

**Doktori (PhD) értekezéstézisei**

**A cink homeosztázis vizsgálata a hüvelyszövetben**

Csikós Anett

Témavezetők: Gálné Dr. Miklós Ida

Prof. Dr. Takács Péter



DEBRECENI EGYETEM

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2022

# 1. Bevezetés és célkitűzés

A cink (Zn) az emberi test alapvető nyomeleme. Biológiai funkciója három kategóriába sorolható: strukturális, szabályozó és katalitikus. Hozzájárul a fehérjeszerkezethez, szabályozza a génexpressziót és katalizálja az enzimaktivitást. A sejtek szintjén, a cink alapvető szerepet játszik a proliferációban, a differenciálódásban és az apoptózisban.

Az elmúlt évtizedben felfedezték a fehérjék homeosztatisz rendszerét, amelyek a celluláris cinket koordinálják; a cink importja, exportja és elosztása által. E rendszer részét képezik regulátorok és olyan transzmembrán transzporter fehérjék, melyek a cinkionokat a membránokon keresztül szállítják. Két fő cink transzporter családot azonosítottak: az SLC30A (más néven Zn transzporter, ZnT) és SLC39A (más néven Zrt-, Irt-kapcsolt fehérjék, ZIP). Emberben tíz *SLC30A/ZnT* gént és 14 *SLC39A/ZIP* gént azonosítottak.

A nők élete folyamán az egyik leglátványosabb biológiai adaptáció a kismedence és a hüvely átalakulása a szülésre való felkészülésre, illetve a terhesség után a normális állapot visszanyerése. A menopauza még jelentősebb változásokat hoz, ugyanis számos kóros folyamat indulhat meg és ezek a negatív folyamatok kihatással vannak a nők szervezetének egészére.

Ezért is fontos, hogy megértsük azokat a folyamatokat, amelyek lassíthatják, vagy akár javíthatják a hüvelyben kialakuló káros hatásokat.

A menopauza után a nyomelemek metabolizmusában bekövetkező rendellenességek kockázata magas. A nyomelemek koncentrációját több tényező is befolyásolhatja, mint például az étrend, az elemek pótlása, illetve a cink transzport működése. Mivel jelenleg a hüvelyszövet cinkszintjéről, a cink transzporter gének működéséről, a közöttük lévő összefüggésekről viszonylag keveset tudunk, így a disszertációban ezek megismerésére törekedtünk.

Feltételeztük, hogy a hüvelyszövet és a teljes vér cinkszintje korrelál, és hogy a nyomelemek koncentrációja összefüggést mutat az öregedéssel vagy a menopauzával. Hipotézisünk az volt, hogy a hüvelyi szövet cinkszintje az öregedéssel csökken. További hipotézisünk volt, hogy a cink transzporterek különböző módon expresszálódnak a hüvelyi szövetekben, és a menopauza után az expresszió szintje csökken, ami hozzájárulhat a posztmenopauzás nőknél fellépő megváltozott hüvelyfal összetételhez.

Hipotézisünk teszteléséhez, pre- és posztmenopauzás nők teljes vastagságú hüvelyfal mintáinak vizsgálatát indítottuk el.

Célul tűztük ki, hogy

1. induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometria (ICP-OES) módszerrel meghatározzuk a vér és a hüvelyi szövet cinkszintjét, és megállapítjuk, hogy van-e összefüggés a teljes vér és a hüvelyi szövetminták cinkszintjei között, és hogy a kapott értékek összefüggenek-e a beteg életkorával vagy a menopauza állapotával.
2. meghatározzuk a ZnT1-10 és ZIP1-14 transzporterek génexpressziós profilját valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR) módszerrel és immunhisztokémiai (IHC) vizsgálattal az egyes gének által kódolt fehérjék termelődését a hüvelyszövetben.
3. bővítsük ismereteinket az SLC30A és SLC39A családokhoz tartozó cink transzporter gének egyedi nukleotid polimorfizmusairól (SNP-k) és megtudjuk, hogy van-e összefüggés ezen SNP-k és a teljes vér, valamint a hüvelyszövet cinkszintje között.

## **2. Anyag és módszer**

### **2.1. A résztvevők kiválasztása és a mintagyűjtés**

A mintagyűjtés a Debreceni Egyetem, Orvostudományi Kar, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján 32 különböző jóindulatú nőgyógyászati okból (a hüvelyi szöveteket nem érintő) műtéten átesett nő esetében, teljes vastagságú hüvelyfal biopszia és vérvétel történt. A mintagyűjtés a Helsinki Nyilatkozat elveit figyelembe véve, a Magyar Nemzeti Intézményi Orvosi Kutatási Tanács jóváhagyásával történt (Etikai engedély száma: 7239-3/2017EIUG). Minden nő írásos formában hozzájárult a kutatásban való részvételhez. A résztvevők a beleegyezés után egyedi azonosítószámot kaptak.

A perifériás teljes vérminták gyűjtése a betegektől azonosító számmal ellátott 10 ml-es BD Vacutainer® K2E (EDTA) műanyag csövekbe történt.

A műtétek alatt a hüvely falából három darab körülbelül 0.5 x 0.5 cm-es szövetdarabot távolítottak el. A hüvelyi szövetmintavétel a metszési sebből történt, így a beteg számára ez nem jelentett extra kockázatot és kellemetlenséget, hiszen a műtét során amúgy is eltávolításra került a szövet. A mintavételezés standardizált volt, az elülső hüvelyfal teljes vastagságú biopsziáit a boltozat középvonali területéről vágták le.

A kiválasztott nőket premenopauzás és posztmenopauzás csoportokra osztottuk. Az összes premenopauzás mintát a menstruációs ciklus proliferációs szakaszában gyűjtötték. A posztmenopauzás nőknél legalább 12 egymást követő hónapos amenorrhea-t határoztak meg, minden egyéb nyilvánvaló ok nélkül, és / vagy folyamatosan emelkedett a follikulus-stimuláló hormon (FSH) vérszintje 30 mIU/ml vagy annál magasabb értékre.

A kutatásból kizártuk azokat a nőket, akiknél csontritkulás, rák, cinkhiány, terhesség, endometriózis, immunológiai és kötőszöveti betegségek, hüvelyi vagy szisztémás hormonpótló terápia közelmúltban (6 hónapon belül) történő alkalmazása, valamint korábbi pesszarium vagy intrauterin eszköz (IntraUterine device, IUD) használat előfordult. A kizárási kritériumok közé tartoztak a cink étrend-kiegészítőket szedő, cukorbetegségben vagy autoimmun betegségben szenvedő nők is.

## **2.2. Cinkszint meghatározása teljes vérben és hüvelyi szövetmintákban ICP-OES módszerrel**

A szöveti cinkszintet atomabszorpciós spektrofotometriás vizsgálattal határoztuk meg.

### ***2.2.1. A minta előkezelése***

A hüvelyszövet mintákat validált analitikai mérlegen lemértük, üveg főzőpoharakba majd szárítószekrénybe helyeztük, hogy állandó tömegig

száradjanak. Az elemanalízis előtt a minták száraz tömegének meghatározása után történt a nedves roncsolás.

A teljes vérmintákat is nedves roncsolással atmoszférikus nyomáson kezeltük az analízis előtt.

### **2.2.2. Elemanalízis**

Az előkezelt szövet és vérminták elemanalízisét induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometriával végeztük (ICP-OES 5100, Agilent Technologies). A méréseket SVDV (Synchronous Vertical Dual View) módban hajtottuk végre. Automatikus minta bevezetést (SPS 4, Agilent Technologies) alkalmaztunk, illetve a mintákat véletlenszerűen választottuk ki.

A cink kvantitatív elemzése ötpontos kalibrációs görbe létrehozásával történt. A kalibrációs oldatok hígítását 1000 mg/l (ICP szabvány IV, Merck) többelemű standardból 0,1 M salétromsavval (ultratiszta vízben) végeztük.

### **2.3. Génexpressziós vizsgálatok a hüvelyi szövetmintákban**

A vizsgálatok során hét-hét pre- és posztmenopauzában lévő nő teljes vastagságú hüvelyfal mintáiban határoztuk meg mind a ZnT1-10 és ZIP1-14 transzporterek génexpressziós profilját.

### **2.3.1. mRNS extrakció, cDNS átírás**

A hüvelyi szövetekből a minták mRNS izolálására, tisztítására a GenElute Direct mRNA Miniprep Kit-et (Sigma-Aldrich) alkalmaztuk.

A mintákat Minilys Homogenizer készülékkel (Bertin Instruments) homogenizáltuk. Megterveztük a hüvelyi szövetminták homogenizálási protokollját. A homogenizálás után folytattuk a GenElute Direct mRNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) 3. lépését. Az mRNS-koncentrációkat (5-10 ng/μl) Qubit<sup>®</sup> 3.0 fluorométerrel határoztuk meg Qubit<sup>™</sup> RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével.

Ahhoz, hogy a további kísérletekben az RNS analizálható legyen, először át kellett írni komplementer DNS-re (cDNS) reverz transzkriptáz enzim segítségével. A kísérletek során az átíráshoz a Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit-et választottuk ki (Thermo Fisher Scientific). A cDNS mennyiségét Qubit<sup>™</sup> ssDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével határoztuk meg a gyártó utasításai szerint. A cDNS mintákat azonnal -20°C-on tároltuk a későbbi qPCR elemzés céljából.

### **2.3.2. Valós idejű PCR elemzés**

A transzporter gének (*ZnT1-10*, *ZIP1-14*) expresszióját a szövetmintákból történő mRNS izolálás és cDNS szintézis után, reverz transzkripció kuantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR) segítségével határoztuk meg. Minden génre egyedi Taqman próbát

alkalmaztunk, a Best coverage assayt választottuk a megbízhatóság érdekében (Thermo Fisher Scientific, TaqMan Gene Expression Assay). Referencia génnek a *glicerinaldehyd-3-foszfát dehidrogenázt (GAPDH)* használtuk.

A qPCR-t 2  $\mu$ l (koncentrációtartomány: 10-15 ng/ $\mu$ l) cDNS-templáttal 20  $\mu$ L reakciótérfogóban hajtottuk végre, TaqMan Universal PCR Master Mix II no UNG (Thermo Fisher Scientific) mix leírása alapján. StepOnePlus valós idejű PCR készüléket (ABI, Thermo Fisher Scientific) használtunk. A protokollt alapbeállításként tartalmazta a StepOne Software v2.3 program. Valamennyi mintát triplikátumban amplifikáltuk, valamint negatív (templát nélküli) kontrollvizsgálatokat alkalmaztunk az egyes lemezekben. Az egyes vizsgálatok amplifikációs hatékonyságát összehasonlító Ct ( $\Delta\Delta$ Ct) módszerrel határoztuk meg. Összehasonlítottuk a célgének (*ZnT1-10* és *ZIP1-14*) és a referencia gén (*GAPDH*) áttörési pontjait (Ct).

## **2.4. Cink transzport fehérjék meghatározása a hüvelyi szövetmintákban IHC módszerrel**

A szövetmintákból  $-70^{\circ}\text{C}$ -on történő tárolásuk után, a cink transzport fehérjék meghatározására került sor, immunhisztokémiai módszerrel. Kutatásunk során a ZnT9, ZIP4, ZIP6 és ZIP11 fehérjéket határoztuk meg.

Az immunreakciókat 14 db hüvelyi szövetmintán végeztük. A mintafeldolgozás során minden mintából 5-5 db fagyasztott metszetet készítettünk későbbi vizsgálatokhoz, majd a maradék hüvelyszövetet formalinban fixáltuk és paraffinba ágyasztuk. A ZnT9, ZIP4, ZIP6 és ZIP11 immunhisztokémiai vizsgálatát minden esetben formalin fixált paraffinba ágyazott hüvelyi szövetmintán végeztük.

#### ***2.4.1. Az immunhisztokémiai reakciók standardizálása***

Az optimális reakciókörülmények biztosítása érdekében az immunreakciók standardizálását a ZNT9, ZIP4, ZIP6 és ZIP11 antigéneket ismert módon expresszáló veseszöveten, mint pozitív kontroll szöveten végeztük.

Minden fehérje esetében kétféle, egy alacsony (citrát pH6) és egy magas pH-jú (Tris-EDTA pH8 és pH9) feltáró oldatot teszteltünk. Az immunreakciók standardizálása során a primer antitest elhagyásával negatív kontrollokat is alkalmaztunk.

A vizsgált ZNT9, ZIP4, ZIP6 és ZIP11 antitestek nyúlban termeltetett poliklonális antitestek voltak.

Az immunreakciók standardizálásának kritikus része a megfelelő primer antitest titer meghatározása, ezért a gyártó cég által javasolt hígítási tartomány környékén többféle titert megvizsgáltunk.

## **2.5. Cink transzport fehérjék egyedi nukleotid polimorfizmusainak meghatározása**

Az általunk vett vérmintákból a *ZnT1-10* és a *ZIP 1-14* gének polimorfizmusát határoztuk meg.

### ***2.5.1. DNS extrakció teljes vérből, gDNS mennyiségi meghatározása***

A teljes vérből való genomiális DNS-extrakcióhoz Blood DNA Isolation Mini Kit-et (Norgen Biotek) használtunk, a gyártó által megadott utasítások szerint.

A Qubit<sup>®</sup> 3.0 fluorométerhez használható Qubit<sup>®</sup> dsDNA HS Assay Kit-tel (Thermo Fisher Scientific) határoztuk meg a gDNS koncentrációt a gyártó leírása alapján.

### ***2.5.2. Új primer párok tervezése PCR reakciókhoz***

A vérből izolált DNS minták ZnT és ZIP fehérjék szekvenciáinak tanulmányozására különböző primerek tervezésére volt szükség. Minden cink transzporter gén minden exonját megvizsgáltuk (National Center for Biotechnology Information, NCBI), kiválasztottuk azokat a régiókat, amelyek nagy számban tartalmaznak misszensz mutációkat, és ezeket a régiókat összehasonlítottuk a rendelkezésre álló Thermo Fisher Scientific TaqMan SNP genotipizáló próbáival. Új primereket terveztünk minden olyan hosszabb exonra, amelyek több misszensz mutációt tartalmaztak és alkalmasnak tűntek megbízható hosszúságú

PCR-fragmensek előállítására a szekvenáláshoz. A tervezett szakaszok hossza 100 és 276 bp közé esett.

### ***2.5.3. PCR amplifikáció***

A PCR-amplifikációkat 25 µl végtérfogatban hajtottuk végre a StepOnePlus (Applied Biosystems) és iCycler (Bio-Rad) készülékek segítségével. Az amplifikáció összeméréséhez a DreamTaq PCR Master Mix-et (2X) (Thermo Fisher Scientific) használtuk az útmutató utasításainak megfelelően, és minden reakcióhoz 1 µl (koncentrációtartomány: 15-30 ng/l) teljes genomialis DNS-t adtunk. A ciklusparaméterek azonosak voltak, azzal a különbséggel, hogy a primer annealációs hőmérsékletét minden primer pár esetén optimalizáltuk. A 24 db génhez huszonnégy primerpárt használtunk, melyek helyzetét a gén első nukleotidjától számoltuk. A ciklusok futási beállításait a korábbi tapasztalataink alapján optimalizáltuk.

### ***2.5.4. PCR termékek ellenőrzése gélelektroforézissel***

A PCR-termékek sikeres amplifikációját követően QIAxcel készülékben (Qiagen) DNA Screening Gel patron segítségével ellenőriztük. A termékek láthatóvá tételét és kiértékelését Screengel szoftver (Qiagen) segítségével végeztük el. A DNS szakasz méretének és koncentrációjának meghatározásához QIAxcel Screening Kit-et alkalmaztunk.

### ***2.5.5. Szekvenciaelemzés***

A PCR-termékeket EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit-tel (Bio Basic Inc.) tisztítottuk. A tisztított PCR-termékeket a Macrogen és a Thermo Fisher Scientific vállalat szekvenálta. A direkt szekvenálásból származó összes kromatogramot vizuálisan ellenőriztük. A nukleotid változatokat GeneDoc és SnapGene szoftverekkel vizualizáltuk.

### **2.6. Statisztikai analízis**

Az adatok statisztikai elemzéseikhez a SigmaStat (Systat Software)/SPSS szoftvert (IBM), a SISA Quantitative Skills szoftvert, és a G\* Power 3.1.9.7 Statisztikai szoftvert használtuk.

Student t-tesztet, többszörös lineáris regressziót, Mann-Whitney U-próbát, valamint Fisher-egzakt tesztet alkalmaztunk.

## 3. Eredmények

### 3.1. Atomabszorpciós eredmények

Kutatásunk során 32 nő szövet- és vérmintáit vizsgáltuk meg. A cink koncentrációkat mind a premenopauzás, mind a posztmenopauzás nőkben elemeztük és rögzítettük a vonatkozó klinikai információkat.

Amint az várható volt, a posztmenopauzás csoportban lévő nők szignifikánsan idősebbek voltak a premenopauzás csoporthoz képest (átlag  $\pm$  szórás,  $68 \pm 9$  év vs.  $44 \pm 8$  év,  $p < 0,01$ ). A pre- és posztmenopauzás nők között a vérben nem találtunk szignifikáns cinkszint különbséget (átlag  $\pm$  szórás, cink  $5,08 \pm 0,62$  mg/l vs.  $4,75 \pm 0,87$  mg/l). Adataink nem mutattak szignifikáns különbséget a menopauza előtti és a posztmenopauzában lévő nők hüvelyi szövet cinkszintjei között sem (átlag  $\pm$  szórás,  $61,26 \pm 24,04$  mg/kg vs.  $56,92 \pm 25,92$  mg/kg). A teljes vér cinkszintje nem korrelált a beteg életkorával ( $r = 0,01$  és  $r = -0,11$ ,  $p = \text{NS}$ ). A hüvelyszövet cinkszintje és az életkor között azonban negatív korrelációt találtunk ( $r = -0,27$ ,  $p = 0,04$ ).

Többszörös lineáris regresszió számítást végeztünk a hüvelyi szövet cinkszintjének megjóslására az életkor, a menopauza, a hüvelyi szülések száma, valamint a vér cinkszintje alapján. Az összes vizsgált változót belefoglaltuk a regressziós modellbe. Jelentős regressziós egyenletet találtunk ( $F(4, 27) = 4,4$ ,  $p = 0,006$ ), ahol az  $R^2$  értéke 0,4 volt. A többszörös lineáris regressziós modell azt mutatta, hogy a cink

hüvelyszöveti szintjének esetében csak az életkor maradt az egyetlen szignifikáns előrejelző [ $p = 0,03$ , 95% CI:  $-2,28 - (-0,06)$ ] változó.

### 3.2. Génexpresszió analízis eredményei

Azért, hogy összehasonlíthassuk a pre- és posztmenopauzában lévő nők génkifejeződésének értékeit, 14 mintát vontunk be a génexpressziós és az immunhisztokémiai vizsgálatainkba.

Sikeresen izoláltuk minden hüvelyi szövetmintából a qPCR reakciókhoz szükséges mRNS mintákat. A vizsgálatok során mind a 24 gén (*ZnT1-10* és *ZIP1-14*) expresszióját meghatároztuk a szövetmintákban. A kapott értékekből megállapítható, hogy mind a 24 gén kifejeződik mind a menopauza előtti, mind a posztmenopauzás nők hüvelyszöveiteiben.

A *ZnT4* és a *ZnT9* mRNS expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a posztmenopauzás nőknél, mint a premenopauzás nők szöveiteiben (átlag  $\pm$  szórás mRNS expresszió relatív egységekben,  $96,43 \pm 140,61$  vs.  $410,59 \pm 304,34$ ,  $p = 0,03$  és  $0,62 \pm 0,39$  vs.  $1,13 \pm 0,31$ ,  $p = 0,02$ ). Hasonlóképpen, a *ZIP2*, *ZIP3* és *ZIP6* gének mRNS expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a posztmenopauzás nőknél, mint a premenopauzás nők mintáiban (átlag  $\pm$  szórás mRNS expresszió relatív egységekben,  $1,11 \pm 0,61$  vs.  $2,29 \pm 1,20$ ,  $p = 0,04$ ;  $2,32 \pm 1,90$  vs.  $15,82 \pm 12,97$ ,  $p = 0,02$  és  $1,10 \pm 0,80$  vs.  $5,73 \pm 4,72$ ,  $p = 0,03$ ).

Nem találtunk azonban szignifikáns különbséget a *ZnT1-3*, a *ZnT5-8* és a *ZnT10* gének, valamint az *ZIP1*, *ZIP4-5* és *ZIP7-14* mRNS-expressziójában a pre- és posztmenopauzás nők között. Az *ZnT1* és *ZnT4* gének, valamint a *ZIP3*, *ZIP6* és *ZIP9* gének mRNS expressziója magasabb volt, mint a többi *ZnT* és *ZIP* gén expressziója.

### **3.3. Az immunreakció standardizálásának eredményei**

Korábbi tanulmányok arról számoltak be, hogy a *ZnT9*, *ZIP4*, *ZIP6* és *ZIP11* antigének különböző szövetekben expresszálódnak [1, 2]. Vese szövetet alkalmaztunk ezen antitestek immunválaszának optimalizálására a megfelelő antigénfeltárási módszer és az elsődleges antitest titer meghatározásához.

A hüvelyszövet immunhisztokémiai vizsgálatához a következő reakciókörülmények voltak optimálisak. A *ZIP4* fehérje optimális reakciókörülményének egyértelműen a citrát feltárás és a primer antitest 1:100 titere bizonyult. A *ZIP11* fehérje immunhisztokémiai vizsgálatára optimális reakciókörülménynek a Tris-EDTA feltárás és a primer antitest 1:200 titere bizonyult. A *ZnT9* immunhisztokémiai reakció optimalizálása során a kontrasztos, optimális színintenzitást a pH9-es Tris-EDTA pufferben történő antigénfeltárás során és a primer antitest 1:100 titere esetén tapasztaltunk. A *ZIP6* immunreakciók értékelése során a *ZIP6* fehérje immunhisztokémiai vizsgálatára optimális

reakciókörülménynek egyértelműen a magas pH-jú Tris-EDTA feltárás és a primer antitest 1:200 titere bizonyult.

### **3.4. Immunhisztokémiai elemzés eredményei**

A cink transzport fehérjék meghatározása a hüvelyből vett mintákban korábban nem kerültek meghatározásra. Immunhisztokémiai vizsgálatot alkalmaztunk a ZnT és a ZIP transzporterek génexpressziójának megerősítésére és értékelésére fehérjeszinten. Kiválasztottunk egy ZnT transzportert (ZnT9) és három ZIP transzportert (ZIP4, ZIP6 és ZIP11), hogy megerősítsük a ZnT / ZIP fehérjék kifejeződését a hüvelyi szövetben.

A hüvelyi nyálkahártyában a stratum spinosum rétegben szignifikánsan gyengébb kifejeződést mutatott a ZnT9 fehérje a posztmenopauzás csoportban a premenopauzális csoporthoz képest [középérték (intenzitási pontszám) 1 (0-1) vs. 2 (1-2),  $p = 0,012$ ]. Nem találtunk ZnT9 expressziót a stratum planocellulare rétegben, a tunica muscularis vagy a tunica adventitia rétegben.

Az elvégzett vizsgálatoknál valamennyi mintánál kimutattuk a ZIP4 fehérje extracelluláris expresszióját. Emellett valamennyi esetben tapasztaltuk az érfali simaizomban megjelenő barna festődést, illetve a tunica muscularis rétegben is látható volt a ZIP4 fehérje expressziója közepesen erős (intenzitási pontszám, 2), diffúz citoplazmatikus reakciója. A hüvelyfalat borító hámszövet a ZIP4 expressziós mintázata

alapján 2 részre osztható. A stratum basale és a stratum spinosum alsó néhány sejtsorában gyenge (intenzitási pontszám, 1), diffúz citoplazmatikus expresszió figyelhető meg, míg a stratum spinosum felsőbb rétegeiben, illetve a teljes stratum planocellulare területén közepesen erős (intenzitási pontszám, 2) reakció alakult ki. Diffúz citoplazmatikus ZIP4 festődést a tunica adventitia rétegben is tapasztaltunk.

A ZIP6 minta diffúz citoplazmatikus expressziót mutatott a hüvelyfalat borító hámszövetben a stratum basale és a stratum spinosum sejtsoraiban (intenzitási pontszám, 2). Nem találtunk kifejeződést a stratum planocellulare rétegben. A tunica muscularis rétegben minden esetben gyenge pozitív festődést (intenzitási pontszám, 1) figyeltünk meg. Mérsékelt pontszerű ZIP6 expressziót is kimutattunk (intenzitási pontszám, 2) a tunica adventitia rétegben.

A hüvelyfal hámszövetében a stratum basale és a stratum spinosum a ZIP11 diffúz citoplazmatikus expresszióját mutatta. Nem találtunk kifejeződést a stratum planocellulare rétegben. Az immunhisztokémiai vizsgálatok feltárták a ZIP11 fehérje expresszióját az érfali simaizomban, illetve a tunica muscularis rétegben (intenzitási pontszám, 3). ZIP11 festődés megfigyelhető volt a tunica adventitia vaszkuláris simaizmában, de a kötőszöveti sejtekben és az extracelluláris matrixban egyértelmű specifikus festődés nem volt látható.

Nem találtunk szignifikáns különbséget a ZIP4, a ZIP6 és a ZIP11 immunfestés eredményeiben a pre- és posztmenopauzás hüvelyi szövetek között.

### 3.5. Szekvenciaelemzés eredményei

#### 3.5.1. Azonosított változatok magasabb allél frekvenciával

Az SNP-k azonosítása a tíz *ZnT* gén és a 14 db *ZIP* gén hosszabb exonjaikra tervezett szakaszaiban PCR és szekvenálási módszerekkel történt.

Eredményeink azt mutatták, hogy csak egy gén (*ZnT10*) tartalmazott egyedi nukleotid polimorfizmust a tíz vizsgált *ZnT* génből, míg az *ZnT1-9* gének exon régiói a referencia szakaszokkal megegyező szekvenciákkal rendelkeztek.

Ezzel szemben a 14 *ZIP* génből négy gén (*ZIP2*, *ZIP4*, *ZIP12* és *ZIP14*) tartalmazott SNP-ket. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a *ZIP* gének vizsgált exonjai valószínűleg hajlamosabbak a pontmutációkra. A szekvencia összehasonlítások nem mutattak további genetikai változatokat a *ZIP1*, *ZIP3*, *ZIP5-11*, *ZIP13* gének exonjaiban.

Vizsgálatunk során összesen tíz misszensz mutációt és hat szinoním mutációt azonosítottunk. Érdekes módon bizonyos SNP-k (590/*ZIP4* - rs17855765, 292/*ZIP14* - rs896378, 1459/*ZnT10* - rs781687046) különösen magas allélfrekvenciával rendelkeztek a mintáinkban. A

*ZIP2* gén SNP-i hasonló adatokat mutattak, mint az európai populáció allélfrekvenciái. Az rs2234636 referencia allélje azonban magasabb volt a vizsgált csoportban. Az *ZIP4* génben az rs17855765 (c.590G>A) gyakoribb, mint az európai és a globális allélfrekvencia. Az *ZIP12* gén SNP-i hasonló adatokat mutattak, mint az európai és a globális tanulmányokban bemutatott populáció allél gyakoriságai. Az *ZIP14* génben azonosított SNP-k közül kettő különbözött az Ensembl és a dbSNP adatbázistól. Az rs896378 SNP (c.292T>C) esetén a C allél magasabb frekvenciával rendelkezik. Az rs33999442 SNP-ben (c.350C>T) mindkét allél 50%-kal jelenik meg az adatbázisban. Ezek az SNP-k a nők több mint 70%-ában találhatóak meg, míg ugyanazon SNP-k (590/*ZIP4*, 292/*ZIP14*) allélfrekvenciája az európai országokban csak körülbelül 50% volt (Ensembl).

### **3.5.2. Öt új azonosított SNP**

Az azonosított 16 db SNP közül öt bizonyult új SNP-nek. Különböző új heterozigóta mutációkat azonosítottunk az *ZnT10* génben és az *ZIP4* génben. Három új polimorfizmus szinoním volt, amely nem okozott változást a fehérjében, míg két SNP misszensz mutáció volt, aminek következtében a fehérje adott pontján az eredetitől eltérő aminosav épült be. Ezen kívül két új heterozigóta misszensz mutációt találtunk: c.1458C>T (p.P416L) - rs1558249270 az gén 4. exonjában és c.471T>A (p.L49G) - rs1564711111 az gén 1. exonjában. Három új

heterozigóta szinoním mutációt találtunk: c.1459C>A (p.P416P) - rs781687046 a 4-es exonban az *ZnT10* génben és c.469C>T (p.G48G) - rs1554873909 és c.481T>A (p.P52P) - rs1484902933 az 1. exonban az *ZIP4* génben. Az egyedi nukleotid polimorfizmusokat az NCBI dbSNP nyilvános adatbázisába feltöltöttük (dbSNP Build, B154) [I1-5].

Az új SNP-k mellett 11 SNP-t találtunk öt génben, amelyek már ismertek voltak. A *ZIP2* génben két misszensz mutációt, a *ZIP12* génben egy misszensz és egy szinoním mutációt, a *ZIP14* génben két misszensz és két szinoním mutációt találtunk. Az *ZIP4* gén 1. exonjában három további SNP-t (rs117535951, rs187080747, rs17855765) találtunk, amelyeket korábban az Acrodermatitis Enteropathica (AE) betegséghez kapcsoltak [3].

### ***3.5.3. SNP-k a nyomelemek vér- és szövetkoncentrációjával összefüggésben***

A cink transzporter gének SNP-i és a vér vagy a szövet cink koncentrációi közötti összefüggéseket nem ismerjük teljesen. Ezért a vizsgált gének SNP-i és a cink koncentráció közötti összefüggéseket is megvizsgáltuk. A hüvelyi szövetminták átlagos cink koncentrációja  $57,88 \pm 26,07$  mg/kg (átlag  $\pm$  szórás) a teljes vér átlagos cink koncentrációja pedig  $4,84 \pm 0,83$  mg/l (átlag  $\pm$  szórás) volt.

Bár minden nőnek egyedi SNP mintázata volt, több összefüggést találtunk az SNP-k és a hüvelyi szövet cinkszintje között.

Elemzésünk összefüggést mutatott ki a betegenkénti SNP-k száma (több mint hat SNP és kevesebb, mint hat) és a magas hüvelyszöveti cinkszint (67% vs. 33%,  $p = 0,004$ ) között. A *ZIP4* SNP 590c (rs17855765) szignifikánsan gyakoribb volt a magas hüvelyszöveti cinkszinttel rendelkező nők csoportjában az SNP nélküli csoporthoz képest (93% vs. 7%,  $p = 0,02$ ). Érdekes módon a *ZIP4* 590c (rs17855765) gyakran jelen volt a *ZIP14* 389c (rs2293144) SNP-vel együtt a magas szöveti cinkszinttel rendelkező nőknél, szemben az SNP nélküli nőkkel (100% vs. 0%,  $p = 0,02$ ).

Ezenkívül vizsgálati eredményeink összefüggést mutattak a *ZnT10* génen belül az SNP-k száma betegenként (egynél több SNP szemben egy SNP vagy SNP nélkül) és a magas szöveti cinkszintek között (100% vs. 0%,  $p = 0,01$ ). Az SNP-k egyedi kombinációja a *ZnT10* génben (több SNP) és a *ZIP4* génben (több mint kettő) szignifikánsan gyakoribb volt a magas cinkszöveti szinttel rendelkező nők csoportjában (61% vs. 39%,  $p = 0,03$ ). Azt is tapasztaltuk, hogy az SNP-k száma (kettő vagy több vs. kevesebb, mint kettő) a *ZIP4* génben szignifikánsan gyakoribb volt az alacsony vér cinkszinttel rendelkező résztvevőknél (76% vs. 24%,  $p = 0,01$ ).

Általánosan elmondható, hogy a magasabb hüvelyszöveti cinkszinttel rendelkező nőknél gyakrabban fordulnak elő egyedi nukleotid polimorfizmusok.

## 4. Diszkusszió

A cink a sejtek és szövetek elengedhetetlen nyomeleme. Fontos szerepe van a sejtes folyamatok, például a fejlődés és a differenciálódás szabályozásában, illetve számos fiziológiai folyamatban is részt vesz. Megtalálható a legkülönbözőbb szervek sejtjeiben és a hiánya komoly betegségekhez, rendellenességekhez vezethet [4, 5]. Hiszen a menopauza után a nyomelemek anyagcseréjében bekövetkező zavarok kockázata igen magas [6].

Az állatokban kapott eredmények alapján feltételeztük, hogy a humán hüvelyi szövetben is megtalálható és kimutatható a cink és mennyisége kapcsolatban lehet az öregedéssel, illetve a menopauzával [7-9]. Kutatásainkat az is ösztönözte, hogy az állatkísérletek vizsgálati eredményeinek alkalmazása humán kísérleteknél sok bizonytalanságot vet fel. Az állatokon elvégzett kísérletek gyakran nem vagy csak részlegesen alkalmazhatók embereken.

Ezért elindítottuk azokat a vizsgálatainkat, amelyek pre- és posztmenopauzás egészséges nők hüvelyi szövetének és a vér cinktartalmának elemzésére irányultak. A vonatkozó tudományos szakirodalom alapos áttekintése után úgy gondoljuk, hogy ez az első vizsgálat az emberi hüvelyszövet cinkszintjének meghatározásáról, valamint a teljes vérben és a hüvelyszövetben található cink koncentrációjának összehasonlításáról. A teljes vért vizsgáltuk a plazma

vagy a szérum helyett, mert a teljes vér a cink állapotának jobb mutatója lehet, mint a szérum vagy a plazma [10]. Az eritrociták eltérő cinkszintje alapján a teljes vérben a cink koncentrációt 4-8 mg/l tartományban határozták meg [11]. A mi adataink is ebbe a tartományba estek (4,84 mg/l (szórás 0,82)), ami megfelel annak, hogy a vizsgálati alanyok teljes egészében egészségesek voltak, nem szenvedtek jelentős krónikus betegségekben és normális hematológiai értékekkel rendelkeztek, beleértve a normális hemoglobin értékeket is. Ez azért fontos, mert néhány kóros állapot, mint például a daganatok vagy a csontritkulás befolyásolhatja a cink koncentrációját a vérben [12, 13].

Eredményeink szerint a teljes vér cinkszintje hasonló volt a mintákban, és nem korrelált a vizsgálati alanyok életkorával ( $r = 0,01$  és  $r = - 0,11$ ,  $p = \text{NS}$ ). Ugyanakkor a hüvelyi szövet cinkszintjei változatosabbak voltak, és negatív korrelációt mutattak az életkorral ( $r = - 0,27$ ,  $p = 0,04$ ). Azaz, a hüvelyszövet cinkszintjének csökkenése összefüggésben van az öregedéssel. A többszörös regressziós elemzésünk során az életkor volt az egyetlen szignifikáns előrejelző, a menopauza állapota pedig nem befolyásolta az eredményeket. Egyes korábbi állatkísérletekben szintén hasonló eredményt kaptak, ahol az állatok öregedésével a különböző szövetek, mint például a vese szöveti cinkszintje csökkent [14, 15]. Ezen eredmények viszont eltérnek a méh cinkszintjének adataitól, ott ugyanis a korábbi kísérletekben a méhszövet cinkszintje a menopauza alatt volt a legalacsonyabb [7, 8,

16], és feltehetően ez az alacsony cinkszint szerepet játszhatott az atrófiás változások kialakulásában.

A humán szövetekben található nyomelemek kis mennyiségük ellenére jelentős hatást gyakorolnak az anyagcserére. A homeosztázis fenntartásához elengedhetetlen a transzporterek expressziója [17], ezért vizsgálatainkat kiegészítettük a cink transzporter gének mRNS és fehérje expressziójának vizsgálatával.

Jelenleg tíz *ZnT* (*ZnT1–10*) és 14 *ZIP* transzportert azonosítottak (*ZIP1–14*) [18, 19]. Kutatásunk során kimutattuk az összes cink transzporter mRNS expresszióját a hüvelyi szövetekben, hasonlóan más szöveteken végzett más tanulmányokhoz [20-23]. Az mRNS szintek részletesebb vizsgálata azt mutatta, hogy elvárásainknak megfelelően a *ZnT4*, *ZnT9* és *ZIP2*, *ZIP3*, *ZIP6* mRNS expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a posztmenopauzás nők esetében, szemben a premenopauzás nők mRNS expressziójával. A *ZnT9* és a *ZIP6* a gének működése különösen fontos lehet, hiszen az expressziós profiljuk változása különböző betegségekhez (pl. daganatok) vezethet [24-26].

Az adataink alapján az is elmondható, hogy a transzportek között is volt különbség, hiszen a *ZnT1* és *ZnT4* gének, valamint a *ZIP3*, *ZIP6* és *ZIP9* gének mRNS expressziója magasabb volt, mint a többi *ZnT* és *ZIP* gén expressziója. Ez azt mutatja, hogy a szövet cinkellátásában a transzporterek hozzájárulása különböző mértékű lehet.

Mivel a magas transzkripciós szint nem feltétlenül jelenti, hogy az adott fehérje is keletkezik a szövetben, ezért a fehérje jelenlétének bizonyítására, immunhisztokémiai ellenőrzéshez kiválasztottunk néhány transzportert. A *ZIP4* és a *ZIP11* transzporterekre azért esett a választásunk, mert számos tanulmány használta őket genetikai vizsgálatokban [1, 2, 24]. A *ZnT9* és a *ZIP6* transzportereket pedig azért választottuk ki, mert ezek a gének szignifikáns különbséget mutattak az mRNA szintekben a poszt- és premenopauzás csoportokban található nőknél.

Megállapítottuk, hogy mind a négy fehérje kimutatható a vizsgált szövetekben. Ugyanakkor nem voltak szignifikáns különbségek a *ZIP4*, *ZIP6* és *ZIP11* immunfestés eredményeinkben a pre- és posztmenopauzás hüvelyi szövetek között, ellentétben a *ZnT9* fehérje mennyiségével, amely a stratum spinosumban szignifikánsan alacsonyabb volt a posztmenopauzás nők hüvelyszöveteiben. Ez a fehérje azért érdemel figyelmet, mert bár a *ZnT* transzporterek családjához tartozik, nem rendelkezik cinkszállító aktivitással, mert hiányzik belőle egy alapvető hisztidin, amely az intramembrán cinkkötő helyet alkotja. Elsősorban a citoplazmában lokalizálódik [27], és sejtnag receptorok koaktivátoraként funkcionál, éppen ennek köszönhetően új elnevezést kapott: *GAC63* (*GRIP1*-kapcsolt koaktivátor 63) [28]. Így szerepének megállapítása a hüvelyszövetben további vizsgálatokat igényel. Feltételezhetjük, hogy a postmenopauzás nőknél a csökkent *ZnT9* expresszió a citoszólos cink koncentrációjának

csökkenéséhez vezethet, és hozzájárulhat a posztmenopauzás hüvelyi szövetekben található abnormális extracelluláris összetételhez. Ennek bizonyítására azonban további vizsgálatok szükségesek.

Vizsgálatunkban szintén kimutattuk, hogy az *ZIP2* és *ZIP3* mRNS expressziója szignifikánsan alacsonyabb a posztmenopauzás nők esetében. A *ZIP1*, a *ZIP2* és a *ZIP3* fehérjék expressziójáról viszont azt tudjuk, hogy a szervezetben gyakran összehangolt módon történik, és például mRNS szintjük csökken az idős emberek limfocitáiban [29].

Viszonylag magas *ZIP3*, *ZIP6* és *ZIP9* mRNS expressziót találtunk a premenopauzás nők szöveteiben, hasonlóan más tanulmányhoz, amely az *ZIP6* és *ZIP9* magas expresszióját írta le különböző szövetekben (pl. a prosztatában, a placentában, a szívben, a herében és a hasnyálmirigyben) [1]. Feltételezzük tehát, hogy az egyes gének szignifikánsan magasabb expressziói hatással vannak a hüvelyszövet cinkszint szabályozására, illetve a menopauza során kialakuló tünetek megjelenésére, de ezek bizonyítására további kutatások szükségesek.

A továbbiakban a transzporter gének egyes régióinak SNP mintázatát is megvizsgáltuk. E munka során sikerült azonosítani egyedi nukleotid polimorfizmusokat (SNP) a magyar nők mintáiban, és megvizsgálni az SNP-k hatását a cink koncentrációra a teljes vérben és a hüvelyszövetben, valamint összehasonlítani eredményeinket más populációkban kapott adatokkal. Megvizsgáltuk azokat a régiókat a hosszabb exonok szekvenciáiban, amelyek más populációkban

tartalmaztak misszensz mutációkat, és amelyek később alkalmasak lehetnek a TaqMan SNP genotipizáló vizsgálatok (Thermo Fisher Scientific) használatára is.

A *ZnT* és *ZIP* géncsaládok polimorfizmusát PCR és szekvenálási módszerekkel vizsgáltuk, amelyhez új primereket terveztünk. A tervezett PCR primerek alkalmazhatók lesznek a cink transzporterek további tanulmányaiban is. A szekvencia-összehasonlításokkal 16 SNP-t tudtunk azonosítani, köztük öt új mutációt fedeztünk fel, melyek feltöltésre kerültek az NCBI adatbázisba [11-5]. Az adataink azt mutatták, hogy az *ZIP2*, *ZIP4*, *ZIP12*, *ZIP14* és *ZnT10* gének rendelkeztek nagyobb fokú polimorfizmussal. A *ZIP4* gén általunk kimutatott, de korábban már azonosított SNP-it (rs117535951, rs187080747, rs17855765) az Acrodermatitis Enteropathica betegséghez kapcsolták [3]. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a *ZIP* gének tesztelt exonjai valószínűleg hajlamosabbak a pontmutációkra, mint az *ZnT* gének hosszabb exonjai.

Az SNP-k fehérjékre való hatásait tekintve, tíz misszensz mutációt és hat szinoním mutációt találtunk. Különösen magas allélfrekvenciával rendelkezett a korábban azonosított misszensz pontmutációk közül kettő (590 / *ZIP4* - rs17855765, 292 / *ZIP14* - rs896378) és egy új SNP (1459 / *ZnT10* - rs781687046) a populációnkban az európai és a globális allélfrekvenciákhoz képest. Adatainkból az is kiderült, hogy minden nőnek egyedi SNP mintázata volt. Ez nehezítette az SNP-k és a cinkszintek közötti összehasonlításokat, illetve az összefüggések

felismerését. Ráadásul eredményeinket nem tudtuk összehasonlítani az irodalom egyéb adataival sem, mert ez volt az első asszociációs kutatás, amely összefüggést vizsgált a *ZnT* és *ZIP* géncsaládok polimorfizmusai és a hüvelyi szövet cinkszintje között. Bizonyos SNP-k és a cinkszintek között viszont lehetnek összefüggések, hiszen Fujihara és mtsai. szignifikánsan magasabb vér cink koncentrációt találtak több pontmutációnál [30]. Ugyanakkor a teljes vérvizsgálat során az általunk kimutatott SNP-kenél (*ZIP12* - rs10764176 és *ZIP4* - rs17855765) megerősítettük Fujihara és munkatársai [30] azon eredményeit, hogy ezek a mutációk nem befolyásolják a cinkszintet.

Az összes SNP számát nézve viszont az elemzésünk összefüggést mutatott ki a betegenkénti SNP-k száma és a magas hüvelyszöveti cinkszint (67% vs. 33%,  $p = 0,004$ ) között. Érdekes módon, a *ZIP4* SNP 590c (rs17855765) szignifikánsan gyakoribb volt a magas hüvelyszöveti cinkszinttel rendelkező nők csoportjában azokhoz képest, akik ezt az SNP-t nem tartalmazták (93% vs. 7%,  $p = 0,02$ ). Továbbá, hogy a *ZIP4* 590c (rs17855765) gyakran együtt volt jelen a *ZIP14* 389c (rs2293144) SNP-vel, a magas szöveti cinkszinttel rendelkező nőknél, szemben e két SNP-vel nem rendelkező nőkkel (100% vs. 0%,  $p = 0,02$ ).

Feltételezzük tehát, hogy az *ZnT* és *ZIP* géncsaládok egyes polimorfizmusai befolyásolják a teljes vér és a hüvelyi szövet cinkkoncentrációját és feltehetően a cink homeosztázisát is, de ennek bizonyítására további vizsgálatok szükségesek.

A hüvelyszövetben kimutatott alacsonyabb cinkszint korrelál egy friss kutatás tapasztalataival, amely feltárta, hogy a cinktartalmú hüvelygél jelentősen javította a hüvely atrófiájával kapcsolatos tüneteket a posztmenopauzás nőknél, ami arra utal, hogy a cinkpótlás segíthet helyreállítani a hüvelyi szövetek minőségét [31].

A további vizsgálatok tisztázhatják, hogy ezek a változások hozzájárulnak-e az öregedéssel vagy a menopauzával kapcsolatos tünetek (hüvelyi szárazság, atrófia) kialakulásához, és hogy a cink transzporterek (ZnT és ZIP) differenciális expressziója szerepet játszik-e a menopauzával kapcsolatos állapotok kialakulásában vagy éppen annak következményei. Hisszük, hogy eredményeink, a humán mintákon végzett kísérleteink, jelentős előrelépést jelenthetnek az alap- és menopauza kutatásban.

## 5. Az értekezés új tudományos eredményei

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy:

1. Sikerült meghatározni mind a hüvelyszövet, mind a teljes vér cink koncentrációját. A vér cinktartalma közel egységes volt, míg a hüvelyszövet esetén nagyobb változatosságot találtunk a minták között.
2. Negatív korrelációt találtunk az életkor és a cink szöveti koncentrációja között, viszont a teljes vér cink koncentrációja nem korrelált a beteg életkorával. Eredményeink arra utalnak, hogy a hüvelyszövet cinkszintje az öregedéssel csökken.
3. A génexpressziós elemzésekből egyértelműen megállapítható, hogy egyes cinkszállító gének kifejeződése nagymértékben csökken a posztmenopauzában lévő nőknél. A *ZnT4* és a *ZnT9*, illetve a *ZIP2*, *ZIP3* és *ZIP6* gének mRNA expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a posztmenopauzás nőknél.
4. *ZnT1* és *ZnT4* gének, valamint a *ZIP3*, *ZIP6* és *ZIP9* gének mRNA expressziója magasabb volt, mint a többi *ZnT* és *ZIP* gén expressziója.
5. A szöveti cink transzporter fehérjék analízise alapján elmondhatjuk, hogy valamennyi vizsgált fehérje termelődött a hüvelyszövetben. A *ZnT9* fehérje expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a posztmenopauzás nőknél, mint a premenopauzásoknál.

6. A polimorfizmus vizsgálatokhoz tervezett PCR primerek alkalmazhatók lesznek a cink transzporterek további tanulmányozásában is.
7. A transzporter gének DNS-sének vizsgálata számos SNP-t mutatott ki. A *ZIP* gének vizsgált exonjaiban több SNP-t találtunk, így valószínűleg hajlamosabbak a pontmutációkra.
8. A kiválasztott exonok szekvenálása 16 SNP-t tárt fel, köztük öt korábban azonosítatlan SNP-t.
9. Habár minden résztvevő egyedi SNP mintázattal rendelkezett, számos összefüggést találtunk az SNP-k és a hüvelyszövet vagy a teljes vér cinkszintje között.
10. Különösen magas allélfrekvenciával rendelkezett a korábban azonosított misszensz pontmutációk közül kettő és egy új SNP a populációnkban az európai és a globális allélfrekvenciákhoz képest.

Eredményeink jelentős előrelépést jelenthetnek a cink homeosztázis és a menopauza kutatásokban.

## 6. Hitelesített Publikációs lista



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/94/2022.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Csikós Anett

Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10038215

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

#### Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

1. **Csikós, A.**, Kozma, B., Baranyai, E., Miklós, I., Larson, K., Póka, R., Takács, P.: Evaluation of zinc and copper levels in vaginal tissues and whole blood: correlation with age.  
*BMC Women's Health*. 21 (1), 1-7, 2021. EISSN: 1472-6874.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12905-021-01215-6>  
IF: 2.809 (2020)
2. **Csikós, A.**, Kozma, B., Pór, Á., Kovács, I., Lampé, R., Miklós, I., Takács, P.: Zinc Transporter 9 (SLC30A9) Expression Is Decreased in the Vaginal Tissues of Menopausal Women.  
*Biol. Trace Elem. Res.* 199 (11), 4011-4019, 2021. ISSN: 0163-4984.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-020-02525-w>  
IF: 3.738 (2020)
3. **Csikós, A.**, Takács, P., Miklós, I.: Comparison of novel single nucleotide polymorphisms of zinc transporters with zinc concentration in the human blood and vaginal tissues.  
*Biometals*. 33 (6), 323-337, 2020. ISSN: 0966-0844.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-020-00249-x>  
IF: 2.949

#### Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (2)

4. **Csikós, A.**, Kozma, B., Miklós, I., Pór, Á., Kovács, I., Lampé, R., Takács, P.: Differential expression of zinc transporters in vaginal tissues.  
*Female Pelvic Reconstr. Surg.* 26 (10S-Suppl1), S127, 2020. ISSN: 2151-8378.
5. **Csikós, A.**, Miklós, I., Takács, P.: Polymorphisms identification of SLC30A (ZnTs) and SLC39A (ZIPs) Family genes in Hungary.  
In: A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2018. évi Nagygyűlése és a XIII. Fermentációs Kollokvium : Absztraktfüzet, [s.n.], Eger, 10-11, 2018.





### További közlemények

#### Magyar nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

6. Szabó, G., Angyal, A., **Csikós, A.**, Bessenyei, É., Tóth, E., Kiss, P., Szabó, S.: A talajvíz veszélyeztetettségének vizsgálata alföldi településeken.  
*Földrajzi Közl.* 134 (2), 173-187, 2010. ISSN: 0015-5411.

#### Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (4)

7. **Csikós, A.**, Németh, M. Z., Frenkel, O., Kiss, L., Váczy, K. Z.: A Fresh Look at Grape Powdery Mildew (*Erysiphe necator*) A and B Genotypes Revealed Frequent Mixed Infections and Only B Genotypes in Flag Shoot Samples.  
*Plants-Basel.* 9 (9), 1156-1167, 2020. ISSN: 2223-7747.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/plants9091156>  
IF: 3.935
8. Pálfi, X., Karácsony, Z., **Csikós, A.**, Bencsik, O., Szekeres, A., Zsófi, Z., Váczy, K. Z.: The potential use of the culture filtrate of an *Aspergillus niger* strain in the management of fungal diseases of grapevine.  
*J. Cent. Eur. Agric.* 21 (4), 839-850, 2020. E-ISSN: 1332-9049.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5513/JCEA01/21.4.2942>
9. Váczy, K. Z., Németh, M. Z., **Csikós, A.**, Kovács, M. G., Kiss, L.: *Dothiorella omnivora* isolated from grapevine with trunk disease symptoms in Hungary.  
*Eur. J. Plant Pathol.* 150, 817-824, 2018. ISSN: 0929-1873.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-017-1323-5>  
IF: 1.744
10. Szabó, G., Angyal, A., **Csikós, A.**, Bessenyei, É., Tóth, E., Kiss, P., Csorba, P., Szabó, S.: Examination of the groundwater pollution at lowland settlements.  
*Stud. Univ. "Vasile Goldis" Ser. Ştiinţ. vieţii.* 20 (4), 89-95, 2010. ISSN: 1584-2363.

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 15,175**

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9,496**

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

Debrecen, 2022.02.22.



**Short thesis for the degree of doctor of philosophy (Ph.D.)**

**Evaluation of zinc homeostasis in the vaginal  
tissue**

by Anett Csikós

Supervisors: Ida Miklós Gálné PhD

Péter Takács MD, PhD, MBA



UNIVERSITY OF DEBRECEN

Juhász-Nagy Pál Doctoral School

Debrecen, 2022

# 1. Introduction

Zinc (Zn) is an essential trace element of the human body. Its biological function can be divided into three categories: structural, regulatory, and catalytic. Zn contributes to the protein structure, regulates gene expression, and catalyzes enzyme activity. In addition, zinc plays an important role in proliferation, differentiation, and apoptosis at the cellular level.

In the last decade has been discovered a homeostatic system of proteins that control cellular zinc by coordinating zinc import and export distribution of zinc. This system consists of regulators and transmembrane transporter proteins that deliver zinc ions across membranes. Two major families of zinc transporters have been identified: SLC30A (also called Zn transporter, ZnT) and SLC39A (also known as Zrt-, Irt-related proteins, ZIP). Ten SLC30A/ZnT genes and 14 SLC39A/ZIP genes have been defined in humans.

One of the most spectacular biological adaptations during a woman's life is the transformation of the pelvis and vagina to prepare for birth and return to normal after pregnancy. Menopause brings even more significant changes, as a number of pathological processes can start, and these negative processes affect women's entire bodies.

That is why it is important to understand the processes that can slow down or even improve the harmful effects in the vagina.

The risk of abnormal metabolism of trace elements after menopause is high. The concentration of trace elements can be affected by several factors, such as diet, elements replacement, and zinc transport. Since we currently know relatively little about the zinc levels in the vaginal tissue, the function of the zinc transporter genes, and the relationships between them, we have sought to understand them in this dissertation.

We hypothesized that vaginal tissue and whole blood zinc levels correlate and that trace element concentrations are associated with aging or menopause. In addition, we hypothesized that zinc levels in vaginal tissue decrease with aging. We further hypothesized that zinc transporters are differentially expressed in vaginal tissues and that expression levels decline after menopause, which may contribute to the altered vaginal wall composition in postmenopausal women.

We initiated a study of full-thickness vaginal wall samples from pre and postmenopausal women to test our hypothesis.

We aimed to

1. define zinc levels in whole blood and vaginal tissue samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) method and establish whether a correlation exists between the zinc levels in whole blood or vaginal tissue samples and whether the values obtained are related to the age of the patient or the state of menopause.
2. determine the gene expression profile of ZnT1-10 transporters and ZIP1-14 transporters by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and immunohistochemistry (IHC) analysis of the production of proteins encoded by each gene in vaginal tissue.
3. Expand our knowledge of the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the zinc transporter genes belonging to the SLC30A and SLC39A families and whether there is a correlation between these SNPs and zinc levels in whole blood and vaginal tissue.

## **2. Material and Method**

### **2.1. Participants and tissue preparation**

Full-thickness vaginal wall biopsies and whole blood samples were collected from 32 women undergoing surgery for benign gynecological reasons (not involving the vaginal tissues) at the University of Debrecen, Faculty of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology. The study protocol complied with the Declaration of Helsinki principles and was approved by the Hungarian National Institutional Review Medical Research Council (approval no. 7239-3/2017EIUG). All women signed written informed consent before participating in our research. Participants were received a unique study identification number after enrolment.

We have collected peripheral whole blood samples from the patients into 10 ml capacity BD Vacutainer® K2E (EDTA) plastic tube with identification numbers.

During the surgeries, three pieces of tissue, approximately 0.5 x 0.5 cm were removed from the vaginal wall. Vaginal tissue sampling was performed from the incision wound, so this did not pose an extra risk or inconvenience to the patient, as the tissue was removed during the surgery anyway. We have standardized the specimen collection, and full-thickness biopsies of the anterior vaginal wall were cut from the midline area of the vault.

The selected women were divided into premenopausal and postmenopausal groups. All premenopausal samples were collected at the proliferative phase of the menstrual cycle. Postmenopausal women were defined as at least 12 consecutive months of amenorrhea without any other obvious reason and or consistently elevated follicle-stimulating hormone (FSH) blood levels of 30 mIU/mL or higher.

We excluded women with osteoporosis, cancer, zinc deficiency, pregnancy, endometriosis, immunological and connective tissue diseases, recent use (within 6 months) of vaginal or systemic hormone replacement therapy, and women with a prior pessary or intrauterine device (IUD) use. Exclusion criteria also included women taking zinc supplements with diabetes or autoimmune diseases.

## **2.2. Determination of zinc in whole blood and vaginal tissue samples by the ICP-OES method**

Tissue zinc levels were determined by atomic absorption spectrophotometry.

### ***2.2.1. Sample pre-treatment***

A validated analytical balance was used to weigh samples of vaginal tissues. The samples were moved into glass beakers and placed into a drying cabinet to dry until constant weight.

After measuring the dry mass of the samples, a pre-treatment of wet digestion was carried out before the elemental analysis.

Whole blood samples were also treated with wet digestion at atmospheric pressure before the analysis.

### ***2.2.2. Elemental analysis***

The elemental analysis of the pre-treated tissue and blood samples was carried out by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES 5100, Agilent Technologies). The measurements were conducted in SVDV (Synchronous Vertical Dual View) mode, gaining intensity data from the axial and radial view, simultaneously. An automatic sample introduction was applied (SPS 4, Agilent Technologies), and the samples were measured in a randomized design.

We have performed measurements to generate a five-point calibration curve. We have diluted the calibration solutions from a multi-element standard of 1000 mg/l (ICP standard IV, Merck, Germany) with 0.1 M nitric acid in ultrapure water.

### **2.3. Gene expression studies in vaginal tissue samples**

During the studies, we determined the gene expression profile of the ZnT1-10 and ZIP1-14 transporters in samples from seven - seven pre and postmenopausal women.

### ***2.3.1. mRNA extraction***

mRNA extraction from vaginal tissues was performed by GenElute Direct mRNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). mRNA. The samples were homogenized by a Minilys Homogenizer instrument (Bertin Instruments). We designed the protocol of homogenization for the vaginal tissue samples. After the homogenization, we continued with step 3 of the GenElute Direct mRNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). mRNA concentrations (5-10 ng/ $\mu$ l) were measured on Qubit 3.0 fluorometer with Qubit™ RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

In order for mRNA to be analyzed in further experiments, it was first necessary to transcribe it into complementary DNA (cDNA) using a reverse transcriptase enzyme. The Thermo Scientific Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) was selected for transcription during the experiments. cDNA was quantified using Qubit™ ssDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's protocol. The cDNA samples were stored immediately at -20°C for subsequent qPCR analysis.

### ***2.3.2. Real-time PCR analysis***

The mRNA expression after the cDNA synthesis was determined by quantitative real-time reverse-transcription PCR (RT-qPCR). Unique Taqman probes were used for each gene, and the Best coverage assay

was chosen for reliability (TaqMan Gene Expression Assay). For the reference gene *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* was used.

qPCR was performed using 2  $\mu$ l (concentration range: 10-15 ng/ $\mu$ l) of cDNA template in a 20  $\mu$ l reaction volume, with TaqMan Universal PCR Master Mix II no UNG (Thermo Fisher Scientific), on the StepOnePlus Real-Time PCR System (ABI, Thermo Fisher Scientific). The protocol was included by default in StepOne Software v2.3. All samples were amplified in triplicate and used negative control assays without a template for each mRNA transcript on each plate. The amplification efficiency of each assay was determined using the Comparative Ct ( $\Delta\Delta$ Ct) method. We compared the threshold cycle (Ct) of the target gene (*ZnT1-10* and *ZIP1-14*) with the reference genes (*GAPDH*).

## **2.4 Determination of zinc transport proteins in vaginal tissue samples by IHC method**

After storing the tissue samples at  $-70^{\circ}$  C, zinc transport proteins were determined by immunohistochemistry.

In our research, we determined the ZnT9, ZIP4, ZIP6, and ZIP11 proteins.

The immune reactions were performed on 14 vaginal tissue samples. During the sample processing, 5-5 frozen sections from each

sample were prepared for later analysis, and the remaining vaginal tissue was fixed in formalin and embedded in paraffin. Immunohistochemical investigation of ZnT9, ZIP4, ZIP6, and ZIP11 was performed on a formalin-fixed paraffin-embedded vaginal specimen.

#### ***2.4.1. Standardization of immunohistochemical reactions***

Kidney tissue was used to optimize these antibodies' immune responses to determine the appropriate antigen digestion method and primary antibody titer. To ensure optimal reaction conditions, standardization of immune responses was performed on kidney tissue known to express ZNT9, ZIP4, ZIP6, and ZIP11 antigens as positive control tissue.

Two types of digestion solution, one low (citrate pH6) and one high pH (Tris-EDTA pH8 and pH9) were tested for each protein. Negative controls were also used to standardize the ZNT9, ZIP4, ZIP6, and ZIP11 immune responses by omitting the primary antibody.

The ZNT9, ZIP4, ZIP6, and ZIP11 antibodies tested were rabbit polyclonal antibodies.

A critical part of the standardization of immune reactions is the determination of the appropriate primary antibody titer, therefore several titers were tested around the dilution range recommended by the manufacturer.

## **2.5 Determination of single nucleotide polymorphism of zinc transporter proteins**

The polymorphisms of the *ZnT1-10* and *ZIP 1-14* genes were determined from the blood samples.

### ***2.5.1. DNA extraction from whole blood, quantification of gDNA***

The Blood DNA Isolation Mini Kit (Norgen Biotek) was used for genomic DNA extraction from whole blood, according to the manufacturer's instructions.

The gDNA concentration was determined with the Qubit<sup>®</sup> 3.0 fluorometer using the Qubit<sup>®</sup> dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) as described by the manufacturer.

### ***2.5.2. Design of new primers for PCR reactions***

The study of the sequences of ZnT and ZIP proteins in DNA samples isolated from blood required the design of different primers.

We checked every exon in every zinc transporter gene (National Center for Biotechnology Information, NCBI), selected those regions which contained missense mutations in high number and the regions were compared with the available TaqMan SNP Genotyping Assays at the ThermoFisher Scientific. We designed new primers for each longer exon which seems to be suitable for giving PCR fragments with reliable

length for the sequencing and contain more missense mutations. The fragments were between 100 bp and 276 bp.

### ***2.5.3. PCR amplification***

The PCR amplifications were carried out in a total volume of 25  $\mu$ l in Step One Plus (Applied Biosystems) and iCycler (Bio-Rad) machine. For the amplification, we used DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific) according to the guide's instructions and adding 1  $\mu$ l (concentration range: 15-30 ng/ $\mu$ l) of total genomic DNA for each reaction. The cycling parameters were identical, except that the primer annealing temperature was set to acceptance of each primer pair. Twenty-four primer sets were used for the 24 genes, the position of which was calculated from the first nucleotide of the gene. The run settings for the cycles have been optimized based on our previous experience.

### ***2.5.4. Verification of PCR products by gel electrophoresis***

Successful amplification of PCR products was confirmed with DNA Screening Gel Cartridge in the QIAxcel Instrument (Qiagen). The products visualized by QIAxcel ScreenGel software (Qiagen). The QIAxcel Screening Kit configured for the AM320 protocol was used to determine the size and concentration of the DNA segment.

### ***2.5.5. Sequence analysis***

PCR products were purified with EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit (Bio Basic Inc.). Amplified products sent to Macrogen and ThermoFisher for sequencing. Sequencing was conducted with the primers used for amplification. Nucleotide variants were visualized with GeneDoc and SnapGene software.

## **2.6. Statistical analysis**

For statistical analyzes of the data, SigmaStat (Systat Software) / SPSS software (IBM), SISA Quantitative Skills software, and G \* Power 3.1.9.7 Statistical software were used.

Student's t-test, multiple linear regression, Mann-Whitney U-test, and Fisher-exact test were used.

## 3. Results

### 3.1. Atomic absorption results

Thirty-two women were enrolled in our study. We have analyzed the vaginal and whole blood zinc and copper concentrations and recorded the relevant clinical information.

As expected, women in the postmenopausal group were significantly older compared to the premenopausal group (mean  $\pm$  SD,  $68 \pm 9$  years vs.  $44 \pm 8$  years,  $p < 0.01$ ). Zinc concentration of whole blood samples in the postmenopausal group was not significantly different compared to the premenopausal group (mean  $\pm$  standard deviation, zinc  $5,08 \pm 0,62$  mg/l vs.  $4,75 \pm 0,87$  mg/l). Zinc concentration of vaginal tissue in the postmenopausal group was not significantly different compared to the premenopausal group (mean  $\pm$  standard deviation, zinc  $61,26 \pm 24,04$  mg/kg vs.  $56,92 \pm 25,92$  mg/kg). In the whole blood samples, the zinc levels did not correlate with the patient's age ( $r = 0,01$  és  $r = - 0,11$ ,  $p = \text{NS}$ ). However, in the vaginal tissue, a negative correlation was found for zinc levels with age ( $r = - 0.27$ ,  $p = 0.04$ ).

Multiple linear regression was calculated to predict vaginal tissue zinc levels based on age, menopausal status, number of vaginal deliveries, and blood zinc levels. All examined variables were included in the regression model.

A significant regression equation was found ( $F(4, 27) = 4.4$ ,  $p = 0.006$ ), with an  $R^2$  of 0.4. The multiple linear regression model showed that only age remained a significant predictor for both zinc and copper vaginal tissues levels ( $p = 0.03$ , 95% CI: -2.28 to -0.06).

### **3.2. Results of gene expression analysis**

To compare gene expression values in pre and postmenopausal women, 14 samples were included in our gene expression and immunohistochemical studies.

We successfully isolated the mRNA samples required for qPCR reactions from all vaginal tissue samples. We have determined the expression of all 24 genes (*ZnT1-10* and *ZIP1-14*) in the tissue samples. All examined ZnTs (1-10) and ZIPs (1-14) were expressed in vaginal tissues of both premenopausal and postmenopausal women.

ZnT4 and ZnT9 mRNA expression were significantly lower in postmenopausal women compared to premenopausal women (mean  $\pm$  SD mRNA expression in relative units,  $96.43 \pm 140.61$  vs.  $410.59 \pm 304.34$ ,  $p = 0.03$  and  $0.62 \pm 0.39$  vs.  $1.13 \pm 0.31$ ,  $p = 0.02$ ). Similarly, ZIP2, ZIP3, and ZIP6 mRNA expression were significantly lower in postmenopausal women compared to premenopausal women (mean  $\pm$  SD mRNA expression in relative units,  $1.11 \pm 0.61$  vs.  $2.29 \pm 1.20$ ,  $p = 0.04$ ;  $2.32 \pm 1.90$  vs.  $15.82 \pm 12.97$ ,  $p = 0.02$  and  $1.10 \pm 0.80$  vs.  $5.73 \pm 4.72$ ,  $p = 0.03$ ).

However, we have found no significant differences in the mRNA expression of *ZnT1-3*, *ZnT5-8*, and *ZnT10* genes and *ZIP1*, *ZIP4-5*, and *ZIP7-14* between pre and postmenopausal women. The *ZnT1* and *ZnT4* genes and *ZIP3*, *ZIP6*, and *ZIP9* genes mRNA expression were higher than other *ZnTs* and *ZIPs*.

### **3.3. Results of standardization of the immune response**

Previous studies have reported that ZnT9, ZIP4, ZIP6, and ZIP11 antigens are expressed in different tissues [1, 2]. Kidney tissue was used to optimize the immune response of these antibodies to determine the appropriate antigen detection method and primary antibody titer.

The following reaction conditions were optimal for immunohistochemical examination of vaginal tissue. The optimal reaction conditions for the ZIP4 protein were clearly citrate digestion and the 1:100 titer of primary antibody. Tris-EDTA digestion and the 1:200 titer of primary antibody proved to be the optimal reaction conditions for the immunohistochemical analysis of the ZIP11 protein. In the optimization of the ZnT9 immunohistochemical reaction, the contrasting, optimal color intensity was observed during antigen detection in Tris-EDTA buffer pH9 and at a titer of 1:100 of the primary antibody. In the evaluation of ZIP6 immunoreactions, the optimal reaction conditions for immunohistochemistry of ZIP6 protein

were clearly found to be high pH Tris-EDTA digestion and a 1:200 titer of primary antibody.

### **3.4. Results of immunohistochemical analysis**

The determination of zinc transport proteins in vaginal samples has not been determined previously. Immunohistochemistry was used to confirm and assess ZnT and ZIP expression at the protein level. We have picked one ZnT (ZnT9) and three ZIPs (ZIP4, ZIP6, and ZIP11) to confirm the presence of the ZnT/ZIP expression in the vaginal tissue.

In the vaginal mucosa, the stratum spinosum layer showed a significantly weaker expression of ZnT9 in the postmenopausal group compared to the premenopausal group [Median, intensity score 1 (0-1) vs. 2 (1-2),  $p = 0.012$ ]. We did not find any expression of ZnT9 in the stratum planocellulare, in the tunica muscularis, or in the tunica adventitia layers (Fig. 1a,b and Table 4).

Extracellular expression of ZIP4 protein was detected in all samples. In addition, positive brown staining in vascular smooth muscle was observed in all cases, and a moderately strong (Intensity score 2) diffuse cytoplasmic response was seen in the tunica muscularis layer based on the expression pattern of ZIP4. Based on the ZIP4 expression pattern the epithelium can be divided into 2 parts, the stratum basale and few lower rows of stratum spinosum with weak (Intensity score 1). diffuse cytoplasmic expression, while in the upper layers of the stratum

spinosum and the full stratum planocellulare showed a moderately strong (Intensity score 2) reaction. Diffuse cytoplasmic ZIP4 staining also was shown in the tunica adventitia layer.

The ZIP6 pattern showed diffuse cytoplasmic expression in the stratum basale and the stratum spinosum (Intensity score 2). We did not find expression in the stratum planocellulare. In addition, weak positive staining (Intensity score 1) was observed in all cases in the tunica muscularis layer. Moderate point-like expression (Intensity score 2) ZIP6 staining also was shown in the tunica adventitia layer.

In the epithelial tissue of the vagina wall, stratum basale and stratum spinosum showed diffuse cytoplasmic expression of ZIP11. There was no expression in the stratum planocellulare. The immunohistochemical tests revealed the expression of ZIP11 protein in the vascular smooth muscle and the tunica muscularis layer (Intensity score 3). There was ZIP11 staining in the vascular smooth muscle of the tunica adventitia, but no other specific immunostaining in the cells of connective tissue.

There were no significant differences in ZIP4, ZIP6, and ZIP11 immunostaining between the pre and postmenopausal vaginal tissues.

## 3.5. Results of sequence analysis

### *3.5.1. SNPs with higher allele frequencies were found among the 16 identified variants*

SNPs were identified by PCR and sequencing methods in the longer regions of the ten *ZnT* genes and the 14 *ZIP* genes designed for their longer exons.

Our results revealed that only one gene (*ZnT10*) contained a SNP from the ten tested *ZnT* genes, while the investigated exon regions of *ZnT1-9* genes had wild-type sequences.

In contrast, four genes (*ZIP2*, *ZIP4*, *ZIP12*, and *ZIP14*) from the 14 *ZIP* genes contained SNPs. At the same time, sequence comparisons revealed no genetic variants within the exons of the *ZIP1*, *ZIP3*, *ZIP5-11*, *ZIP13* genes.

In our study altogether, ten missense mutations and six cds-synonymous mutations were identified. Interestingly, certain SNPs (590/*ZIP4* - rs17855765, 292/*ZIP14* - rs896378, 1459/*ZnT10* - rs781687046) had especially high allele frequencies in our samples. The SNPs of the *ZIP2* gene showed similar data as the European allele frequency. However, the reference allele of rs2234636 was higher in the investigated group. In the *ZIP4* gene, the rs17855765 (c.590G>A) is more frequent, like the European and Global allele frequency. The SNPs of the *ZIP12* gene showed similar data as the European and

Global allele frequency. Two of the identified SNPs in the *ZIP14* gene were different compared to the Ensembl and dbSNP database. In the rs896378 (c.292T>C), the C allele has a higher frequency. In the rs33999442 (c.350C>T), both alleles appear with 50% against the database. Namely, these SNPs could be found in more than 70% of women, while allele frequencies of the same SNPs (590/*ZIP4*, 292/*ZIP14*) were about only 50% in the European countries (Ensembl).

### **3.5.2. Five novel SNPs were identified**

Five of the identified 16 SNPs proved to be new SNPs. Namely, different novel SNPs were identified in *ZnT10* and *ZIP4*. Three novel polymorphisms were cds-synonymous, while two SNPs resulted in missense mutations, and consequently, amino acid substitutions in the protein. In addition, we found two novel heterozygous missense mutations: c. 1458C>T (p.P416L) - rs1558249270 at exon 4 of the *ZnT10* gene and c. 471T>A (p.L49G) - rs1564711111 at exon 1 of the *ZIP4* gene. Three novel heterozygous cds-synonymous mutations were identified: c. 1459C>A (p.P416P) - rs781687046 at exon 4 in the *ZnT10* gene and c. 469C>T (p.G48G) - rs1554873909 and c. 481T>A (p.P52P) - rs1484902933 at exon 1 in the *ZIP4* gene. We submitted these new SNPs into the NCBI public database and are publicly available in the dbSNP Build (B154) [I1-5].

Besides the novel SNPs, we found 11 SNPs in five genes, which were already known. We found two missense mutations in the *ZIP2* gene, a missense and a cds-synonymous mutation in the *ZIP12*, two missense mutations, and two cds-synonymous mutations in the *ZIP14* gene. Three further SNPs, rs117535951, rs187080747, rs17855765, located in the exon 1 of *ZIP4* were also found, which were earlier associated with Acrodermatitis Enteropathica (AE) [3].

### ***3.5.3. SNPs relation with trace elements concentration of blood and tissue***

The relation between the SNPs of zinc transporter genes and zinc concentrations of blood or tissue is not fully understood. Therefore, the associations between SNPs of the tested genes and the concentration of zinc were also investigated. The mean zinc concentration of vaginal tissue samples was  $57.88 \pm 26.07$  mg/kg (mean  $\pm$  standard deviation), and the mean zinc concentration of the whole blood was  $4.84 \pm 0.83$  mg/l (mean  $\pm$  standard deviation).

Although every woman had a unique SNP pattern, we have found multiple associations between SNPs and vaginal tissue zinc levels. Our analysis revealed an association between the number of SNPs (more than six SNPs vs. less than six) per patient and high zinc vaginal tissue levels (67% vs. 33%,  $p = 0.004$ ). The *ZIP4* SNP 590c (rs17855765) was significantly more frequent in the group of women with high zinc

vaginal tissue levels compared to the group without SNP (93% vs. 7%,  $p = 0.02$ ). Interestingly, *ZIP4* 590c (rs17855765) was often present together with *ZIP14* 389c (rs2293144) SNP in women with high zinc tissue levels compared to women without SNPs (100% vs. 0%,  $p = 0.02$ ).

In addition, our study results showed an association between the number of SNPs within the *ZnT10* gene (more than one SNP vs. none or one SNP) per patient and high zinc tissue levels (100% vs. 0%,  $p = 0.01$ ). A unique combination of SNPs *ZnT10* gene (more than one SNP) and the *ZIP4* gene (more than two) were significantly more frequent in the group of women with high zinc tissue levels (61% vs. 39%,  $p = 0.03$ ).

Also, we have found that the number of SNPs (two or more vs. less than two) in *ZIP4* were significantly more frequent in the patients with low zinc blood level (76% vs. 24%,  $p = 0.01$ ).

In general, single nucleotide polymorphisms are more common in women with higher vaginal zinc levels.

## 4. Discussion

Zinc is an essential element for cells and tissues and has an important role in regulating cellular processes, such as development and differentiation. Zinc is involved in many physiological processes. It is found in the cells of various organs and its absence can lead to serious diseases and disorders [4, 5]. The risk of disturbances in the metabolism of trace elements after menopause is high [6].

Based on the results obtained in animals, we hypothesized that zinc is also found and detectable in human vaginal tissue and may be associated with aging and menopause [7-9]. Our research was also motivated by the fact that there are many uncertainties in the application of animal test results to human experiments. Animal experiments are often not or only partially applicable to humans.

Therefore, we launched our studies to analyze the vaginal tissue and blood zinc levels in pre and postmenopausal healthy women. After a thorough review of the relevant scientific literature, we believe that this is the first report on the determination of zinc levels in human vaginal tissue and the correlation between zinc concentration in the whole blood and the vaginal tissue. We investigated whole blood rather than plasma or serum, because whole blood may be a better indicator of zinc status rather than serum or plasma [10]. Based on the different zinc

levels in the erythrocytes, the zinc concentration in the whole blood was determined in the range of 4–8 mg/l [11].

Our data were within this range [4.84 mg/l (standard deviation 0.82)], which corresponds to the fact that the participants were completely healthy, did not suffer from significant chronic diseases, and had normal hematological values, including normal hemoglobin values. This is important because some pathological conditions, such as tumors or osteoporosis, can affect zinc levels in the blood [12, 13].

Our results showed that in the whole blood samples, the zinc levels were similar and did not correlate with the participant's age ( $r = 0,01$  és  $r = - 0,11$ ,  $p = \text{NS}$ ). However, in the vaginal tissue were more varied, and a negative correlation was found for zinc levels with age ( $r = -0.27$ ,  $p = 0.04$ ). That is, a decrease in zinc levels in the vaginal tissue is associated with aging. In our multiple regression analysis, age was the only significant predictor, and menopausal status did not affect the results. Similar results have also been obtained in some previous animal experiments, where the zinc levels of various tissues, such as the kidney, decreased with the aging of the animals [14, 15]. However, these results differ from the data on zinc levels in the uterus, wherein previous experiments, zinc levels in uterine tissue were lowest during menopause [7, 8, 16], and it is possible this low zinc level may have played a role in the development of atrophic changes.

Despite their small amounts, trace elements in human tissues have a significant effect on metabolism. The expression of transporters is essential for the maintenance of homeostasis [17], so we supplemented our studies with investigation of mRNA and protein expression of zinc transporter genes.

Currently, ten ZnT transporters (ZnT1–10) and fourteen ZIP transporters have been identified (ZIP1–14) [18, 19]. Our results showed the expression of all zinc transporter mRNA in the vaginal tissues, similar to other studies in other tissues [20-23]. A more detailed analysis of mRNA levels showed that, in line with our expectations, the ZnT4, ZnT9, and ZIP2, ZIP3, ZIP6 mRNA expressions were significantly lower in postmenopausal women compared to premenopausal women. The function of ZnT9 and ZIP6 genes may be particularly important, as changes in their expression profile may lead to different diseases (e.g., tumors) [24-26].

Based on our data, it can also be said that there was a difference between the transports as the ZnT1 and ZnT4 genes and ZIP3, ZIP6, and ZIP9 genes mRNA expression were higher than other ZnTs and ZIPs. This indicates that the contribution of transporters to tissue zinc supply may be variable. Since high levels of transcription do not necessarily indicate that a particular protein is produced in the tissue, we selected some transporters for immunohistochemical verification to prove the presence of the protein.

We chose ZIP4 and ZIP11 because several studies have used these transporters in genetic studies [1, 2, 24]. ZnT9 and ZIP6 were selected because these genes showed a significant difference in mRNA levels in the post- and premenopausal women. We found that all four proteins were detectable in the tissues examined. However, there were no significant differences in ZIP4, ZIP6, and ZIP11 immunostaining results between the pre and postmenopausal vaginal tissues, in contrast, the amount of ZnT9 protein in the stratum spinosum was significantly lower in postmenopausal women. This protein deserves attention because, although it belongs to the family of ZnT transporters, it has no zinc transport functions because it lacks an essential histidine which consists the intramembrane zinc-binding site. It localizes mainly in the cytoplasm [27] and acts as a coactivator of nuclear receptors, hence its new name GAC63 (GRIP1-coactivator 63) [28]. Thus, its role in vaginal tissue requires further investigation. We can only speculate that reduced ZnT9 expression in postmenopausal women may lead to decreased cytosolic zinc concentrations and could contribute to the abnormal extracellular composition found in postmenopausal vaginal tissues. However, further studies are needed to prove this.

In our study, we also showed that the expression of ZIP2 and ZIP3 mRNA was significantly lower in postmenopausal women. However, the expression of ZIP1, ZIP2, and ZIP3 proteins is known to occur in a coordinated manner in the body, and for example their mRNA levels are reduced in lymphocytes of elderly [29].

We have found relatively high ZIP3, ZIP6, and ZIP9 mRNA expression in the tissue of premenopausal women, similarly to other study which described high expression of ZIP6 and ZIP9 in different tissues (e.g. in the prostate, placenta, heart, testis, and pancreas) [1]. We hypothesize that significantly higher expression of each gene has an effect on the regulation of zinc levels in vaginal tissue and the occurrence of symptoms during menopause, but further studies are needed to confirm these.

Further, the SNP pattern of each region of the transporter genes was also examined. In this study, we were able to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) in samples from Hungarian women and to examine the effect of SNPs on zinc concentration in whole blood and vaginal tissue, and to compare our results with data obtained in other populations. We have looked at regions in sequences of the longer exons which contained missense mutations in other populations and which regions later can be suitable for using the TaqMan SNP Genotyping Assays (Thermo Fisher Scientific).

Polymorphism of ZnT and ZIP gene families was investigated by PCR and sequencing methods, for which new primers have been designed. The designed PCR primers can be applied in further studies of zinc transporters. Sequence comparisons enabled us to identify 16 SNPs, among them five novel mutations, which was submitted to the NCBI database [11-5]. The ZIP2, ZIP4, ZIP12, ZIP14, and ZnT10 genes showed a higher degree of polymorphism. The previously identified

SNPs of the ZIP4 gene (rs117535951, rs187080747, rs17855765) that we have detected have been linked to Acrodermatitis Enteropathica [3]. These results suggested that the tested exons of ZIP genes possibly more prone to have point mutations than the longer exons of ZnT genes.

In terms of the effects of SNPs on proteins, we have found ten missense mutations and six cds-synonymous mutations. Especially high allele frequencies were two of the earlier identified missense SNPs (590/ZIP4 - rs17855765, 292/ZIP14 - rs896378) and one novel SNP (1459/ZnT10 - rs781687046) in our population compared to the European and Global allele frequency. Our data revealed that all patients had unique SNP patterns. This made it difficult to make comparisons between SNPs and zinc levels and to identify correlations. Moreover, we could not compare our results with other data in the literature because it was the first research investigating the association between polymorphisms in the ZnT and ZIP gene families and vaginal tissue zinc levels. There may be correlations between certain SNPs and zinc levels, as Fujihara et al. significantly higher blood zinc concentrations were found in several point mutations [30]. However, we found mutations in the whole blood investigation (ZIP12 / rs10764176 and ZIP4 / rs17855765), and we could confirm the results of Fujihara et al. [30] that these SNPs were not associated with the zinc concentration.

In terms of total SNP numbers, our analysis showed an association between the number of SNPs per patient and high vaginal zinc levels

(67% vs. 33%,  $p = 0.004$ ). Interestingly, ZIP4 SNP 590c (rs17855765) was significantly more frequent in the group of women with high zinc vaginal tissue levels than those who did not contain this SNP (93% vs. 7%,  $p = 0.02$ ). Furthermore, ZIP4 590c (rs17855765) was frequently occurred with the ZIP14 389c (rs2293144) SNP in women with high tissue zinc levels compared to women not assigned to these two SNPs (100% vs. 0%,  $p = 0.02$ ).

We hypothesized that polymorphisms in the ZnT and ZIP gene families affect the whole blood and vaginal tissue zinc concentration and probably also zinc homeostasis, but further studies are needed to prove this.

The lower zinc levels in vaginal tissue correlate with recent research which revealed that zinc-containing vaginal gel significantly improved vaginal atrophy-related symptoms in postmenopausal women, suggesting that zinc replenishment may help to restore vaginal tissue quality [31].

Further studies may clarify whether these changes contribute to the development of aging or menopause-related symptoms (vaginal dryness, atrophy) and whether differential expression of zinc transporters (ZnT and ZIP) plays a role in the development of menopausal conditions or its consequences. We believe that our results, experiments on human samples, could represent a significant advance in basic and menopausal research.

## 5. New scientific results of the dissertation

Summarizing our results, we can conclude that:

1. Zinc concentrations in both vaginal tissue and whole blood were determined. The zinc content in the blood was quite uniform, while in the case of vaginal tissue, we found greater variability between the samples.
2. We have found a negative correlation between age and tissue levels of zinc, but whole blood zinc concentration did not correlate with patient age. Our results suggest that levels of zinc in the vaginal tissue decrease with aging.
3. It is clear from gene expression analyses that the expression of some zinc transporter genes is greatly reduced in postmenopausal women. mRNA expression of *SLC30A4/ZnT4*, *SLC30A9/ZnT9* and *SLC39A2/ZIP2*, *SLC39A3/ZIP3*, and *SLC39A6/ZIP6* genes was significantly lower in postmenopausal women.
4. The mRNA expression of *SLC30A1/ZnT1* and *SLC30A4/ZnT4* genes as well as the *SLC39A3/ZIP3*, *SLC39A6/ZIP6* and *SLC39A9/ZIP9* genes was higher than the expression of other *SLC30A/ZnT* and *SLC39A/ZIP* genes.

5. Based on the analysis of zinc transporters in the tissue, we found that all examined proteins were produced in the vaginal tissue. ZnT9 protein expression was significantly lower in postmenopausal women compared to premenopausal women.
6. PCR primers were designed for polymorphism studies, and these can be applied in further studies of zinc transporters.
7. Examination of the DNA of the transporter genes revealed a number of SNPs. We have found more SNPs in the examined exons of the *SLC39A/ZIP* genes, so those are probably more prone to point mutations.
8. Although each participant had a unique SNP pattern, we have found several associations between SNPs and vaginal tissue or whole blood zinc level.
9. Sequencing of selected exons revealed 16 SNPs, including five previously unidentified SNPs.
10. Two of the previously identified missense point mutations and one new SNP had a particularly high allele frequency in our population compared to European and global allele frequencies.

Our results could represent a significant advancement in zinc homeostasis and menopausal studies, as well as open up further new areas for research.

## 6. Publication list



UNIVERSITY of  
DEBRECEN

UNIVERSITY AND NATIONAL LIBRARY  
UNIVERSITY OF DEBRECEN

H-4002 Egyetem tér 1, Debrecen

Phone: +3652/410-443, email: publikaciok@lib.unideb.hu

Registry number: DEENK/94/2022.PL  
Subject: PhD Publication List

Candidate: Anett Csikós

Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences

MTMT ID: 10038215

### List of publications related to the dissertation

#### Foreign language scientific articles in international journals (3)

1. **Csikós, A.**, Kozma, B., Baranyai, E., Miklós, I., Larson, K., Póka, R., Takács, P.: Evaluation of zinc and copper levels in vaginal tissues and whole blood: correlation with age.  
*BMC Women's Health*. 21 (1), 1-7, 2021. EISSN: 1472-6874.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12905-021-01215-6>  
IF: 2.809 (2020)
2. **Csikós, A.**, Kozma, B., Pór, Á., Kovács, I., Lampé, R., Miklós, I., Takács, P.: Zinc Transporter 9 (SLC30A9) Expression Is Decreased in the Vaginal Tissues of Menopausal Women.  
*Biol. Trace Elem. Res.* 199 (11), 4011-4019, 2021. ISSN: 0163-4984.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-020-02525-w>  
IF: 3.738 (2020)
3. **Csikós, A.**, Takács, P., Miklós, I.: Comparison of novel single nucleotide polymorphisms of zinc transporters with zinc concentration in the human blood and vaginal tissues.  
*Biometals*. 33 (6), 323-337, 2020. ISSN: 0966-0844.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-020-00249-x>  
IF: 2.949

#### Foreign language abstracts (2)

4. **Csikós, A.**, Kozma, B., Miklós, I., Pór, Á., Kovács, I., Lampé, R., Takács, P.: Differential expression of zinc transporters in vaginal tissues.  
*Female Pelvic Reconstr. Surg.* 26 (10S-Suppl1), S127, 2020. ISSN: 2151-8378.
5. **Csikós, A.**, Miklós, I., Takács, P.: Polymorphisms identification of SLC30A (ZnTs) and SLC39A (ZIPs) Family genes in Hungary.  
In: A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2018. évi Nagygyűlése és a XIII. Fermentációs Kollokvium : Absztraktfüzet, [s.n.], Eger, 10-11, 2018.





### List of other publications

#### Hungarian scientific articles in Hungarian journals (1)

6. Szabó, G., Angyal, A., **Csikós, A.**, Bessenyei, É., Tóth, E., Kiss, P., Szabó, S.: A talajvíz veszélyeztetettségének vizsgálata alföldi településeken.  
*Földrajzi Közl.* 134 (2), 173-187, 2010. ISSN: 0015-5411.

#### Foreign language scientific articles in international journals (4)

7. **Csikós, A.**, Németh, M. Z., Frenkel, O., Kiss, L., Váczy, K. Z.: A Fresh Look at Grape Powdery Mildew (*Erysiphe necator*) A and B Genotypes Revealed Frequent Mixed Infections and Only B Genotypes in Flag Shoot Samples.  
*Plants-Basel.* 9 (9), 1156-1167, 2020. ISSN: 2223-7747.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/plants9091156>  
IF: 3.935
8. Pálfi, X., Karácsony, Z., **Csikós, A.**, Bencsik, O., Szekeres, A., Zsófi, Z., Váczy, K. Z.: The potential use of the culture filtrate of an *Aspergillus niger* strain in the management of fungal diseases of grapevine.  
*J. Cent. Eur. Agric.* 21 (4), 839-850, 2020. EISSN: 1332-9049.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5513/JCEA01/21.4.2942>
9. Váczy, K. Z., Németh, M. Z., **Csikós, A.**, Kovács, M. G., Kiss, L.: *Dothiorella omnivora* isolated from grapevine with trunk disease symptoms in Hungary.  
*Eur. J. Plant Pathol.* 150, 817-824, 2018. ISSN: 0929-1873.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-017-1323-5>  
IF: 1.744
10. Szabó, G., Angyal, A., **Csikós, A.**, Bessenyei, É., Tóth, E., Kiss, P., Csorba, P., Szabó, S.: Examination of the groundwater pollution at lowland settlements.  
*Stud. Univ. "Vasile Goldis" Ser. Ştiinţ. vieţii.* 20 (4), 89-95, 2010. ISSN: 1584-2363.

**Total IF of journals (all publications): 15,175**

**Total IF of journals (publications related to the dissertation): 9,496**

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.



22 February, 2022

## 7. Irodalomjegyzék / References

1. Yang J, Zhang Y, Cui X, Yao W, Yu X, Cen P, Hodges SE, Fisher WE, Brunicaudi FC, Chen C mtsai (2013) Gene profile identifies zinc transporters differentially expressed in normal human organs and human pancreatic cancer. *Curr Mol Med* 13(3):401-9.
2. Martin AB, Aydemir TB, Guthrie GJ, Samuelson DA, Chang SM, Cousins RJ (2013) Gastric and colonic zinc transporter ZIP11 (Slc39a11) in mice responds to dietary zinc and exhibits nuclear localization. *J Nutr* 143(12):1882-8.
3. Schmitt S, Küry S, Giraud M, Dréno B, Kharfi M, Bézieau S (2009) An update on mutations of the SLC39A4 gene in acrodermatitis enteropathica. *Hum Mutat* 30(6):926-33.
4. Kambe T, Hashimoto A, Fujimoto S (2014) Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases. *Cell Mol Life Sci* 71(17):3281-95.
5. Maret W (2013) Zinc and human disease. *Met Ions Life Sci* 13:389-414.
6. Grider A (2013) Zinc, Copper and Manganese. Stipanuk MH, Caudill MA szerk. *Biochemical, Physiological, and Molecular Aspects of Human Nutrition*. 3. kiadás, St. Louis, MO: Elsevier/Saunders 828-45.
7. Kelkar MA, Khar SK, Mandakhot VM (1989) Studies on antepartum prolapse of the vagina in buffalo--plasma trace element concentrations. *Arch Exp Veterinarmed* 43(2):315-8.

8. Taneja SK, Kaur R (1990) Pathology of ovary, uterus, vagina and gonadotrophs of female mice fed on Zn-deficient diet. *Indian J Exp Biol* 28(11):1058-65.
9. Takacs P, Jaramillo S, Zhang Y, Datar R, Williams A, Olczyk J, Candiotti K, Medina CA (2013) The effects of PPAR $\delta$  agonist and zinc on ovariectomized rats' vagina. *Female Pelvic Med Reconstr Surg* 19(3):126-31.
10. Maret W, Sandstead HH (2006) Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J Trace Elem Med Biol* 20(1):3-18.
11. Prohaska C, Pomazal K, Steffan I (2000) Determination of Ca, Mg, Fe, Cu, and Zn in blood fractions and whole blood of humans by ICP-OES. *Fresenius J Anal Chem* 367(5):479-84.
12. Kucharzewski M, Braziewicz J, Majewska U, Gózd S (2003) Copper, Zinc, and Selenium in Whole Blood and Thyroid Tissue of People with Various Thyroid Diseases. *Biological Trace Element Research* 93(1-3):9-18.
13. Aaseth J, Boivin G, Andersen O (2012) Osteoporosis and trace elements--an overview. *J Trace Elem Med Biol* 26(2-3):149-52.
14. Zhang B, Podolskiy DI, Mariotti M, Seravalli J, Gladyshev VN (2020) Systematic age-, organ-, and diet-associated ionome remodeling and the development of ionic aging clocks. *Aging cell* 19(5):e13119.
15. Oztürk G, Akbulut KG, Afrasyap L (2008) Age-related changes in tissue and plasma zinc levels: modulation by exogenously administered melatonin. *Exp Aging Res* 34(4):453-62.
16. Honoré LH, Salkie ML, Jajczay FL (1986) The influence of anatomical site and hormonal status on the copper and zinc levels of human uterine smooth muscle. *Clin Biochem* 19(1):46-8.

17. Lichten LA, Cousins RJ (2009) Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annu Rev Nutr* 29:153-76.
18. Huang L, Tepasamorndech S (2013) The SLC30 family of zinc transporters: a review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. *Mol Aspects Med* 34(2-3):548-60.
19. Jeong J, Eide DJ (2013) The SLC39 family of zinc transporters. *Mol Aspects Med* 34(2-3):612-9.
20. Jackson KA, Valentine RA, Coneyworth LJ, Mathers JC, Ford D (2008) Mechanisms of mammalian zinc-regulated gene expression. *Biochem Soc Trans* 36(Pt 6):1262-6.
21. Ford D (2004) Intestinal and placental zinc transport pathways. *Proc Nutr Soc* 63(1):21-9.
22. Liuzzi JP, Blanchard RK, Cousins RJ (2001) Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. *J Nutr* 131(1):46–52.
23. Liuzzi JP, Bobo JA, Lichten LA, Samuelson DA, Cousins RJ (2004) Responsive transporter genes within the murine intestinal–pancreatic axis form a basis of zinc homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(40):14355-60.
24. Kang X, Chen R, Zhang J, Li G, Dai PG, Chen C, Wang HJ (2015) Expression Profile Analysis of Zinc Transporters (ZIP4, ZIP9, ZIP11, ZnT9) in Gliomas and their Correlation with IDH1 Mutation Status. *Asian Pac J Cancer Prev* 16(8):3355-60.

25. Li M, Zhang Y, Liu Z, Bharadwaj U, Wang H, Wang X, Zhang S, Liuzzi JP, Chang SM, Cousins RJ mtsai (2007) Aberrant expression of zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) significantly contributes to human pancreatic cancer pathogenesis and progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(47):18636-41.
26. Taylor KM, Morgan HE, Smart K, Zahari NM, Pumford S, Ellis IO, Robertson JF, Nicholson RI (2007) The emerging role of the LIV-1 subfamily of zinc transporters in breast cancer. *Mol Med* 13(7-8):396-406.
27. Sim DL, Chow VT (1999) The novel human HUEL (C4orf1) gene maps to chromosome 4p12-p13 and encodes a nuclear protein containing the nuclear receptor interaction motif. *Genomics* 59(2):224-33.
28. Chen YH, Kim JH, Stallcup MR (2005) GAC63, a GRIP1-dependent nuclear receptor coactivator. *Mol Cell Biol* 25(14):5965-72.
29. Giacconi R, Malavolta M, Costarelli L, Busco F, Galeazzi R, Bernardini G, Gasparini N, Mocchegiani E (2012) Comparison of intracellular zinc signals in nonadherent lymphocytes from young-adult and elderly donors: role of zinc transporters (Zip family) and proinflammatory cytokines. *J Nutr Biochem* 23(10):1256-63.
30. Fujihara J, Yasuda T, Kimura-Kataoka K, Takinami Y, Nagao M, Takeshita H (2018) Association of SNPs in genes encoding zinc transporters on blood zinc levels in humans. *Leg Med* 30:28-33.
31. Takacs P, Kozma B, Erdodi B, Jakab A, Larson K, Poka R (2019) Zinc-containing Vaginal Moisturizer Gel Improves Postmenopausal Vulvovaginal Symptoms: A Pilot Study. *J Menopausal Med* 25(1):63-8.

*dbSNP (B154) adatbázis:*

I1. SLC30A10/ZnT10 - rs1558249270:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1558249270>

I2. SLC30A10/ZnT10 - rs781687046:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs781687046>

I3. SLC39A4/ZIP4 - rs1554873909:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1554873909>

I4. SLC39A4/ZIP4 - rs1564711111:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1564711111>

I5. SLC39A4/ZIP4 - rs1484902933:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1484902933>