l) (2. ábra). Az egységnyi HDL-re jutó paraoxonáz aktivitás (PON/HDL) mind az AD, mind a VD csoportban szignifikánsan csökkent (K: 194 ± 79 , VD: 98.4 ± 34 , AD: 88.4 ± 34 ; $p < 0.001$) (3. ábra).



2. ábra Szérumban paraoxonáz aktivitás

Só: 1 M NaCl jelenlétében mért maximális enzimaktivitás.

Arilészteráz: A fenilacetát hidrolízisét jellemző aktivitás



3. ábra Egységnyi HDL-ra jutó paraoxonáz aktivitás a különböző betegcsoportokban

4.1.3. ApoE isoformok eloszlása

Az ApoE isoformok közül 44%-ban fordult elő az E3/4, 33%-ban az E3/3, 19%-ban a E4/4, 4%-ban az E2/3 az Alzheimer betegcsoportban, míg a vaszkuláris demenciában szenvedőknél az ApoE megoszlása a következő volt: 56%-ban E3/3, 38%-ban E3/4, 6%-ban E2/3. Az egészséges kontrollokban 65%-ban E3/3, 23%-ban E3/4, 8%-ban E2/3, 1%-ban E4/4, 1%-ban E2/4, 2%-ban E2/2 ApoE isoform fordult elő (2. Táblázat).

	AD	VD	K
ApoE 3/4	0,44	0,38	0,23
ApoE 3/3	0,33	0,56	0,65
ApoE 2/3	0,04	0,06	0,08
ApoE 4/4	0,19		0,01
ApoE 2/2			0,02
E2 (%)	1,77	3,57	6,4
E3 (%)	58,72	76,78	80,4
E4 (%)	39,78	19,74	12,9

2. Táblázat ApoE isoformok megoszlása

4.2. PXE-ban szenvedő betegek klinikai jellemzői

P1-es betegünk egy 21 éves magyar nőbeteg (P1, IV/1) (4. Ábra), akinek serdülőkorában jelentkeztek bőrtünetei: sárgásfehér papulák, melyek helyenként plakkokká folytak össze a nyak hátsó felén és az okcipitális régióban. A PXE-t bőrbíopsziát követően a beteg 20 éves korában diagnosztizálták. Szemérintettség, kardiovaszkuláris tünetek nem voltak igazolhatóak a betegnél. A beteg családjában más PXE-s tünetekkel rendelkező egyén nem volt (3. Táblázat).

P2-es betegünk egy 49 éves magyar nőbeteg (P2, III/2) (4. Ábra) volt, aki 8 éves kora óta észlelte a jellegzetes bőrtüneteket: sárga papulák, laza, nyúlékony bőr a nyakon, a könyök hajlító felszínén, az axillában, és az ingvinális területekben. A PXE diagnózisát 18 éves korában bizonyították bőrbíopsziával. Progresszív szemérintettség is kimutatható a betegnél: "angioid streak" léziók, choroidea atrófia. Kardiovaszkuláris érintettség nem volt észlelhető (3. Táblázat). A beteg családjában más PXE-s beteg nem volt. A betegünk édesanyjának (P2, IV/1) ischaemiás szívbetegsége évtizedek óta ismert, apai nagynénje (P2, II/5) agyvérzésben halt meg. A beteg édesanyjának féltestvére (P2, II/1) 64 éves korában szívinfarktus következtében halt meg.

P3-as betegünk 23 éves, német származású férfibeteg (P3, III/4) (4. Ábra), akinek a bőrtünetei 4 éves korban kezdődtek a nyak laterális oldalán. Diagnózisát bőrbíopsziával az ő esetében is alátámasztották. Az alapbetegségből következő szemérintettsége és kardiovaszkuláris komplikációk nála nem állnak fenn (3. Táblázat). Rokonai között PXE-s tünetekkel rendelkező egyén nem ismert.

P4-es betegünk 53 éves német férfibeteg (P4, II/2) (4. Ábra) volt. 22 éves kora óta ismertek szemtünetei („angioid streak” léziók), napjainkban komoly látáskárosodástól szenved (80% vízuscsökkenés mindkét szemén). Karakterisztikus

bőrtünetekkel rendelkezik a nyak lateralis oldalain és mindkét könyökhajlatban 10 éves kora óta. Bőrbiopszia igazolta a PXE diagnózist. Kardiovaszkuláris tünetei nem voltak észlelhetőek (3. Táblázat). Családjában több érintett rokont nem találtunk. A beteg édesapja (P4, I/3) 74 évesen szívinfarktusból halt meg.

P5-ös betegünk 19 éves, magyar nőbeteg (P5, III/3) (4. Ábra). Bőrtünetei 10 éves korában kezdődtek: sárga papulák, laza bőr a hónaljterületen, a köldök körüli régióban, a nyakon és a lágyékhajlatban. Bőrbiopsziás eredménye jellegzetes volt PXE-ra. Szemtünetei nincsenek. Szívultrahang során mitrális prolapszust fedeztek fel (3. Táblázat). Családjában több PXE-s beteg nem volt ismert. Betegünk édesapja (P5, II/2) hypertóniában szenvedett, egyik apai nagynénje 67 éves korában szívinfarktusból halt meg, másik apai nagynénje 63 éves volt amikor szívinfarktus következtében meghalt.

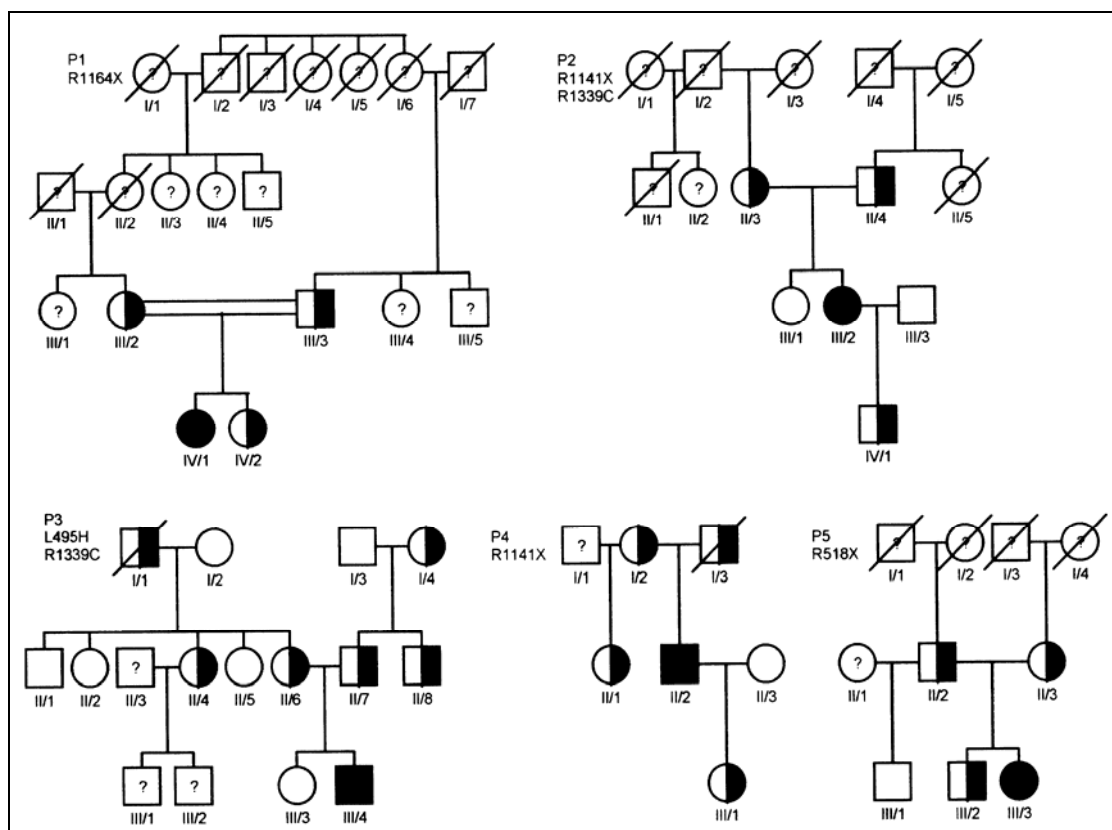
P1-P5 betegeinkről elmondhatjuk, hogy betegségük megjelenése, klinikai lefolyása megfelel az irodalomban közölt esetismertetéseknek. A családokban gyakori a hypertonia, a kardio- és cerebrovaszkuláris betegségek előfordulása, mely a hordozó heterozigóta genotípussal összefüggésben áll.

P6-os betegünk klinikai megjelenése szintén jellegzetes a pseudoxanthoma elasticum tüneteire, de a fenti betegektől eltérően súlyosabb, szisztémás formában jelentkezett, igen korai kezdettel (3. Táblázat).

A beteg bőrtüneteit 7 éves korában fedezték fel: sárga papulák a periumbilikális területen, a nyak lateralis felén, az axillában és a vállakon. Jelenleg, 27 éves korban igen kiterjedt, szisztémás bőrérzékenységgel rendelkezik. A PXE diagnózisát bizonyító bőrbiopszia a beteg 12 éves korában történt.

Egy éves korában derült ki hypertóniája, ennek hátterében renovaszkuláris eredet igazolódott, 8 éves korában az arteria renalis szűkületét sebészi úton

megoldották, azóta vérnyomása normalizálódott. Szemészeti komplikációit 17 éves korában fedezték fel, „angioid streak”, bilaterális macula degeneráció és bal oldali csökkent vízus került leírásra. Majd ezt követően mitrális prolapszust és mitrális insufficienciát diagnosztizáltak. Mindhárom jellegzetesen PXE-ben érintett szervben igen korán súlyos formában jelentkeztek tünetek ebben az esetben. A beteg családjában nem tudtak rokonházasságról, és PXE-re jellegzetes bőrtünetei nem voltak egy családtagnak sem. Mindkét szülő anamnézisében hypertonia szerepel, és az édesanyjának tranzitórikus ischaemiás agyi keringészavara volt, mely hemiparézissel járt. A családban angina pectoris, szívinfarktus, gasztrointesztinális vérzés, klaudikáció, lipideltérések nem fordultak elő.



4. Ábra. PXE-ban szenvedő betegeink családfavizsgálata

	Beteg	Mutáció	Exon	Aminosav	Genotípus	Betegség kezdete	Bőr-tünetek, biopszia	Szemtünetek	Kardio-vaszkuláris tünetek
1.	21 éves magyar nő	C3490T	24.	R1164X	Homozigóta	12 év	PXE-re jellemző Biopszia:+	-	-
2.	49 éves magyar nő	C3421T C4015T	24. 28.	R1141X R1339C	Kompond heterozigóta	8 év	PXE-re jellemző Biopszia:+	Angioid streak, Choroidea atrófia	-
3.	23 éves német férfi	<i>T1484A</i> C4015T	12. 28.	<i>L495H</i> R1339C	Kompond heterozigóta	4 év	PXE-re jellemző Biopszia:+	Pepper and salt fundus	-
4.	53 éves német férfi	C3421T	24.	R1141X	Homozigóta	22 év	PXE-re jellemző Biopszia:+	Angioid streak, Súlyos látásromlás	-
5.	19 éves magyar nő	C1552T	12.	R518X	Homozigóta	10 év	PXE-re jellemző Biopszia:+	-	Mitrális prolapszus
6.	27 éves magyar nő	del23-29 del24-25	23-29 24-25		Kompond heterozigóta	7 év	Súlyos, disszeminált Biopszia:+	Angioid streak, bilaterális macula degeneráció, csökkent vízus (17 é)	Hypertonia (1é), art. renalis sztenózis, mitrális prolapszus, mitrális insuficiencia

3. Táblázat A PXE-ban szenvedő betegek adatainak összefoglalása

4.3. PXE-ban szenvedő betegeink genetikai analízise, családfa elemzése

Klinikailag jól karakterizált 6 PXE-ben szenvedő beteg és elérhető családtagjaik *ABCC6* génjének genetikai analízisét végeztük.

5 betegünk esetében (P1-P5) a rendelkezésünkre álló adatok segítségével családfa vizsgálatot végeztünk (4. Ábra). A családfavizsgálat minden esetben recesszív öröklődésmentet igazolt. Ebben az 5 betegünkben 5 különböző pontmutációt találtunk (3. Táblázat), 3 közülük homozigóta volt (P1, P4, P5), a P2 és P3 beteg esetében kompond heterozigóta genotípust sikerült igazolni. A pontmutációk között 2 misszensz R1339C, L495H, és 3 nonszensz mutációt (R1164X, R1141X, R518X) igazoltunk.

P1-es betegünk (P1, IV/1) esetében a 24-es exonban homozigóta misszensz mutációt azonosítottunk, a 3490-es nukleotid C -T cseréjét (C3490T), ami az 1164-es

Arginin helyett stop kodont eredményez (R1164X), a képződő lánc idő előtti végződésével. Ezt a mutációt Struk és Meloni munkacsoportjai (92,118) közölték korábban. A családtagok vizsgálata során azt találtuk, hogy a szülők (P1; III/2, III/3) és a beteg (P1) nővére (P1; IV/2) heterozigóták az R1164X mutációra. A családfavizsgálat alapján látható a rokonházasság a III/2 és III/3 családtagok között (4. Ábra).

P2-es betegünk egy (P2; III/2) genetikai vizsgálata során az *ABCC6* egyik alléljén a 24-es exonban a 3421-es nukleotid C –T cseréjét azonosítottuk, mely Arginin helyett stop kodont jelent, így a peptidlánc szintézise idő előtt terminálódik (R1141X), ezt a nonszensz mutációt korábban már közölték az irodalomban, mint PXE-t okozó mutációt (103,91). A másik allélen a 28-as exonban a 4015. pozícióban detektált C –T szubsztitúció Arginin –Cystein cserét jelent az aminosavak esetében (R1339C). Ezt a mutációt, mint PXE-t okozó mutációt Struk és Le Saux munkacsoportjai írták le (92,103). Betegünk compound heterozigóta volt a részletezett mutációkra. Az apa (II/4) és a beteg fia (IV/1) heterozigótaként hordozzák az R1141X mutációt, míg betegünk édesanyja az R1339C mutációt hordozza.

P3-as betegünk (P3; III/4) genetikai analízise (hasonlóan a P2 betegünkhöz) során a 28-as exonban az R1339C (C4015T) misszensz mutációt azonosítottuk, erre nézve a beteg heterozigóta volt. Ezen kívül a korábban már publikált betegségokozó mutáción kívül két, eddig még nem közölt nukleotid polimorfizmust találtunk: a 23-as exonban a R1064W (C3190T), és a 12-es exonban L495H (T1484A) eltéréseket. Ezt követően SNP és mutáció detektálást végeztünk TaqMan real-time PCR assay használatával 464 egészséges kontroll csoporton. A kontroll csoport egészséges német származású egyének DNS mintáiból állt. Vizsgálatunkban a R1064W (C3190T) pontmutáció 2%-os allélfrekvenciával fordult elő a 464 vizsgált kontroll között, így ez nem bizonyult betegség okozó mutációnak. Ezzel ellentétben a T1484A (L495H)

pontmutáció, mely Leucin – Hisztidin cserét eredményez a 12-es exonban, nem fordult elő a vizsgált nagyszámú kontroll csoportban, így ezt tekinthetjük betegségkókozó mutációnak, melyet elsőként detektáltunk. Így a betegünk compound heterozigóta az R1339C és a L495H mutációkra. Az L495H új mutációt a család anyai ágában sikerült azonosítani, a betegünk édesanyja (P3; II/6), anyai nagynénje (P3;II/4) és anyai nagyapja (P3;I/1) heterozigótaként hordozzák ezt a mutációt. Az R1339C mutációt a család apai ágában sikerült azonosítani, betegünk édesapja (P3;II/7), nagybátyja (P3; II/8), és apai nagymamája hordozta ezt a mutációt.

P4-es betegünk (P4;II/2) genetikai analízise során azt találtuk, hogy homozigóta a C3421T (R1141X) stop kodont eredményező mutációra, mely a P2-es betegünkben is előfordult compound heterozigóta formában. A beteg édesapja (P4;I/3), édesanyja (P4;I/2), féltestvére (P4;II/1) és lánya (P4;III/1) heterozigóta formában hordozzák ezt a mutációt. A családfavizsgálat során rokonházasságot nem sikerült igazolni.

P5-ös betegünk (P5;III/3) homozigóta volt a már ismert (118) C1552T (R518X) nukleotid szubsztitúcióra a 12-es exonban, mely stop kodont és idő előtti lánc terminációt eredményez. A családtagok vizsgálata során a szülők és a fiútestvér (P5;II/2, II/3,III/2) bizonyult hordozónak (4. Ábra).

P6-os betegünk (3. Táblázat) DNS szekvenálása során nem sikerült mutációt igazolni az 1-23 és 26-31 exonokban. A 24. és 25. exon amplifikációja során végzett PCR reakció nem eredményezett PCR produktumot, így felvetődött hogy a beteg mindkét alléljén hiányzik ez a genomiális régió. Hosszú DNS templátok amplifikálására alkalmas „Long range PCR” reakcióval a 23-26-os exon régiójában a betegben (2,03 kilobázis, kb) rövidebb PCR produktum keletkezett, mint a kontrollban (6,71 kb) (5. Ábra). A beteg édesanyja heterozigóta volt erre a 24-25 -ös exont tartalmazó delécióra,

mivel az ő esetében a rövidebb PCR termék mellett normál nagyságú PCR produktum is keletkezett (5. Ábra).

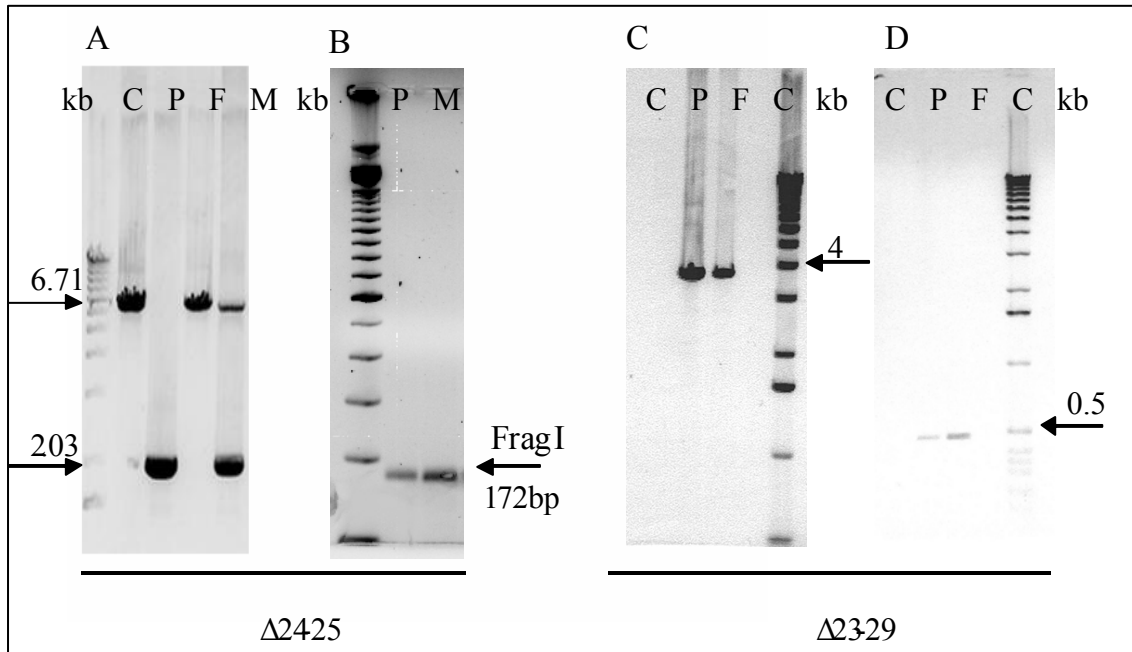
Feltételeztük, hogy betegünk édesapjának egyik alléljén szintén kimutatható egy 24-25 exont is tartalmazó deléció. Az intronikus primereket kombinációban alkalmazva azt találtuk, hogy heterozigóta a gyakran előforduló 23-29 exonokat tartalmazó delécióra. A 22-es és 29-es intronokban elhelyezkedő primerekkel (1. Táblázat, 103) amplifikálva DNS mintáját kisméretű PCR produktumot detektáltunk, mely deléció jelenlétére utalt. A törési pontot a Le Saux és mtsai által közölt módon azonosítottuk (103) (5. Ábra). A családtagok analízise alapján kimutatható volt, hogy a P6-os betegünk szüleitől örökölt alléljei genomikus deléciót tartalmaztak, az apától örökölt del23-29 a populációban gyakran előforduló mutáció (97), míg a del24-25 eddig még ismeretlen, korábban nem közölt genetikai eltérés.

4.3.1. A del24-25 törési pontjának azonosítása

Az új, eddig még nem közölt deléció törési pontjának azonosítása céljából a P6-os beteg DNS mintájából a 23 forward (F) és 26 reverse (R) primerekkel történt PCR reakcióból származó 2,03 kb nagyságú fúziós PCR termékben DNS szekvenálást végeztünk olyan primerekkel, melyek a 24-es és 25-ös exonok köré lokalizálódnak. A 23F és a 23FR (23 reverse primer az ellenkező irányultságban) értékelhető szekvenciát eredményezett. A 23int1F primer a jelzett pontig (6. Ábra, +359) eredményezett értékelhető szekvenciát, ott néhány ismétlődő timin-t (T) tartalmaz a szekvencia, melyet néhány ismétlődő adenin (A) és T követ. A 23int2F primerünk nem eredményezett értékelhető szekvenciát, mivel ez már a deléció következtében már nem tudott illeszkedni a fúziós PCR termékhez. Sem a 24-es, sem a 25-ös exonhoz tartozó primerek nem működtek a fúziós PCR produktumon.

A másik oldalon 26R, a 26 FR (a 26F primer reverse változata), a 25int3R, a 25int2R primerek értékelhető szekvenciát eredményeztek a fúziós PCR termék szekvenálása során. A 25int1R primer a jelölt bázisig (6. Ábra, -1074) eredményezett értékelhető szekvenciát, ez egy ismétlődő timineket tartalmazó szakasz, melyet nem olvasható, egymásra vetülő szignálok követtek, ez a jelenség gyakran látható hosszú ismétlődő timineket tartalmazó DNS szakaszok körül, ugyanis a Taq polimeráz képtelen ezen régiók szekvenálására (stuttering). Fontos hangsúlyozni, hogy a közel 700 bázissal proximálisabban lokalizált 25R primer már nem eredményezett olvasható szekvenciát a 2,03 kb nagyságú fúziós PCR termékben, mely arra utal, hogy az a régió már nem része a fúziós terméknek (6. Ábra).

A törési pont fentebb részletezett megközelítése után a fúzió helyének megerősítése céljából újabb PCR reakciót végeztünk a 2,03 kb nagyságú fúziós termékben, a törési ponthoz lehető legközelebb pozícióba lokalizált primerekkel: 23int1F és 25int1R (1. Táblázat). Ebben a reakcióban egy 172 bázispár hosszúságú terméket kaptunk (5. Ábra), ennek szekvenálása megerősítette az előzőekben feltételezett törési pontot (6. Ábra), ugyanazt az eredményt kaptuk, mint a 2,03 kb hosszúságú fúziós termék szekvenálása során.



5. Ábra. A P6 beteg deléciójának kimutatása PCR produktumok analízisével agaróz gélen

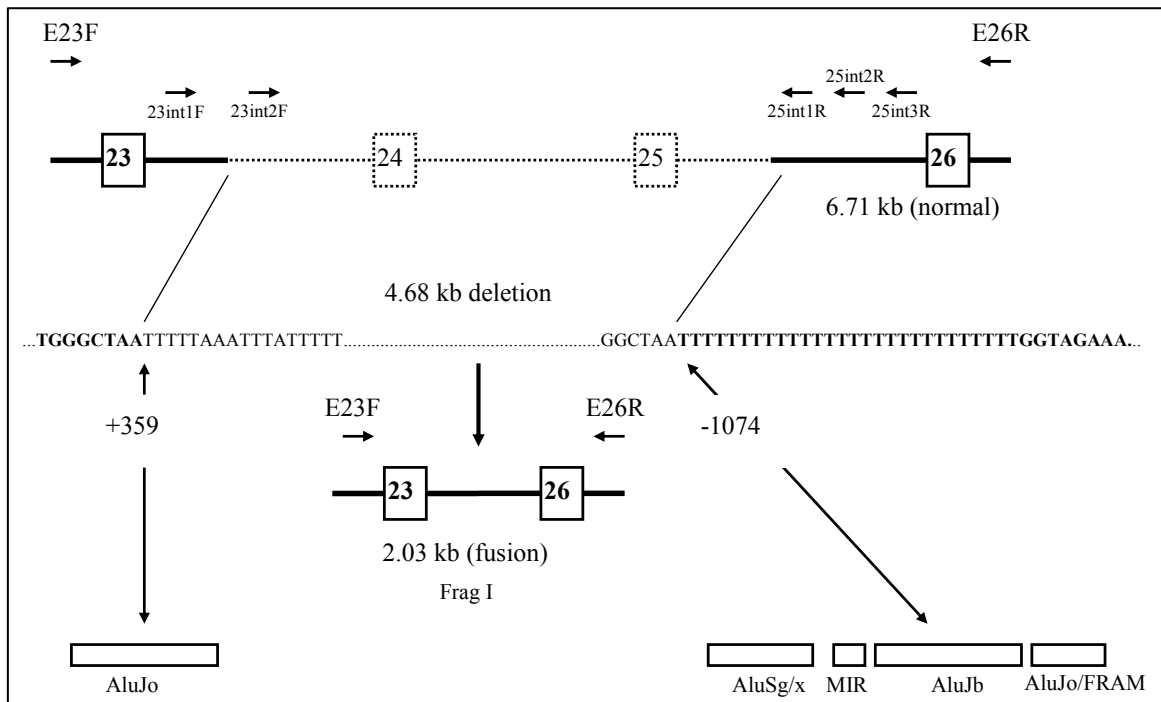
A betegen a 24-es és 25-ös exon PCR reakciója során PCR termék nem volt kimutatható (az ábrán nincs feltüntetve).

A: Hosszú DNS templátok amplifikálására alkalmas „Long range PCR” reakcióval a 23-26-os exon régiójában a 23F és 26R primerekkel (1. Táblázat) végeztünk PCR-t kontroll (C oszlop), a P6-os beteg (P oszlop), a beteg édesapja (F oszlop) és édesanyja (M oszlop) genomikus DNS mintájából, a betegen (P) 4,68 kilobázissal (kb) rövidebb, (2,03 kb nagyságú) PCR produktum keletkezett, mint a kontrollban (6,71 kb). A beteg édesanyja heterozigóta erre a delécióra, az ő esetében (M) egy normál méretű (6,71 kb) és egy rövidebb PCR produktum (2,03 kb) is keletkezett.

B: A 2,03 kb nagyságú fúziós PCR termék reamplifikációját végeztük a törési ponthoz közelebb elhelyezkedő 23int1F és 25int1R primerekkel, egy 172 bp nagyságú fúziós terméket kaptunk, mely tartalmazza a törési pontot a beteg (P) és édesanyja (M) mintájában.

C: „Long range” PCR a 22F és 31R primerekkel (1. Táblázat). A nagy távolság miatt PCR termék nem keletkezhet a kontroll DNS mintában (C). A betegen (P) és az édesapja (F) esetén egy rövidebb (4 kb nagyságú) PCR produktum volt kimutatható az allélről ahol a deléció bekövetkezett.

D: Az IVS22F és IVS29R intronikus primerek (1. Táblázat) használatával egy a törési pontot is tartalmazó 0,5 kb nagyságú PCR termék keletkezett a betegen (P) és az édesapja esetén (F), de a kontroll mintában nem volt kimutatható.



6. Ábra. Az *ABCC6*del24-25 deléció genomikus elhelyezkedése és a törési pont lokalizációja

A vad típusú, 23F és 26R primerek használatával keletkező PCR termék 6,71 kb hosszúságú. A genomikus deléció, mely a betegben és édesanyjában volt kimutatható 4,68 kb nagyságú, és egy 2,03 kb nagyságú PCR produktumot eredményez a 23F és 26R primerekkel végzett PCR során. A 2,03 kb nagyságú fragmentum DNS szekvenálásával kimutattuk a törési pontokat a 23-as és 25-ös intronban két, ismétlődő timinekből álló helyen. A törési pontok pozícióját a 23-as exon 3'- végétől (+359 nukleotid) és a 26-os exon 5'- végétől (-1064 nukleotid) adtuk meg. A rekombináció Alu-repeat szakasz közepén jött létre. A további közeli ismétlődő szakaszokat is feltüntettük (Alu, MIR).

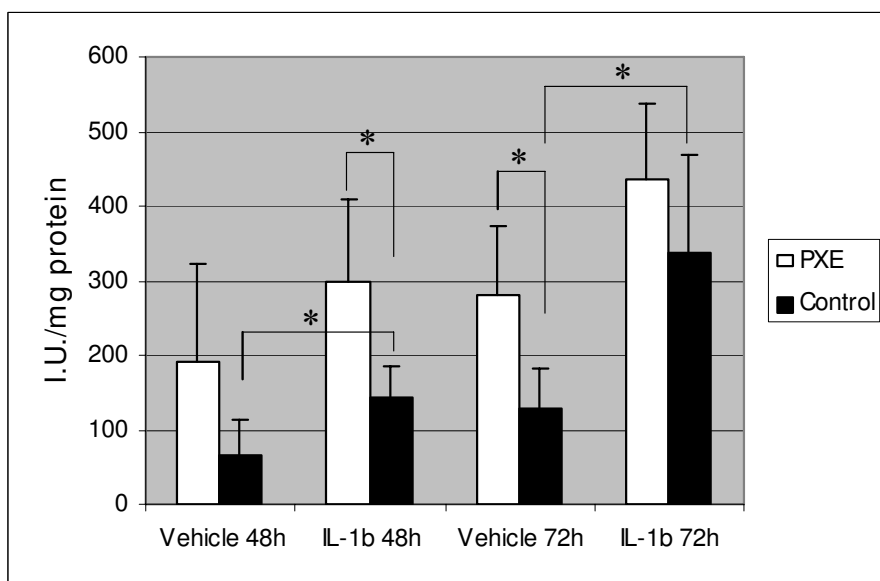
4.4. Elasztáz aktivitás

Vizsgálatainkban 4 PXE-ban szenvedő betegünk (P2,P3,P4) bőrbioptizás mintájából származó fibroblasztokból intracelluláris elasztáz aktivitást határoztunk meg, és összehasonlítottuk 6 egészséges kontrollból származó fibroblaszt mintájával.

Kísérletünkben mind a kontroll, mind a PXE fibroblasztokban nagyobb elasztáz aktivitást kaptunk 72 órás inkubálás után, mint 48 órás inkubálást követően. A PXE-

sejtekben az alap elasztáz aktivitás nagyobb volt, mint a normál fibroblasztoké, ez a különbség 48 órás inkubálás után nem bizonyult szignifikánsnak T teszt alkalmazásával, de 72 órás inkubálást követően PXE sejtek elasztáz aktivitása szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontrollokban ($p < 0,05$) (7. Ábra).

A szubkonfluens fibroblaszt tenyészeteket IL-1 β -val stimuláltuk (100 U/ml), ez szignifikáns elasztáz aktivitásnövekedést eredményezett mindkét csoportban ($p < 0,05$). Az IL-1 β stimuláció nagyobb mértékű elasztáz aktivitásnövekedést idézett elő a kontroll sejtekben (48 óra inkubáció után 117%-al, 72 óra inkubáció 164%-al nőtt meg az enzimaktivitás), mint a PXE sejtekben (48 óra stimulálás után 55%-al, 72 óra stimulálás után 56%-al nagyobb enzimaktivitást detektáltunk) (7. Ábra).



7. Ábra. Elasztáz aktivitás meghatározása

In vitro intracelluláris elasztáz aktivitás meghatározás egészséges kontroll egyének, és PXE-ban szenvedő betegek bőrbioptziás mintájából nyert fibroblasztokban IL-1 β (100 U/ml; 48 és 72 h) stimulációval és anélkül. A „vehicle” reprezentálja az IL-1 β stimuláció nélküli mintákat, ahol az inkubáció során a sejt kultúrához használt mediumhoz 0,2% BSA-t adtunk. Az oszlopokon a 4 PXE beteg és 6 normál kontroll minta enzimaktivitásainak átlagértékét tüntettük fel \pm S.D. egységnyi proteinmennyiségre vonatkoztatva.

4.5. Új eredmények

1. Az Alzheimer kórban és a vaszkuláris dementiában szenvedő betegcsoportokban szignifikánsan emelkedett koleszterin és LDL koleszterin mellett a só stimulálta paraoxonáz aktivitás szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll csoportban, míg az enzim arilészteráz aktivitása szignifikánsan nem változott.

2. A szignifikánsan magasabb HDL szinttel rendelkező Alzheimer kóros betegcsoportban szignifikánsan alacsonyabb egységnyi HDL-re jutó paraoxonáz aktivitást észleltünk. A vaszkuláris dementiában szenvedő betegek esetén a HDL szint szignifikánsan nem különbözött a kontroll csoporttól, az egységnyi HDL-re jutó paraoxonáz aktivitás szintén szignifikánsan alacsonyabb volt, az Alzheimer kórban szenvedő betegekéhez hasonlóan.

3. PXE-ben szenvedő betegeinkben és családjaikban autoszómális recesszív öröklődés menet mellett egy esetben új, eddig még nem közölt T1484A (L495H) pontmutációt azonosítottunk az *ABCC6* génben, mely Leucin – Hisztidin cserét eredményez a 12-es exonban. Oki szerepét SNP és mutáció detektálásával, TaqMan real-time PCR assay-használatával bizonyítottuk nagyszámú egészséges kontroll vizsgálata során.

4. A PXE súlyos, szisztémás formájában szenvedő betegünk genetikai vizsgálata során új, eddig még nem közölt *ABCC6*del24-25 genomikus deléciót azonosítottunk kompond heterozigóta állapotban a gyakori *ABCC6*del23-29 delécióval. Az új deléció törési pontját meghatároztuk, mely Alu repeat szakaszok közelében jött létre.

Az irodalomban eddig még nem volt ismert olyan eset amelyben az *ABCC6* mindkét allélján deléción fordult volna elő a PXE hátterében.

5. PXE fibroblasztokban szignifikánsan nagyobb intracelluláris elasztáz aktivitást kaptunk 72 órás inkubálás után a kontroll fibroblasztokéhoz képest.

A szubkonfluens fibroblaszt tenyészeteket IL-1 β proinflammatorikus citokinnel stimuláltuk, ez szignifikáns elasztáz aktivitásnövekedést eredményezett mindkét csoportban. Az IL-1 β stimuláció szignifikánsan nagyobb mértékű elasztáz aktivitásnövekedést idézett elő a kontroll fibroblasztokban mint a PXE sejtekben, jelezve, hogy a PXE fibroblasztok rezisztensebbek az IL-1 β stimulációra.

5. Megbeszélés

5.1. Lipideltérések és az antioxidáns PON1 aktivitása AD és VD betegcsoportokban

Az Alzheimer betegségben és az atherosclerosisban észlelt pathogenetikai történések sok vonatkozásban hasonlóak. Mindkettőben megfigyelhető a lipidanyagcsere megváltozása és az oxidatív folyamatok szerepe a betegség kialakulásában. A vaszkuláris és Alzheimer dementiák egyre növekvő száma szükségessé teszi a jobb megismerés érdekében azokat a vizsgálatokat, amelyek a patomechanizmus egyes lépéseinek pontosabb tisztázását eredményezik.

Az irodalmi adatokkal egyezően azt találtuk, hogy az ApoE-4 isoform jóval gyakrabban fordul elő AD típusú demencia esetén (62). Az ApoE-4 előfordulása 39.8% volt az Alzheimer típusú dementiában, míg 19.7% a vaszkuláris dementiában. Hasonlóan a mi eredményeinkhez Kálmán és mtsai 28%-os ApoE-4 allél előfordulást találtak hazai AD betegek populációjában (119), míg VD betegek esetén az ApoE-4 előfordulása 19%-volt (120).

A HDL atherogenesis gátló hatása részben az antioxidáns hatásával függ össze (16,17). Mackness és mtsai kimutatták, hogy in vitro körülmények között a HDL megvédi az LDL-t a lipid peroxidok akkumulációjától (121). Ismert az is, hogy diabetes mellitusban, hypercholesterinaemiában, acut myocardialis infarctuson átesett egyéneknél, valamint a fokozott érlelmeszesedésre hajlamosító krónikus hemodializált és vesetranszplantált egyéneknél csökken a HDL-hez kötött paraoxonáz aktivitás (122).

Jelen munkánkban azt találtuk, hogy a vaszkuláris eredetű és Alzheimer típusú

dementiában szenvedő egyének szérum koleszterin és LDL koleszterin szintje szignifikánsan magasabb volt az egészséges kontrollcsoporthoz képest. Ezzel szemben az Alzheimer típusú demenciában szenvedő egyének HDL koleszterin szintje szignifikánsan magasabb volt, mint a vaszkuláris demenciában szenvedők és az egészséges kontroll egyéneké. Hasonló eredményekről számoltak be Kálmán és mtsai is (123).

Ugyanakkor a HDL-hez kötött paraoxonáz enzim aktivitás szignifikánsan nem változott a betegcsoportokban az egészséges kontrollcsoporthoz képest, csak a só stimulálta paraoxonáz aktivitás csökkent szignifikánsan a betegcsoportban, ami azt sugallja, hogy a fokozott aktivitásra kevésbé képesek a fenti betegcsoportban szenvedő egyének HDL-hez kötött enzimjei. Corrigan és mtsainak vizsgálatai alapján felvetődik annak a lehetősége, hogy a HDL összetevőinek megváltozása játszhat szerepet ezen aktivitásváltozásokban (124).

Mivel a paraoxonáz a HDL-hez kötődik és a korábbi vizsgálatok során azt találtuk, hogy az Alzheimer demenciában szenvedők HDL szintje szignifikánsan magasabb volt, ez felvetette azt a kérdést, hogy az egységnyi HDL-re vonatkoztatott PON aktivitás hogyan változik a betegcsoportban az egészséges kontrollcsoporthoz képest. Az egészséges kontrollcsoporthoz képest szignifikánsan csökkent mind az Alzheimer típusú, mind a vaszkuláris demenciában szenvedő egyének PON/HDL aktivitása. Thome és mtsai vizsgálatai is arra hívták fel a figyelmet, hogy az antioxidatív rendszer csökkent kapacitása szerepet játszhat az AD patomechanizmusában, ugyanis AD betegcsoportban leírták a Mn-SOD szignifikáns csökkenését (125). Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a patomechanizmus szempontjából fenti betegségekben nem csak a fokozott oxidatív folyamatok és lipid eltérések játszhatnak szerepet, hanem ezek kivédését szolgáló ún. antioxidatív rendszer működésének, jelen esetben a HDL-hez kötött paraoxonáz

aktivitásának csökkenése is.

5.2. A PXE-ben szenvedő betegek klinikai manifesztációja és genetikai eltérései

P6-os 27 éves betegünk genetikai analízise során a PXE háttérében genomikus deléciókat igazoltunk az *ABCC6* gén mindkét allélján. Azonosítottuk a hibás allélek szülői eredetét (anya: del24-25, apa: del23-29), és autoszómális recesszív öröklődés menetét találtunk. Két deléció kombinálódása egy betegben eddig még nem került közlésre.

A 23-29 exonokat érintő deléció nagy gyakorisággal fordul elő a PXE-s betegek között: Le Saux és mtsai által készített kohort vizsgálatban az *ABCC6*del23-29 12,9 %-os frekvenciával fordult elő 122 független PXE-s beteg körében az Amerikai Egyesült Államokban (103), egy francia tanulmányban 13%-os gyakoriságot találtak (98). A legtöbb mutáció a fehérje C-terminális részét érinti, különösen a 24. exonban gyakoriak az eltérések, amely a nagyobb intracelluláris hurkot kódolja a fehérjén belül. Az NBD2 Walker régiót a 28-30 exonok kódolják. Mindkét régió kulcsfontosságú a fehérje ATP kötéséhez és transzport funkciójához (103). Az *ABCC6*del23-29 a 3. transzmembrán domén és az NBD2 szekvenciájának az elvesztéséhez vezet, így egy funkcióképtelen *ABCC6* proteint eredményez (126).

A del24-25 új mutáció esetében azonosítottuk a törési pontot a 23. és 25. intronban 6. Ábrán látható a nukleotid szekvencia. A deléció lokalizációja repetitív DNS szakaszok között (Alu repeat) helyezkedik el. A proximális törési pont egy 295 bázispár hosszúságú, inverz orientációjú „Alu-repeat” (AluJo) szakasz közepén helyezkedik el. A disztális törési pont egy ismétlődő T-ket tartalmazó szakaszban helyezkedik el, a 295 bázispár hosszúságú „Alu-repeat” (AluJb) szakasz közepén, melyet distal felé egy 143 bázispár hosszúságú „AluJo/FRAM repeat”, egy 65 bázispár

hosszúságú „mammalian interspersed repeat (MIR)” szakasz és proximal felé egy 171 bázispár hosszúságú „AluSg/x-repeat” szakasz szegélyez.

A deléció pozícióit a 16-os kromoszóma teljes szekvenciájának adatbázisa alapján (2004. máj.) határoztuk meg.

A PXE klinikai megjelenése intra- és interfamiliáris változatosságot mutat. Az esetek egy részében a bőr manifesztációk állnak előtérben enyhe szemérintettséggel, más esetekben pedig fordítva: a szem eltérései a súlyosabbak (95).

A bőrtünetek megjelenhetnek már gyermekkorban, de általában fiatal felnőttkorban alakulnak ki. Az esetek egy részében a bőrtünetek súlyosak, minimális kardiovaszkuláris- és szemtünetekkel, míg más esetekben a kardiovaszkuláris tünetek dominálnak, az enyhe bőrérintettség mellett (111). Ezidáig nem írtak le egyértelmű genotípus-fenotípus korrelációt (97,98,101,103). Összefüggést találtak a beteg életkora és a betegség súlyossága között (99). Egy francia kohort vizsgálatban, melybe 19 PXE-s családot vontak be, mindössze egyetlen, 51 éves betegnél találták meg a PXE teljes klinikai manifesztációját, az összes, a betegségre jellemző szervrendszeri manifesztációt (98).

P6-os, 27 éves betegünkben az *ABCC6* mindkét allélján deléciót azonosítottunk genetikai elemzésünk során, és mindkét deléció a fehérje működése szempontjából kiemelkedő fontosságú lokalizációjú. A szokatlanul súlyos klinikai kép, a korai kezdet, a betegség szisztémás megjelenése megerősíti ezen régiók fontosságát. Továbbá először írtunk le kompond heterozigóta deléciót PXE genetikai hátterében. Megállapítottuk az irodalomban leközölt esetekkel (és saját P1-P5 betegünkkel) való összehasonlítás után, hogy a durva genetikai eltérések nagyon korai kezdettel és igen súlyos, szisztémás klinikai képpel társultak vizsgált P6-os betegünk esetében. Minden jellemző szervrendszeri manifesztáció (3. Táblázat) már a korai felnőttkorban jelen volt.

Mindezek az adatok felvetik jelen esetünkben a genotípus-fenotípus közötti korreláció lehetőségét.

Továbbá esetünk felhívja a figyelmet a genomiális deléció irányába történő vizsgálatok fontosságára a PXE-s betegek esetén, hiszen az exonspecifikus PCR és szekvenálás a delécióval rendelkező betegek esetén félrevezető lehet, elfedheti a jelen lévő deléciót.

5.3. A PXE fibroblasztok megnövekedett elasztáz aktivitása

Az elasztázok a szerin proteázok közé tartoznak, számos sejtípus termeli, pl.: polimorfonukleáris neutrofilok, makrofágok és fibroblasztok. Az elasztáz az elasztikus rostokat hasítja (115).

PXE-ben az elasztikus rostok kóros méretűek, deformált alakúak, feltöredezetek és intrafibrillárisan akkumulálódott Ca^{++} ionokat tartalmaznak (127), ez felveti az elasztáz enzim esetleges kóros szerepét pseudoxanthoma elasticumban. Mivel korábban kimutatták, hogy a PXE fibroblasztok elasztáz aktivitása fokozott (128), és a fibroblasztok elasztáz aktivitását az IL-1 β upregulálja (129), ezért azt vizsgáltuk, hogy a PXE sejtek megváltozott elasztáz aktivitásában lehet-e szerepe az IL-1 β hatásnak.

A PXE-s és normál fibroblasztok elasztáz aktivitás meghatározása során azt tapasztaltuk, hogy a PXE fibroblasztok 72 óra inkubálás után szignifikánsan nagyobb enzimaktivitással rendelkeztek, mint a kontroll sejtek (7. Ábra). Az elasztáz aktivitást IL-1 β stimuláció után meghatározva mindkét csoportban szignifikáns elasztáz aktivitásemelkedést detektáltunk, azonban a növekedés mértéke a kontroll csoportban kifejezettebb volt, mint a PXE sejtekben (7. Ábra). Ezek az eredményeink azt jelzik, hogy a PXE fibroblasztok relatíve rezisztensek az IL-1 β stimulációra.

Az IL-1 β lényegesen befolyásolja a fibroblasztok működését, hatással van az extracelluláris mátrix komponenseinek termelésére különböző szignál transzdukciós útvonalakon keresztül, melyek tartalmazzák az NF κ β , JNK/AP1, P38 MAP kinázok és az ERK szignálokat. Kísérletünkben kóros válaszreakciót észleltünk PXE-s fibroblasztjainkban IL-1 β stimulációt követően az elasztáz aktivitás tekintetében. Az IL-1 β hatékonyabbnak bizonyult az egészséges fibroblasztokban. Mindez felveti a lehetőségét annak, hogy az IL-1 β citokinnek a gyulladásos-, autoimmun kórképeken és az atherosclerosis kivül szerepe lehet a PXE patomechanizmusában is.

6. Összefoglalás

Az általunk vizsgált különböző kórállapotok patomechanizmusában közös folyamatok vesznek részt, ezek az antioxidáns rendszer csökkent kapacitása, dyslipidaemia, fokozott szerin proteáz aktivitás, az extracelluláris mátrix eltérései.

A két vizsgált dementia típusban az egységnyi HDL-re jutó PON1 aktivitás csökkenését tapasztaltuk, mely a vaszkuláris dementia esetében nem meglepő, hiszen ott az elváltozások alapja az atherosclerosis folyamata. A fokozott atherosclerosisral járó állapotok és a csökkent paraoxonáz aktivitás kapcsolata ismert.

Az Alzheimer dementia esetében a fokozott oxidatív stressz, és a lipideltérések szerepét korábban az irodalomban ismertették, emellett vizsgálatunk alapján felmerül az antioxidáns rendszer csökkent kapacitásának etiológiai szerepe is, mivel az antioxidáns PON1 csökkent aktivitását detektáltuk. A PON1 aktivitásának csökkenése leginkább a megváltozott mikrokörnyezetnek köszönhető, nem pedig a genetikailag determinált polimorfizmusoknak.

A pseudoxanthoma elasticum kialakulását az ABCC6 transzporter fehérje defektusa okozza. Az ABCC6 természetes szubsztrátja ismeretlen, továbbá az sem tisztázott hogy mi az összefüggés a fehérje működése és az elasztikus rostok feltöredezése között.

Vizsgálatunkban a kórkép háttérében álló ismert mutációk sorát bővítettük, eddig még két, le nem írt mutáció azonosításával. A PXE fibroblasztok funkcionális vizsgálata során szintén sikerült az előzőekkel rokon folyamatot detektálni: a fibroblasztok emelkedett elasztáz aktivitását találtuk, melynek szerepe jól ismert az atherosclerotikus léziók kialakulásában. Ezen kívül a sejtek elasztáz aktivitása kevésbé volt érzékeny az IL-1 β stimulációra, így felmerül a gyulladáshoz köthető citokin szerepe is a tünetek kialakulásában. További vizsgálatokat tervezünk a megváltozott IL-1 β reguláció, és az

extracelluláris mátrix eltéréseinek tanulmányozására, melyekkel új adatokat nyerhetünk az ABCC6 fehérje szerepére vonatkozóan.

7. Irodalomjegyzék

1. Ross R: Atherosclerosis: the role of endothelial injury, smooth muscle proliferation and platelet factors. *Triangle* 15(2-3):45-51, 1976.
2. Robert L, Robert AM, Jacotot B: Elastin-elastase-atherosclerosis revisited. *Atherosclerosis* 140(2):281-95, 1998.
3. Kannel WB, Dawber TR, Friedman GD et al.: Risk factors in Coronary Heart Disease. An evaluation of several serum lipids as predictors of coronary heart disease: the Framingham Study. *Ann Intern Med* 61:888-899, 1964.
4. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB: Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: the Framingham Study. *JAMA* 256:2835-2838, 1986.
5. Heinecke JW: Mechanisms of oxidative damage of low density lipoprotein in human atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 8:268-274, 1997.
6. Berliner JA, Heinecke JW: The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 20:707-727, 1996.
7. Steinberg D: Atherogenesis in perspective: hypercholesterolaemia and inflammation as partner in crime. *Spec focus on Atheroscler* 8(11):1211-1217, 2002.
8. Gordon DH, Rifkind BM: High-density lipoprotein: the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* 321:1311-1316, 1989.
9. Blanche PJ, Gong EL, Forte TM, Nichols AV: Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 665:408-19, 1981.
10. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B (eds): *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed. New York, McGraw-Hill, p 2915-2931, 2001.
11. von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G: High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:13-27, 2001.
12. Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani MF, Chimini G, Kaminski WE, Schmitz G : Molecular cloning of the human ATP binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 257:29-33, 1999.
13. Tall AR: Plasma high density lipoproteins – Metabolism and relationship to atherogenesis. *J Clin Invest* 86:376-384, 1990.

14. Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, Marcel YL, Anderson RG, Mendelsohn ME, Hobbs HH, Shaul PW: High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 7: 853–857, 2001.
15. Mertens A, Holvoet P: Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J* 15:2073-2084, 2001.
16. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, Subbanagounder G, Faull KF, Reddy ST, Miller NE, Fogelman AM: Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res* 41:1481–1494, 2000.
17. Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, Reddy ST, Sevanian A, Fonarow GC, Fogelman AM: Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res* 41:1495–1508, 2000.
18. Furlong CE, Richter RJ, Seidel SL, Costa LG, Motulsky AG: Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase. *Anal Biochem* 180:242–247, 1989.
19. Hassett C, Richter RJ, Humbert R, Chapline C, Crabb JW, Omiecinski CJ, Furlong CE: Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry* 30:10141–10149, 1991.
20. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN: Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 286:152-154, 1991.
21. Watson AD, Navab M, Hama SY, Sevanian A, Prescott SM, Stafforini DM, McIntyre TM, Du BN, Fogelman AM, Berliner JA. Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 95:774-82, 1995.
22. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN: Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 101:1581-90, 1998.
23. Blatter MC, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D: Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. *Eur J Biochem* 211:871-9, 1993.
24. Rosenblat M, Vaya J, Shih D, Aviram M: Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis* 179:69-77, 2005.
25. Deakin S, Leviev I, Gomaraschi M, Calabresi L, Franceschini G, James RW: Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing

cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *J Biol Chem* 277:4301-4308, 2002.

26. Krieger M: Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu Rev Biochem* 68:523-558, 1999.

27. Shih DM, Gu L, Xia YR, Navab M, Li WF, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusis AJ: Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 394:284-7, 1998.

28. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN: The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 33:498-507, 1996.

29. Costa LG, Li WF, Richter RJ, Shih DM, Lusis A, Furlong CE: The role of paraoxonase (PON1) in the detoxication of organophosphates and its human polymorphism. *Chem Biol Interact* 119/120: 429-438, 1999.

30. Draganov DI, La Du BN: Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369:78-88, 2004.

31. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST: Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 276:44444-9, 2001.

32. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusis AJ, Navab M, Fogelman AM. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:542-7, 2001.

33. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST: The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 38:153-63, 2005.

34. Deakin SP, James RW: Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci (Lond)* 107:435-47, 2004.

35. Jarvik GP, Hatsukami TS, Carlson C, Richter RJ, Jampsa R, Brophy VH, Margolin S, Rieder M, Nickerson D, Schellenberg GD, Heagerty PJ, Furlong CE: Paraoxonase activity, but not haplotype utilizing the linkage disequilibrium structure, predicts vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1465-71, 2003.

36. Jarvik GP, Rozek LS, Brophy VH, Hatsukami TS, Richter RJ, Schellenberg GD, Furlong CE: Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1(192) or PON1(55) genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2441-7, 2000.

37. Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, Roberts C, Durrington PN, Mackness MI: Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1451-7, 2001.
38. Wheeler JG, Keavney BD, Watkins H, Collins R, Danesh J: Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet* 363:689-95, 2004.
39. Feingold KR, Memon RA, Moser AH, Grunfeld C: Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atherosclerosis* 139:307-15, 1998.
40. Van Lenten BJ, Wagner AC, Navab M, Fogelman AM: Oxidized phospholipids induce changes in hepatic paraoxonase and ApoJ but not monocyte chemoattractant protein-1 via interleukin-6. *J Biol Chem* 276:1923-9, 2001.
41. James RW, Blatter Garin MC, Calabresi L, Miccoli R, von Eckardstein A, Tilly-Kiesi M, Taskinen MR, Assmann G, Franceschini G: Modulated serum activities and concentrations of paraoxonase in high density lipoprotein deficiency states. *Atherosclerosis* 139:77-82, 1998.
42. Deakin S, Leviev I, Gomaschi M, Calabresi L, Franceschini G, James RW: Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *J Biol Chem* 277:4301-8, 2002.
43. Forte TM, Subbanagounder G, Berliner JA, Blanche PJ, Clermont AO, Jia Z, Oda MN, Krauss RM, Bielicki JK: Altered activities of anti-atherogenic enzymes LCAT, paraoxonase, and platelet-activating factor acetylhydrolase in atherosclerosis-susceptible mice. *J Lipid Res* 43:477-85, 2002.
44. Sutherland WH, Walker RJ, de Jong SA, van Rij AM, Phillips V, Walker HL: Reduced postprandial serum paraoxonase activity after a meal rich in used cooking fat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1340-7, 1999.
45. Wallace AJ, Sutherland WH, Mann JI, Williams SM: The effect of meals rich in thermally stressed olive and safflower oils on postprandial serum paraoxonase activity in patients with diabetes. *Eur J Clin Nutr* 55:951-8, 2001.
46. Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, Elis A, Aviram M: Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2744-52, 1997.
47. van der Gaag MS, van Tol A, Scheek LM, James RW, Urgert R, Schaafsma G, Hendriks HF: Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase

- activity; a diet-controlled, randomised intervention study in middle-aged men. *Atherosclerosis* 147:405-10, 1999.
48. James RW, Leviev I, Righetti A: Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease. *Circulation* 101:2252-7, 2000.
49. Seres I, Paragh G, Deschene E, Fulop T Jr, Khalil A: Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Exp Gerontol* 39:59-66, 2004.
50. McElveen J, Mackness MI, Colley CM, Peard T, Warner S, Walker CH: Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction. *Clin Chem* 32:671-673, 1986.
51. Kordonouri O, James RW, Bennetts B, Chan A, Kao YL, Danne T, Silink M, Donaghue K. Modulation by blood glucose levels of activity and concentration of paraoxonase in young patients with type 1 diabetes mellitus. *Metabolism* 50:657-60, 2001.
52. Mackness MI, Peuchant E, Dumon MF, Walker CH, Clerc M: Absence of "A"-esterase activity in the serum of a patient with Tangier disease. *Clin Biochem* 22:475-478, 1989.
53. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M, Durrington PN: Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 86:193-199, 1991.
54. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Julier K, Abuasha B, Miller JE, Boulton AJM, Durrington PN: Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 139:341-349, 1998.
55. Paragh Gy, Seres I, Balogh Z, Varga Zs, Kárpáti I, Mátyus J, Újhelyi L, Kakuk Gy: The serum paraoxonase activity in patients with chronic renal failure and hyperlipidemia. *Nephron* 80:166-170, 1998.
56. Paragh Gy, Asztalos L, Seres I, Balogh Z, Lócsey L, Kárpáti I, Mátyus J, Katona E, Harangi M, Kakuk Gy: Serum paraoxonase activity changes in uremic and kidney transplanted patients. *Nephron* 83:126-131, 1999.
57. Balogh Z, Seres I, Harangi M, Kovacs P, Kakuk G, Paragh G: Gemfibrozil increases paraoxonase activity in type 2 diabetic patients. A new hypothesis of the beneficial action of fibrates? *Diabetes Metab* 27:604-10, 2001.
58. Paragh, Gy., Balogh, Z., Seres, I. és mtsai: Effect of gemfibrozil on HDL-associated serum paraoxonase activity and lipoprotein profile in patients with hyperlipidaemia. *Clin Drug Inv* 19:1-6, 2000.
59. Dietschy JM, Turley SD: Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol* 12:105-12, 2001.

60. Kuo YM, Emmerling MR, Bisgaier CL, Essenburg AD, Lampert HC, Drumm D, Roher AE: Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain β 1-42 levels. *Biochem Biophys Res Commun* 252:711-5, 1998.
61. McGeer PL, McGeer EG: The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 21:195-218, 1995.
62. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA: Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921-925, 1993.
63. LaDu MJ, Lukens JR, Reardon CA, Getz GS: Association of human, rat, and rabbit apolipoprotein E with β -amyloid. *J Neurosci Res* 49:9-18, 1997.
64. Morris, J. C. (ed.): *Handbook of Dementing Illnesses*. Marcel Dekker Inc. New York, NY, 92-97, 1994.
65. Migliore L, Fontana I, Colonato R, Coppede F, Siciliano G, Murri L: Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 26:587-95, 2005.
66. Behl C, Davis J: Vitamin E protects nerve cells from amyloid β protein toxicity. *Biochem-Biophys Res Commun* 186:944-50, 1992.
67. Dyrks T, Dyrks E: Amyloidogenicity of β A amyloid. *J Biol Chem* 267:18210-18217, 1992.
68. Sayre LM, Perry G, Harris PL, Liu Y, Schubert KA, Smith MA: In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. *J Neurochem* 74:270-9, 2000.
69. Troncoso JC, Costello A, Watson AL jr: In vitro polymerization of oxidized TAU into filaments. *Brain Res* 613:313-316, 1993.
70. Pratico D, Clark CM, Lee VM, Trojanowski JQ, Rokach J, FitzGerald GA: Increased 8,12-iso-iPF₂alpha-VI in Alzheimer's disease: correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity. *Ann Neurol* 48:809-12, 2000.
71. Cecchi C, Fiorillo C, Sorbi S, Latorraca S, Nacmias B, Bagnoli S, Nassi P, Liguri G: Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients. *Free Radic Biol Med* 33:1372-9, 2002.
72. Merched A, Xia Y, Visvikis S, Serot JM, Siest G: Decreased high-density lipoprotein cholesterol and serum apolipoprotein AI concentrations are highly correlated with the severity of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21:27-30, 2000.
73. Olesen OF, Dago L: High density lipoprotein inhibits assembly of amyloid β -peptides into fibrils. *Biochem Biophys Res Commun* 270:62-6, 2000.

74. Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Durrington PN: Alloenzymes of paraoxonase and effectiveness of high-density lipoproteins in protecting low-density lipoprotein against lipid peroxidation. *Lancet* 349:851-852, 1997.
75. Pola R, Gaetani E, Flex A, Gerardino L, Aloï F, Flore R, Serricchio M, Pola P, Bernabei R: Lack of association between Alzheimer's disease and Gln-Arg 192 Q/R polymorphism of the PON-1 gene in an Italian population. *Dement Geriatr Cogn Disord* 15:88-91, 2003.
76. Sodeyama N, Yamada M, Itoh Y, Suematsu N, Matsushita M, Otomo E, Mizusawa H: No association of paraoxonase gene polymorphism with atherosclerosis or Alzheimer's disease. *Neurology* 53:1146-8, 1999.
77. Scacchi R, Gambina G, Martini MC, Broggio E, Vilaro T, Corbo RM: Different pattern of association of paraoxonase Gln192-Arg polymorphism with sporadic late-onset Alzheimer's disease and coronary artery disease. *Neurosci Lett* 339:17-20, 2003.
78. Dean M, Hamon Y, Chimini G: The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 42:1007-17, 2001.
79. Higgins CF: ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8:67-113, 1992.
80. Smith AJ, Timmermans-Hereijgers JL, Roelofsen B, Wirtz KW, van Blitterswijk WJ, Smit JJ, Schinkel AH, Borst P: The human MDR3 P-glycoprotein promotes translocation of phosphatidylcholine through the plasma membrane of fibroblasts from transgenic mice. *FEBS Lett* 354:263-6, 1994.
81. Klucken J, Buchler C, Orso E, Kaminski WE, Porsch-Ozcurumez M, Liebisch G, Kapinsky M, Diederich W, Drobnik W, Dean M, Allikmets R, Schmitz G: ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:817-22, 2000.
82. Schmitz G, Kaminski WE: ATP-binding cassette (ABC) transporters in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 4:243-51, 2002.
83. Bungert S, Molday LL, Molday RS: Membrane topology of the ATP binding cassette transporter ABCR and its relationship to ABC1 and related ABCA transporters: identification of N-linked glycosylation sites. *J Biol Chem* 276:23539-46, 2001.
84. Wang N, Silver DL, Thiele C, Tall AR: ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein. *J Biol Chem* 276:23742-7, 2001.
85. Tsukamoto K, Hirano K, Tsujii K, Ikegami C, Zhongyan Z, Nishida Y, Ohama T, Matsuura F, Yamashita S, Matsuzawa Y: ATP-binding cassette transporter-1 induces rearrangement of actin cytoskeletons possibly through Cdc42/N-WASP. *Biochem Biophys Res Commun* 287:757-65, 2001.

86. Lin G: Insights of high-density lipoprotein apolipoprotein-mediated lipid efflux from cells. *Biochem Biophys Res Commun* 291:727-31, 2002.
87. McNeish J, Aiello RJ, Guyot D, Turi T, Gabel C, Aldinger C, Hoppe KL, Roach ML, Royer LJ, de Wet J, Broccardo C, Chimini G, Francone OL: High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4245-50, 2000.
88. Vaisman BL, Lambert G, Amar M, Joyce C, Ito T, Shamburek RD, Cain WJ, Fruchart-Najib J, Neufeld ED, Remaley AT, Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo S: ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *J Clin Invest* 108:303-9, 2001.
89. Joyce CW, Amar MJ, Lambert G, Vaisman BL, Paigen B, Najib-Fruchart J, Hoyt RF Jr, Neufeld ED, Remaley AT, Fredrickson DS, Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo S: The ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) modulates the development of aortic atherosclerosis in C57BL/6 and apoE-knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:407-12, 2002.
90. Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozcurumez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G: The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet* 22:347-51, 1999.
91. Bergen AA, Plomp AS, Schuurman EJ, Terry S, Breuning M, Dauwerse H, Swart J, Kool M, van Soest S, Baas F, ten Brink JB, de Jong PT: Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* 25:228-231, 2000.
92. Struk B, Cai L, Zach S, Ji W, Chung J, Lumsden A, Stumm M, Huber M, Schaen L, Kim CA, Goldsmith LA, Viljoen D, Figuera LE, Fuchs W, Munier F, Ramesar R, Hohl D, Richards R, Neldner KH, Lindpaintner K: Mutations of the gene encoding the transmembrane transporter protein ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *J Mol Med* 78:282-286, 2000.
93. Madon J, Hagenbuch B, Landmann L, Meier PJ, Stieger B: Transport function and hepatocellular localization of mrp6 in rat liver. *Mol Pharmacol* 57:634-41, 2000.
94. Belinsky MG, Chen ZS, Shchaveleva I, Zeng H, Kruh GD: Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer Res* 62:6172-7, 2002.
95. Neldner K: Pseudoxanthoma elasticum. *Clin Dermatol* 6:1-92, 1988.
96. Trip MD, Smulders YM, Wegman JJ, Hu X, Boer JM, ten Brink JB, Zwinderman AH, Kastelein JJ, Feskens EJ, Bergen AA: Frequent mutation in the ABCC6 gene (R1141X) is associated with a strong increase in the prevalence of coronary artery disease. *Circulation* 106:773-5, 2002.

97. Hu X, Plomp A, Wijnholds J, Brink t J, van Soest S, Born LI, Leys A, Peek R, T V M de Jong P, B Bergen A: ABCC6/MRP6 mutations: further insight into the molecular pathology of pseudoxanthoma elasticum. *Eur J of Hum Genet* 11:215-224, 2003.
98. Chassaing N, Martin L, Mazereeuw J, Barrie L, Nizard S, Bonafe JL, Calvas P, Hovnanian A: Novel ABCC6 mutations in pseudoxanthoma elasticum. *J Invest Dermatol* 122:608-13, 2004.
99. Gheduzzi D, Guidetti R, Anzivino C, Tarugi P, Di Leo E, Quaglino D, Ronchetti IP: ABCC6 mutations in Italian families affected by pseudoxanthoma elasticum (PXE). *Hum Mutat* 24:438-9, 2004.
100. Noji Y, Inazu A, Higashikata T, Nohara A, Kawashiri MA, Yu W, Todo Y, Nozue T, Uno Y, Hifumi S, Mabuchi H: Identification of two novel missense mutations (p.R1221C and p.R1357W) in the ABCC6 (MRP6) gene in a Japanese patient with pseudoxanthoma elasticum (PXE). *Intern Med* 43:1171-6, 2004.
101. Hendig D, Schulz V, Eichgrun J, Szliska C, Gotting C, Kleesiek K: New ABCC6 gene mutations in German pseudoxanthoma elasticum patients. *J Mol Med* 83:140-7, 2005.
102. Ilias A, Urban Z, Seidl TL, Le Saux O, Sinko E, Boyd CD, Sarkadi B, Varadi A: Loss of ATP-dependent transport activity in pseudoxanthoma elasticum-associated mutants of human ABCC6 (MRP6). *J Biol Chem* 277:16860-7, 2002.
103. Le Saux O, Beck K, Sachsinger C, Silvestri C, Treiber C, Goring HH, Johnson EW, De Paepe A, Pope FM, Pasquali-Ronchetti I, Bercovitch L, Marais AS, Viljoen DL, Terry SF, Boyd CD: Spectrum of ABCC6 mutations is responsible for Pseudoxanthoma Elasticum. *Am J Hum Genet* 69:749-764, 2001.
104. Kool M, van der Linden M, de Haas M, Baas F, Borst P: Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer res* 59:175-182, 1999.
105. Pasquali-Ronchetti I, Volpin D, Baccarani-Contri M, Castellani I, Peserico A: Pseudoxanthoma elasticum. Biochemical and ultrastructural studies. *Dermatologica* 163:307-25, 1981.
106. Passi A, Albertini R, Baccarani Contri M, de Luca G, de Paepe A, Pallavicini G, Pasquali Ronchetti I, Tiozzo R: Proteoglycan alterations in skin fibroblast cultures from patients affected with pseudoxanthoma elasticum. *Cell Biochem Funct* 14:111-20, 1996.
107. Clarkson JG, Altman RD: Angioid streaks. *Surv Ophthalmol* 26:235-46, 1982.
108. Dreyer R, Green WR: The pathology of angioid streaks: a study of twenty-one cases. *Trans PA Acad Ophthalmol Otolaryngol* 31:158-167, 1978.
109. Lebowhl M, Halperin I, Phelp RG: Brief report: occult pseudoxanthoma elasticum in patients with premature cardiovascular disease. *N Engl J Med* 329:1237-9, 1993.

110. Lebowohl MG, Distefano D, Prioleau PG, Uram M, Yannuzzi LA, Fleischmajer R: Pseudoxanthoma elasticum and mitral-valve prolapse. *N Engl J Med* 307:228-231, 1982.
111. Ringpfeil F, Lebowohl MG, Christiano AM, Uitto J: Pseudoxanthoma elasticum: mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc Natl Acad Sci Usa* 97:6001-6006, 2000.
112. Lebowohl M, Neldner K, Pope FM, De Paepe A, Christiano AM, Boyd CD, Uitto J, McKusick VA: Classification of pseudoxanthoma elasticum: Report of a consensus conference. *J Am Acad Dermatol* 30:103-107, 1994.
113. Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Boulton AJ, Durrington PN: Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1812-1818, 1995.
114. Hixson JE, Vernier DT: Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 31:545-548, 1990.
115. Bieth J, Spiess B, Wermuth CG: The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase. *Biochem med* 11:350-357, 1974.
116. Szendroi M, Meimon G, Bakala H, Frances C, Robert L, Godeau G, Hornebeck W: On the presence of a metalloprotease in human skin fibroblasts that degrades the human skin elastic fiber system. *J Invest Dermatol* 83:224-9, 1984.
117. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goetze NM, Olsen BJ, Klenk DC: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85, 1985.
118. Meloni I, Rubegni P, De Aloe G, Bruttini M, Pianigini E, Cusano R, Seri M, Mondillo S, Federico A, Bardelli MA, Andreassi L, Fimiani M, Renieri A: Pseudoxanthoma Elasticum: Point mutations in the ABCC6 gene and a large deletion including also ABCC1 and MYH11. *Hum Mutat* 18:85, 2001.
119. Kálmán J, Juhász A, Császár A, Kanka A, Maglóczy E, Bencsik K, Janka Z, Raskó I: Apolipoprotein E allele frequencies in patients with late-onset sporadic Alzheimer's dementia in Hungary. *Acta Neurol Scand* 95:56-59, 1997.
120. Kálmán J, Juhász A, Császár A, Kanka A, Rimanóczy Á, Janka Z, Raskó I: Increased apolipoprotein E4 allele frequency is associated with vascular dementia in the Hungarian population. *Acta Neurol Scand* 98:166-168, 1998.
121. Mackness MI, Abbott CA, Arrol S, Durrington PN: The role of high density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *Biochem J* 294:829-835, 1993.
122. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M, Durrington

PN: Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 86:193-199, 1991.

123. Kalman J, Kudchodkar BJ, Murray K, McConathy WJ, Juhasz A, Janka Z, Lacko AG: Evaluation of serum-lipid-related cardiovascular risk factors in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 10:488-493, 1999.

124. Corrigan FM, Mowat B, Skinner ER, Van Rhijn AG, Cousland G: High density lipoprotein fatty acids in dementia. *Prostag Leukotr Ess* 58:125-127, 1998.

125. Thome J, Gsell W, Rösler M, Kornhuber J, Frölich L, Hashimoto E, Zielke B, Wiesbeck GA, Riederer P: Oxidative-stress associated parameters (lactoferrin, superoxide dismutases) in serum of patients with Alzheimer's disease. *Life Sci* 1:13-19, 1997.

126. Ringpfeil F, Nakano A, Uitto J, Pulkinnen L: Compound heterozygosity for a recurrent 16,5-kb Alu-mediated deletion mutation and single-base-pair substitutions in the ABCC6 gene results in pseudoxanthoma elasticum. *Am J Hum Genet* 68:642-652, 2001.

127. Huang SN, Steele HD, Kumar G, Parker JO: Ultrastructural changes of elastic fibers in pseudoxanthoma elasticum. *Arch Pathol* 83:108, 1967.

128. Schwartz E, Cruickshank FA, Lebwohl MG: Elastase-like protease and elastolytic activities expressed in cultured dermal fibroblasts derived from lesional skin of patients with pseudoxanthoma elasticum, actinic elastosis, and cutis laxa. *Clin Chim Acta* 176:219-24, 1988.

129. Croute F, Delaporte E, Bonnefoy JY, Fertin C, Thivolet J, Nicolas JF: Interleukin-1 beta stimulates fibroblast elastase activity. *Br J Dermatol* 124:538-41, 1991.

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

AZ ÉRTEKEZÉSBEN FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK:

1. Paragh Gy, Balla P, **Katona E**, Seres I, Derdák Z, Degrell I: A paraoxonáz aktivitás változása Alzheimer betegségben és vascularis dementiában. Ideggyógyászati Szemle 54:33-37, 2001.

2. Paragh Gy, Balla P, **Katona E**, Seres I, Égerházi A, Degrell I: Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 252:63-67, 2002.

IF: 2,076

3. **E Katona**, C Aslanidis, É Remenyik, M Csikós, S Kárpáti, Gy Paragh, G Schmitz: Identification of a novel deletion in the ABCC6 gene leading to Pseudoxanthoma elasticum. J Dermatol Sci 40:115-121, 2005.

IF:1.477

EGYÉB TÉMÁJÚ KÖZLEMÉNYEK:

1. Paragh Gy, Seres I, Balogh Z, **Katona E**, Fülöp P, Kárpáti I, Mátyus J, Kakuk Gy: Serumparaoxonáz-aktivitás vizsgálata, chronicus uraemiában szenvedő betegekben. Hypertonia és Nephrologia 3(2):106-109, 1999.

2. Paragh Gy, Asztalos L, Seres I, Balogh Z, Lócsey L, Kárpáti I, Mátyus J, **Katona E**, Harangi M, Kakuk Gy: Serum paraoxonase activity changes in uremic and kidney transplanted patients. Nephron 83:126-131, 1999.

IF: 1.696

3. Paragh Gy, Seres I, Balogh Z, Harangi M, **Katona E**, Fülöp P, Kakuk Gy: A szimvasztatin hatása a szérum lipidszintekre és a paraoxonáz aktivitására. Magyar Belorvosi Archívum 3:255-258, 1999.

4. Balogh Z, Fülöp P, Seres I, Harangi M, **Katona E**, Kosztáczky B, Paragh Gy: Effects of simvastatin on serum paraoxonase activity. Clin Drug Invest 21:505-510, 2001.

IF: 0.846

5. Harangi M, **Katona E**, Remenyik É, Paragh Gy: Sclerosis tuberosa. Hypertonia és Nephrologia 5:144-149, 2001.

6. Audikovszky M, Pados Gy, Seres I, Harangi M, Fülöp P, **Katona E**, Winkler G, Paragh Gy: Obes betegek lipidprofiljának és paraoxonáz aktivitásának változása orlistat kezelést követően. Orvosi Hetilap 142: 2779-2783, 2001.

7. Paragh Gy, Harangi M, Balogh Z, **Katona E**, Kakuk Gy: A leptin klinikai jelentősége. Táplálkozás Allergia Diéta 2001.

8. Harangi M, Remenyik É, Seres I, Varga Zs, **Katona E**, Paragh Gy: Determination of DNA damage induced by oxidative stress in hyperlipidemic patients. *Mutat Res* 513:17-25, 2002.

IF: 1.636

9. Kárpáti I, Balla J, Szőke G, Bereczky Zs, Páll D, Ben T, Toma K, **Katona E**, Mohácsi A, Paragh Gy, Varga Zs, Kakuk Gy, Muszbek L: A hyperhomocysteinaemia gyakorisága, folsavpótlásban részesülő hemodializált betegekben. *Orvosi Hetilap* 143:1635-1640, 2002.

10. Szabó Z, Harangi M, Lőrincz I, Seres I, **Katona E**, Karányi Zs, Paragh Gy: A hyperlipidaemia hatása a QT diszperzióra nem ischaemiás szívbetegekben. *Metabolizmus* 2:175-178, 2004.

11. Kalmár T, Seres I, Balogh Z, Káplár M, Katona É, **Katona E**, Paragh Gy: Lipoprotein-lipáz, hepatikus lipáz és paraoxonáz aktivitás változása 2-es típusú Diabetes Mellitusban. *Diabetologia Hungarica* 11; 265-271, 2003.

12. Paragh Gy, Márk L, **Katona E**: A statinok nem lipid hatásai. *Orv Hetil* 145; 1903-1910, 2004.

13. Magyar MT, Paragh Gy, **Katona E**, Valikovics A, Seres I, Csiba L, Bereczki D: Serum cholesterol have a more important role than triglycerides in determining intima-media thickness of the common carotid artery in subjects below 55 years of age. *J Ultras Med* 23:1161-1169, 2004.

IF: 1.010

14. Szabó Z, Harangi M, Lőrincz I, Seres I, **Katona E**, Karányi Z, Paragh G: Effect of hyperlipidaemia on QT dispersion in patients without ischaemic heart disease. *Can J Cardiol* 21(10):847-50, 2005.

IF:1.297

15. **Katona E**, Paragh Gy: Az LDL-aférezis szerepe a hyperlipidaemia terápiájában. *Metabolizmus* 3: 116-123, 2005.

16. Paragh Gy, **Katona E**, Csongrádi É, Juhász A: Az elhízás komplex kezelése. *Metabolizmus* 3: 155-159, 2005.

Összesített impact faktor: 10,038

KONGRESSZUSI RÉSZVÉTEL (ELŐADÁS):

1. Katona E, Seres I, Balogh Z, Fülöp P, Kakuk Gy, Paragh Gy: Az antioxidáns hatású paraoxonáz változása krónikus vesebetegekben. 1998. Magyar Atherosclerosis Társaság XII. Kongresszusa. Sopron.

2. Katona E., Fülöp P., Seres I., Balogh Z., Harangi M., Paragh Gy: A paraoxonáz aktivitás változása simvastatin kezelést követően. Debrecen, DAB, 1998. december 14.
3. Katona E, Seres I, Balogh Z, Fülöp P, Kakuk Gy, Paragh Gy: Az antioxidáns hatású paraoxonáz változása krónikus vesebetegekben. 1999. Korányi Frigyes Szakkollégium III. Tudományos Fórum (1. helyezés, a Knoll Hungária különdíja).
4. Katona E, Balla P, Seres I, Paragh Gy, Kakuk Gy: A paraoxonáz aktivitás változása Alzheimer betegségben és vascularis dementiában. Magyar Atherosclerosis Társaság XIII. Kongresszusa, Sopron, 2000. október 12-14.
5. Katona E: Hanta-vírus és Leptospira fertőzések okozta interstitialis nephritis. 2000. VI. Debreceni Nephrológiai Napok.
6. Katona E: Infekciók az akut veseelégtelenség kiváltásában. 2001. VII. Debreceni Nephrológiai Napok.
7. Katona E: Atherosclerosis krónikus veseelégtelenségben - epidemiológiai adatok 2004. IX. Debreceni Nephrológiai Napok.
8. Katona E, Remenyik É, Paragh Gy, Schmitz G: Pseudoxanthoma Elasticum (PXE) és a háttérben álló anyagcsere változások Sopron 2004. Magyar Atherosclerosis Társaság Naggyűlés.
9. Katona E, Remenyik É, Sohajda Z, Kiss B, Schmitz G, Paragh Gy: Pseudoxanthoma elasticum és a háttérben álló anyagcsere eltérések. A Magyar Belgyógyász Társaság Északkelet-Magyarországi Szakcsoportjának Tudományos ülése Nyíregyháza 2004.
10. Katona E: LDL apheretizáló módszerek. 2005. X. Debreceni Nephrológiai Napok.
11. Katona E: Pseudoxanthoma Elasticum (PXE) és a háttérben álló pathofiziológiai elváltozások. Nagyerdei Belgyógyászati Tudományos Napok. 2005. 05. 03.
12. Katona E, Balla P, Seres I, Degrell I, Paragh Gy: A paraoxonáz aktivitás és lipid profil eltérései különböző etiológiájú demenciákban. Magyar Szabadgyógykutató Társaság III. Konferenciája. 2005.10.13.

POSZTER:

1. Kel A, Voss N, Konovalova T, Kel-Margoulis O, **Katona E**, Schmitz G, Wingender E: Composite modules in promoters of disease genes help to find cellular signalling network. 4th European Conference on Computational Biology. 28th Sept-1st Oct. 2005. Madrid.
2. Juhász A, Csongrádi É, Fülöp T, Bajnok L, **Katona E**, Varga Z, Karányi Z, Paragh G: Relationship of echocardiographic characteristics with anthropometric and metabolic parameters in obesity. 4th International Symposium on Obesity and Hypertension. 27-29th Oct. 2005. Berlin.

KÖNYVRÉSZLET:

1. **Katona E.** Hanta-vírus és Leptospira fertőzések okozta interstitialis nephritis. *Nephrologia* 2000. (Szerk: Kárpáti I, Kakuk Gy) Debrecen, 2000; 207-213.
2. **Katona E.** A beteg előkészítése dialysis programba. *Klinikai Nephrologia*. (Szerk: Kakuk Gy) Medicina, Budapest, 2004.

IDÉZHETŐ NEMZETKÖZI FOLYÓÍRATBAN MEGJELENT ABSTRACT

1. Paragh Gy, Asztalos L, Seres I, Balogh Z, Lőcsey L, Kárpáti I, Mátyus J, **Katona E**, Harangi M, Kakuk Gy: Serum paraoxonase activity changes in uremic and kidney transplanted patients. 71st Congress of the European Atherosclerosis Society. Athen. 1999. május 26-29. *Atherosclerosis*, 144:117.
2. Paragh Gy, Seres I, Harangi M, Illyés L, **Katona E**, Varga Zs: Atorvastatin effect on HDL associated paraoxonase activity. XIVth World Congress of Cardiology, Sydney, *J Am Coll Card* 2002; 39:142B
3. Juhász A, Csongrádi É, Fülöp T, Bajnok L, **Katona E**, Varga Z, Karányi Z, Paragh G: Relationship of echocardiographic characteristics with anthropometric and metabolic parameters in obesity. 4th International Symposium on Obesity and Hypertension. 27-29th Oct. 2005. Berlin. Germany. *Int J Obesity* 2005; 29: suppl 3.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Paragh György Professzor Úrnak, hogy már hallgató koromban csatlakozhattam az általa vezetett tudományos munkacsoporthoz, hogy immár 9 éve töretlen bizalommal irányítja a tudományos és klinikai tevékenységemet, és mindezek mellett a külföldi tanulmányutam feltételeit is biztosította, személyes kapcsolataival ennek sikeréhez és létrejöttéhez nélkülözhetetlenül hozzájárult. Mindezek, ill. tanácsai és útmutatásai nélkülözhetetlenek voltak ennek a tanulmánynak a létrejöttéhez.

Köszönöm Dr. Remenyik Évának témavezetőmnek, a Bőrgyógyászati Klinika docensének a munkám Pseudoxanthoma elasticummal kapcsolatos részének ötletét, tudományos szakmai segítségét mely külföldi tanulmányutam alatt is töretlen volt, továbbá köszönettel tartozom segítő biztatásáért és építő tanácsaiért.

Köszönettel tartozom Dr. Kakuk György professzor úrnak, hogy tudományos és klinikai munkámat a kezdetektől mindenben támogatta.

Köszönöm Dr. Gerd Schmitz Professzor Úrnak, a Regensburgi Egyetem Klinikai Kémia Intézet igazgatójának, hogy az ott eltöltött összesen 23 hónap alatt magas szintű szakmai irányítása és a tárgyi feltételek biztosítása mellett folytathattam tudományos munkámat. Köszönöm Nicole Richternek a laboratóriumi módszerek elsajátításában nyújtott professzionális segítségét.

Köszönöm az I. Belklinika Kutató Laboratóriumában dolgozó Dr. Seres Ildikónak a kísérleti munkában nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Balla Petrának a Pszichiátria Intézet Tanársegédjének a demens betegekkel kapcsolatos vizsgálatban való segítségét.

Szeretném megköszönni a klinikusoknak, hogy betegek adatait rendelkezésemre bocsátották: Prof. Dr. Kárpáti Sarolta, Dr. Csikós Márta (*SOTE Bőrclinika*), Dr. Thomas Voght (*Uniklinikum Regensburg*), Dr. Remenyik Éva (*DEOEC, Bőrclinika*), Dr. Balla Petra (*DEOEC, Pszichiátria Tanszék*).

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom Családomnak, akik szeretete, türelme és segítése nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.

9. Függelék

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények másolatai