

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Nyesténé Nagy Teréz

Témavezető: Prof. Dr. Góth László



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2017

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Nyesténé Nagy Teréz okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Góth László, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Vásárhelyi Barna, az MTA doktora
Dr. Németh Norbert, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK Kardiológia Intézet könyvtára

2017. október 26. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Salamonné Prof. Dr. Toldy Erzsébet PhD
Dr. Shemirani Amir Housang PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Vásárhelyi Barna, az MTA doktora
Dr. Salamonné Prof. Dr. Toldy Erzsébet PhD
Dr. Németh Norbert, az MTA doktora
Dr. Shemirani Amir Housang PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Augusztia Épület nagy
előadó

2017. október 26. 13:00 óra

Tartalom

1. BEVEZETÉS.....	2
2. A KATALÁZ ENZIM	2
3. CÉLKITŰZÉSEIM	5
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	6
4.1. Vizsgálati minták	6
4.2. Betegek és kontrollok.....	6
4.3. Kataláz enzim aktivitás mérés	6
4.4. Lipid paraméterek és a glükóz meghatározása	6
4.5. A hematológiai paraméterek meghatározása	6
4.6. Molekuláris biológiai módszerek.....	7
4.7. Statisztikai analízis.....	7
5. EREDMÉNYEK	8
5.1. Kataláz gén polimorfizmus vizsgáló módszer	8
5.2. A kataláz gén rs769217 polimorfizmusának vizsgálata Magyarországi mikrociter anemias, beta-thalasemias betegeknél és kontroll egyéneknél	9
5.3. A kataláz gén rs769217 és rs1001179 polimorfizmusainak hatása a szénhidrát és lipid biomarkerekre diabetes mellitusban	9
5.3.1. rs769217 (9. exon C111T/+22348C>T).....	9
5.3.2. rs1001179 (5'UTR régió -262C/T).....	9
5.4. Új akatalazémia mutációs szűrési program.....	10
5.4.1 Az új akatalazémia mutációk.....	10
6. A VIZSGÁLATI EREMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE ÉS ÖSSZEFOGALALÁSA.....	11
7. ÚJ EREDMÉNYEK.....	12

1. BEVEZETÉS

A kataláz enzim (EC1.11.1.6, hidrogénperoxid-hidrogénperoxid oxidoreduktáz) egyike a legkorábban ismert és vizsgált enzimeknek, és számos különleges tulajdonságáról beszámoltak. Ezek között jelentős számban vannak olyanok, amelyeket csak a későbbiekben, a legújabb kori tudományos módszerekkel tudtak igazolni, megmagyarázni. A 90'-es években robbanásszerűen meginduló molekuláris biológiai kutatások, majd a 2000-ben megvalósuló teljes genom szekvenálás, a kataláz enzimmel kapcsolatos kutatásoknak is új lendületet adott.

A kataláz gén teljes szekvenciájának megismerése nagymértékben segítette a kutatókat, köztük a Mi kutatócsoportunkat. Lehetőség nyílt a kódoló és nem kódoló szakaszok feltérképezésére a magyarországi populációkban, azonosíthatóvá váltak mutációk, polimorfizmusok, SNP-k a kataláz génben és ezek vizsgálata különböző betegségekben. Témavezetőm és munkatársai a kataláz enzim aktivitás csökkenésének okait kutatták. A kutatások egyik iránya a különböző megbetegedésekben detektálható enzim aktivitás csökkenés és a genetikai eltérések kapcsolata volt. Én ehhez a témához kapcsolódtam 2008-ban.

A következő betegségekben szenvedőknél (1-es, 2-es és gesztációs diabetes, vitiligo, időskori halláskárosodás, mikrociter anémia, beta-thalassémia) mértük a kataláz enzim aktivitásokat. A csökkent aktivitású mintákat molekuláris biológiai módszerekkel (PCR-SSCP, RFLP, heteroduplex analízis, szekvencia analízis) vizsgáltuk tovább, keresve a csökkenés genetikai okait. Számos érdekes és értékes eredmény született, amelyek kezdetben hallgatói diplomadolgozatok, TDK dolgozatok, konferenciák keretein belül kerültek bemutatásra, míg az új eredményeink nemzetközi folyóiratokban is publikálásra kerültek.

A kataláz enzimet kódoló gén polimorfizmusainak azonosításával, a csökkent enzim aktivitás okainak feltárásával foglalkozom mind a mai napig. A 2008-óta elért eredményeim összefoglalásaként született meg értekezésem.

2. A KATALÁZ ENZIM

Az emberi szervezetben folyamatosan keletkeznek és alakulnak át szabadgyökök az oxidációs-redukciós biokémiai folyamatok során. Az oxidatív stressz akkor alakul ki, amikor a keletkező reaktív oxigén vegyületek (ROS) koncentrációja meghaladja a szervezet antioxidáns kapacitását. A ROS károsító szerepe ismert olyan megbetegedésekben, mint a diabetes mellitus, atherosclerosis, krónikus májbetegségek, veseelégtelenség, tumoros megbetegedések, rheumatoid arthritis és a neurodegeneratív betegségek.

A reaktív oxigén speciestek képesek károsítani a fehérjéket, lipideket, és a sejtek örökítő anyagát a DNS-t. A károsító folyamat eredményeként jelentkezhethet az enzim aktivitások csökkenése, membrán működési defektusok, oxidált állapotú lipidek megjelenése, és mutációk a DNS-ben. A hosszantartó oxidatív hatás a sejtek öregedéséhez, krónikus betegségek megjelenéséhez, tumorhoz vezethet.

A károsító ágensekkel, köztük a hidrogén peroxiddal szemben, a második védelmi vonalat az antioxidáns enzimek a szuperoxid-dizmutáz, glutation-peroxidáz és a kataláz képezik, melyek a keletkező szabad gyököket részben vagy teljes mértékben eliminálják.

Napjainkban elfogadott, hogy a kataláz enzim a legnagyobb jelentőséggel bír, a hidrogén-peroxid eliminációs folyamatában.

A kataláz enzim (EC 1.11.1.6, hidrogén-peroxid-hidrogén-peroxid oxidoreduktáz) 4 egymással szimmetrikus alegységből felépülő tetramer szerkezetű 240 kDa nagyságú molekula. A szubsztrát bontási mechanizmus különlegessége abban rejlik, hogy a fiziológias koncentrációban jelenlévő H_2O_2 esetén az enzim nem lép működésbe.

A hidrogén-peroxid bontási reakció két lépéses folyamat, amelynél az első lépésként enzim szubsztrát komplex I (Compound I) jön létre, ez a folyamat reverzibilis.

A második katalitikus lépésben a komplex I egy újabb hidrogén peroxid molekulával lép kölcsönhatásba és oxigén és víz molekula képződik.

A teljes vér alkotó elemei különböző koncentrációban tartalmazzák a kataláz enzimet. A vérkataláz aktivitás gyakorlatilag a vörösvértestekben mérhető kataláz enzim aktivitást jelenti, mivel a vérkataláz 99%-a a vörösvértestekből származik. A vérkataláz referens átlaga 113,3 MU/1 l vérré vonatkoztatva. Ha ezt a vörösvértestek 1 l-re vonatkoztatjuk, akkor 251,7 MU aktivitással kell számolnunk.

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

Az enzim csökkent aktivitása hozzájárulhat különböző megbetegedések korai manifesztálódáshoz (tumorok, anémiák, vitiligo, diabetes mellitus).

Az akatalazémia a kataláz enzim veleszületett hiánya, genetikailag a mutáns homozigóta állapot. Ilyen esetekben is mérhető a szubsztrát meghatározási eljárásokkal 1-8 % kataláz-szerű aktivitás.

Az enzim aktivitás csökkenés a kataláz gén polimorfizmusaira illetve a fehérje expressziójának csökkenésére is visszavezethető.

Az első akatalazémiás egyént Takahara professzor ismertette 1946-ban Japánban. A hidrogén-peroxid bontás közel teljes hiányát tapasztalta egy 11 éves leány betegénél. A vérkataláz aktivitás mérésre a permanganometriás hidrogén-peroxid eljárást alkalmazta és 6 esetben a kataláz aktivitás „teljes” hiányát, 5 esetben <10%, míg 2 esetben 10%-os aktivitást mért. Takahara professzor felfedezését követően további 12 országban detektáltak akatalazémiás állapotot, közöttük a legnagyobb számba Japánban (91) és Svájcban (11). A Magyarországi kutatások során a vizsgált populáció (n=28 252) alapján 0.05/1000 az akatalazémia gyakorisága. Az első magyarországi két akatalazémiást 1989-ben detektálta kutatócsoportunk. Hypokatalazémia vonatkozásában ez az arány a magyarországi populációban 0,18/1000.

A 2-es típusú diabetes mellitus komplex betegségnek tekinthető. Kialakulását környezeti tényezők és genetikai faktorok egyaránt befolyásolják. A kataláz enzim hiánya és a diabetes közötti kapcsolat vizsgálata számos kutatócsoport munkájában megjelenik. Magyarországon a Mi kutatócsoportunk végzett széleskörű vizsgálatokat ebben a témában. Az eddigi vizsgálatok alapján mondható, hogy egy vagy több kataláz gén mutáció hozzájárulhat a 2-es típusú diabetes mellitus korai manifesztációjához. A veleszületett kataláz hiányban a diabetes gyakoribb előfordulása annak tulajdonítható, hogy a kataláz hiány révén a hidrogén-peroxid koncentráció tartósan megnövekszik és károsító hatást fejt ki az oxidációra igen érzékeny pancreas beta-sejtekben.

Mikrociter anémiában a vörösvértestek száma és nagysága csökken. A vörösvértestek kisebbek az átlagosnál és alacsonyabb a hemoglobin tartalmuk, hipokrómok. Genetikai rendellenességek is vezethetnek kisméretű, hipokróm vörösvértestek képződéséhez. Genetikai eltérés okozza a thalassemiákat, amelynek két nagy csoportját különböztetjük meg. Az α -thalassemiában a hemoglobin α -lánc elégtelen működésű. A gyakoribb β -thalassemiában a β -lánc nem tölti be megfelelően szerepét, mivel csökkent szintézise vagy hiánya okozza a megbetegedést. A csökkent vérkataláz aktivitás ezekben a

vörösvértetekben az oxidatív folyamatok fokozódásához vezet. A károsan aktív H_2O_2 eltávolítása nem biztosított a vörösvértetekben. A csökkent vérkataláz aktivitások és a β -thalassemia közötti kapcsolat vizsgálata hozzásegíthet a betegség patológiájának megértéséhez.

A kataláz fehérjét egyetlen gén a kataláz gén kódolja, amely a 11-es kromoszóma rövid karján a 13-as pozícióban található. 33 114kb hosszúságú génnek 13 exonja és 12 intronja van, amelyek a kromoszómán a 34 417 054 és a 34 450 176 nukleotidok között helyezkednek el. Az NCBI adatbázisban található információkat felhasználva 2012-ig a kataláz génben 245 olyan nukleotid pozíció volt azonosítható, amely a konszenzusostól eltérő. A polimorfizmusok nagy része olyan benignus elváltozást eredményez, amely nincs hatással az enzim aktivitására, nem befolyásolja a kataláz fehérje expresszióját, és nincsenek patológiai vonatkozásai, vagy azokat jelenleg nem ismerjük.

Kutatócsoportunk is több évtizede foglalkozik különböző megbetegedések és a kataláz génben fellelhető mutációk, polimorfizmusok, SNP kapcsolatával. Összefüggés volt kimutatható a 9. exon C111T polimorfizmusa és a diabetes mellitus között. A T mutáns allél jelenlétében a kataláz aktivitás szignifikáns csökkenése volt detektálható, és az általunk vizsgált populációban vitiligo megbetegedésben hajlamosító tényezőnek találtuk a C111T missense mutációt.

Az enzimet kódoló gén exonális és intronális régióinak feltérképezése napjainkban is folyamatosan történik. A molekuláris biológiai módszerek elterjedésével számos, a konszenzusostól eltérő nukleotidot sikerült azonosítani a magyarországi populációban. Csoportosításra kerültek az azonosított, az akatalazémiáért felelős mutációk, amelyek alapján genetikai csoportokat lehetett kialakítani, ezek a magyarországi A, B, C, D, E típusok.

Az akatalazémia és hypokatalazémia okainak feltárása segítséget nyújthat az enzim működést befolyásoló genetikai, epigenetikai tényezők megismerésében. Genetikai eltérésekre visszavezethető kataláz enzim aktivitás csökkenés következményeként megnövekedett hidrogén-peroxid koncentrációval számolhatunk a sejtekben és szövetekben. A fokozottan oxidatív környezet hatására oxidatív stressz alakulhat ki, amely károsíthatja az arra érzékeny szerveket, szöveteket. A kataláz gén mutációinak megismerése közelebb vezet a patológiás folyamatok megértéséhez, és azok esetleges kezeléséhez.

3. CÉLKITŰZÉSEIM

A kataláz gén kódoló és szabályozó régiójának vizsgálata különböző betegségekben című értekezésben a következők a célkitűzéseim:

1. Egyszerűen kivitelezhető mutáció/polimorfizmus szűrő módszer kialakítása és alkalmazásával a 9. exonban az ismert rs769217 polimorfizmus hatásának vizsgálata a kataláz enzim aktivitásra mikrociter anemiás és beta-thalassemiás betegeknél.
2. Az 9. exonban található rs769217 polimorfizmus és a promóter (nem kódoló) régióban található rs1001179 polimorfizmus hatásainak vizsgálata a vérkataláz aktivitásra, valamint lipid és szénhidrát biomarkerekre (triglicerid, koleszterin, HDL, LDL, ApoA-I, ApoB, glükóz, HbA1c).
3. Kialakítani egy olyan csoportot, amelynek tagjainál kisebb, mint 50% a vér kataláz aktivitás, és feltehetően gyakoribbak polimorfizmusok, mint a normokatalazémiás egyéneknél. Az így kiválasztott egyéneknél vizsgálni a 13 exonális és a 12 intronális régiót, további mutációk, polimorfizmusok, SNP-k detektálásának reményében. Az újonnan azonosított DNS eltérések mutációk hatásának vizsgálata különböző megbetegedésekben.
4. Céлом továbbá, jelen dolgozat kereteit túl egy kontroll csoport létrehozása, olyan betegek mintáiból akiknél a vérkataláz aktivitása referens tartományban van. Ezen minták vizsgálata a kataláz gén összehasonlító elemzéseit teszi lehetővé.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Vizsgálati minták

A kísérletes munkám során felhasznált vizsgálati vérmintákat (EDTA-val alvadásgátolt teljes vér) az akkori Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum klinikáiról (Belgyógyászat, Gyermekklinika, Fül-orr-gégészet) gyűjtöttük, amelyeket a Klinikai Biokémiai és Molekuláris Patológiai Intézetbe, ma Laboratóriumi Medicina Intézetbe küldtek laboratóriumi vizsgálati kérésekkel. A vizsgálatokban csak azon betegek adatai szerepelnek, akiknek a vér hemoglobin koncentrációja referens tartományban (120 g/L fölötti) volt.

4.2. Betegek és kontrollok

Kataláz gén exon 9: rs769217 polimorfizmus vizsgálatánál, 98 beteg (microciter anemias és beta-thalassemiás) és 50 kontroll mintát vizsgáltunk

A kataláz rs769217 és rs1001179 polimorfizmusainak vizsgálatánál a beteg és kontroll minták a Debreceni Egyetem Belgyógyászati Klinika Diabetes szakrendelésén 2007 és 2010 között megjelent betegektől kaptuk.

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

Kontroll mintaként szolgáltak azok a vérminták, amelyek a fenti intézetbe munka alkalmassági, egészségügyi alkalmassági vizsgálatra érkeztek és a Debreceni Egyetem Klinikai Központ (korábban Orvos és Egészségtudományi Centrum) klinikáin dolgozóktól származtak.

A kontroll csoportba azon egyéneket soroltuk, akiknek a vérkataláz aktivitása (80,3-146,3 MU/l) és a hemoglobin koncentrációja (120-180 g/l) is a referens tartományon belüli volt. A minták számból és betűből álló kódot kaptak, így biztosítottuk az anonimitást. Kutatásainkhoz etikai engedéllyel rendelkezünk, az engedély száma: 2734-2008.

4.3. Kataláz enzim aktivitás mérés

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

A hidrogén-peroxid szubsztrát bontást 60 sec után ammónium-molibdenáttal leállítottuk. Az ammónium-molibdenát leállítja az enzimatis reakciót, mivel a hidrogén-peroxiddal komplexet képez. A kialakult komplex (hidrogén-peroxid és ammónium-molibdenát) sárga színű, amelynek 405 nm-nél mérhető abszorbanciája a hidrogén-peroxid koncentrációval arányos.

4.4. Lipid paraméterek és a glükóz meghatározása

A lipid anyagcsere paramétereinek (triglicerid, összkoleszterin, HDL koleszterin, LDL koleszterin, ApoAI, ApoB) és glükóz koncentrációjának meghatározása szérumból történt, Roche Integra tesztekkel, Roche Integra 700, Modular P800 műszerekkel (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

4.5. A hematológiai paraméterek meghatározása

Az EDTA-val alvadásgátolt vérből a vér hemoglobin, a vörösvértestek sejt átlagos térfogat (MCV) meghatározása Sysmex XE 2011D hematológiai automatával (Sysmex, Japán) a hemoglobin A2, hemoglobin F meghatározás HPLC módszerrel, Variant II készülékkel (Haemoglobin Testing System, BioRad, Hercules, CA, USA) történt. A vizsgálatokat a

Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézet Hematológia és Elválasztástechnika részlegein végezték.

4.6. Molekuláris biológiai módszerek

DNS izolálás

A genomiális DNS-t EDTA-val alvadásgátolt vérből nyert buffy coat-ból (leukocitákban gazdag vér frakció) QIAmp Kittel (DNA Blood Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Germany) izoláltuk.

PCR

A PCR reakcióhoz Wen és Kishimoto által javasolt primereket és lépéseket alkalmaztuk, az exonális szakaszok amplifikálásakor.

Elektroforézis

A keletkezett PCR terméket 6 %-os poliakril-amid gélben szeparáltuk, ezüstözési technikával tettük láthatóvá és a DNS szakaszokat a molekulatömeg markerekhez viszonyítottuk.

SSCP analízis

Denaturáló közegben a dsDNS-t egyszálúsítjuk, majd a létrejött ssDNS-t jégben való gyors hűtéssel konzerváltuk.

PCR-RFLP analízis BsTXI enzimmel

Restrikciós fragmenthossz eljárást (RFLP) alkalmaztunk BsTXI restrikciós enzimmel (Amersham Pharmacia Biotech UK, Buckinghamshire, England) mutáció szűrésre. Az enzim a CCANNNNN*NT**GG szekvenciát ismeri fel és hasítja a 238 bp hosszúságú PCR terméket 153 bp és egy 85 bp nagyságú szakaszokra.

DNS szekvencia analízis

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

Heteroduplex analízis

A heteroduplex analízis a heterozigóta állapot vizsgálatára alkalmas mutáció szűrő módszer. Az amplifikált DNS szakaszokat vagy SURVEYOR Mutation Detection Kit-el (Transgenomic Ltd., Elancourt, France) vagy a hagyományos eljárással vizsgáltuk. A SURVEYOR nukleáz enzim hasítja az egyszálú DNS-t is, amelynek termékei detektálhatók elektroforézissel. A hagyományos heteroduplex eljárásnál a magas hőmérsékleten (96°C) a kettős szálú DNS szétválik. A keletkező ssDNS lassú, fokozatos hűtés hatására képes hetero (vad és mutáns) duplaszálúvá alakulni, amely az elektroforetikus mintázatban a homo (vad és vad, valamint mutáns és mutáns) duplaszálú PCR terméknél lassabban vándorol.

4.7. Statisztikai analízis

A mérési eredmények kiértékeléséhez Student's féle *t*-tesztet alkalmaztunk. A genotípus frekvencia meghatározását 3 x 2 kontingencia táblázat, az allél frekvenciák és az odds ratio (ráta) (OR) meghatározásához 2 x 2 kontingencia táblázatot használtunk. A Hardy-Weinberg (H-W) eloszlást χ^2 próbával ellenőriztük. A *p* értékét 0,05 alatt tekintettük szignifikánsnak.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Kataláz gén polimorfizmus vizsgáló módszer

A mutáció analízis kezdeti lépéseként a kataláz gén 2. 3. 7. és 9. exon PCR termékeit vizsgáltuk poliakril-amid gélelektroforézissel, és ezüstözési vizualizációval. A 2.3. és 7. exonok elektroforetikus mintázata a szokásos, azaz a 200 és 400 bázispárnak megfelelő régióban láthatók a kétszálú PCR termékek, míg a 400-600 bp régióban a sokkal kisebb intenzitású egyszálú DNS sávok fedezhetők fel.

A 9. exon vizsgálatakor a szokásostól eltérő képet kaptunk. A duplaszálú DNS 238 bp - hosszúságú sávok gyengébb intenzitásúak és a 400-600 bp régióban erősen festődő egy vagy egymástól jól elkülönült két sáv figyelhető meg.

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

1. Különböző DNS festési eljárásokat (ezüst impregnáció, SYBR Green II, SYBR Green I) alkalmaztunk. A 400-600bp régióban megjelenő sávokat csak az egyszálú DNS-t festő (SYBR Green II) módszerrel tudtuk láthatóvá tenni. Az ezüst impregnáció mindkét területet detektálta.
2. Ezután elvégeztük a különböző mintázatú minták DNS szekvencia analízisét. A minták DNS szekvencia analízise összhangban volt az elektroforetikus mintázattal. A 400-600bp régióban a gyorsabban vándorló sáv a TT homozigóta mutáns, a lassabban vándorló a CC homozigóta vad, amennyiben pedig mind két sáv egyszerre jelenik meg a CT heterozigóta genotípus azonosítható.
3. A feltételezés megerősítésére az elektroforetikus mintázat és a DNS szekvencia analízist, további 74 minta esetében hasonlítottuk össze és azonos eredményeket kaptunk.
4. A hagyományos SSCP eljárással történő összehasonlítás során denaturáló közeget alkalmaztunk (formamid /nátrium hidroxid, 94⁰C 6 percig) a dupla szálú DNS egyszálúsításához. Denaturáció mentes és a denaturált minták mintázata azonos fő sávokat mutatott. A denaturáció mentes mintázat nem tartalmaz további konformereket, mint a denaturált mintáké.
5. Nukleázos emésztés során (SURVEYOR Mutation Detection Kit) a heteroduplex és az egyszálú DNS emésztődik. Az alkalmazott nukleáz enzim (SURVEYOR Mutation Detection Kit) képes felismerni nem illeszkedő pontokat és hasítja a dupla szálát, valamint az egyszálú DNS-t. Az enzim a heterozigóta mutánst (CT genotípus) és az ssDNS-t vágta, mivel csak ennél látható a kisebb (154 bp) molekulatömegű vágási termék.
6. PCR-RFLP analízist is alkalmaztunk az összehasonlító vizsgálatok sorában. A PCR termékeket BstXI (Amersham Pharmacia Biotech UK, Buckinghamshire, England) restrikciós enzimmel emésztettük. Az enzim a CCANNNNN*NT**GG szekvenciát képes felismerni, amely nukleotid sorrend megtalálható az általunk vizsgált exon9 régióban. A vizsgálatba bevont 72 minta esetében a két módszer azonos genotípusokat eredményezett.

Az C111T (egyszerű) polimorfizmus kimutatási módszer alkalmazhatóságát vizsgáltam a kataláz gén 9. exon további, ismert polimorfizmusai C37T, G113A, G5 esetén is. A C37T, G113A és a G5A polimorfizmusok esetében a módszer nem nyújt segítséget a genotípusok azonosításához.

Összefoglalva az 1-6 kísérletek eredményeit elmondható, hogy a denaturáció nélküli spontán kialakuló egyszálú DNS mintázat jól alkalmazható a kataláz gén 9. exon C111T (rs769217, +22348) polimorfizmusának vizsgálatára.

5.2. A kataláz gén rs769217 polimorfizmusának vizsgálata Magyarországi mikrociter anemias, beta-thalassemias betegeknel és kontroll egyéneknél

Az 5.1. fejezetben bemutatott módszert alkalmaztuk a kataláz gén 9. exonja C111T polimorfizmusának vizsgálatára. A vizsgálatban 55 mikrociter anemias, 43 beta-thalassemias beteg és 50 kontroll egyén genotípusait vizsgáltuk és ezeket az Európai populáció adataihoz hasonlítottam. A C vad allél (71 %) közel azonos arányban jelent meg a magyar kontroll csoportban, mint az európaiban (80 %). Nem találtunk szignifikáns eltérést a C allélok gyakoriságában mikrociter anemiában (67%, $p=0,559$) és beta-thalassemiában (65%, $p=0,265$), ha az Európai kontroll csoporthoz történt a hasonlítás. Az európai kontroll csoportban előforduló genotípus megoszlások szignifikáns eltérést mutattak a hazai mikrociter anemiás ($p=0,0059$) és a beta-thalassemiás ($p=0,049$) csoporthoz hasonlítva. A mikrociter anemiás csoport vérkataláz aktivitása alacsonyabb, mint a magyarországi kontroll csoporté ($p < 0,025$). Ugyan ez mondható el a beta-thalassemiás csoport és a kontroll csoport kataláz aktivitás adatainak összehasonlításakor ($p < 0,016$).

A mikrociter anemiás CC genotípusú betegek kataláz aktivitás eredményeit (89 ± 25 MU/l) összevetve a csoport TT genotípusú mintáival (64 ± 31 MU/l) szignifikáns csökkenés tapasztalható ($p=0,005$). A beta-thalassemiás CC genotípusú mintákat (92 ± 19 MU/l) összehasonlítva a TT genotípusúakkal (75 ± 3 MU/l) szintén szignifikáns a csökkenés ($p=0,044$).

5.3. A kataláz gén rs769217 és rs1001179 polimorfizmusainak hatása a szénhidrát és lipid biomarkerekre diabetes mellitusban

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

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

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

A különböző genotípusú egyének vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a T allél jelenléte és az életkor között szignifikáns a kapcsolat (CC: 45 ± 13 év, CT: 39 ± 14 év, TT: 36 ± 10 év, $p < 0,04$). A genotípusokat és a lipid, szénhidrát paramétereket összehasonlítva nem találtunk jelentős különbséget az 1-es típusú diabetesben ($p > 0,08$).

A 2-es típusú diabetesben szignifikáns csökkenést tapasztaltunk ($p < 0,001$) a kataláz aktivitásokban CC és CT genotípusú mintákban a kontroll és az 1-es típusú diabeteshez viszonyítva. A 2-es típusú diabetesben a TT mutáns (rs769217) genotípusú mintákban emelkedettnek találtuk az átlagos glükóz koncentrációt ($p < 0,02$) a CT genotípushoz képest, a hemoglobin A1c-t ($p < 0,03$) a CC genotípushoz, valamint az ApoB koncentrációt CC és a CT genotípusokhoz képest ($p < 0,05$).

5.3.2. rs1001179 (5'UTR régió -262C/T)

Az általunk végzett részletes elemzés azt mutatta, hogy a vérkataláz aktivitás csökkent a 2-es típusú (91 ± 20 MU/L, $p < 0,001$), és az 1-es típusú diabetesben (95 ± 20 MU/L, $p < 0,048$) a kontroll csoporthoz képest (105 ± 17 MU/L).

Az 1-es típusú diabetesben a genotípus szerinti elemzés során a vérkataláz aktivitások CC

(96±26 MU/l) és CT (94±30 MU/l) csoportokban a kontrollhoz képest (CC:109±25 MU/L, CT:102±16 MU/l, $p<0,05$) szignifikáns csökkenés tapasztalható.

A 2-es típusú diabetes mellitusban mindhárom genotípusnál (CC: 98±30 MU/l, CT: 88±34 MU/l, TT :84±23 MU/l) szignifikáns csökkenést ($p<0,05$) találtunk, a kontroll csoporthoz képest (105±17 MU/l). A legnagyobb mértékű eltérést a TT genotípusú csoport mutatta ($p<0,03$), ha a kontroll csoporthoz viszonyítottunk.

Sem a genotípusok, sem az allélok frekvenciája tekintetében nem találtunk szignifikáns eltérést ($p>0,1$) az 1-es és a 2-es típusú diabetes valamint a kontroll csoport között.

A szénhidrát markerek vizsgálata során a 2-es típusú diabetesben a glükóz ($p<0,02$), és a HbA1c ($p<0,05$) mutatott szignifikáns eltérést a CC és TT genotípusok között. szignifikáns különbség adódott. A lipid paraméterek esetén a CC és TT genotípusok vizsgálatakor a koleszterin ($p<0,01$), a HDL ($p<0,05$), és az ApoB ($p<0,05$) koncentrációi mutattak szignifikáns eltéréseket.

5.4. Új akatalazémia mutációs szűrési program

617 beteg mintájának vizsgálata során 51 esetben regisztráltunk a referens átlagos kataláz enzim aktivitás 50%-a alatti aktivitásokat.

14 esetben a csökkent kataláz aktivitás mellett csökkent MCV-t (71±10 fl, referens 89±9 fl, $P<0,0001$), és nem szignifikánsan csökkent vér hemoglobin koncentrációt (129±14 g/L, referens 134±20 g/L, $P>0,05$) detektáltunk.

A csökkent aktivitások a következő megbetegedésekben voltak detektálhatók 18 esetben (35%) diabetes mellitus, 14 esetben (27%) mikrociter anémia, 10 (19,7 %) esetben presbycusis, és 4 esetben (7,8 %) beta-thalassemia.

A betegek DNS mintáiban 4, eddig még nem azonosított kataláz gén mutációt találtunk 7 betegnél. Ezen eredményeink alapján a most azonosított akatalazémia mutációkat a Magyarországi G1, H1, H2, és H3 típusoknak neveztük el.

Az új mutációknak több mint a fele (57%, $n=4$) diabeteses betegeknél került felderítésre. A 4 betegből három a 2-es típusú, és 1 a gesztációs diabetes csoportba tartozik.

Két beteg esetében a G1 típust (c.106_107insC, pG36Afs*5), egy esetben pedig missense mutációt a 4. exonális régióban (magyar H1 típus, c.3379C>T, p.R127Y) találtunk.

5.4.1 Az új akatalazémia mutációk

Tanulmányunkban négy új kataláz mutációt mutattunk be, amelyeket 7 betegnél azonosítottunk. Ezzel a magyarországi akatalazémia mutációk száma 11-ről 15-re nőtt.

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

A H1 típusnál a 4. exonban a c.379C>T missense mutáció révén az Arg127Tyr szubsztitúciójön létre. Ez az aminosav csere csökkentheti a kataláz aktivitását azáltal, hogy megváltoztatja a csatorna alakját és így csökkenthet a szubsztrát hozzáférhetősége az aktív centrumhoz. Ezt a misense mutációt detektáltuk egy mikrociter anemiás nőbetegnél, és egy másik gesztációs diabeteses nőbetegnél.

A H2 típust a missense c.390C>T szubsztitúció okozza, megváltoztatva az aminosav szekvenciát (Arg129Leu). Ezt a mutációt egy 2-es típusú diabeteses férfinél azonosítottuk.

A Magyar H3 típusban a c.431A>T nukleotid csere szintén aminosav cserét (Asp143Val) eredményez. Ezt a mutációt egy 2-es típusú diabeteses férfi betegnél és két fiánál tudtuk kimutatni.

A H1, H2 és H3 típusú mutációk a 4. exonban találhatóak.

6. A VIZSGÁLATI EREMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE ÉS ÖSSZEFOGALALÁSA

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

A C111T polimorfizmust detektáló módszerünkkel mikrociter anemiás és beta-thalassemiás betegcsoportot vizsgáltunk. Csökkent vér kataláz aktivitást találtunk a C111T polimorfizmus TT genotípusánál.

A C111T polimorfizmus TT genotípust nagy frekvenciával (12%) azonosítottuk 1-es típusú diabetesben, de szignifikáns változást nem tapasztaltunk a vérkataláz aktivitásokban a glukóz, hemoglobin A1c, triglicerid, koleszterin, HDL, LDL, ApoA-I és APOB koncentrációkban.

Ezzel ellentétben a 2-es típusú diabetesben szignifikánsan csökkent vérkataláz mértünk a CC és CT genotípusú mintáknál valamint emelkedett glukóz, hemoglobin A1c és ApoB koncentrációkat.

Vizsgáltuk az 5' régió -262C>T nukleotid polimorfizmusát (rs1001179) amely a szabályozásban játszhat szerepet. Csökkent vérkataláz aktivitást találtunk 1-es típusú diabetesben a CC és CT genotípusoknál, valamint 2-es típusú diabetesben a CC, CT, TT genotípusoknál. 2-es típusú diabetes mintákban a -262C>T polimorfizmus esetén szignifikáns összefüggést kaptunk csökkent vérkataláz aktivitás, életkor, HDL vizsgálatokor, valamint a glukóz, hemoglobin A1c, koleszterin, ApoB koncentrációk emelkedését is tapasztaltuk.

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

Négy új akatalazémia mutációt azonosítottunk, amelyekkel az eddigi 11 akatalazémiás eset 15-re emelkedett Magyarországon. 51 mintából hét mintában négy új mutációt mutattunk ki, amely minták 2-es típusú diabetes és mikrociter anémia betegcsoportban fordultak elő, újabb bizonyítékot szolgáltatva arra, hogy az akatalazémia egy kockázati faktor lehet bizonyos életkorral is összefüggő rendellenességekben.

7. ÚJ EREDMÉNYEK

1. A kataláz gén 9. exon PCR termékeinek elektroforetikus mintázat értékelő módszer részletes elemzését készítettük el. Mutáció szűrő módszerek (PCR-SSCP, egy és kétszálú DNS festés, nukleázos emésztés, PCR-RFLP) segítségével egyértelműen igazoltuk, hogy konformáció változás következtében egyszálú DNS szakaszok keletkeznek, amelyek az elektroforetikus képen, 400-800bp helyeken detektálhatók.
2. Az elektroferogramon a sávok a kataláz gén 9. exon polimorfizmus azonosítására alkalmasak. Ezzel a módszerrel egyszerűen, gyorsan és költséghatékonyan, szekvencia analízis nélkül határozhatók meg polimorfizmusok.
3. Módszerünk a C111T (rs769217) polimorfizmus azonosítására, a genotípusok meghatározására nagy hatékonysággal alkalmazható.
4. A további 9. exon polimorfizmusok (C37T, G113A, G5A) szintén azonosíthatók az általunk alkalmazott módszerrel, de kisebb hatékonysággal. Ezen nukleotid eltérések esetén a genotípusok nem határozhatók meg egyértelműen.
5. Elsőként alkalmaztuk az általunk igazolt módszert magyarországi mikrociter anemiás, beta-thalassemiás és magyarországi kontroll csoport vizsgálatára. Mindkét megbetegedésben a TT homozigóta mutáns genotípusú mintákban szignifikánsan alacsonyabb vérkataláz aktivitást találtunk.
6. A két betegségben kapott eredményeket a magyar kontrollokon túl európai kutatási eredmények adataival és az NCBI nemzetközi adatbázis adataival is összehasonlítottuk.
7. Mi vizsgáltuk először a C111T polimorfizmus és a csökkent vérkataláz közötti kapcsolatot.
8. Elsőként végeztünk átfogó elemzést, amelyben két ismert kataláz gén polimorfizmus (rs769217 és rs1001179) hatását vizsgáltuk 1-es és 2-es típusú diabetes mellitusos betegcsoportokban.
9. Részletes összehasonlító elemzést készítettünk az rs769217 és a rs1001179 polimorfizmus hatásáról magyarországi kontroll csoportban és 1-es, 2-es típusú diabetes mellitusban. .
10. 10 diagnosztikailag fontos paraméter (életkor, vérkataláz, glükóz, HgbA1c, triglicerid, koleszterin, HDL, LDL, ApoA-I, ApoB) változását követtük nyomon 1-es és 2-es típusú diabetesben és a kontroll csoportban. A mutáns (rs1001179 TT genotípus) betegek mintáiban csökkent vérkataláz aktivitást, emelkedett glükóz és HbA1c koncentrációkat mértünk. Ugyanezen betegcsoportban emelkedett koleszterin, HDL és ApoB koncentrációkat kaptunk. Összefüggést mutattunk ki 2-es típusú diabetes és az rs1001179 polimorfizmus TT mutáns genotípusa között.
11. 617 beteg mintájából, elsőként alakítottunk ki olyan csoportot, amelyben csökkent vérkataláz aktivitású (referens átlag 50%-a alatti) betegektől származó DNS mintákat gyűjtöttünk össze (n=51).
12. Az általunk létrehozott csökkent kataláz aktivitású betegcsoportban vizsgáltuk a kataláz enzimet kódoló gén teljes kódoló 13 exonális szakaszát.
13. 7 betegnél 4 új akatalazémia mutációt azonosítottunk. A 2. exonban egy mikrociter anemiás férfi, egy mikrociter anemiás kislány és egy 2-es típusú diabeteszes nőbetegnél a C_106_107insC polimorfizmust. A 4. exonban egy mikrociter anemiás nő és egy gesztációs diabeteszes nőbetegnél a c.379C>T nukleotid cserét, valamint két 2-es típusú diabeteszes férfi beteg esetében a c.390T>C, és egy másik

- 2-es típusú diabetesesnél a c.431A>T polimorfizmusokat új akatalazémia mutációként azonosítottuk.
14. Ezzel az ismert magyarországi akatalazémia mutációk számát 11-ről 15-re növeltük.
 15. Három mikrociter anémiás betegben a 2. és a 4. exonális régióban regisztráltunk új akatalazémia mutációkat, ezzel elsőként mutattunk rá, a kataláz gén mutációk lehetséges hatására mikrociter anémiában.
 16. A négy diabeteses betegnél detektált 3 különböző mutáció további bizonyíték lehet, hogy a 2-es típusú diabetesben nem a mutáció típusa a meghatározó. Feltehetően a mutáció eredményként az egész életen át ható, csökkent kataláz aktivitás révén megnövekedett hidrogén-peroxid koncentráció játszhat szerepet a 2-es típusú diabetes mellitus patomechanizmusában.



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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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





További közlemények

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





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

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 24,016

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

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

Debrecen, 2017.02.27.



Poszterek, és előadások

1. Kiss A. **Nagy T.** Kósa Z. A kataláz gén 9. exon polimorfizmus vizsgálata diabetes mellitus-os és beta-thalassemiás egyéneknek Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 55. Nagyülése Pécs, 2010. augusztus 26-28. (poszter)
2. Verbenszky K. Madai O. **Nagy T.** Kósa Z. A kataláz gén mutációinak és aktivitásának vizsgálata diabetes mellitus-os és beta-thalassemiás egyéneknél. Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 55. Nagyülése Pécs, 2010. augusztus 26-28. (poszter)
3. Rácz A. Kósa Z. **Nagy T.** ROS vizsgálatok (SOD, GPx, BAP, d-ROM-s) végzése betegségekben, kontroll egyéneknél és kapcsolatuk a kataláz aktivitással. Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 55. Nagyülése Pécs, 2010. augusztus 26-28. (poszter)
4. Kósa Z. **Nagy T.** Génanalitika a kataláz tükrében. Vegyészkonferencia és 53. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, Hajdúszoboszló 2010. június 30.-július 2. (poszter)
5. Medgyessi M. Kósa Z. **Nagy T.** Egyszálú DNS konformációs polimorfizmusa és elektroforetikus mintázata közötti összefüggés vizsgálata a kataláz gén 9. exonjában. Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság 6. Kongresszusa, Gödöllő 2011. május 27-28. (poszter)
6. Erdei E. Kósa Z. **Nagy T.** Kataláz gén (exon 3 és 4) polimorfizmusok vizsgálata csökkent kataláz aktivitású mintákban különböző megbetegedésekben. Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság 6. Kongresszusa, Gödöllő 2011. május 27-28. (poszter)
7. Fejes Z. **Nagy T.** Kósa Z. Kataláz gén 5' promóter régió -262T/C mutáció kontroll egyéneknél Magyarországon. Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság 6. Kongresszusa, Gödöllő 2011. május 27-28. (poszter)
8. Bogáti R. Kósa Z. **Nagy T.** Kataláz gén 7 és 10 exonjai polimorfizmusainak vizsgálata különböző megbetegedésekben. Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság 6. Kongresszusa, Gödöllő 2011. május 27-28. (poszter)
9. **Nagy T.** A kataláz gén 9. exonja polimorfizmusának vizsgálata. Az Orvosi Laboratóriumi és Képző Diagnosztikai Tanszék Tudományos ülése 2012. december 10. (előadás)
10. Zabolai E. Góth L. **Nagy T.** A kataláz enzim genetikai polimorfizmusainak vizsgálata különböző megbetegedésekben: az 1. exon és az 5' régió -21. és -262. nukleotidjai.

Magyar Szabadgyök Kutató Társaság 7. Kongresszusa, Debrecen 2013. augusztus 29-31 (előadás).

11. **Nagy T.** Tokodi E. Nagy O. Széles S. Viszányik B. Vincze V. Sarnyai A. A kataláz gén polimorfizmusainak vizsgálata csökkent kataláz aktivitású egyének DNS mintáiban, különböző megbetegedésekben. Magyar Szabadgyök Kutató Társaság 7. Kongresszusa, Debrecen 2013. augusztus 29-31 (előadás)

12. Fejes Z. **Nagy T.** Góth L. A kataláz enzimet kódoló gén -262C/T polimorfizmus vizsgálata csökkent kataláz aktivitású egyéneknél. „Genetikai Műhelyek Magyarországon” XII. Minikonferencia Szeged, 2013. szeptember 9. (előadás)

13. Zabolai E. **Nagy T.** Góth L. A kataláz enzimet kódoló gén -776. nukleotidjának vizsgálata kontroll és beteg egyéneknél „Genetikai Műhelyek Magyarországon” XIII. Minikonferencia Szeged, 2014. szeptember 12 (videoposzter)

14. Marsi E. **Nagy T.** Kataláz gén polimorfizmusainak vizsgálata kontroll csoportban nagy érzékenységű melting analízissel (HRM) a -21.-262. +20. nukleotid pozíciók. „Genetikai Műhelyek Magyarországon” XIV. Minikonferencia 2015. szeptember 9. Szeged. (videoposzter).

15. **Nagy T.** A kataláz gén nem kódoló régiójának vizsgálata csökkent vérkataláz aktivitású betegcsoportban. Laki Kálmán Doktori Iskola konferenciája. 2015. június 6. (előadás).

16. **Nagy T.** Góth L. Zabolai E. Analysis of non-coding region of catalase gene in Hungarian patients with decreased blood catalase. European Medical Laboratory Conference, Paris 2015. június 21-25. (poszter)

