

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

**A KARDIOVASZKULÁRIS BETEGSÉGEKRE
HAJLAMOSÍTÓ GENETIKAI TÉNYEZŐK
ÉS AZOK VIZSGÁLATÁNAK LEHETŐSÉGEI**

POCSAI ZSUZSA

Témavezető: Prof. Dr. Ádány Róza

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
NÉPEGÉSZSÉGÜGYI ISKOLA
MEGELŐZŐ ORVOSTANI INTÉZET**

DEBRECEN, 2001

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések magyarázata	4
Ábrajegyzék	6
1. Bevezetés	8
1.1. A kardiovaszkuláris betegségek molekuláris biológiai háttere.....	8
1.1.1. Az exogén anyagcsereút és genetikai károsodásai.....	10
1.1.2. Az endogén anyagcsereút és genetikai károsodásai.....	12
1.1.3. A reverz koleszterin transzport és genetikai károsodásai	13
1.2. Az LDL RG géndefektusok és kardiovaszkuláris betegségek kapcsolata	15
1.3. Az ApoE polimorfizmus és kardiovaszkuláris betegségek kapcsolata.....	20
2. Célkitűzések.....	25
2.1. LDL RG vizsgálatok.....	25
2.2. ApoE vizsgálatok.....	25
3. Anyag és módszer	27
3.1. A vizsgálatokhoz használt anyagok, oldatok.....	27
3.2. Alkalmazott módszerek	28
3.2.1. Vizsgálati minták előkészítése a genetikai vizsgálatokhoz	28
3.2.1.1. Genomiális DNS preparálása.....	28
3.2.1.2. Genomiális DNS agaróz elektroforézis	28
3.2.1.3. DNS koncentráció meghatározása	29
3.2.2. LDL RG vizsgálata	29
3.2.2.1. Vizsgálati populáció kiválasztása	29
3.2.2.2. Multiplex PCR	30
3.2.2.3. Agaróz gélelektroforézis	31
3.2.3. ApoE polimorfizmusok vizsgálata.....	34
3.2.3.1. Vizsgálati populáció kiválasztása	34
3.2.3.2. PCR-RFLP analízis.....	34
3.2.3.3. Genotipizálás olvadáspont analízissel.....	35
3.2.3.4. Statisztikai módszerek	38
4. Eredmények	40
4.1. Az LDL RG vizsgálat eredményei.....	40
4.2. Az apoE vizsgálat eredményei.....	43
5. Diskusszió	49

5.1. Az eredmények népegészségügyi hasznosíthatósága	52
6. Irodalmi hivatkozások.....	55
7. Függelék	63
2.1. A tézisekhez felhasznált közlemények jegyzéke	63
2.2. Egyéb közlemények.....	63
2.3. Hazai és nemzetközi konferenciákon való részvétel	64
2.3.1. Az értekezés témájához kapcsolódó előadások, poszterek jegyzéke.....	64
2.3.2. Egyéb előadások, poszterek jegyzéke.....	66
Köszönetnyilvánítás	68
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai és kézirata.....	69

RÖVIDÍTÉSEK MAGYARÁZATA

$\epsilon 2$	apolipoprotein E2 allél
$\epsilon 3$	apolipoprotein E3 allél
$\epsilon 4$	apolipoprotein E4 allél
A_{260}	260 nm-en mért abszorbancia
A_{280}	280 nm-en mért abszorbancia
apo AI	apolipoprotein AI
apo AII	apolipoprotein AII
apo AIV	apolipoprotein AIV
apo B100	apolipoprotein B100
apo B48	apolipoprotein B48
apo CII	apolipoprotein CII
apo CIII	apolipoprotein CIII
apo E	apolipoprotein E
APS	ammónium perszulfát
ASO	allélspecifikus oligonukleotid
BSA	borjú szérum albumin (bovine serum albumin)
CETP	koleszterinészter transzfer protein
dATP	dezoxiadenozin trifoszfát
dCTP	dezoxicitozin trifoszfát
dGTP	dezoxiguanozin trifoszfát
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxiribonukleotid trifoszfát
DTT	dithiotreitol

dTTP	dezoitimidin trifoszfát
EDTA	etiléndiamin-tetraacetát
EGF	epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)
FL	fluoreszcein fluorochrom
FH	familiáris hiperkoleszterinémia
FH-Helsinki	FH-t eredményező helsinki típusú LDL RG mutáció
FH-North Karelia	FH-t eredményező észak-karéliai típusú LDL RG mutáció
FRET	fluoreszcencia rezonancia elektron transzfer
HDL	high density lipoprotein
IDL	intermediate density lipoprotein
LC	LightCycler
LCAT	lecitin-koleszterin-acil-transzferáz
LCRed640	LightCycler Red 640 fluorochrom
LCRed705	LightCyclerRed 705 fluorochrom
LDL	low density lipoprotein
LDL RG	low density lipoprotein receptor gén
LP lipáz	lipoprotein lipáz
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PCR	polimeráz láncreakció
RFLP	restrikciós fragmenthossz analízis (restriction fragment length polymorphism)
SSCP	single strand conformation polymorphism
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> eredetű DNS polimeráz
TBE	Tris-borát-EDTA puffer
TE	Tris-EDTA puffer
TEMED	N,N,N',N'-tertamil-etiléndiamin
VLDL	very low density lipoprotein

ÁBRAJEGYZÉK

A lipidmetabolizmus anyagszereitjai	11
Az LDL receptor szerkezete	15
Az LDL RG mutációk és deléciók jellemző helyei különböző etnikai közösségekben	17
Az LDL RG deletált szakaszai különböző finn közösségekben	18
Jellegzetes finn LDL RG mutációk és azok következményei a receptor szerkezetében	19
Az apolipoprotein E szerkezete	21
ApoE ε4 allélfrekvencia gyakoriság Európa egyes régióiban	23
Az apoE polimorfizmusok kimutatásának lehetőségei modern molekuláris biológiai technikák alkalmazásával	24
Az LDL RG minden exonjának és promóter régiójának amplifikálására alkalmas primerek szekvenciái	32
A multiplex PCR tesztben használt reakcióelegyek összetétele	33
Az apoE PCR RFLP vizsgálatokhoz használt primerek szekvenciái	34
A fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) elve	37
Az olvadásponton alapuló apoE mutációanalízishez használt primerek és próbák szekvenciái a jelző fluorochromok feltüntetésével	38
Az LDL RG vizsgálata multiplex PCR technikával	42
Az apoE polimorfizmus meghatározása PCR RFLP módszerrel	44
A különböző apoE izotípusok száma és előfordulási gyakorisága hiperkoleszterinémiás és a referencia populációkban, valamint a hiperkoleszterinémia	

különböző izotípusokkal kapcsolatos, a 3/3-as genotípushoz viszonyított esélyhányadosai és azok 95%-os konfidencia intervallumai	45
Az egyes apoE izotípusokhoz rendelhető szérumban koleszterinszint értékek hiperkoleszterinémias és referencia populációkban	46
ApoE allélek száma és előfordulási gyakorisága a hiperkoleszterinémias és referencia csoportokban, valamint a hiperkoleszterinémia különböző allélekkel kapcsolatos, az ε3 allélhez viszonyított esélyhányadosai és azok 95%-os konfidencia intervallumai	46
ApoE genotipizálás olvadásponton alapuló mutációanalízissel	48

1. BEVEZETÉS

1.1. A KARDIOVASZKULÁRIS MEGBETEGEDÉSEK MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI HÁTTERE

A szív-és érrendszeri betegségek a modern társadalmakban világszerte vezető halálokat képeznek. Az elmúlt két évtized nagy észak-amerikai és nyugat-európai epidemiológiai vizsgálatai egyértelműen igazolták e betegségek létrejöttében az ún. kardiovaszkuláris rizikófaktorok elsőrendű szerepét [1-4]. Ugyanezen vizsgálatokból az is kitűnik, hogy ezen rizikófaktorok csökkentése ill. eliminálása, avagy a prediszpozíció korai felismerésére alapozott megelőző intervenciók szignifikánsan csökkentik a szív- és érrendszeri betegségekre visszavezethető morbiditást és mortalitást [4]. Ez a csökkenő tendencia a fejlett országokban már hosszú évek óta tartó és konzekvens folyamat, ezzel szemben hazánk férfi lakossága esetében 1973-1984 között meredeken emelkedett, majd átmeneti csökkenést követően 1992-ben tetőzött a 0-64 éves korcsoportban bekövetkező keringési rendszer okozta halálozás. 1993 óta némi optimizmusra okot adó folyamatos halálozási arányszám csökkenés észlelhető, mely azonban az EU országok lakosságához viszonyított pozíciónkon nem javított. A keringési rendszer okozta korai halálozás relatív kockázata úgy a magyar férfiak, mint a nők esetében ma is az EU átlag háromszorosa. Az országon belüli egyenlőtlenségek elemzésével az is igazolást nyert, hogy a keringési betegségek okozta korai halálozás az országos átlagnál szignifikánsan magasabb Északkelet-Magyarországon. Megelőzésükre, manifesztációjuk késleltetésére, sőt hatékony terápiájukra is csak a kóroki tényezők megismerése, a korai diagnózis, a veszélyeztettség kimutatása adhat lehetőséget [5].

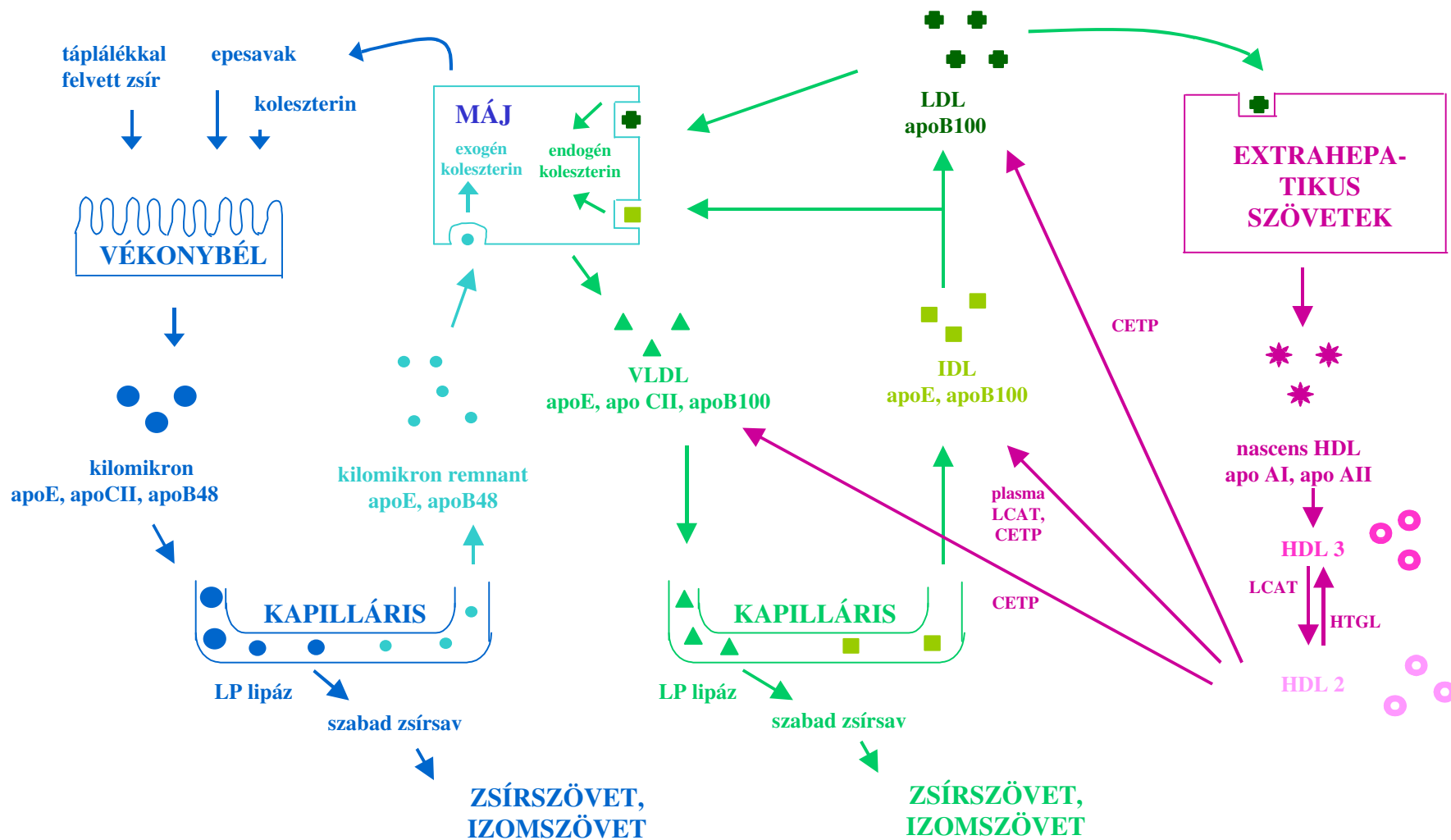
A fejlett ipari országokban elvégzett epidemiológiai és genetikai epidemiológiai vizsgálatok eredményei alapján a fiatal felnőtt korban manifesztálódó kardiovaszkuláris betegségek esetében ma már általánosan elfogadott az a kóreredetet értelmező koncepció, miszerint e betegségek permisszív környezeti és szerzett vagy öröklött genetikai tényezők együtthatásának eredményeként alakulnak ki. Ezen genetikai tényezők között, gyakoriságukat tekintve, kiemelt jelentőséggel bírnak a lipidmetabolizmusban involvált fehérjék génjeinek előnytelen variánsai és defektusai, melyek a lipidháztartás zavarához, következményesen szív- érrendszeri károsodáshoz vezetnek [6].

A vizsgálatok során a kardiovaszkuláris betegségekkel összefüggést mutató, hatásukban jellegzetes kumulatív jellegű genetikai elváltozások váltak ismertté, melyek a plazma low density lipoprotein (LDL) szint szignifikáns emelkedéséhez vezetnek, és így a betegségre nézve fogékonyságot, hajlamot, veszélyeztetettséget jelző “biomarkereknek” tekinthetők [7]. A polimeráz láncreakción (PCR) alapuló molekuláris biológiai technikák széles körű elterjedésével lehetőség nyílt a lipidháztartásban involvált transzportfehérjék és enzimek génszintű vizsgálatára, s napjainkban rohamosan nő mind az új genetikai alterációk felismerésének, mind a már ismert genetikai defektusok gyors és megbízható laboratóriumi vizsgálatának lehetőségét biztosító eljárások száma [8].

1.1.1. Az exogén anyagcsereút és genetikai károsodásai

Az exogén zsíryanycsere során a táplálékkal felvett zsírokat és koleszterint a bélhámsejtek felszívják, trigliceridekké ill. koleszterinészterekké alakítják, majd ezeket a kilomikronok belsejébe építik be. A kilomikron felszíni burkát AI, AIV és B48 apolipoproteinek alkotják. A nyirokcsatornákon át a vénás keringésbe jutva ez a burok a HDL molekulákból származó CII, CIII és E apolipoproteinekkal és koleszterinészterekkel egészül ki. Az apo CII aktiválja a triglicerideket hidrolizáló endothelialis lipoprotein (LP) lipáz enzimet, melynek hatására a kilomikronokból tekintélyes mennyiségű zsírsav szabadul fel. A lipolízis során megkisebbedett, koleszterinészterben gazdag kilomikron-remnantok apoE révén a májsejteken elhelyezkedő receptorokhoz kötődnek, majd a májsejtekbe jutva az endolizoszomális enzimek hatására koleszterin szabadul fel, s válik hozzáférhetővé az építő folyamatok számára (1. ábra) [9].

Az exogén anyagcsereút genetikai károsodásai 1.) defektív kilomikron szekrécióban, 2.) a lebontás zavarában, valamint 3.) a remnantok eliminálásának elégtelenségében jelentkeznek [10, 11]. Az apoB gén szerkezeti változása abnormális kilomikron szekréciót eredményez azáltal, hogy lecsökken a plazma apoB tartalmú lipoproteinjeinek (VLDL, LDL, kilomikron) mennyisége. Ez a ritka kórkép klinikailag két, autoszomális recesszív öröklésmenetet mutató betegség, az abetalipoproteinémia (ABLP) és hipobetalipoproteinémia (HBLP) formájában manifesztálódik, melyek előfordulási gyakorisága kisebb, mint 1/1.000.000 egy átlagos populációban [10]. A kilomikron lebontás zavarát a LP lipáz gén károsodása mellett - mely evidens módon vezet a lipolízis elégtelenségéhez – az apo CII gén



1. ábra A lipidmetabolizmus anyagcsereútjai. A kék vonalak az exogén, a zöld az endogén anyagcsereutakat, a lila szín a reverz koleszterin transzportot jelöli. CETP: koleszterinészter transzport protein, LPL: lipoprotein lipáz, LCAT: lecitin-koleszterin-acil-transzfráz, HTGL: májeredetű triglicerid lipáz [9].

szerkezeti változása is okozhatja, ugyanis az apo CII a LP lipáz kofaktoraként szerepel a kilomikron és VLDL molekulák hidrolízisében. Mindkét géndefektus klinikailag autoszomális recesszív öröklésmenetet mutató, I. típusú hyperlipidémiaként (familiális kilomikronémia) manifesztálódik, melynek előfordulási gyakorisága kisebb, mint 1/1.000.000 az általános populációban [12]. A kilomikron-remnantok eliminálásának genetikai defektusa klinikailag III. típusú hiperlipoproteinémiaként jelentkezik. A remnantok felszíni lipoproteinje, az apoE, mely a májsejtek kilomikron-remnant ill. LDL receptorainak ligandja. Az apoE génben bekövetkezett báziscsere miatt a fehérje nem tud stabil kapcsolatot kialakítani a receptorral, ami a plazma IDL és kilomikron-remnantok magasabb koncentrációját eredményezi [13].

1.1.2. Az endogén anyagcsereút és genetikai károsodásai

A májsejtek által szekretált VLDL molekulák trigliceridje glicerinből ill. zsírszöveti eredetű, vagy májsejtekből származó zsírsavakból áll, koleszterinje szintén máj eredetű vagy a keringő lipoproteinekből származik. A keringésbe jutott VLDL molekulák lipolízise során felszabaduló zsírsavak – mely folyamatot a kapilláris-endothelium LPL enzimje katalizálja – a zsírszövetbe ill. az izomszövetbe kerülnek. A VLDL remnantok egy részét a májsejtek LDL receptoraikon keresztül veszik fel, míg másik része IDL-lé átalakulva a plazmában marad, ahol a májeredetű lipáz enzim LDL-lé alakítja. Az LDL a koleszterint a májsejtekhez és bizonyos extrahepatikus sejtekhez szállítja. Az LDL molekulák a felületükön levő apoB100 fehérje révén a sejtek LDL receptoraihoz kapcsolódnak és receptor által irányított endocitózissal a sejtekbe jutnak. Az LDL-ből származó szabad koleszterint az anabolikus enzimek

szteroid hormonok és sejtmembránok szintézisére használják. A koleszterin sejten belüli felhalmozódásának három fontos biokémiai következménye van: (1) csökken a sejt de novo koleszterinképzését szabályozó hidroximetilglutaril-koenzim-A-reduktáz képzése, (2) aktiválódik az acil-koleszterin-aciltranszferáz enzim, mely a szabad koleszterint koleszterinészterre alakítja; (3) gátlódik az LDL receptorok képződése a sejtben; azaz összességében, a sejtekben felhalmozódó koleszterinészter által indukált feedback mechanizmus révén csökken a sejtek LDL-felvétele a keringésből (1. ábra) [9].

Az endogén transzport genetikai eredetű abnormalitásai, melyek az LDL molekulák eliminálási zavarához vezetnek, a következők: 1.) károsodás léphet fel az LDL receptor ligandjában, az apoB100 fehérjében vagy magában az LDL receptorban. 2.) az apoB fehérje defektív szintézise a VLDL molekulák szekréciójának zavarát okozza elsősorban, míg a LPL és apo CII defektusok döntően a VLDL metabolizmusban észlelhető abnormalitásokért felelősek; 3.) az apoE gén szerkezeti változásai illetve az LDL receptor gén defektusai az IDL-clearance problémáiért, illetve a plazma magas koleszterin koncentrációjáért tehetők felelőssé [14].

1.1.3. A reverz koleszterin transzport és genetikai károsodásai

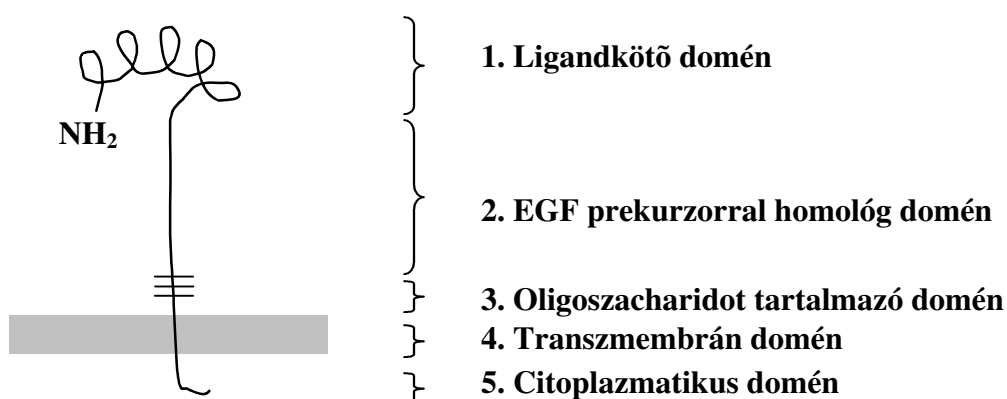
Az extrahepatikus szövetekből a HDL távolítja el a koleszterint és visszajuttatja a májba. Fő apolipoproteinje a májban és a vékonybélben képződő apo AI és apo AII. Ezek az apolipoproteinek foszfolipidekkel együtt nascens HDL-ként szekretálódnak. A foszfolipidek és apolipoproteinek nagy része a kilomikronok és a VLDL felszínére, majd lipolízis révén a HDL-ből kialakuló HDL3-ra kerül. A keringő lecitin-

koleszterin-aciltranszferáz (LCAT) enzim a HDL-hez kötődik és az apo AI által aktiválva észterifikálja a HDL felületére kötődött szabad koleszterint. Az így kialakult koleszterinészterben gazdag HDL2 molekula koleszterinészter transzfer protein (CETP) segítségével trigliceridekkel kicserélődve lipoproteinekbe vándorol, amit a máj triglicerid-lipáza hidrolizál. A hidrolízissel a HDL2 HDL3-má alakul vissza, és ismét képes szabad koleszterint felvenni. Az apoE-t tartalmazó, koleszteringazdag HDL2 molekulákat a májreceptorok közvetlenül is képesek felvenni, ám ennek mechanizmusa ma még tisztázatlan (1. ábra) [9].

A reverz koleszterintranszporttal kapcsolatban nagyon kevés genetikai károsodást ismeretes, ezek 1.) a defektív HDL produkciót, valamint 2.) a HDL-koleszterin transzport defektusait foglalják magukban. A szakirodalomban apo AI deficienciának nevezett defektív HDL produkció hátterében az apo AI gén szerkezeti károsodása áll, ami a fehérje szintézisének hiányát eredményezi [15]. A LP lipáz enzim és apo CII deficienciák, azaz a kilomikron és VLDL molekulák érése során bekövetkező károsodások, egyaránt alacsony HDL-szinthez vezetnek [10, 12, 16, 17]. A LCAT valamint CETP deficienciák a plazma HDL-szint és a HDL molekulák összetételének megváltozását váltják ki a koleszterinészter-képzés és szállítás során, mely elégtelen HDL-koleszterin transzportot eredményez [18]. A Tangier betegséget a gyors HDL eliminálás jellemzi, mely következményesen alacsony HDL-koleszterinszinttel párosul [19]. A reverz koleszterintranszport defektusaihoz vezető eddig ismert genetikai eltérések kumulatív frekvenciája igen alacsony, mindössze 1/1.000.000 az általános populációban [10].

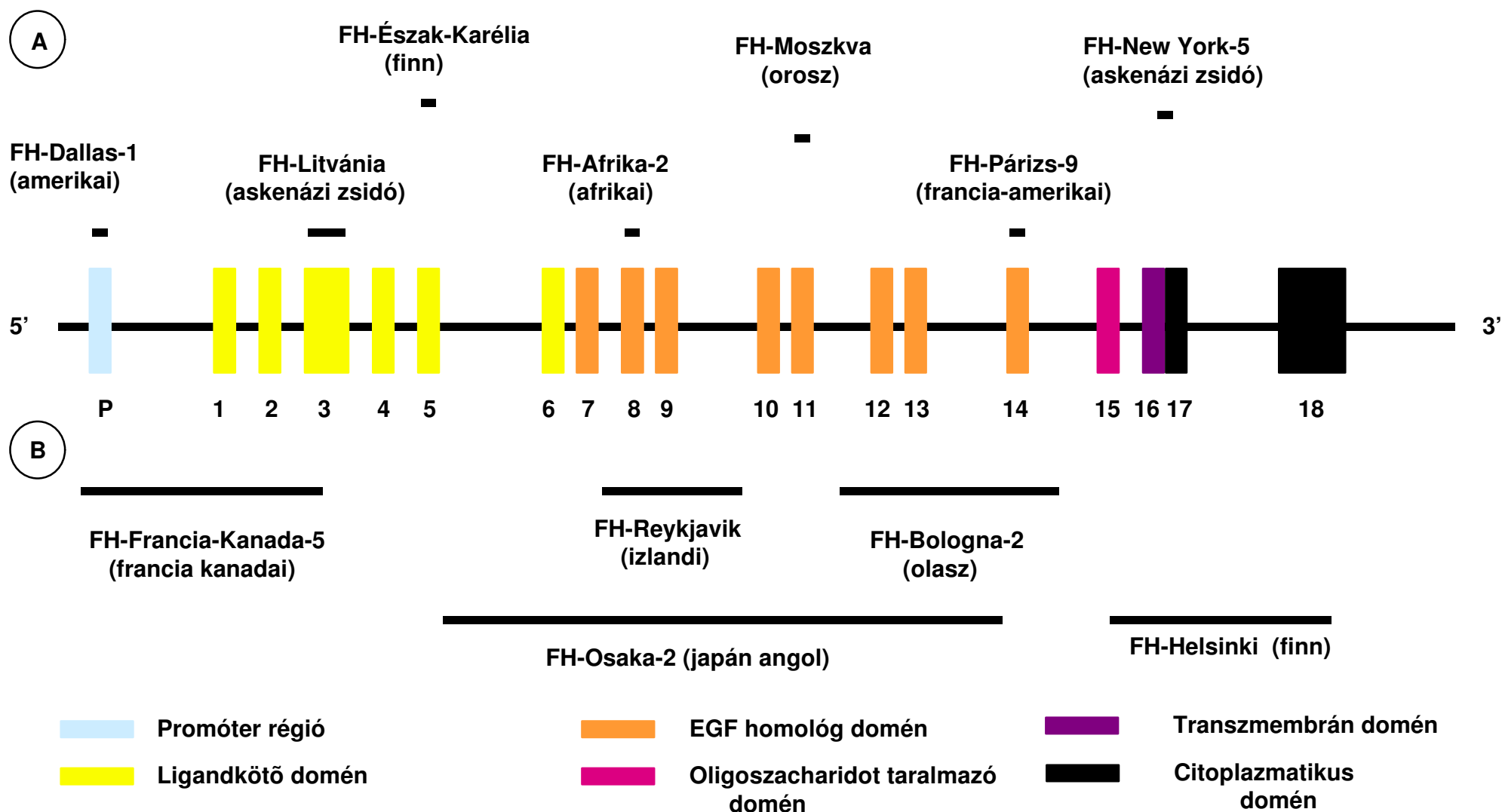
1.2. AZ LDL RECEPTOR GÉNDEFEKTUSOK ÉS A KARDIOVASZKULÁRIS BETEGSÉGEK KAPCSOLATA

Az LDL receptor egy 5 doménből álló, 115 kD molekulatömegű fehérje [20]. Az N terminális végén található a ciszteinben gazdag ligandkötő domén. A receptor negatív töltésű glutaminsav, aszparaginsav oldalláncai az LDL molekula B100 proteinje által protonálódnak és ez teremt lehetőséget a receptor-ligand kapcsolat kialakulására. Ezt követi a human EGF prekursor molekulával homológiát mutató szakasz. A harmadik domén egy szerinben, treoninban gazdag szakasz, mely poszttranszlációs modifikáció során oligoszacharidokkal egészül ki, melyek segítenek távol tartani a receptort a membrántól. Ez előfeltétele a receptor-ligand kapcsolat kialakulásának. A receptor transzmembrán doménje alfa helikális szerkezetet mutat, a C terminális végén pedig a citoszolba süllyedő citoplazmatikus domén helyezkedik el. Ez a domén a citoskeletális fehérjékkel létesít kapcsolatot [20] (2. ábra).

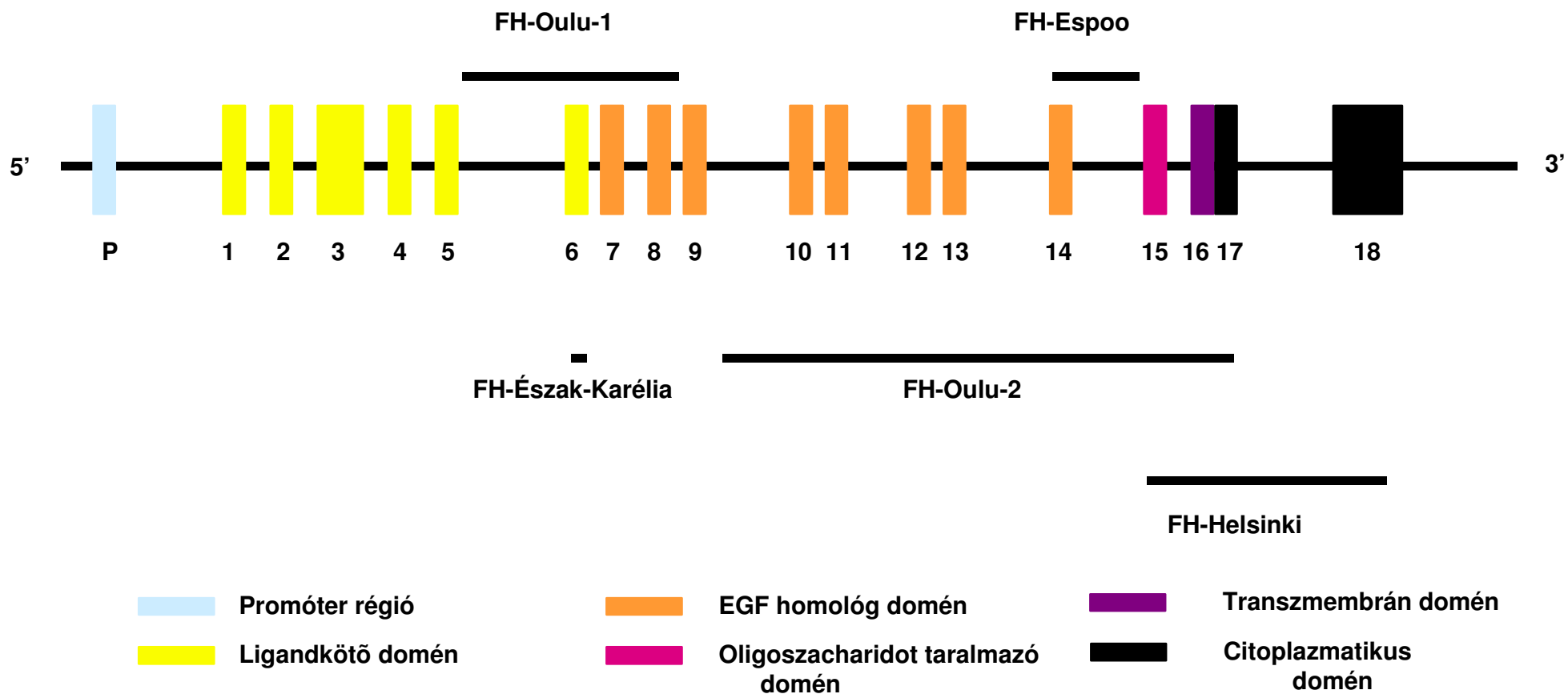


2. ábra. Az LDL receptor szerkezete.

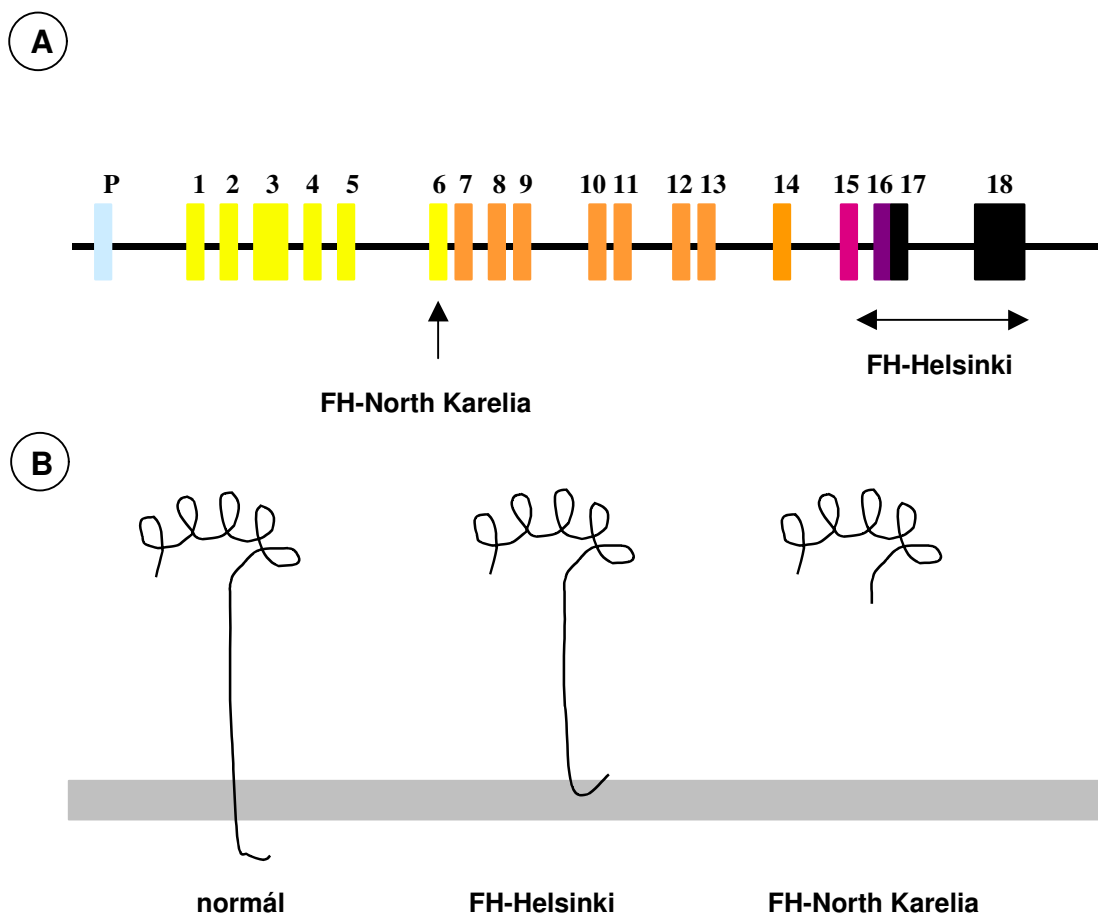
Amennyiben a receptor bármely része károsodik, az az LDL felvétel zavarához vezet. A receptort meghatározó gén 45 kb hosszúságú: promóter régióból és az azt követő 18 exonból áll. A gén a 19. kromoszóma rövid karján, disztálisan helyezkedik el. Transzkripciója feed-back szabályozás alatt áll, melyet az intracelluláris koleszterin mennyisége regulál [21]. LDL receptor károsodások között ismeretesek kis és nagy szakaszokat érintő deléciók, inszerciók, nonszensz mutációk egyaránt [22]. Eddig kb. 150, az LDL receptor génben fellépő DNS alterációt írtak le, melynek több mint egyharmada a plazma koleszterinszintjének emelkedését eredményezi. A génben fellépő deléciók és mutációk helye és mértéke etnikai közösségenként igen eltérő; nem ismeretesek jellegzetes, minden etnikai közösségre, népcsoportra jellemző génkárosodások ún. mutációs forró pontok (3. ábra). Egy adott országon belül is megfigyelhető a deléciók és mutációk variabilitása: pl. Finnországban különböző etnikai közösségekben eltérő DNS károsodásokat találtak [23] (4. ábra). A Helsinki típusú mutáció esetében a 16. introntól a 18. exonig deletált a gén (FH-Helsinki), míg az észak karéliei etnikai közösségben a 6. exonban egy 6 bp hosszúságú szakasz elvesztése (FH-North Karelia) az általános [24, 25]. A FH-Helsinki gén esetében, jóllehet rendelkezik ligandkötő aktivitással a mutáns receptor, azonban nem képes a sejtmembránnal adekvát kapcsolatot létesíteni, így nem jöhet létre az LDL partikulumok internalizációja. Becslések szerint minden ezredik ember mutáns FH-Helsinki gént hordoz Finnországban [24]. Az elmúlt évek vizsgálatai szerint a FH-Helsinki allél igen elterjedt Észak-Finnországban, míg ez a mutáció az észak-karéliei területen hiányzik. A FH-North Karelia gén esetében egy kis, hat bázispár hosszúságú, szakasz deléciója miatt az átírókeret megváltozik és így csak egy 345 aminosavat tartalmazó fehérje szintetizálódik, amely nem tud a membránhoz kapcsolódni [25] (5. ábra). Ezen jellegzetes deléciók felismerése juttatta abba a



3. ábra Az LDL receptor gén mutációk (A) és deléciók (B) jellemző helyei különböző etnikai közösségekben [22].



4. ábra Az LDL receptor gén deletált szakaszai különböző finn közösségekben [22].



5. ábra. Jellemzőes LDL RG mutációk és azok következményei a receptor szerkezetében [7]. A: LDL RG; B: LDL receptor. A FH-Helsinki esetében a 16. introntól a 18. exonig deletált az LDL RG. Rendelkezik ugyan ligandkötő aktivitással a mutáns receptor, de nem képes a sejtmembránnal adekvát kapcsolatot létesíteni, így nem jöhet létre az LDL partikulumok internalizációja. Az FH-North Karelia a 6. exonban egy 6 bp hosszúságú szakasz elvesztése miatt az átírókeret megváltozik és így csak egy 345 aminosavú tartalmú fehérje szintetizálódik, amely nem tud a membránhoz kapcsolódni.

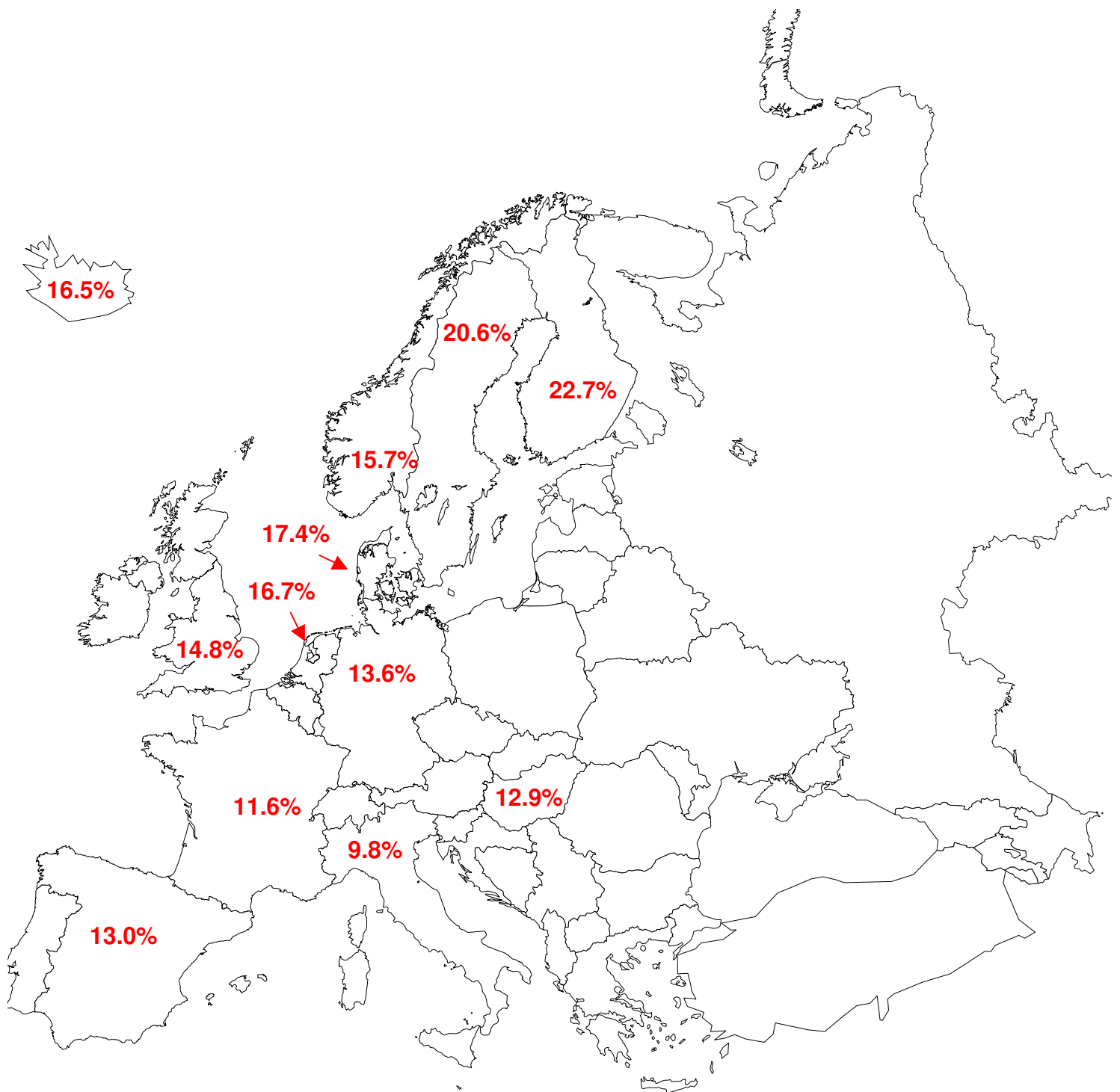
helyzetbe a finn egészségügyet, hogy rizikócsoporthoz ma már szűrővizsgálat jelleggel tesztelik a tipikus deléciók fennállását, s így a genetikusan terhelt családok gondozásba vételére ideje korán sor kerülhet.

1.3. APOE POLIMORFIZMUS ÉS KARDIOVASZKULÁRIS BETEGSÉGEK KAPCSOLATA

Az apoE a májsejtek kilomikron remnant illetve LDL receptorainak ligandja; szerepe a kilomikron remnantok eliminálása mellett az IDL clearance-ben kulcsfontosságú. A gén három gyakori allélja ismeretes ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$), melyek kombinációja hat fenotípust eredményez (E2/2, E2/3, E3/3, E4/3, E4/4, E2/4) [26]. A három allél az apoE gén 4. exonjában két lókuszon különbözik, melyek 138 bp távolságra vannak egymástól. Egy-egy nukleotidcserét követően a 112. és 158. aminosavhelyeken Arg→Cys aminosavcserék játszódnak le [26] (6. ábra). Az E2/2 fenotípus 90%-ban a III. típusú hiperkoleszterinémia kiváltója, míg az E4/4 fenotípus a szérum magas koleszterinszintjével mutat szoros korrelációt és ezáltal fokozott kockázati tényezőt jelent a kardiovaszkuláris betegségek kialakulása szempontjából [27].

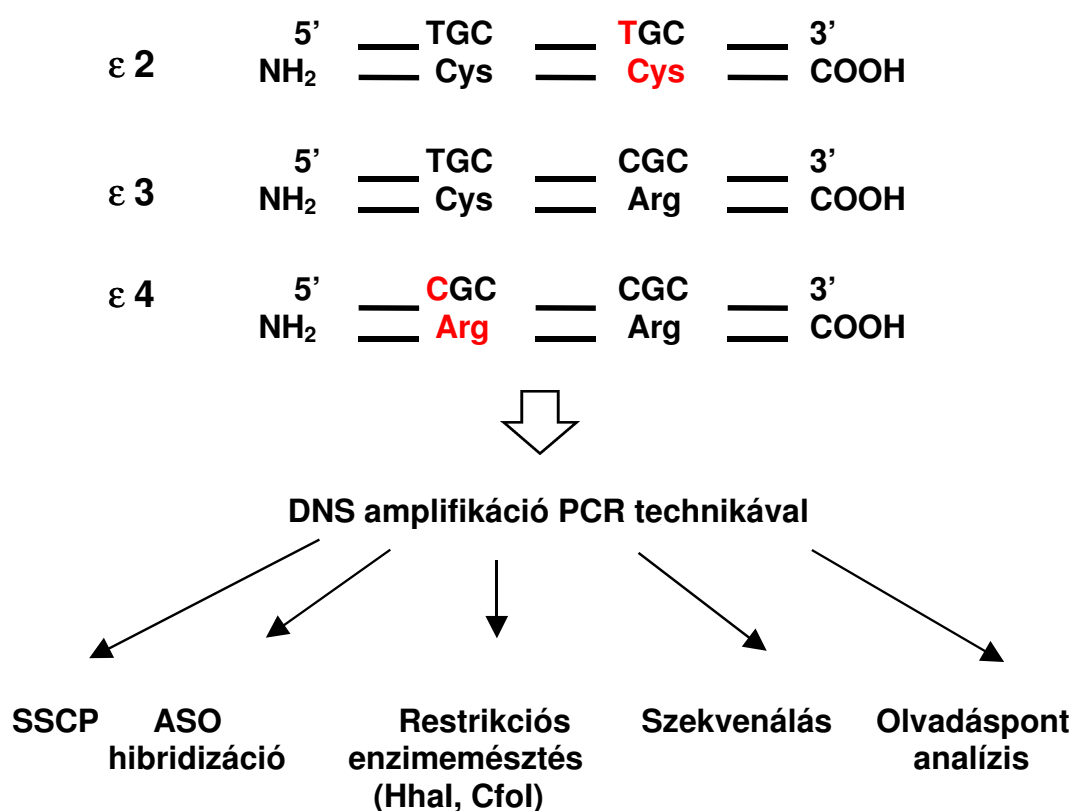
Ismeretes, hogy az endogén anyagcsere során a legtöbb plazma apoE HDL-re kerül és csak zsírfelvétel után jut a kilomikronba ill. azok maradványaiba. Az E4/3 fenotípusú emberek LDL koleszterin szintje magasabb, mint az E3/3 fenotípusúaké [28]. Kísérletes adatok igazolják, hogy az $\epsilon 4$ allél terméke nem tartalmaz ciszteint és ezáltal a HDL-ben nem képes diszulfid híddal kapcsolódni a többi lipoproteinhez (pl. az apo AII molekulához) és sokkal könnyebben leválik onnan mint a $\epsilon 3$ allél által meghatározott apolipoprotein [10]. Így az apo E4 gyorsabban jut a HDL-ről a kilomikronra mint az apo E3, következményesen a kilomikron clearance felgyorsul, az exogén koleszterin rapid módon akkumulálódik a májban, mely az LDL receptor gén downregulációját váltja ki [27].

Az apoE polimorfizmus és az atherogenezis közötti kapcsolatra először tapasztalati tények hívták fel a figyelmet, nevezetesen az E4/4 apoE fenotípussal rendelkező betegek fiatal korban manifesztálódó szív- és érrendszeri megbetegedései [29]. Az utóbbi években a világ számos országában/etnikai közösségében végeztek vizsgálatot az apoE allél frekvencia meghatározására, és számos kutatás eredménye alapján igazolást nyert, hogy az atherosclerosis kialakulásának és lefolyásának egyik genetikai meghatározója lehet az apoE gén polimorfikus tulajdonsága [30]. Az ε4 allél frekvenciája és a plazma koleszterin koncentrációja között a vizsgált populációkban egyértelmű összefüggést találtak, így az ε4 allél jelenlétét prediszpozíciónak tekintik az atherosclerosisra nézve [31-37]. Menzel és munkatársai kimutatták, hogy az ε2 allél protektív hatást fejt ki a coronaria atherosclerosis kialakulásával szemben [38], az ε2 allél jelenléte heterozigóta formában (E2/3, E2/4) csökkenti a koleszterin koncentrációt, ez a koleszterinszint-csökkentő hatás az adott etnikai közösségtől függően 2-3-szorosa az ε4 koleszterinszintnövelő hatásának [27]. Az ε4 allél földrajzi megoszlása Európán belül jellegzetes észak-déli gradienst mutat: a déli népek esetében a ε4 allél előfordulási gyakorisága jóval alacsonyabb, mint az északi közösségekben (7. ábra) [27]. Az egyes népcsoportokon belüli apoE allélfrekvencia gyakoriságokat befolyásoló tényezők lehetséges okait vizsgáló speciális tanulmányok hiánya miatt csak feltételezhető, hogy az ε4 allélfrekvencia eloszlás magyarázza (legalább részben) az egyes országok/etnikai közösségek kardiovaszkuláris betegség prevalencia eltéréseit [27].



7. ábra. ApoE ε4 allélfrekvencia gyakoriság Európa egyes régióiban [7].

Az a tény, hogy a két polimorfizmushely igen közel helyezkedik el egymáshoz a lókuszon PCR reakciókkal való vizsgálatát megkönnyíti. Az apoE polimorfizmusok kimutatására eddig többféle molekulárbiológiai módszert írtak le: mindegyik alapja az apoE gén kérdéses szakaszának PCR reakcióval történő felerősítése. Ezt követheti restrikciós enzimemésztés Hha I vagy Cfo I restrikciós enzimekkel [39, 40] (8. ábra); szekvenálás [41], esetleg allélspecifikus oligonukleotidok hibridizáltatása a PCR termékekre [42]. Napjainkban az olvadásponton alapuló mutációanalízis idő- és anyagtakarékos kivitelezhetőségével egyre inkább elterjed a hagyományos molekuláris biológiai eljárásokkal szemben.



8. ábra. Az apoE polimorfizmusok kimutatásának lehetőségei modern molekuláris biológiai technikák alkalmazásával [27].

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. LDL RG vizsgálatok

Magyarországon a kardiovaszkuláris betegségek genetikai hátterének feltérképezése ez idáig nem történt meg. A lehetséges LDL RG károsodások feltárásához a magyar lakosság nagymérvű etnikai keveredése és a mutációk következményesen nagyfokú variabilitása miatt adekvát szűrővizsgálati módszer átvételére nincs lehetőség.

- A lipidmetabolizmus és a familiáris hiperkoleszterinémia genetikai hátterének jobb megértése érdekében célul tűztük ki egy új, multiplex PCR elven alapuló diagnosztikai teszt kidolgozását, mely alkalmas a teljes gén vizsgálatára és a génben lévő 20bp-nál hosszabb szakaszt érintő deléciók kimutatására. Egy ilyen előszűrésre alkalmas, a rutindiagnosztika szintjén is alkalmazható eljárás nemzetközi érdeklődésre tarthat számot, hisz a populációk nagyfokú genetikai variabilitása – az izolált törzsi közösségeket leszámítva – világjelenség.

2.2. ApoE vizsgálatok

A magyar populációra vonatkozóan egyetlen adat áll rendelkezésre az apoE allélfrekvenciák vonatkozásában [35], s ez is mindössze 202 véradó genetikai analíziséen alapul, s adatai nehezen értelmezhetőek. Az a tény, hogy az E3/2 fenotípusú egyének koleszterin szintje szokatlanul magas, nem egyeztethető össze az ε2 allél protektív szerepéről számos etnikai közösség genetikai analízise kapcsán felállított teóriával. Önmagában ez a diszkrepancia is feltétlenül indokoltá teszi a familiáris hiperkoleszterinémiával sújtott családok apoE polimorfizmusának tisztázását hazánkban. ApoE vizsgálataink célkitűzése a kelet-magyarországi

hiperkoleszterinémias populációban az apoE izotípusok allélfrekvencia gyakoriság meghatározása volt.

- PCR RFLP módszer segítségével arra a kérdésre kerestünk választ, hogy vajon különbözik-e a kelet-magyarországi hiperkoleszterinémias populációban észlelt apoE allélfrekvencia eloszlás a magyar átlagpopulációt reprezentáló csoportban mért allélfrekvencia eloszlástól;
- továbbá célunk volt egy egylépcsős, zárt rendszerű, gyors diagnosztikai teszt beállítása apoE polimorfizmusok vizsgálatára, ami a rutindiagnosztikai laboratóriumokban helyettesítheti az idő- és munkaigényes RFLP módszert.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A VIZSGÁLATOKHOZ HASZNÁLT ANYAGOK, OLDATOK

A vizsgálatokhoz használt vegyszerek általában a Sigma Chemical Co. cégtől (St. Louis, MO, USA) kerültek beszerzésre; az ettől eltérő eredetű vegyszerek beszerzési forrásait külön feltüntetjük.

DNS preparáláshoz használt anyagok: TKM1 puffer (10mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10mM MgCl₂, 2mM EDTA); TKM2 puffer (10mM Tris-HCl, 10mM KCl, 10mM MgCl₂, 0.4M NaCl, 2mM EDTA); 10% SDS; 6M NaCl; TE puffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0);

Agaróz gélelektroforézishez használt anyagok: 10xTBE puffer pH 8.3 (1M Tris base, 1M bórsav, 20mM EDTA); agaróz; 10mg/ml etídium bromid; 10x jelölő festék (10% glicerín, 10xTBE puffer pH 8.3 [1M Tris base, 1M bórsav, 20mM EDTA], 1% brómfenolkék, 1% xylen cianol); EcoR I HindIII λ DNS marker; pBR322 Hae III DNS marker

PCR reakcióhoz használt anyagok: Taq polimeráz (Amersham-Pharmacia Biotech; Uppsala, Svédország, Hoffmann-La Roche Ltd; Bázél, Svájc), dNTP (Amersham-Pharmacia Biotech), MgCl₂ (Promega; Madison, WI, USA), DMSO, primerek (Amersham-Pharmacia Biotech)

Restrikciós enzimemésztéshez használt anyagok: Hha I restrikciós enzim, Palette Green Buffer (20mM Tris-acetát pH 7.9, 10mM magnézium-acetát, 50mM kálium-acetát, 1mM DTT, 0.1 mg/ml BSA)

PAGE-hez használt anyagok: 30% akrilamid puffer (4.08M akrilamid, 0.07M N,N-bis-akrilamid); 10xTBE pH 8.3 (1M Tris base, 1M bórsav, 20mM EDTA); TEMED; 10% APS;

Olvadásponton alapuló mutáció-analízishez használt anyagok: hibridizációs próba (TIB MolBiol, Berlin, Németország); primer (TIB MolBiol); Taq polimeráz (Hoffmann- La Roche Ltd.)

3.2. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

3.1.1. VIZSGÁLATI MINTÁK ELŐKÉSZÍTÉSE A GENETIKAI VIZSGÁLATOKHOZ

3.1.1.1. Genomiális DNS preparálása

A vizsgálatokat EDTA-val alvadásgátolt perifériás vénás vér limfocitáiból nyert DNS mintákon végeztük (100µl 15% EDTA / 5 ml vér) a Lahiri és munkatársai által leírt sóextrakciós módszerrel [43].

3.1.1.2. Genomiális DNS agaróz gélelektroforézis

A preparált genomiális DNS intakt voltát agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. A gélelektroforézishez 1%-os agaróz gél, 1xTBE puffert és EcoR I HindIII λ DNS markert használtunk. Az elektroforézis körülményei az alábbiak voltak: 80V, 100mA, 400W, 45 perc. A DNS festése 10 percig tartó 1 µg/ml (TBE puffer) etídium bromid festéssel történt az elektroforézist követően.

3.1.1.3. DNS koncentráció meghatározása

A DNS koncentráció meghatározása GeneQuantII (Amersham Pharmacia Biotech) DNS spektrofotométerrel történt a minták százszoros desztillált vizes hígításából. A DNS mintákat további vizsgálatra csak akkor használtuk fel, ha azok számított $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ hányadosa (nukleinsav/fehérje tartalom) nagyobb volt, mint 1,6.

3.1.2. LDL-RG VIZSGÁLATA

3.1.2.1. Vizsgálati populáció kiválasztása

A teszt kidolgozásához egészséges emberektől származó DNS mintákat, a teszt validitásának ellenőrzéséhez ismert státuszú FH-Helsinki génnel rendelkező betegek DNS mintáit használtuk. A kelet-magyarországi hiperkoleszterinémiás populáción végzett vizsgálatokhoz a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum I.sz. Belgyógyászati Klinikáján működő Regionális Lipid Szakrendelésen gondozott, familiáris hiperkoleszterinémiával sújtott betegeket vettünk be a vizsgálatba (n=20). A vizsgálatba vonás kritériumai a következők voltak: 1.) szérum koleszterin szint >7.8mmol/l, 2.) szérum LDL koleszterin szint >4.9 mmol/l, 3.) normál triglicerid szint, 4.) tendon xanthomák jelenléte, 5.) tendon xanthomák és/vagy hiperkoleszterinémia jelenléte legalább egy elsőfokú rokonnál, valamint 6.) fiatalkori miokardiális infarktusra nézve pozitív családi anamnézis. A vizsgálatba bevont egyének közül senki sem szenvedett szívbetegségben, vese, máj vagy pajzsmirigy megbetegedésben, illetve semmilyen egyéb krónikus betegségben (mint például diabetes, hipertónia). Amennyiben a gondozott betegek bármilyen véralvadásgátló

gyógyszert szedtek, azt a vizsgálatból való kizáró tényezőként értékeltük. Valamennyi beteg beleegyezését adta az LDL RG vizsgálathoz. Az LDL RG analízisre történő vérvétel kapcsán, a terápiás beavatkozás megkezdése előtt, minden vizsgálati személytől „lipid panel” (szérum koleszterin, HDL koleszterin, LDL koleszterin, apo AI, apoB, Lp(a), triglicerid, lipid elektroforézis) meghatározás történt standard módszerekkel [44-47].

3.1.1.2. Multiplex PCR

Az LDL RG teljes átíródo szakaszát amplifikáltuk polimeráz láncreakció segítségével. A 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16. exon szintéziséhez saját tervezésű oligonukleotidokat használtunk, míg a promóter régió, 1, 7, 8, 9, 17 és 18. exon amplifikálásához a Hobbs és munkatársai által tervezett primerpárokat alkalmaztuk [22]. Az 1. táblázat foglalja össze az alkalmazott primerek szekvenciáit. Minden 50µl-es reakcióelegy összetétele a következő volt: 0,3µg genomiális DNS, 10 mmol/l Tris-HCl (pH 9.0), 50 mmol/l KCl, 1.5- 1.5 mmol/l dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 1-1 µmol/l primer, 2.5 U Taq polimeráz, 10% DMSO. A reakció optimalizálása érdekében a láncreakció minden paraméterét teszteltük minden átírt szakaszra, így: a reakcióközeg komponenseinek koncentráció változását, a hőmérsékleti optimumokat denaturációra, hibridizációra, polimerizációra. A módszer beállítása során a keletkezett amplikonok mérete közötti különbségeket felhasználva úgy állítottuk össze a tesztrendszert, hogy a teljes gén valamennyi exonja és promóter régiója 7 reakcióelegyben amplifikálható, és egyetlen elektroforetikus lépéssel egymástól jól elkülöníthető sávokként vizualizálható legyen. Ilyen módon 83-386 bp hosszúságú szakaszokat szintetizáltunk két hibridizációs hőmérséklet alkalmazásával. Az 1, 2, 3 sz. reakcióelegyek esetében a

hibridizációs hőmérséklet 51°C, míg a többi (4, 5, 6, 7 sz.) reakcióelegy esetében 47°C volt. A 2. táblázat mutatja az alkalmazott hibridizációs hőmérsékletek mellett az egyes reakcióelegyek primer és MgCl₂ összetételét, valamint a szintetizált amplikonok méretét. A kezdeti denaturációt követően programozható hőtermosztátban (Gene Machine Junior, UNITEK Ltd., Luton, Egyesült Királyság) 35 PCR ciklust alkalmaztunk. A ciklusok paraméterei a következők voltak: 1 perc inkubálás 94°C-on, 1 perc inkubálás hibridizációs hőmérsékleten, 2 perc inkubálás 72°C-on. A lánchosszabbítás időtartamát a 35. ciklus után megnöveltük 12 percre annak érdekében, hogy a reakció során megkezdett, de be nem fejezett amplikonok szintézise befejeződhessen. A PCR reakció után szintetizált DNS szakaszokat tartalmazó 50µl-es elegyet vákumcentrifuga (Automatic Environment SpeedVac, AES 1000 Savant, Farmindale, NY, USA) segítségével 8µl térfogatra koncentráltuk.

3.1.1.3. Agaróz gélelektroforézis

A szintetizált amplikonokat 3.5%-os agaróz gélben 1xTBE pufferben, pBR322 HaeIII DNS marker mellett elektroforetizáltuk. A szakaszok festése az elektroforézissel egyidejűleg történt: a gélben és az 1xTBE pufferben 0.05 µg/ml etídium-bromid koncentráció beállításával. Az elektroforézis körülményei: 70V, 100mA, 400W, 150 perc.

Primer	Szekvencia	Termék mérete	LDL RG amplifikált szakasza
PP.1	5'- gag tgg gaa tca gag ctt cac ggg t -3'	155 bp	promoter régió
PP.2	5'- cca cgt cat tta cag cat ttc aat g -3'		
P1.1	5'- act cct ccc cct gct aga aac ctc a -3'	234 bp	1 exon
P1.2	5'- ttc tgg cgc ctg gag caa gcc tta c -3'		
P2.1	5'- tgg gcg aca gat gtg aaa gaa ac -3'	123 bp	2 exon
P2.2	5'- agc acg tct cct ggg gac tca t -3'		
P3.1	5'- tgt ctg tca cct gca aat cc -3'	131 bp	3 exon
P3.2	5'- act tac gac agc ctt gct cgt c -3'		
P4.1	5'- tgc agc ccc caa gac gtg ct -3'	386 bp	4 exon
P4.2	5'- cgc agt ttt cct cgt cag at -3'		
P5.1	5'- tcc tgt ttt cca gct gtg gcc -3'	136 bp	5 exon
P5.2	5'- cat taa cgc agc caa ctt c -3'		
P6.1	5'- tga cac tct gcg agg gac cca aca a -3'	123 bp	6 exon
P6.2	5'- cgc act ctt tga tgg gtt ca -3'		
P7.1	5'- agt ctg cat ccc tgg ccc tgc gca g -3'	169 bp	7 exon
P7.2	5'- agg gct cag tcc acc ggg gaa tca c -3'		
P8.1	5'- cca agc ctc ttt ctc tct ctt cca g -3'	175 bp	8 exon
P8.2	5'- cca ccc gcc gcc ttc ccg tgc tca c -3'		
P9.1	5'- tcc atc gac ggg tcc cct ctg acc c -3'	271 bp	9 exon
P9.2	5'- agc cct cat ctc acc tgc ggg cca a -3'		
P10.1	5'- cac cca gct tga cag agc cca -3'	228 bp	10 exon
P10.2	5'- cca tga aca gga tcc acc a -3'		
P11.1	5'- ctt cat gta ctg gac tga ctg g -3'	119 bp	11 exon
P11.2	5'- cta ggg tga tgc cat tgg g -3'		
P12.1	5'- atc tcc tca gtg gcc gcc tct act -3'	140 bp	12 exon
P12.2	5'- ctc aaa gac ggc caa gga gaa -3'		
P13.1	5'- tgc ctg ttt agg aca aag ta -3'	153 bp	13 exon
P13.2	5'- ctc ttg gct ggg tga ggt tgt -3'		
P14.1	5'- gag tga act ggt gtg aga gga -3'	153 bp	14 exon
P14.2	5'- ctg tga ggc agc tcc tca tgt -3'		
P15.1	5'- tct ttc aga ggc tga ggc tg -3'	179 bp	15 exon
P15.2	5'- ctt ggt gag aca ttg tca cta tct cc -3'		
P16.1	5'- tgc agc tct ggg cga cgt tg -3'	83 bp	16 exon
P16.2	5'- cga tgg gga gga caa tgg aca ga -3'		
P17.1	5'- tga cag agc gtg cct ctc cct aca g -3'	207 bp	17 exon
P17.2	5'- gct ttc tag aga ggg tca cac tca c -3'		
P18.1	5'- tcc gct gtt tac cat ttg ttg gca g -3'	135 bp	18 exon
P18.2	5'- aat aaa aca agg ccg gcg agg tct c -3'		

1. táblázat. Az LDL RG minden exonjának és promóter régiójának amplifikálására alkalmas primerek szekvenciái

Reakció- elegy	Amplifikált szakasz	Primerpárok	Amplikon mérete (bp)	Hibridizációs hőmérséklet (°C)	[Mg ²⁺] koncentráció (mM)
1	17 exon	P 17.1-P 17.2	207 bp	51 °C	6.0 mM
	18 exon	P 18.1-P 18.2	135 bp		
2	1 exon	P 1.1-P 1.2	234 bp	51 °C	4.7 mM
	7 exon	P 7.1-P 7.2	169 bp		
	9 exon	P 9.1-P 9.2	271 bp		
3	promoter	P P.1-P P.2	155 bp	51 °C	4.5 mM
	8 exon	P 8.1-P 8.2	175 bp		
4	3 exon	P 3.1-P 3.2	131 bp	47 °C	5.6 mM
	4 exon	P 4.1-P 4.2	386 bp		
	13 exon	P 13.1-P 13.2	153 bp		
5	5 exon	P 5.1-P 5.2	136 bp	47 °C	4.4 mM
	6 exon	P 6.1-P 6.2	123 bp		
	14 exon	P 14.1-P 14.2	153 bp		
6	10 exon	P 10.1-P 10.2	228 bp	47 °C	4.5 mM
	11 exon	P 11.1-P 11.2	119 bp		
	12 exon	P 12.1-P 12.2	140 bp		
7	2 exon	P 2.1-P 2.2	123 bp	47 °C	4.3 mM
	15 exon	P 15.1-P 15.2	179 bp		
	16 exon	P 16.1-P 16.2	83 bp		

2. táblázat A multiplex PCR tesztben használt reakcióelegyek összetétele

3.1.3. APOE POLIMORFIZMUSOK VIZSGÁLATA

3.1.3.1. Vizsgálati populáció kiválasztása

A Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum I.sz. Belgyógyászati Klinikáján működő Regionális Lipid Szakrendelésen gondozott hiperkoleszterinémiával sújtott betegeket (n=247) kértünk fel a vizsgálatban való részvételre. A vizsgálatba vonás kritériumai ugyanazok voltak, mint az LDL RG vizsgálat esetében. Referencia populációként a magyar populációt reprezentáló irodalmi kontroll csoportot (mely vizsgálat 202 önkéntes véradó apoE genetikai analízisét tartalmazta) fogadtuk el [35].

3.1.1.2. PCR-RFLP analízis

Az ApoE genotípus meghatározást a Hixon és munkatársai által kidolgozott módszer alkalmazásával végeztük [40]. Az apoE gén 4. exonjának felerősítése 25µl-es reakcióelegyben történt megfelelő primerpárok alkalmazásával. A primerek szekvenciáit a 3. táblázat mutatja be.

PRIMER	SZEKVENCIA
A.1F	5'- ggC gCA ggC CCg gCT ggg CgC ggA -3'
A.2R	5'- Cgg ATg gCg CTg Agg CCg CgC TCg -3'

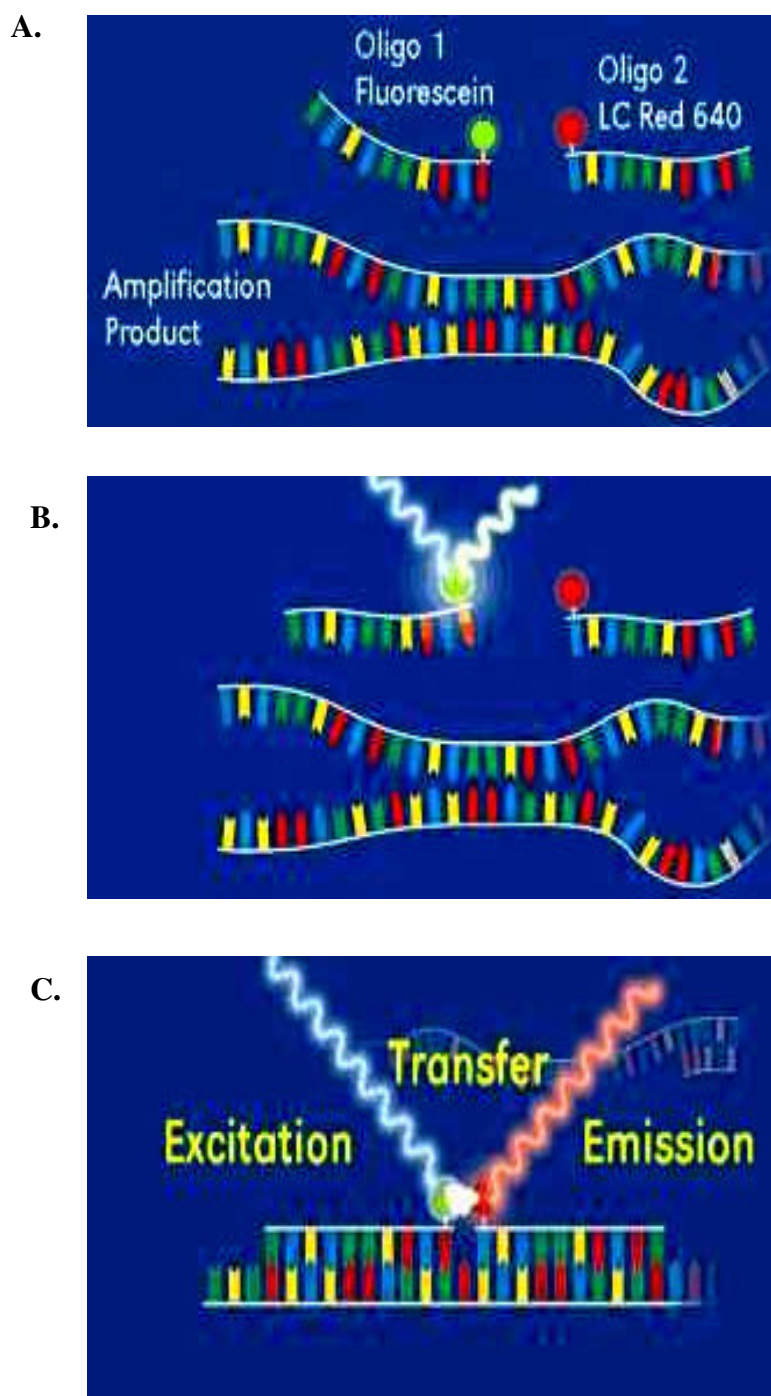
3. táblázat Az apoE PCR RFLP vizsgálatához használt primerek szekvenciái.

A PCR reakcióelegyek összetétele a következő volt: 0,15µg genomiális DNS, 5,1mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l Tris-HCl (pH 9.0), 50 mmol/l KCl, 1,5-1,5 mmol/l dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 1-1 µmol/l primer, 0,25 U Taq polimeráz, 10% DMSO. A kezdeti denaturációt 35 PCR ciklus követett, amely az alábbi lépésekből állt: 1 perc inkubálás 94°C-on, 1 perc inkubálás 63°C-on, 2 perc inkubálás 72°C-on. Az utolsó ciklus lánchosszabbítási lépését 10 percre hosszabbítottuk a megkezdett amplikonok szintézisének befejezése érdekében. A PCR lépéseket programozható automata készülék (Gene Machine Junior, UNITEK Ltd.) segítségével végeztük. A PCR termékeket 10U Hha I enzimmel Palette Green Buffer jelenlétében 3 órán keresztül 37°C-os vízfürdőben emésztettük. Az emésztett fragmentek vizualizálását poliakrilamid gélelektroforézissel végeztük. A 9%-os semleges akrilamid gél 0.2% APS-t, 0.15% TEMED-et tartalmazott, a DNS fragmentek elektroforézise 1xTBE pufferben, pBR322 HaeIII DNS marker mellett történt. Az elektroforézis körülményei a következők voltak: 70V, 100mA, 400W, 150 perc. A gél az elektroforézis végén 1µg/ml (1xTBE puffer) etídium bromiddal festettük 10 percig.

3.2.3.3. Genotipizálás olvadáspont analízissel

Az olvadáspont analízissel történő genotipizálást Aslanidis és munkatársai módszere szerint végeztük [48]. A módszer elvét a 9. ábra szemlélteti. A genotipizálás a fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) jelenségén alapul. A PCR reakciót üvegapillárisban, 20µl térfogatban LightCycler real time PCR készülékkel (Hoffmann-La Roche Ltd.) végeztük. A reakcióelegy összetétele a következő volt: 0,04µg genomiális DNS, 4,5 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l Tris-HCl (pH 9.0), 50 mmol/l KCl, 25-25 µmol/l dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 0,4-0,4 µmol/l primer, 0,2-0,2 µmol/l

hibridizációs próba szett (LCRed640 ill. LCRed705 és fluoreszcein fluorochrom), 2,5 U Taq polimeráz, 12% DMSO. A mutáció helyére tervezett primerek és hibridizálódó próbák szekvenciáját a 4. táblázat mutatja. A specifikus hibridizációs próbák egyikét a mutáció helyére tervezve az olvadáspont meghatározásakor a mutáns szakaszhoz kötődő próba a mismatch miatt mintegy 7-8°C-kal alacsonyabb hőmérsékleten disszociál le, mint a vad szakaszhoz tökéletesen illeszkedő. A kezdeti denaturációt az alábbi inkubációs lépések követték 65 ciklusban: felfűtés 94°C-ra, 60°C 10 másodperc, 72°C 10 másodperc (20°C/s hűtés/fűtés kapacitás mellett). Az olvadáspont analízis körülményei a következők voltak: rövid denaturálást követően gyorsan (20°C hőmérséklet csökkenés/s) lehűtöttük a reakcióelegyet 40°C-ra, melyen 120 másodpercig inkubáltuk annak érdekében, hogy a próbák az amplikonokra hibridizáljanak. Ezt követően az elegy hőmérsékletét igen lassan emeltük (0.1°C/s), miközben folyamatosan monitoroztuk a fluoreszcencia szignál csökkenését, és meghatároztuk azt a hőmérsékletet, ahol a próbák 50%-a már disszociált állapotban van jelen (olvadáspont). A mért fluoreszcencia intenzitás negatív deriváltját (-dF/dT) ábráztuk a hőmérséklet függvényében.



9. ábra. A fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) elve.

Az egyik targetspecifikus próba 3' végén a gerjesztő fluoreszcinnel, a másik próba 5' végén LCRed640 (vagy LCRed705) akceptor festékkel jelölt. Amennyiben a targetspecifikus próbák bekötődnek az annealing folyamán, az 1-4 bázis közelségbe kerülő fluorescein és az LC Red között FRET jön létre, melynek következményét, az LC Red fluoreszcens emisszióját, a LightCycler műszer detektálja.

PRIMER/PRÓBA	SZEKVENCIA
primer	
hu ApoE CA1	TTgAAggCCTACAAATCggAACTg
hu ApoE CA2	CCggCTgCCCATCTCCTCCATCCg
próba	
ApoE4-112M	LCRed640 -ACATggAggACgTgCgCgg
ApoE4-112A	CTgCAggCggCgCAggCCCggCTgggCgC- FL
ApoE2-158M	LCRed705 -gACCTgCAgAAgCgCCTggC
ApoE2-158A	gCTgCgTAAgCggCTCCTCCgCgATgCCg- FL

4. táblázat. Az olvadásponton alapuló apoE mutációanalízishez használt primerek és próbák szekvenciái a jelző fluorochromok feltüntetésével. LCRed640 LightCycler Red 640; LCRed705 LightCycler Red 705; FL fluoreszcein.

3.2.3.4. Statisztikai módszerek

Az eredmények kiértékeléséhez STATA 5.0 programcsomagot használtunk. Az összefüggés jellemzésére esélyhányadosokat alkalmaztunk, melyeket a Cornfield módszere alapján számított 95%-os konfidencia intervallumaikkal együtt tüntettünk fel [49]. Referencia kategóriának az apoE 3/3 genotípust jelöltük ki, ehhez viszonyítottuk a többi izotípus előfordulási gyakoriságát és az izotípusokkal kapcsolatos esélyhányadosokat. Az allélfrekvenciákat és esélyhányadosokat standard módszerekkel számítottuk –pl. $\epsilon 2$ allél frekvenciájának számítása a következő algoritmus alapján történt: $\{(2 \cdot \text{apoE2}/2 \text{ allélek száma} + \text{apoE3}/2 \text{ allélek száma} + \text{apoE4}/2 \text{ allélek száma}) / \text{az összes, vizsgálatban részt vett allél}\}$. Az allélfrekvenciák

közötti statisztikai különbséget χ^2 próbával vizsgáltuk. Az általunk végzett vizsgálat statisztikai ereje 80%, szignifikancia szintje 5%. Figyelembe véve azt a tényt, hogy a referenciapopulációban az $\epsilon 4$ allél előfordulási gyakorisága 12.90%, az alkalmazott mintaszámmal (247 hiperkoleszterinémiás beteg, és 202 egészséges egyén) az apoE allélfrekvencia előfordulási gyakoriság 22.85%-os változása kimutatható.

4. EREDMÉNYEK

4.1. AZ LDL RG VIZSGÁLAT EREDMÉNYEI

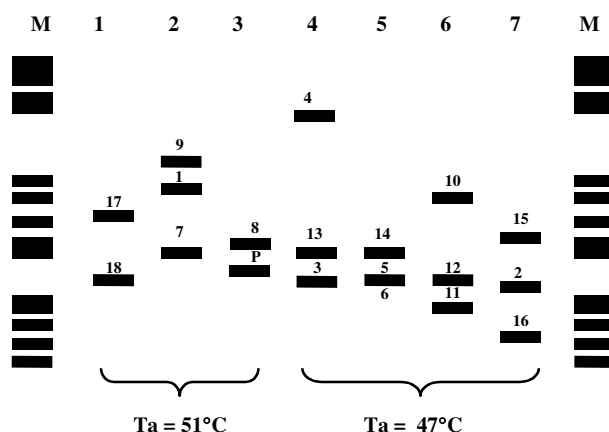
Új, multiplex PCR alapú diagnosztikai tesztet dolgoztunk ki, mely alkalmas a 20bp-nál nagyobb méretű deléciók kimutatására, függetlenül attól, hogy azok a gén átíródo szakaszán hol helyezkednek el. A promóter régiót és az egyes exonokat teljes mértékben közrefogó primerpárokat használva, polimeráz láncreakció segítségével a teljes gén átíródo szekvenciája exononkénti bontásban szintetizálható és tanulmányozható (10.A és B ábra).

A teszt alkalmazásával a teljes LDL receptor gén igen rövid idő alatt levizsgálható deléciók genetikai károsodásokra. A szintetizált amplikonok alkalmasak további molekulárbiológiai vizsgálatokra (szekvenálás, SSCP analízis) is, így lehetővé válik a gén finomabb szerkezeti károsodásainak kimutatása.

A teszt diagnosztikai hasznosíthatóságának igazolására FH-Helsinki génnel rendelkező finn betegek DNS mintáit használtuk. Ez esetben a betegek LDL receptor génjében a 16-os introntól a 18. exont magába foglaló nagyméretű deléció tehető felelőssé a betegség kialakulásáért. A 10.C ábrán FH-Helsinki típusú génen, egészséges kontroll DNS mintán, valamint kelet-magyarországi hiperkoleszterinémias beteg DNS mintáján végzett vizsgálat eredménye látható. Az analízisben két reakciócsövet alkalmaztunk: az 1.sz. reakcióelegy alkalmas az 17, 18 exonok amplifikációjára (1., 3., 5. sáv az agaróz gélben), míg a 7.sz. reakcióelegy segítségével a 2, 15, 16 exonok szintetizálhatók (2., 4., 6. sáv). Az FH-Helsinki típusú gén

esetében (3, 4 sáv) csak a 123bp és 179bp hosszúságú szakaszok (2., 15. exon) amplifikálódnak a 7.sz. reakcióelegyben, míg az 1.sz. reakcióelegyben nincs amplifikáció. Kontroll és hiperkoleszterinémiás betegből származó DNS minták esetében (1, 2 sáv) mind az öt exont amplifikálni tudtuk.

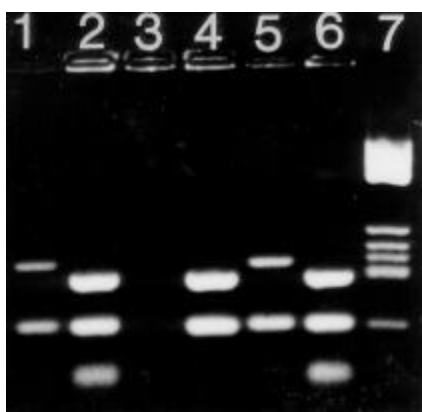
20 familiáris hiperkoleszterinémiában szenvedő kelet-magyarországi beteg DNS mintájának analízise során nem találtunk deletált LDL receptor génnel rendelkező DNS mintát. Vizsgálatunk alapján valószínűsíthető, hogy a kelet-magyarországi hiperkoleszterinémiás állapotok hátterében nem az LDL receptor gént érintő nagy genetikai átrendeződések vagy deléciók állnak.



A. LDL RG teljes átírózó szakaszának vizsgálatára alkalmas multiplex PCR teszt eredménye; a vizsgálat során az LDL receptor gén promóter régióján és exonjain szintetizálódott ampliconok elektroforetikus mintázata. Az exonok száma az azokat jelző vonalak felett található. Az 1, 2, 3 reakcióelegy amplifikálásához 51 °C hibridizációs hőmérsékletet alkalmaztunk; míg a 4, 5, 6, 7 elegyek esetében ez a hőmérséklet 47 °C volt.



B. Multiplex PCR fragmentek vizualizálása gél elektroforézisben etídium-bromid festéssel. 1. sáv: 1 reakcióelegy; 2 sáv: 2 reakcióelegy; 3 sáv: 3 reakcióelegy; 4 sáv: 4 reakcióelegy; 5 sáv: 5 reakcióelegy; 6 sáv: 6 reakcióelegy; 7 sáv: 7 reakcióelegy; 8 sáv: pBR 322 HaeIII DNS marker.



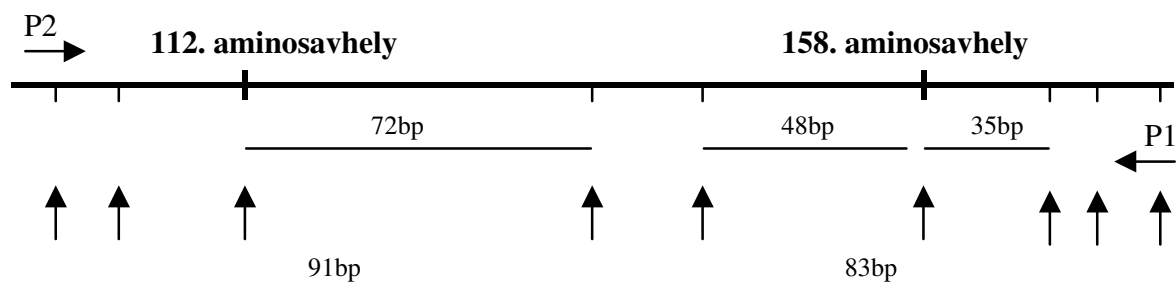
C. A multiplex PCR teszt diagnosztikai hasznosíthatóságának igazolása 1, 3, 5 sávokban az LDL RG 17, 18 exonjainak amplifikálásához, míg a 2, 4, 6 sávokban a 2, 15, 16 exonok szintéziséhez alkalmas primerpárokat tartalmazzák a reakcióelegyek. 1,2 sáv: kontroll DNS minta; 3,4 sáv: bizonyítottan FH-Helsinki génnel rendelkező beteg DNS mintája; 5,6 sáv: kelet-magyarországi hiperkoleszterinémiás beteg DNS mintája; 7 sáv: pBR 322 DNA HaeIII DNS marker.

10. ábra LDL RG vizsgálata multiplex PCR technikával

4.2. AZ APOE VIZSGÁLAT EREDMÉNYEI

Hixson és munkatársai által bevezetett PCR RFLP vizsgálattal [40] 247 25-65 éves hiperkoleszterinémiás beteg esetében végeztünk apoE genotípus meghatározást. A módszer elve az amplifikációt és restrikciós enzimemésztést követő elektroforézis eredményének sémás rajza és 12 minta fenotípus analízisének elektroforetogramja a 11. ábrán látható. A teljes vizsgálati populációt 97 férfi és 150 nő alkotta. A hiperkoleszterinémiás csoporton belül észlelt apoE izotípusok előfordulási gyakoriságát, a becsült esélyhányadosokat és azok 95%-os konfidencia intervallumát egy előzetes magyarországi vizsgálat eredményeihez hasonlítottuk [35] (5. táblázat). Az izotípusok eloszlásában χ^2 próba alkalmazásával nem találtunk szignifikáns különbséget a referencia csoport és hiperkoleszterinémiás csoport között. Az E3/3 genotípust referencia kategóriának tekintve a hiperkoleszterinémia esélyhányadosaival jellemeztük az egyes genotípus kategóriákat. Az izotípus csoportokban (E2/2, E3/2, E4/2, E4/3 és E4/4) számított esélyhányadosokat és 95%-os konfidencia intervallumait a 5. táblázat szemlélteti. A 6. táblázatban a vizsgálati populációk izotípusait jellemző szérumszint értékek vannak feltüntetve, míg a 7. táblázat összesíti az észlelt relatív allélfrekvencia (ϵ_2 , ϵ_3 , ϵ_4) eloszlásokat a két vizsgálati populációban. Eredményeink nem támasztják alá azt a hipotézist, miszerint az ϵ_2 alléllal rendelkező egyének szérumszintje alacsonyabb, mint az ϵ_4 alléllal rendelkezőké, nem találtunk bizonyítékot arra sem, hogy a hiperkoleszterinémiás betegek apoE allélfrekvencia megoszlása eltérő lenne a referenciacsoporttól. A feltüntetett esélyhányadosok az egyes kategóriáknak a

A) Elve



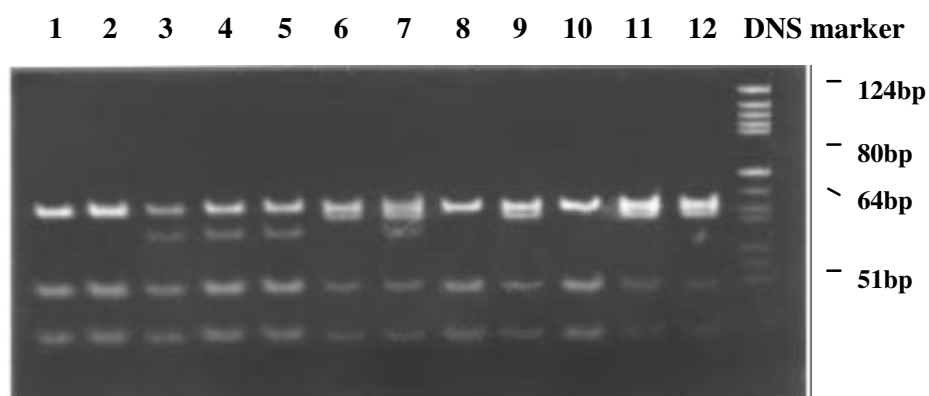
Az apoE gén kritikus régiója a báziscsere (112, 158 aminosavhelyek), a restrikciós enzim (HhaI) lehetséges támadáspontjainak és a primerek kapcsolódási helyeinek, valamint a lehetséges restrikciós fragmentek hosszának feltüntetésével

B) Mintázat

fragment	E 2/2	E 3/3	E 4/4	E 3/2	E 4/3	E 4/2
91bp	—	—		—	—	—
83bp	—			—		—
72bp			—		—	—
48bp		—	—	—	—	—
35bp		—	—	—	—	—

Az apoE izotípusokhoz rendelhető PCR-RFLP mintázatok a gén 3708-3920bp közötti szakaszán nyert ampliconok HhaI restrikciós enzim emésztését követően

C) Elektroforetikus kép



Fenotípus eloszlás: 3/3: 1, 2, 8, 10 minta; 4/3: 3, 4, 5 minta; 3/2: 6, 9, 11, 12 minta; 4/2: 7 minta. Minden minta familiáris hiperkoleszterinémias beteg DNS-ének HhaI restrikciós enzim emésztéssel nyert fargmentjeit mutatja.

11. ábra Az apoE polimorfizmus meghatározása PCR RFLP módszerrel

referencia (ε3) kategóriához viszonyított esélyeit jellemzik. Nem tudtunk statisztikailag szignifikáns különbséget kimutatni egyik apoE allél esetében sem a hiperkoleszterinémiás populációban.

ApoE izotípusok	Hiperkoleszterinémiás csoport (%)	Referencia csoport (%)	Esély- hányados	95% CI
E 2/2	2 (0.8)	4 (2.0)	0.44	0.04-3.11
E3/2	23 (9.3)	16 (7.9)	1.26	0.61-2.66
E 4/2	4 (1.6)	2 (1.0)	1.75	0.25-19.58
E 3/3	151 (61.1)	132 (65.3)	1.00	-
E 4/3	65 (26.4)	46 (22.8)	1.24	0.77-1.98
E 4/4	2 (0.8)	2 (1.0)	0.87	0.06-12.22
Összesen	247 (100)	202 (100)		

Megjegyzés: 95% CI, 95% konfidencia intervallum.

5. táblázat. A különböző apoE izotípusok száma és előfordulási gyakorisága a hiperkoleszterinémiás és a referencia populációkban, valamint a hiperkoleszterinémia különböző izotípusokkal kapcsolatos, a 3/3-as genotípushoz viszonyított esélyhányadosai és azok 95 %-os konfidencia intervallumai.

Hiperkoleszterinémias		
ApoE izotípus	csoport (átlag(±SD))	Referencia csoport (átlag(±SD))
E 2/2	8.0 (±0.0)	4.4 (±0.5)
E 3/2	7.9 (±1.1)	5.9 (±0.9)
E 4/2	8.8 (±2.7)	4.8 (±0.4)
E 3/3	8.3 (±1.5)	5.7 (±1.1)
E 4/3	8.5 (±1.8)	5.9 (±1.1)
E 4/4	7.5 (±0.4)	8.0 (±0.4)

Megjegyzés: SD, szórás (standard deviation)

6. táblázat Az egyes apoE izotípusokhoz rendelhető szérumszint értékek (mmol/l) hiperkoleszterinémias és referencia populációkban.

Apo E allél	Apo E allélek a hiperkoleszterinémias csoportban (%)	Apo E allélek a referencia csoportban (%)	Esélyhányados	95% CI
ε2	31 (6.3)	26 (6.4)	0.99	0.56-1.79
ε3	390 (78.9)	326 (80.7)	1.00	-
ε4	73 (14.8)	52 (12.9)	1.17	0.79-1.76

Megjegyzés: 95% CI, 95%-os konfidencia intervallum.

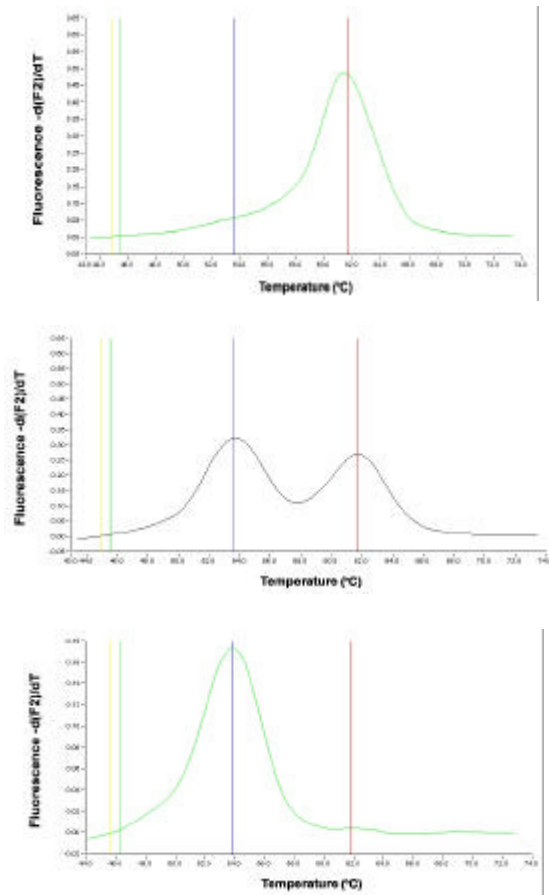
Az allélfrekvenciákat és esélyhányadosokat standard módszerekkel számítottuk pl. ε2 allél frekvenciájának számítása a következő algoritmus alapján történt:

{(2*apoE2/2 allélek száma+apoE3/2 allélek száma +apoE4/2 allélek száma)/az összes, vizsgálatban részt vett allél}.

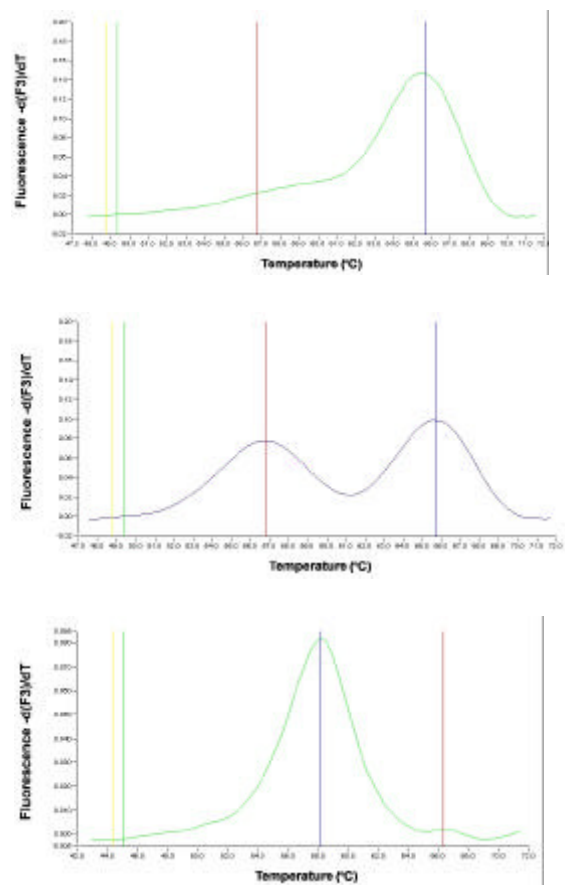
7. táblázat ApoE allélek száma és előfordulási gyakorisága a hiperkoleszterinémias és referencia csoportokban, valamint a hiperkoleszterinémia különböző allélekkel kapcsolatos, az ε3 allélhez viszonyított esélyhányadosai és azok 95%-os konfidencia intervallumai.

A genotipizálás automatizálása, az analízis-idő lerövidítése érdekében intézetünkben bevezettük az apoE pontmutációk olvadásponton alapuló analízisét a szakirodalomban leírt próbák alkalmazásával [48], és eredményeinket összevetettük a hagyományos PCR RFLP módszerrel nyert eredményekkel. A genotipizálás elvét a 12. ábra szemlélteti. Az apoE pontmutációk helyére tervezett hibridizációs próbák alkalmazásával LightCycler real time PCR készülékkel a két lókuszt egymástól függetlenül vizsgálható és a mellékelt táblázat alapján a DNS minták 100%-os biztonsággal genotipizálhatók. A 112. aminosavhely vizsgálata során mutáns allél jelenléte esetében a hibridizációs próba 54°C-on, míg a vad allél esetében 62°C-on olvad le. A 158-as aminosavhely mutációjának vizsgálata során a vad allél jelenlétét a 66°C-on míg mutáns allél jelenlétét az 58°C-on megjelenő fluoreszcencia intenzitás változás jelenti. Az apoE olvadásponton alapuló genotipizálása a két csatorna párhuzamos analízisével történik. A 12. ábrán látható táblázat alapján az ε4 allélre nézve homozigóta fenotípus esetén mind az 112., mind a 158. aminosavhelyen a magasabb hőmérsékleten jelenik meg a fluoreszcencia intenzitás negatív deriváltjának a csúcsa. Mindkét csatornán mindkét hőmérsékleten megjelenő fluoreszcencia csúcs E2/E4 fenotípust, míg a fluoreszcencia intenzitás negatív deriváltjának mindkét csatornán az alacsonyabb hőmérsékleten észlelt csúcsa E2/E2 fenotípust jelöl. Ezzel a módszerrel a genotipizálás időtartama a hagyományos módszerrel végzett művelet töredékére csökken: 32 minta analízise végezhető mintegy 50 perc alatt, ami jelentős időmegtakarítás a PCR-RFLP analízis 12 órás időtartamával szemben.

112. aminosavhely



158. aminosavhely



genotípus	E112 próba		E158 próba	
E2/E2	•		•	
E3/E3	•			•
E4/E4		•		•
E2/E3	•		•	•
E2/E4	•	•	•	•
E3/E4	•	•		•
	54°C	62°C	58°C	66°C

12. ábra. ApoE genotipizálás olvadásponton alapuló mutációanalízissel.

A 112. aminosavhely vizsgálata során mutáns allél jelenléte esetében a hibridizációs próba 54°C-on, míg a vad allél esetében 62°C-on olvad le. A 158-as aminosavhely mutációjának vizsgálata során a vad allél jelenlétét a 66°C-on míg mutáns allél jelenlétét az 58°C-on megjelenő fluoreszcencia intenzitás változás jelenti. Az apoE olvadásponton alapuló genotipizálása a két csatorna párhuzamos analízisével történik. Az ε4 allélre nézve homozigóta fenotípus esetén mind az 112., mind a 158. aminosavhelyen a magasabb hőmérsékleten jelenik meg a fluoreszcencia intenzitás negatív deriváltjának a csúcsa. Mindkét csatornán mindkét hőmérsékleten megjelenő fluoreszcencia csúcs E2/E4 fenotípust, míg a fluoreszcencia intenzitás negatív deriváltjának mindkét csatornán az alacsonyabb hőmérsékleten észlelt csúcsa E2/E2 fenotípust jelöl.

5. DISZKUSSZIÓ

A familiáris hiperkoleszterinémia monogénis öröklésmentet mutató betegség, melynek hátterében az LDL RG defektusa áll. A betegség frekvenciája európai és észak-amerikai populációkban átlagosan 0.2% [50], azonban ez az előfordulási arány egyes populációkban sokkal magasabb is lehet. Az elmúlt években nagyszámú genetikai károsodást írtak le, melyek az LDL receptor szintézisének zavarához, funkciójának megváltozásához vezetnek és klinikailag hiperkoleszterinémia formájában manifesztálódnak [7, 22]. A jelenleg ismert genetikai elváltozások nagyfokú variabilitást mutatnak: jelenthetnek kis és nagy deléciót, inszerciót, nonsense és missence mutációt [22, 24, 25, 51-53]. Az a tény, hogy a génben ezidáig nem azonosítottak mutációs forró ponto(ka)t, igen megnehezíti a veszélyeztetettség kimutatását. A lehetséges genetikai károsodások széles skálája miatt egy populáció vagy rizikócsoporthoz szűrésére nem lehet már bevezetett vizsgálatokat átvenni, hanem egy olyan tesztrendszer kell kidolgozni, amely lehetőséget ad a gén teljes szakaszának analízisére. Célkitűzésünknek megfelelően kidolgoztunk egy olyan multiplex PCR elven alapuló módszert az LDL RG deléciós károsodásainak vizsgálatára, amely alkalmas a teljes gén levizsgálására és a génben lévő, 20 bp-nál nagyobb szakaszt érintő, deléciók kimutatására. Ez a tesztrendszer egyben kiindulási alapul szolgálhat a gén további analíziséhez.

A tesztrendszer alkalmazásával nyert eredményeink arra utalnak, hogy a kelet-magyarországi hiperkoleszterinémiás állapotok esetében valószínűleg minor deléciók vagy mutációk jelentik az LDL receptor defektust. E feltevésünk igazolására a

szintetizált PCR termékek részletesebb analízisével (szekvenálás, SSCP analízis) kell folytatni a vizsgálatokat.

Klinikai és genetikai epidemiológiai tanulmányok eredményei alapján megállapítható, hogy az apoE ϵ 2 allél jelenléte a szervezetben protektív, míg az ϵ 4 allél predisponáló hatást fejt ki a kardiovaszkuláris betegségekre vonatkozóan [34, 36, 37]. Ez a feltevés összhangban áll azzal a felismeréssel, hogy az ϵ 2 allél csökkent affinitással kapcsolódik az LDL receptorhoz, ami az apoE tartalmú lipoproteinek akkumulációjához, következetesen megemelkedett koncentrációjához vezet, továbbá azzal, hogy az ϵ 4 allél jelenléte az LDL clearance csökkenését, ezáltal az LDL receptor downregulációját váltja ki [54, 55]. Általánosan elfogadott, hogy az apolipoprotein E molekula izotípusa befolyásolja a plazma koleszterin szintjét; megválaszolatlan kérdés azonban, hogy az egyes apoE izotípusok azonos mértékű hatást gyakorolnak-e a szérum koleszterinszintre az egyes etnikai csoportokban. A Cardiovascular Risk in Young Finns Study epidemiológiai vizsgálat a szív- és érrendszeri betegségekkel összefüggést mutató genetikai markerek szérum lipid szint alakulására gyakorolt hatását tanulmányozta, és nem mutatott ki kapcsolatot az apoE fenotípusok alakulása és a plazma LDL-koleszterin szint változása között [56]. Hallman és munkatársai kilenc különböző populációban vizsgálták az apoE allélek eloszlását, és kimutatták, hogy a vizsgált populációk között a szudáni népcsoportban volt a legmagasabb az ϵ 4 allél előfordulása, és a várttal ellentétben ez a csoport rendelkezett a legalacsonyabb szérum koleszterin szinttel [35]. Hasonlóképpen a maláj népesség körében is alacsonyabb koleszterin szinttel társult az ϵ 4 allél jelenléte [35]. Megalapozottnak látszik az a következtetés, hogy a kérdés megválaszolására az

általános populációra vonatkozó szabályszerűségek feltárása helyett hiperkoleszterinémiás populáción végzett vizsgálatok szükségesek.

Ezidáig hiperkoleszterinémiás populáción apoE allélfrekvencia vizsgálatot nem végeztek, illetve erre vonatkozó utalás nincs a szakirodalomban. Így hiánypótlónak joggal nevezhető vizsgálataink eredményei alapján megállapítható, hogy a hiperkoleszterinémiás populációban észlelt allélfrekvencia eloszlás nem különbözik szignifikánsan az általános populációban észlelttől. Megfigyelésünk nem támasztja alá azt a hipotézist, miszerint az $\epsilon 4$ allélre nézve homozigóta vagy heterozigóta egyének fokozott kardiovaszkuláris betegség kockázatnak vannak kitéve. Ugyanakkor nem zárható ki hogy a szív- és érrendszeri betegségek Kelet-Magyarországon észlelt magas prevalenciájának hátterében olyan metabolikus zavarok állnak, melyekben az apoE izotípusok is involváltak.

Adataink alapján felvethető a kérdés: az apoE polimorfizmus vizsgálat eredménye alapján véleményezhető-e az egyén veszélyeztetettsége kardiovaszkuláris betegségekkel szemben? Napjainkban egyre több laboratórium tervezi az apoE polimorfizmusok – mint a kardiovaszkuláris betegségek egyik kockázati tényezője – meghatározásának bevezetését, azonban fontos kihangsúlyozni, hogy még nem áll rendelkezésre elegendő adat a szakirodalomban az apoE polimorfizmusok szérumban a koleszterin szintre gyakorolt hatására vonatkozóan. További kutatások szükségesek a lipidháztartásban involvált egyéb gének genetikai polimorfizmusainak és a hiperkoleszterinémia különböző típusai közötti kapcsolat vizsgálatára is.

5.1. Az eredmények népegészségügyi hasznosíthatósága

Modern molekulárbiológiai módszerekkel a kardiovaszkuláris megbetegedések eddig ismeretlen rizikófaktorai felderíthetők, igazolhatók, a már ismertek tovább vizsgálhatók, és ezáltal a megbetegedések genetikai háttere tisztázható. Az apolipoproteineket, LDL receptort, valamint a lipidmetabolizmus enzimjeit kódoló gének polimorfizmusainak és génkárosodásainak PCR technikával történő vizsgálata ma már nélkülözhetetlen a pontos diagnózis és a rizikófelmérésre épülő megelőzés, manifesztáció-késleltetés szempontjából [8]. Ugyanezen metodikák felhasználásával eddig nem ismert, új génkárosodások mutathatók ki a zsíryanycsere regulátor génjeiben, valamint multiplex PCR tesztek alkalmazásával a szív-és érrendszeri betegségek rizikófaktorainak szűrővizsgálat jellegű felmérésére van lehetőség úgy individuális, mint populációs szinten.

A fejlett nyugati országokban a kardiovaszkuláris betegségek rizikófaktorainak csökkentésére ill. eliminálására irányuló programok hatására szignifikánsan csökkent a szív- és érrendszeri betegségekre visszavezethető morbiditás és mortalitás. Napjainkban a nyugat-európai és észak-amerikai országokban ezért egyre általánosabbá válnak azok a molekuláris epidemiológiai szűrővizsgálatok amelyek a vezető halálokokat jelentő népbetegségekkel szembeni fogékonyság korai kimutatását, a mielőbbi gondozásba vételt, s a betegség manifesztációjának maximális késleltetését célozzák. Így intenzív kutatások folynak az ischaemiás szívbetegségek genetikai hátterének megismerésére azzal az igénnyel, hogy 1.) a kardiovaszkuláris betegségek prevencióját a másodlagos - azaz a korai tünetek kimutatása - szintről az elsődleges - a genetikai károsodással jelzett

veszélyeztetettség kimutatása - szintre hozzák; 2.) s így a betegség jelentkezése előtt a veszélyeztetetteket gondozásba vonják, mely során életviteli tanácsadással, adekvát, prevenciót célzó gyógyszeres kezeléssel a veszélyeztetettség csökkenése érhető el.

Morbiditási és mortalitási statisztikai adatok egybehangzóan igazolják a kardiovaszkuláris és daganatos megbetegedések súlyozott népegészségügyi jelentőségét a magyar népesség vonatkozásában [57]. Az országon belüli területi egyenlőtlenségek elemzésével igazolást nyert, hogy a keringési betegségek okozta korai halálozás az országos átlagnál szignifikánsan magasabb Északkelet-Magyarországon [58, 59]. Az idő előtti halálozáshoz vezető népbetegségek esetében a megelőzés és a gyógyító ellátás színvonalának emeléséhez nélkülözhetetlenek azok az adatok, melyek a hajlamosító genetikai defektusokat és konstellációkat, a kórfolyamatok progressziójához rendelhető genetikai elváltozásokat írják le, s ezáltal diagnosztikus, terápiás, prognosztikus és prevenciós konzekvenciák levonását teszik lehetővé. Az elmúlt évtizedben igen nagy számú közlés látott napvilágot a familiáris aggregációt mutató kardiovaszkuláris betegségek genetikai hátterére vonatkozóan. A közlések óriási száma csak részben magyarázható az intenzív kutatással; az okok között döntő súllyal szerepel az a tény, hogy a genetikai predispozíciót jelentő eltérések geográfiai, regionális, sőt etnikai variabilitást mutatnak. Következésképp nem lehet egy országos genetikai, molekuláris epidemiológiai szűrőprogramot nemzetközi adatokra alapozva tervezni, alapfeltétel az adott ország régióiban/etnikumaiban jellegzetes eltérések feltárása, melyre a későbbiekben a szűrőprogram építhető. Hazánkban ezek az adatok teljesen hiányoznak, így a kardiovaszkuláris betegségek primer prevencióját célzó hazai genetikai epidemiológiai szűrőprogramokra, ill. a szűrési és a következményes gondozási

algoritmusok kidolgozására kell javaslatot tenni. A kardiiovaszkuláris betegségek genetikai hátterének alaposabb megismerésével a betegségek prevenciója koncepcionálisan új alapokra helyezhető. Az egyének genetikai fogékonyságának kimutatása lehetőséget ad a megbetegedések primer (preszimptomás) prevenciójának megvalósítására, mely az egyén esetében a betegségmentes életevek számának növekedését, az egészségügyi ellátás költségvetésének szempontjából pedig a krónikus kardiiovaszkuláris betegségek következtében kialakult ellátási költségek csökkenését vonhatja maga után.

6. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. Grundy SM, Greenland P, Herd A, Huebsch JA, Jones RJ, Mitchell JH, Schlant RC: Cardiovascular and risk factor evaluation of healthy American adults. A statement of clinicians by an ad hoc Committee appointed by the Steering Committee, American Heart Association. *Circulation* 1987; 75:1340-1362.
2. Menotti A, Keys A, Aravanis C, Blackburn H, Dontas A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kromhout D, Nedjelkovic S, Nissinen A: The seven countries study. First 20-year mortality data in six countries. *Ann Med* 1989; 21:175-179.
3. De Backer GG, Maes L, Van de Mierop E: Issues for cardiovascular disease risk factor development in Europe. *Prev Med* 1999; 29:S96-101.
4. Pekkanen J, Nissinen A, Vartiainen E, Salonen JT, Punsar S, Karvonen MJ: Changes in serum cholesterol level and mortality: a 30-year follow-up. The Finnish cohorts of the seven countries study. *Am J Epidemiol* 1994; 139:155-165.
5. Menotti A, Keys A, Blackburn H, Karvonen M, Punsar S, Nissinen A: Blood pressure changes as predictors of future mortality in the Seven Countries Study. *J Hum Hypertens* 1991; 5:137-144.
6. Tervahauta M, Pekkanen J, Kivinen P, Stengard J, Jauhiainen M, Enholm A, Nissinen, A: Prevalence of coronary heart disease and associated risk factors among elderly Finnish men in the Seven Countries Study. *Atherosclerosis* 1993; 104:47-59.
7. Kontula K: Molecular genetic diagnosis of hypercholesterolaemia. *Klin Lab* 1993; 10:34-36.

8. Kontula K: The use of PCR in diagnosing lipoprotein disorders. *Ann Med* 1992; 24:195-199.
9. Biochemistry and Disease. Bridging Basic Science and Clinical Practice. (Eds. Cohn RM, Roth KS) Williams and Wilkins, New York, 1999; pp.263-283
10. Breslow JL: Genetic basis of lipoprotein disorders. *J Clin Invest* 1989; 84:373-380.
11. Breslow JL: Human apolipoprotein molecular biology and genetic variation. *Ann Rev Biochem* 1985; 699-727.
12. Fojo SS, Brewer HB: Hypertiglyceridaemia due to genetic defects in lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II. *J Intern Med* 1992; 231:669-677.
13. Weisgraber K, Innerarity TL, Mahley RW: Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J Biol Chem* 1982; 257:2518-2526.
14. Llopart R, Donate T, Oliva JA, Roda M, Rousand F, Gonzales-Sastre F, Pedreno J, Ordonez-Llanos J: Triglyceride-rich lipoprotein abnormalities in CAPD-treated patients. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10:537-540.
15. Huang W, Sasaki J, Matsunaga A, Nanimatsu H, Moriyama K, Han H, Kugi M, Koga T, Yamaguchi K, Arakawa K: A novel homozygous missense mutation in the apo AI gene with apo AI deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:389-396.
16. Brown MS, Goldstein JL: A receptor mediated pathway of cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232:34-47.
17. Farese RV, Lintin MF, Young SG: Apolipoprotein B gene mutations affecting cholesterol levels. *J Intern Med* 1992; 231:643-652.

18. Taramelli R, Pontoglio M, Candiani G, Ottolenghi S, Dieplinger H, Catapano A, Albers J, Vergani C, McLean J: Lecithin cholesterol acyl transferase deficiency. Molecular analysis of a mutated allele. *Hum Genet* 1990; 85:195-199.
19. Schaefer EJ, Blum CB, Levy RI, Jenkins LL, Alaupovic P, Foster DM, Brewer HB: Metabolism of high-density lipoprotein apolipoproteins in Tangier disease. *N Engl J Med* 1978; 299:905-919.
20. Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML, Goldstein JL, Russell DW: The human LDL receptor: a cysteine rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* 1984; 39:27-38.
21. Sudhof TC, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW: The LDL receptor gene: a mosaic of exon shared with different proteins. *Science* 1985; 228:815-822.
22. Hobbs H, Brown MS, Goldstein JL: Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolaemia. *Human Mutation* 1992; 1:445-466.
23. Kontula K, Koivisto UM, Koivisto P, Turtola H: Molecular genetics of familial hypercholesterolaemia: common and rare mutations of the low density lipoprotein receptor gene. *Ann Med* 1992; 24:363-367.
24. Aalto-Setälä K, Helve E, Kovanen PT, Kontula K: Finnish type of LDL receptor gene mutation (FH-Helsinki) deletes exons encoding the carboxy terminal a part of the receptor and creates an internalization-defective phenotype. *J Clin Invest* 1989; 84:499-505.
25. Koivisto UM, Turtola K, Aalto-Setälä K, Top B, Frants RR, Kovanen PT, Syvänen AC, Kontula K: The Familial Hypercholesterolaemia (FH)-North Karelia Mutation of the Low Density Lipoprotein Receptor Gene Deletes Six

- Nucleotides of Exon 6 and Is a Common Cause of FH in Finland. *J Clin Invest* 1992; 90:219-228.
26. Utermann G: Apolipoprotein E polymorphism in health and disease. *Am Heart J* 1987;113:433-440.
 27. Siest G, Pillot T, Regis-Bailly A, Leininger-Muller B, Steinmetz J, Galteau MM, Visvikis S: Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem* 1995; 41:1068-1086.
 28. Gylling H, Aalto-Setälä K, Kontula K, Miettinen TA: Serum low density lipoprotein cholesterol and cholesterol absorption efficiency are influenced by apolipoprotein B and E polymorphisms and by the FH-Helsinki mutation of the low density lipoprotein gene in familial hypercholesterolaemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1991; 11:368-375.
 29. Davignon J, Gregg R, Sing CF: Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 8:1-21.
 30. Kuusi T, Nieminen MS, Ehnholm C, Yki-Järvinen H, Valle E, Nikkila EA: Apolipoprotein E polymorphism and coronary artery disease-increased prevalence of apolipoprotein E4 in angiographically verified coronary patients. *Arteriosclerosis* 1989; 9:237-241.
 31. Kim YS, Paeng JR, Woo JT, Kim SW, Yang IM, Kim JW, Kim KW, Choi YK: Apolipoprotein E genotypes of normal and hyperlipidaemic subjects. *J Korean Med Sci* 1993; 8:262-266.
 32. Corbo RM, Scacchi R, Mureddu L, Mulas G, Alfano G: Apolipoprotein E polymorphism in Italy investigated in native plasma by a simple polyacrylamide gel isoelectric focusing technique. Comparison with frequency data of other European populations. *Ann Hum Genet* 1995; 59:197-209.

33. Gerdes LU, Klausen IC, Sihm I, Faergeman O: Apolipoprotein E polymorphism in a Danish population compared to findings in 45 other study populations around the world. *Genet Epid* 1992; 9:155-167.
34. Ehnholm C, Lukka M, Kuusi T, Nikkila E, Utermann G: Apolipoprotein E polymorphism in the Finnish population: gene frequencies and relation to lipoprotein concentrations. *J Lipid Res* 1986; 27:227-235.
35. Hallman DM, Boerwinkle E, Saha N, Sandholzer C, Menzel HJ, Csaszar A, Utermann G: The apolipoprotein E polymorphism: A comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am J Human Genet* 1991; 49:338-349.
36. Kamboh MI, Aston CE, Hamman RF: The relationship of APOE polymorphism and cholesterol levels in normoglycemic and diabetic subjects in a biethnic population from the San Luis Valley, Colorado. *Atherosclerosis* 1995; 112:145-159.
37. Kamboh MI, Evans RW, Aston CE: Genetic effect of apolipoprotein (a) and apolipoprotein E polymorphisms on plasma quantitative risk factors for coronary heart disease in American black women. *Atherosclerosis* 1995; 117:73-81.
38. Menzel HJ, Kladetsky RG, Assmann G: Apolipoprotein E polymorphism and coronary artery disease. *Arteriosclerosis* 1983; 3:310-315.
39. Wenham PR, Sedky A, Spooner RJ: Apolipoprotein E phenotyping: a word of caution. *Ann Clin Biochem* 1991; 28:599-605.
40. Hixson JE, Vernier DT: Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990; 31:545-548.

41. Emi M, Wu LL, Robertson MA, Myers RL, Hegele RA, Williams RR, White R, Lalouel JM: Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. *Genomics* 1988; 3:373-379.
42. Weisgraber KH, Newhouse YM, Mahley RW: Apolipoprotein E genotyping using the polymerase chain reaction and allele specific oligonucleotide probes. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157:1212.
43. Lahiri DK, Nurnberger JI: A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucl Acid Res* 1991; 19:5444.
44. Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS: Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499-502.
45. Richmond W.: Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia sp.* and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin Chem* 1973; 19:1350-1356.
46. Sullivan DR, Krusjwijk Z, West CE, Kohlmeier M, Kotan MB: Determination of serum triglyceride by an accurate enzymatic method not affected by free glycerol. *Clin Chem* 1985; 31:1227-1228.
47. Warnick GR, Benderson J, Albers JJ: Dextran sulphate-Mg precipitation procedure for quantitation of high density lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1982; 28:1379-1388.
48. Aslanidis C, Schmitz G: High-Speed Apolipoprotein E Genotyping and Apolipoprotein B3500 Mutation Detection Using Real-Time Fluorescence PCR and Melting Curves. *Clin Chem* 1999; 45:1094-1097.

49. Cornfield J: A statistical problem arising from retrospective studies. Neyman, J (eds): Proceedings Third Berkeley Symposium. Berkeley University of California Press, 1956, pp 135-148
50. Soutar A: Familial hypercholesterolaemia: mutations in the gene for the low density lipoprotein receptor. *Mol Med Today*, 1995; 1:90-97.
51. Sun XM, Webb JC, Gudnason V, Humphries S, Seed M, Thompson GR, Knight BL, Soutar AK: Characterisation of deletions in the LDL receptor gene in patients with familial hypercholesterolaemia in the United Kingdom. *Arterioscler Thrombosis Vasc Biol*, 1992; 12:762-770.
52. Meiner V, Landsberger D, Berkman N, Reshef A, Segal P, Seftel HC, van der Wedthuyzen DR, Jeenach MS, Coetzee GA, Leitersdorf E: A common Lithuanian mutation causing familial hypercholesterolaemia in Ashkenazi Jews. *Am J Hum Gen* 1991; 49:443-449.
53. Leitersdorf E, Tobin EJ, Davignon J, Hobbs HH: Common low density lipoprotein receptor mutations in the French Canadian population. *J Clin Invest* 1990; 85:1014-1023.
54. Boerwinkle E, Brown SA, Rohrbach K, Gotto AM Jr, Patsch W: Role of apolipoprotein E and B gene variation in determining response of lipid, lipoprotein, and apolipoprotein levels to increased dietary cholesterol. *Am J Hum Gen* 1991; 49:1145-1154.
55. Robitaille N, Cormier G, Couture R, Bouthillier D, Davignon J, Perusse L: Apolipoprotein E polymorphism in a French Canadian population of northeastern Quebec: allele frequencies and effects on blood lipid and lipoprotein levels. *Hum Biol* 1996; 68:357-370.

56. Porkka KK, Taimela S, Kontula K, Lehtimäki T, Aalto-Setälä K, Akerblom HK, Viikari JS: Variability gene effects of DNA polymorphisms at the apoB, apo A I/C III and apo E loci on serum lipids: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. Clin Genet 1994; 45:113-121.
57. Vargáné Hajdú P, Ádány R: A halálozás területi különbségei Magyarországon, 1994-1996. Népegészségügy 2000; 81:4-26.
58. Kósa Zs, Vokó Z, Vargáné Hajdú P, Ádány R: A halandóság területi különbségei Szabolcs-Szatmár- Bereg megyében, 1994-1996. Népegészségügy 2000; 81:43-51.
59. Fodor M, Vargáné Hajdú P, Ádány R: A halandóság területi különbségei Hajdú-Bihar megyében, 1994-1996. Népegészségügy 2000; 81:35-42.

7. FÜGGELÉK

7.1. A TÉZISEKHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Pocsai Zs, Paragh Gy, Ádány R: A kardiovaszkuláris megbetegedések molekuláris biológiai háttere: a lipidmetabolizmus genetikai defektusai, mint a veszélyeztetettség biomarkerei. Klinikai Kísérletes Laboratóriumi Medicina, 23:169-179 (1996)

IF: -

Pocsai Zs, Paragh Gy, Ádány R: Multiplex PCR assay for screening deletions in the low density lipoprotein receptor gene. Clinica Chimica Acta 307:7-12 (2001)

IF: 1,035

Pocsai Zs, Paragh Gy, Ádány R: Apolipoprotein E polymorphism among patients with hypercholesterolaemia in Eastern-Hungary. Cardiology, 6:S7-8 (1997)

IF: 0,692

Pocsai Zs, Paragh Gy, Ádány R: Is the apoE ε4 allele associated with hypercholesterolaemia? (*közlésre elküldve*)

7.2. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Varga Cs, Pocsai Zs, Kertai P: Genotoxicity studies on urine and bone marrow samples of rats bearing transplanted nephroma. Mutagenesis, 10:253-255 (1995)

IF: 2,176

Varga Cs, Pocsai Zs, Kertai P: Urinary and serum mutagenicity studies with rats bearing experimental tumours. *Mutagenesis*, 10:43-45 (1995)

IF: 2,176

Varga Cs, Pocsai Zs, Horváth G, Timbrell V.: Studies on genotoxicity of orally administered crocidolite asbestos in rats: Implications for ingested asbestos carcinogenesis. *Anticancer Research*, 16: 811-814 (1996)

IF: 1,049

Szücs S, Kávai M, Varga Cs, Kertai P, Pocsai Zs, Karányi Zs, Ádány R.: Changes in superoxide anion production and phagocytosis by circulating neutrophils during tumor progression in a rat model. *Cellular Immunology*, 170:202-211 (1996)

IF: 2,142

7.3. HAZAI ÉS NEMZETKÖZI KONFERENCIÁKON VALÓ RÉSZVÉTEL

7.3.1. Az értekezés témájához kapcsolódó posztterek, előadások jegyzéke

DOTÉ Tudományos Napok I. Ph.D. Konferencia, Debrecen, 1996. március 21-23.

Pocsai Zs: Multiplex PCR rendszer kidolgozása LDL receptor gén deléciók kimutatására (*előadás*)

European Thrombosis Research Organization (ETRO) 2nd Working party on Population genetics of haemostatic risk factors for arterial vascular disease,

Consortio Mario Negri Sud, Santa Maria Imbaro (Italy), May 30-June 1, 1996.

Zs Pocsai, Gy Paragh, R Ádány: Multiplex PCR assay for detecting deletions in the low density lipoprotein receptor gene (*előadás*)

Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 46. Nagygyűlése, Miskolc, 1996 szeptember 5-7. Pocsai Zs, Paragh Gy, Ádány R: Multiplex PCR rendszer kidolgozása LDL receptor gén deléciók kimutatására (*előadás*)

5th International Symposium of Slovak Atherosclerosis Association, Bratislava (Slovakia), Jan 29, 1997. Zs Pocsai, Gy Paragh, R Ádány: Apolipoprotein E polymorphism among patients with hypercholesterolaemia in Eastern-Hungary (*előadás*)

DOTÉ Tudományos Napok II. Ph.D. Konferencia, Debrecen, 1997. március 6-8. Pocsai Zs: Apolipoprotein E fenotípus eloszlás a kelet-magyarországi hiperkoleszterinémiás populációban (*előadás*)

XVI. International Society of Thrombosis Haemostasis Congress, Firenze, Italy 1997. június 6-13. Zs Pocsai, Gy Paragh, R Ádány: Apolipoprotein E polymorphism among patients with hypercholesterolaemia in Eastern-Hungary (*poszter*)

MEDLAB, 12th IFCC European Congress of Clinical Chemistry, Basel, 1997. augusztus 15-22, Zs Pocsai, Gy Paragh, R Ádány: Apolipoprotein E polymorphism among patients with hypercholesterolaemia in Eastern-Hungary (*poszter*)

Magyar Higiénikusok Társasága 29. Vándorgyűlés, Balatonföldvár, 1997. szeptember 24-26. Pocsai Zs., Paragh Gy, Ádány R: Apolipoprotein E fenotípus eloszlás a kelet-magyarországi hiperkoleszterinémiás populációban (*előadás*)

Népegészségügyi Tudományos Társaság 7. Nagygyűlése, Pécs, 1998. április 23-25. Pocsai Zs., Paragh Gy, Ádány R: Apolipoprotein B-100 Xba I allélfrekvencia gyakoriság a kelet-magyarországi hiperkoleszterinémiás populációban (*előadás*)

Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 47. Nagygyűlése, Kecskemét, 1998. szeptember 2-5. Pocsai Zs., Paragh Gy, Ádány R: Apolipoprotein B-100 Xba I allélfrekvencia gyakoriság a kelet-magyarországi hiperkoleszterinémiás populációban (*előadás*)

7.3.2. Egyéb előadások, posztterek jegyzéke

Magyar Onkológusok Társaságának XX. Országos Kongresszusa, Budapest, 1993. november 3-5. Pocsai Zs., Varga Cs., Kertai P.: A tumormarker pszeudouridin mutagenitásának vizsgálata Ames tesztben (*poszter*)

Népegészségügyi Tudományos Társaság III. Országos Kongresszusa, Gyula, 1994. április 27-29. Varga Cs., Pocsai Zs., Kertai P.: Az azbesztrostok karcinogenitásáról új megközelítésben (*előadás*)

UICC International Cancer Congress New Delhi, Nov 1994. Varga Cs., Pocsai Zs.,
Kertai P.: Genotoxic substances produced during development of transplanted renal
tumour (*poszter*)

Népegészségügyi Tudományos Társaság 9. Nagygyűlése, Hévíz, 2000. április 13-15.

Pocsai Zs., Fletcher T: Passzív dohányzás hatása a gyermekkori légzőszervi
megbetegedések gyakoriságára (*előadás*)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönetem fejezem ki Dr. Ádány Róza professzornőnek, hogy intézetvezetőként és témavezetőként lehetővé tette Ph.D. tanulmányaimat az Egyetem Megelőző Orvostani Intézetében, és biztosította számomra a folyamatos szakmai fejlődés lehetőségét. Külön köszönetem fejezem ki a kísérletek megtervezésében, kivitelezésében és értékelésében nyújtott szakmai támogatásáért.

Köszönöm Dr. Paragh György egyetemi tanárnak a beteganyag felkutatásában és az adatok értelmezésében és értékelésében nyújtott szakmai segítségét.

Nagyon köszönöm Tóth Zsuzsa asszisztensnek az apoE vizsgálatokban nyújtott segítségét, kitartó és nagyon alapos munkáját. Köszönet illeti Bana Sándornét a DNS minták egy részének preparálásáért, valamint Tóth Lajosnét a gélelektroforézis felvételek elkészítéséért. Köszönöm az Egyetem I.sz. Belgyógyászati Klinika Regionális Lipid Szakrendelés minden munkatársának a vizsgálati anyag gyűjtésében nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Vokó Zoltánnak, Dr. Széles Györgynek és Dr. Kardos Lászlónak, hogy munkámat segítették a kísérletes adatok statisztikai feldolgozásával és kiértékelésével.

Végezetül szeretném megköszönni a Megelőző Orvostani Intézet minden munkatársának és mindazoknak a segítségét és támogatását, akik hozzájárultak értekezésem elkészítéséhez.

**AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK
KÜLÖNLENYOMATAI ÉS KÉZIRATA**